

Aus dem Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Einfluss von Grüntee-Extrakt auf oxidativen Stress, Entzündung
und Stress des endoplasmatischen Retikulums bei Kühen im
peripartalen Zeitraum**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. agr.)

im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und
Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

M. Sc. Corinna Sophie Brock

aus Wehrda

Gießen, 2020

Mit Genehmigung des Fachbereichs Agrarwissenschaften,
Ökotoxikologie und Umweltmanagement der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Prüfungskommission:

1. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Eder

2. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Wenzel

Prüfer: Prof. Dr. habil. Bernd Honermeier

Prüfer: apl. Prof. Dr. Robert Ringseis

Vorsitzende: Prof. Dr. Gesine Lühken

Tag der Disputation: 24.08.2020

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Journal of Animal Science and Biotechnology. 2020, 11(57).

Effects of supplementation of green tea extract on the milk performance of peripartal dairy cows and the expression of stress response genes in the liver.

Gessner D.K., Brock C., Hof L.M., Most E., Koch C., Eder K.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis.....	XII
1 Einleitung.....	1
1.1 Die besondere Stoffwechsellage der hochleistenden Milchkuh	1
1.2 Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan.....	3
1.2.1 Der Lipidstoffwechsel der Leber	4
1.2.2 Fibroblast Growth Factor 21	8
1.3 Das Antioxidative System	10
1.4 Entzündung.....	12
1.4.1 Die Akute-Phase-Reaktion	15
1.5 Das endoplasmatische Retikulum und seine Homöostase	17
1.5.1 Stress des endoplasmatischen Retikulums	18
1.6 Polyphenole und ihre biologische Wirkung	23
1.7 Einsatz von Grüntee-Extrakt	26
1.8 Zielsetzung der Arbeit	28
2 Material und Methoden	31
2.1 Material.....	31
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	31
2.1.2 Chemikalien.....	33
2.1.3 Medien und Puffer	37
2.1.4 Enzymatische Testsätze	38
2.1.5 Enzym-linked Immunosorbent Assay	38
2.1.6 Oligonukleotide.....	39
2.2 Tierversuch	46
2.2.1 Versuchstiere, Fütterung und Versuchsdesign.....	46
2.2.2 Datenerhebung und Probenentnahme	50
2.2.3 Analyse von Fettstoffwechselfparametern.....	53
2.2.3.1 Triacylglyceride und Cholesterol.....	53
2.2.3.2 Nicht-veresterte Fettsäuren und β -Hydroxybutyrat	54
2.2.4 Analyse von Parametern des antioxidativen Systems und von Retinol .	55
2.2.4.1 Retinol, β -Carotin, α - und γ -Tocopherol.....	55
2.2.4.2 Trolox äquivalente antioxidative Kapazität.....	57

2.2.4.3	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen	58
2.2.5	Analyse von Akute-Phase-Proteinen.....	59
2.2.6	Analyse der Expression von Genen des Lipidstoffwechsels, der β-Oxidation, der Inflammation und der UPR.....	61
2.2.6.1	RNA-Isolation und Konzentrationsmessung	61
2.2.6.2	cDNA-Synthese	62
2.2.6.3	Primer	62
2.2.6.4	Polymerasekettenreaktion	63
2.2.6.5	Gelelektrophorese	63
2.2.6.6	Auswertung.....	64
2.3	Statistische Auswertung.....	65
3	Ergebnisse	66
3.1	Leistungsdaten.....	66
3.2	Parameter des Lipidstoffwechsels	71
3.3	Parameter des antioxidativen Systems.....	73
3.4	Proteine der Akute-Phase-Reaktion.....	76
3.5	Hepatische Expressionen von Genen des Lipidstoffwechsels, der β-Oxidation, der Inflammation, der Nrf2-Zielgene und der UPR	78
4	Diskussion	87
4.1	Einsatz des polyphenolhaltigen Futterzusatzstoffs Grüntee-Extrakt	87
4.2	Einfluss der Fütterung von Grüntee-Extrakt auf die Milchleistung	89
4.3	Einfluss der Fütterung von Grüntee-Extrakt auf den Lipidstoffwechsel.....	94
4.4	Einfluss der Fütterung von Grüntee-Extrakt auf das antioxidative System .	102
4.5	Einfluss der Fütterung von Grüntee-Extrakt auf Entzündung und die APR .	107
4.6	Einfluss der Fütterung von Grüntee-Extrakt auf ER-Stress.....	112
5	Zusammenfassung	115
6	Summary	117
7	Literaturverzeichnis.....	118
8	Erklärung	143
9	Danksagung.....	144

Abkürzungsverzeichnis

a.p.	<i>ante partum</i>
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenthiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz
ACACA	Acetyl-CoA Carboxylase alpha(Gen)
ACAD	Acyl-CoA Dehydrogenase
ACADM	Acyl-CoA Dehydrogenase, <i>medium chain</i>
ACAT	Acetyl-CoA Acetyltransferase
ACC	Acetyl-CoA Carboxylase (Protein)
ACN	Acetonitril
ACOX	Acyl-CoA Oxidase
ACS-ACOD-Methode	Acyl-CoA Synthetase-Acyl-CoA Oxidase-Methode
ADF	Saure Detergenzienfaser
ADR	Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter
Alb	Albumin
ALT	Alaninaminotransferase
AMP	Adenosin-5-Monophosphat-Dinatriumsalz
AP-1	<i>activator protein-1</i>
Apo	Apolipoprotein
APP	Akute-Phase-Protein
APR	Akute-Phase-Reaktion
ARE	<i>antioxidant response element</i>
AST	Aspartataminotransferase
ATF	<i>activating transcriptionfactor</i>
ATP	Adenosin-5-Triphosphat

Bak	<i>B-cell lymphoma 2-antagonist/killer 1</i>
BAX	<i>B-cell lymphoma 2 associated X apoptoseregulator</i>
BCG	Bromcresolgrün
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCS	<i>Body Condition Score</i>
BHBA	β -Hydroxybutyrat
bHLH-Zip	<i>basic helix-loop-helix-leucine zipper</i>
BHT	2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol
BiP	<i>immunglobulin heavy chain binding protein</i>
BME-UV1	<i>bovine mammary epithelial-cells</i>
bp	Basenpaar
BTB	<i>bric-à-bric, tramtrack, broad complex</i>
c	Konzentration
CASP	Caspase
CAT	Katalase
CCL	<i>C-C motif chemokine ligand</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHOD-PAP	Cholesterol Oxidase- 4-Aminophenazon
Chol	Cholesterol
CHOP	<i>transcription factor C/EBP homologous protein</i>
CNP	<i>cap'n'collar</i>
CoA	Coenzym A
COX-2	<i>Cyclooxygenase-2</i>
CP	Ceruloplasmin
CPT	Carnitin Palmitoyltransferase
CRP	C-reaktives Protein

ct	<i>cycle-threshold</i>
CXCL	<i>CXC-motif-chemokine ligand</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DDIT3	<i>DNA-damage-inducible transcript 3</i>
DEPC	Diethyldicarbonat
DGR	<i>kelch-repeat, double glycine repeat</i>
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	<i>Desoxyribonucleinacid</i>
DNAJC3	<i>DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C3</i>
ECM	Energie-korrigierte Milchleistung
EDEM	<i>ER degradation-enhancing 1,2-mannosidase-like protein</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEF1A1	<i>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1</i>
EGCG	Epigallocatechin Gallat
EGM-2-Zellen	humane Endothelzellen der Nabelschnurvene
eIF2 α	<i>eukaryotic initiation factor 2 alpha</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EpRE	<i>electrophile response elements</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ERp57	Endoplasmatisches Retikulum Protein 57
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FAS	Fettsäuresynthase (Protein)
FASN	Fettsäuresynthase (Gen)
FGF21	<i>Fibroblast Growth Factor 21</i>

FRAP	<i>ferric reducing ability of plasma</i>
GADD34	<i>growth arrest and DNA damage inducible 34</i>
GAE	Gallussäurenäquivalente
GfE	Gesellschaft für Ernährung
GPAT	Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase, mitochondrial
GPO-PAP	Glycerol-3-Phosphat Oxidase-4-Aminophenazon
GPX	Glutathionperoxidase
GRP78	<i>glucose-regulated protein 78</i>
GTE	Grüntee-Extrakt
H3F3A	<i>H3 histone familiy member 3A</i>
HepG2-Zellen	humane Leberkarzinomzellen
HERPUD1	<i>Homocysteine inducible ER protein with ubiquitin like domain 1</i>
HMG-CoA	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzym A</i>
HMGCL	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl- coenzym A lyase</i>
HMGCS2	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl- coenzym A synthase 2</i>
HP	Haptoglobin
HPLC	<i>high perfomance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish-peroxidase</i>
Hsp	<i>heat shock protein</i>
HSPA5	<i>heat shock protein familie A (Hsp70) member 5</i>
IκB	<i>inhibitor of kappa B</i>
IκK	<i>inhibtor of kappa kinase</i>
IL	Interleukin
IL-1β	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8

IRE-1	<i>inositol-requiring enzyme-1</i>
IVR	<i>intervening region</i>
JNK	c-Jun NH ₂ -terminale Kinase
Keap1	<i>kelch-like ECH associated protein 1</i>
Kon	Kontrollgruppe
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LUFA	Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt
Maf	<i>musculoaponeurotic fibrosarcoma</i>
MDA	Malondialdehyd
ME	Metabolisierbare Energie
mRNA	<i>messenger-Ribonucleinacid</i>
MT-1A	Metallothionein-1A
MTP	Mikrosomal Triglycerid Transfer Protein (Protein)
MTPP	Mikrosomal Triglycerid Transfer Protein (Gen)
<i>n</i>	Anzahl
NAD(P)	Nicotinamidadenindinukleotid(-Phosphat)
NDF	Neutrale Detergenzienfaser
NEB	Negative Energiebilanz
NEFA	Nicht-veresterte Fettsäuren
Neh	<i>Nrf2-ECH homology</i>
NEL	Nettoenergielaktation
NF-κB	<i>nuklear factor kappa B</i>
NLR	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors</i>
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>

NQO	<i>NAD(P)H-Quinon oxidoreductase</i>
Nrf2	<i>nuclear factor E2 related factor 2</i>
NTC	<i>no template control</i>
nXP	nutzbares Rohprotein
<i>P</i>	Signifikanzwert
p.p.	<i>post partum</i>
p38	Protein 38
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PDIA4	<i>protein disulfide isomerase family A member 4</i>
peIF2 α	<i>eukaryotic initiation factor 2 alpha, phosphorylated</i>
PERK	<i>protein kinase RNA-like ER kinase</i>
PP1	Protein Phosphatase 1
PPAR α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor-α</i>
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor-γ</i>
PRR	<i>pattern-recognition receptor</i>
PTG	Prostaglandin
PTGS2	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
(q)PCR	(quantitative) Polymerasekettenreaktion
RBP	Retinol-bindendes Protein
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i>
RNA	<i>Ribonucleinacid</i>
RNB	Ruminale Stickstoffbilanz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

RPL12	<i>Ribosomal protein L12</i>
RWZ	Raiffeisen Waren-Zentrale Rhein-Main eG
S1P	<i>site-1-protease</i>
S2P	<i>site-2-protease</i>
SAA	Serum Amyloid A
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
SLC	<i>solute carrier family</i>
SLC27A1	<i>solute carrier family 27, member 1</i>
SOD	Superoxid Dismutase
SRE	<i>sterol response elements</i>
SREBF	<i>Sterol regulating element binding transcription factor</i>
SRP	<i>signal recognition particle</i>
T _a	Annealingtemperatur
TAC	<i>total antioxidant capacity</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TAG	Triacylglycerol
TBA	2-Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TEP	Tetraethoxypropane
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TM	Trockenmasse
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMR	Totale Mischration
TNF	Tumornekrose Faktor
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure

TTR	Transthyretin
UGT1A1	<i>UDP-Glucuronosyltransferase familiy1(A1)</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom System
VLDL	<i>Very-low density lipoprotein</i>
VDLUFA	Verband deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
XBP1	<i>X-Box binding Protein 1</i>
XBP1s	<i>X-Box binding Protein 1, spliced</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Signalwege des ER-Stress (modifiziert nach Cnop et al. 2012)	20
Abb. 2: Grundstruktur und Nomenklatur eines Flavonoid (Bravo 1998)	23
Abb. 3: Struktur der Flavanole in Grünem Tee (Miyoshi et al. 2015)	27
Abb. 4: Versuchsdesign des Fütterungsversuches von Grüntee-Extrakt (GTE) bei Deutsch Holstein.....	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften der im Versuch verwendeten Oligonukleotide	39
Tabelle 2: Milchleistung und Milchzusammensetzung der Vorlaktation von Kühen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe (GTE) über die Gesamtlaktation von 305 Tagen	47
Tabelle 3: Zusammensetzung der Totalen Mischraktion über die Zeit des Trockenstehens und der Laktation.....	48
Tabelle 4: HPLC-Parameter zur Bestimmung von Retinol, Tocopherolen und β -Carotin im Plasma	56
Tabelle 5: Futteraufnahme, Milchleistung und Milchinhaltsstoffe von Kühen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe (GTE) über den Zeitraum von Woche 2 bis 7 nach der Kalbung	68
Tabelle 6: Futteraufnahme und Milchleistung über den Zeitraum von Woche 2 bis 7 nach der Kalbung von Kühen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe (GTE)	69
Tabelle 7: Milchleistung und Milchzusammensetzung der aktuellen Laktation von Kühen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe (GTE) über die Gesamtlaktation von 305 Tagen ¹	70
Tabelle 8: Lipidkonzentrationen in Leber und Plasma, sowie metabolische Parameter in Plasma von Kühen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe (GTE)	72
Tabelle 9: Antioxidative Plasmaparameter von Kühen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe (GTE)	75
Tabelle 10: Konzentration der Akute-Phasen-Proteine und der negativen Akute-Phasen-Proteine im Plasma von Kühen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe (GTE)	77
Tabelle 11: Relative hepatische mRNA-Konzentration von Genen des metabolischen Stoffwechsels, der Inflammation, der <i>unfolded protein response</i> (UPR) von Kühen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe (GTE)	82

1 Einleitung

1.1 Die besondere Stoffwechsellage der hochleistenden Milchkuh

Milchkühe haben im peripartalen Zeitraum, welcher sich von drei Wochen vor (*ante partum*, a.p.) bis drei Wochen nach der Kalbung (*post partum*, p.p.) erstreckt, besondere Herausforderungen zu bewältigen (Bertoni et al. 2008, Bradford et al. 2015). Der Zeitraum vor der Kalbung ist geprägt durch die Versorgung des ungeborenen Kalbes, dem Aufbau der Milchdrüse und der Produktion von Kolostrum. Nach der Kalbung ist die hochleistende Milchkuh mit der Adaptation an die Laktation, der Rückbildung der Gebärmutter, metabolischen Herausforderungen und Infektionen konfrontiert (Grummer 1993, Bionaz et al. 2007, Ringseis et al. 2014, Bradford et al. 2015). Nach der Geburt des Kalbes hat die Kuh einen erhöhten Nährstoff- und Energiebedarf, den sie bedingt durch eine begrenzte Futteraufnahme nicht abdecken kann (Drackley et al. 2005, Grummer 2008). Eine resultierende negative Energiebilanz (NEB) belastet den Organismus der Kuh auf weiteren Ebenen (Ringseis et al. 2014, Bradford et al. 2015). Die Folge von physiologischen und pathologischen Veränderungen in Kombination mit einer NEB stehen im Zusammenhang mit der Entwicklung von Ketose, Labmagenverlagerung und beeinflussen das Immunsystem so, dass Infektionskrankheiten wie Mastitis oder Metritis häufiger auftreten (Drackley et al. 2005).

Über ein gutes Management und Futterqualität muss für eine optimale Situation der Milchkuh gesorgt werden, um Leistungseinbrüche und gesundheitliche Folgen zu verhindern (Grummer 2008, Drackley et al. 2005, Bradford et al. 2015). Der Erhaltungsbedarf einer laktierenden Kuh liegt 10 – 20 % über dem Erhaltungsbedarf einer nicht laktierenden, nicht trächtigen Kuh (Kirchgeßner 2004). Der Leistungsbedarf steigt mit Eintritt der Laktation enorm an und nimmt in Abhängigkeit von der produzierten Milchmenge weiter zu (Grummer 2008). Während bereits einer Laktation werden zum Teil Herdenleistungen von 12.000 kg erzielt (DHV 2012). Der Leistungsbedarf p.p. ergibt sich aus Milchmenge und Milchinhaltsstoffen. Kuhmilch ist nach Abschluss der Kolostralphase im Mittel aus 3,4 % Gesamtprotein, 4,0 % Fett und 4,8 % Laktose zusammengesetzt und besitzt einen Trockenmassegehalt (TM) von 12,9 % (Kirchgeßner 2004). Der Energiebedarf, um 1 kg Milch mit 4,0 % Fett und 3,4 % Protein zu produzieren, beträgt 3,3 MJ Nettoenergielaktation (NEL) und 85 g

nutzbares Rohprotein (nXP, GfE 2001). Damit ist der Energiebedarf insgesamt in der Laktation 3 bis 5 Mal höher als in der Trockenstehphase (Kirchgeßner 2004, Drackley et al. 2005).

Die Herausforderung stellt hierbei die Trockenmasseaufnahme dar, welche speziell im ersten Laktationsdrittel hochleistender Milchkühe vermindert ist (Drackley et al. 2005). Kenntnisse über Fütterungstechnik bedingter und Tier bedingter Faktoren sind bei der Trockenmasseaufnahme unerlässlich. Futterqualität, physikalische Beschaffenheit und die Schmackhaftigkeit der verfütterten Pflanzen sowie die Fütterungstechnik selbst spielen eine wichtige Rolle für die Trockenmasseaufnahme von Milchkühen (Allen 2000, Kirchgeßner 2004, Grummer 2008). Zu den tierbedingten Faktoren der Trockenmasseaufnahme zählen das Pansenvolumen, welches im letzten Drittel der Trächtigkeit wegen des Kalbes im Uterus eingeschränkt ist, und die Passagegeschwindigkeit des Futters im Pansen. Trotz guten Managements ist es nicht möglich, den Nährstoff- und Energiebedarf einer hochleistenden frühlaktierenden Milchkuh über die Fütterung auszugleichen (Bell 1995, Grummer 2008). Im Laufe der Laktation steigt die Trockenmasseaufnahme mit steigender Milchleistung, somit ist der Zeitraum direkt nach der Kalbung als die kritischste Phase zu betrachten, welche im Zusammenhang mit einer NEB steht (Allen 2000, Kirchgeßner 2004, Grummer 2008).

Infolge der NEB findet die Mobilisierung von Körpersubstanz für die Energie- und Milchfettbildung statt. Die Lipolyse führt zu einem Anstieg der nicht-veresterten Fettsäuren (*non-esterified fatty acid*, NEFA) im Plasma (Lomax und Baird 1983, Abuajamieh et al. 2016). Proportional zur NEFA-Plasmakonzentration werden diese in der Leber aufgenommen und dort über die β -Oxidation abgebaut. Das Produkt Acetyl-Coenzym A (CoA) wird anschließend im Tricarbonsäurezyklus weiter abgebaut. Dabei können vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen, die zu Oxidationsschäden führen (Du et al. 2017). Bei einem Mangel an Oxalacetat wird Acetyl-CoA alternativ zu Ketonkörpern umgebaut. Eine vermehrte Bildung von Ketonkörpern kann in einer Ketose resultieren (Abuajamieh et al. 2016). Zum Teil werden die NEFA in der Leber reverestert und als Triacylglyceride (TAG) gespeichert oder über *very-low density lipoproteins* (VLDL) abtransportiert (Grummer 1993, Drackley et al. 2001, Drackley et al. 2005). Ein erhöhter hepatischer NEFA-Influx

führt zu einer erhöhten Speicherung von TAG auf Grund einer speziebedingten geringen VLDL-Sekretion und begünstigt somit eine Fettleberbildung (Katoh 2002).

Neben der metabolischen Herausforderung steht die Milchkuh auch diversen Faktoren gegenüber, welche eine Entzündung auslösen (Drackley et al. 2005). Mikrobielle Toxine wie Lipopolysaccharide (LPS), pro-inflammatorische Cytokine oder ROS, die im Rahmen von Infektionskrankheiten wie Mastitis oder Endometritis freigesetzt werden, gelten als primäre Ursachen für eine Entzündung (Gozho et al. 2005, Abuajamieh et al. 2016, Magata et al. 2017). Futterumstellung, Separierung der hochträchtigen Kuh in eine Abkalbebox oder Hitzestress sind weitere Faktoren, die eine Entzündung auslösen können (Bradford et al. 2015). Der Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) aktiviert die Transkription pro-inflammatorischer Gene wie Tumor-Nekrose-Faktor(TNF)- α , Interleukin(IL)-1b und IL-6, welche ebenfalls eine Entzündung induzieren (Burfeind et al. 2016). Infolge einer Entzündung und auf Grund der Oxidation von NEFA in der Leber kommt es zu einem vermehrten Aufkommen von ROS.

Auf Grund der beschriebenen metabolischen und inflammatorischen Herausforderungen in der Früh lactation ist ein Organ von besonderer Bedeutung. Die Leber ist die zentrale Schaltstelle der im peripartalen Zeitraum ablaufenden Reaktionen. Der enorme NEFA-Influx und deren Metabolisierung, das Unschädlichmachen von ROS, sowie die Aktivierung des Immunsystems sind belastend für die Leber und können zu Krankheiten führen. Daher sollen die physiologischen und biochemischen Vorgänge in der Leber während dieser besonderen Stoffwechsellage der Milchkuh im nächsten Kapitel in den Fokus gestellt werden.

1.2 Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan

Die Leber ist die größte Drüse des Körpers und befindet sich bei Wiederkäuern in der rechten Hälfte des intrathorakalen Teils der Bauchhöhle. Die Leberpforte umfasst eintretend die Leberarterie (*Arteria hepatica*), die Pfortader (*Vena portae*) sowie verschiedene Nerven und austretend Lymphgefäße und Gallengänge. Aufgebaut ist die Leber aus Leberlappen, die wiederum aus millimetergroßen, sechseckigen Leberläppchen bestehen. Hauptbestandteil der Leberläppchen sind die metabolisch aktiven Leberzellen (Hepatozyten), zwischen denen sich auch zahlreiche Makro-

phagen, die sogenannten Kupffer-Sternzellen, befinden. Zu den Funktionen der Leber zählen unter anderem die Produktion und Sekretion der Galle, Speicherung von Vitaminen und Spurenelementen, Entgiftung und Abwehr. Außerdem ist sie am Metabolismus der Makronährstoffe sowie der Bildung von Harnstoff beteiligt (Ramadori et al. 2008, Loeffler und Gäbel 2018).

Der Nährstoff Glucose, welcher Wiederkäuern in unzureichenden Mengen zur Verfügung steht, wird in der Leber über Gluconeogenese aus der kurzkettigen Fettsäure Propionat sowie aus glycoplastischen Aminosäuren und Glycerol gebildet (Lomax und Baird 1983, Bergman 1990, Loeffler und Gäbel 2018). Fettsäuren werden in der Leber über den Stoffwechselweg der β -Oxidation zur Energiegewinnung abgebaut, durch eine Reveresterung als TAG gespeichert oder über VLDL abtransportiert (Grummer 1993, Bauchart 1993, Loeffler und Gäbel 2018). Lipoproteine unterscheiden sich auf Grund ihrer Dichte, dem Anteil an Lipidklassen, dem Proteingehalt und dem Charakter der Apolipoproteine (Apo), welche als Liganden oder Aktivatoren für Enzyme im Lipidstoffwechsel fungieren. Die Isoform ApoB 100 wird bei Wiederkäuern ausschließlich in der Leber synthetisiert (Bauchart 1993). In der Leber kommt es zu einem ständigen Auf- und Abbau von Proteinen. Proteine sind unter anderem von Bedeutung für Strukturaufbau, Transport, Ablauf biochemischer Prozesse, Enzyme und sie sind in der Immunreaktion beteiligt (Amm et al. 2014, Ron und Walter 2007).

1.2.1 Der Lipidstoffwechsel der Leber

Im peripartalen Zeitraum befindet sich die Milchkuh in einer besonderen Stoffwechsellage, was Auswirkungen auf ihre Leber hat. In der frühen Laktation zeichnet sich der metabolische Status der Milchkuh durch geringe Konzentrationen des Seruminsulins, der Plasmaglucose und des Leberglycogens aus. Die Hormone Glucagon, Adrenalin und Wachstumshormone sowie die Plasmakonzentration von β -Hydroxybutyrat (BHBA), NEFA und der TAG-Gehalt der Leber sind erhöht. In dieser Situation kommt es zu einer Insulinresistenz (Hayirli 2006). Die im peripartalen Zeitraum entstandene NEB führt zur Mobilisierung von Energie aus dem Fettgewebe.

Die hormonsensitive Lipase wird aktiviert und im Plasma kommt es zu einem Anstieg der NEFA. Über verschiedene Transportmechanismen, wie zum Beispiel Transportproteine der *solute carrier family* (SLC), werden Fettsäuren in die Leber aufgenommen (Ordovas et al. 2008). In der Leber steigt die Konzentration von Acyl-CoA an. Die aktivierten Fettsäuren werden über Carnitin in das Mitochondrium transportiert, wo die β -Oxidation abläuft. Langkettige Fettsäuren werden über die β -Oxidation in den Peroxisomen der Hepatozyten abgebaut. Die Kapazität der β -Oxidation in der Leber wird über den nuklearen Rezeptor *peroxisome proliferator-activated receptor- α* (PPAR α) kontrolliert (Drackley et al. 2005). Initial wird der Abbau der aktivierten Fettsäure im Mitochondrium mit Hilfe des Enzyms Acyl-CoA Dehydrogenase (ACAD), im Peroxisom mit Acyl-CoA Oxidase (ACOX), und jeweils dem Coenzym Flavinadenindinukleotid (FAD) eingeleitet, anschließend folgen vier weitere Reaktionsschritte. In jedem Zyklus werden FADH₂, Nicotinamidadenindinukleotid (NADH + H⁺) und Acetyl-CoA gewonnen. Die Produkte FADH₂ und NADH+H⁺ dienen der Energiegewinnung über oxidative Phosphorylierung. Acetyl-CoA kann weiter zur Energiegewinnung über Oxalacetat in den Tricarbonsäurezyklus eingeschleust werden (Hocquette und Bauchart 1999). Ist die Menge des Oxalacetats ausgeschöpft, wird Acetyl-CoA im Cytoplasma über die Ketogenese umgebaut.

Über Acetyl-CoA Acetyltransferase (ACAT) findet in der Ketogenese die Umwandlung von Acetyl-CoA zu Acetacetyl-CoA statt. Mit einem zweiten Molekül Acetyl-CoA wird unter der Reaktion von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) Lyase (HMGCL) ein Zwischenprodukt gebildet, welches über HMG-CoA Synthase 2 (HMGCS2) zu dem Ketonkörper Acetacetat umgewandelt wird. Aceton und BHBA zählen ebenfalls zu den Ketonkörpern, sie werden über einen weiteren Reaktionsschritt aus Acetacetat gebildet. Ketonkörper dienen in bestimmten Geweben als Energielieferanten (Drackley et al. 2001, Abuajamieh et al. 2016, Loeffler und Gäbel 2018). Wenn das aus der β -Oxidation entstandene Acetyl-CoA auf Grund einer begrenzten Verfügbarkeit des Oxalacetats nicht in den Tricarbonsäurezyklus eingeschleust werden kann, kommt es zur vermehrten Bildung von Ketonkörpern und damit zu einer Ketose. Ein Anstieg von BHBA im Plasma ist assoziiert mit verminderter Milchleistung, Labmagenverlagerung, verminderter Fertilität, Metritis und Mastitis (Abuajamieh et al. 2016).

In einer anabolen Stoffwechsellage würde Acetyl-CoA über die Acetyl-CoA Carboxylase alpha (ACACA) zu Malonyl-CoA umgewandelt werden und das Ausgangsprodukt für die Lipogenese über den Fettsäure-Synthase-Komplex (*fatty acid synthase*, FAS) bilden. Hohe Konzentrationen von Malonyl-CoA inhibieren die Carnitin Palmytoyltransferase (CPT1). In der Leber ist CPT1 der Regulator für die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren aus dem Cytoplasma in das Mitochondrium, wo sie verestert oder oxidiert werden. Damit wird verhindert, dass bei Fettsäureaufbau gleichzeitig ein Abbau über β -Oxidation stattfindet (Grummer 1993, Hayirli 2006). Acetyl-CoA kann auch über HMG-CoA in die Cholesterolsynthese eingehen (Bauchart et al. 1996, Horton et al. 2002, Pan et al. 2015). Diese Prozesse unterliegen der Regulation über den Transkriptionsfaktor *sterol regulatory element binding protein transcription factor* (SREBF).

Der Transkriptionsfaktor SREBF aktiviert die Expression von Genen für die Synthese und den Transport von Cholesterol (Chol), Fettsäuren, TAG und Phospholipiden. Er gehört zu der Familie der *basic helix-loop-helix-leucine zipper* (bHLH-Zip) und besteht aus der NH₂-terminalen Domäne mit bHLH-Zip Region für *Desoxyribonucleinacid*(DNA)-Bindung, zwei hydrophoben transmembran-überspannenden Segmenten und einer Carboxyl-terminalen Domäne, mit regulatorischer Funktion. Die Isoform SREBF-1a fungiert in der Synthese von Chol, Fettsäuren und TAG, SREBF-1c hingegen ausschließlich in der Fettsäure- und TAG-Synthese. Die dritte Isoform SREBF-2 aktiviert die Cholesterolsynthese. Bei Cholesterlmangel wandert SREBF in seiner inaktiven Form, zunächst als *Precursor* mit der Carboxyl-terminalen Domäne an das endoplasmatische Retikulum (ER) gebunden, zum Golgi-Apparat. Dort trennt eine membrangebundene *site-1-protease* (S1P) die transmembran-überspannenden Segmente, wodurch das Molekül SREBF geteilt wird. Die NH₂-terminale bHLH-Zip Domäne wird anschließend über *site-2-protease* (S2P), eine membrangebundene Zink-Metalloproteinase, abgetrennt. Die NH₂-terminale bHLH-Zip Domäne wandert in den Zellkern, wo sie an *sterol response elements* (SREs) von Promotor/Enhancer Regionen verschiedener Zielgene bindet und die Transkription aktiviert (Horton et al. 2002).

Über die mitochondriale Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase (GPAT) kann das aus der Lipogenese entstandene Palmitat zu TAG-Synthese genutzt werden (Gruffat et al. 1996, Takeuchi und Reue 2009). Über das Mikrosomal Triglyceride Transfer

Protein (MTP) werden TAG, Cholesterolester, Phospholipide und Retinylpalmitat aus dem ER-Lumen an Lipoproteine mit ApoB transportiert (Gruffat et al. 1996). Apolipoprotein B, welches für den Transport von Lipiden über VLDL aus der Leber in die Peripherie verantwortlich ist, kommt im Wiederkäuer in den beiden Isoformen ApoB100 und ApoB48 vor (Bauchart et al. 1996). Die *de novo* Lipidsynthese in der Kuhleber ist sehr gering im Vergleich zum Menschen oder der Ratte, daher macht der Fettanteil der Leber nur einen geringen Anteil des Gesamtkörperfettes bei der Kuh aus. Folglich ist die Transkription von ApoB und damit die Ausschleusung von Lipiden aus der Leber bei Wiederkäuern ebenfalls sehr gering. Eine erhöhte Reveresterung von Fettsäuren in Folge eines hohen NEFA-Influx in die Leber resultiert daher in einer Akkumulation von TAG in der Leber, es entsteht das Krankheitsbild einer Fettleber (Grummer 1993, Bauchart 1993, Bauchart et al. 1996, Hocquette und Bauchart 1999, Bobe et al. 2004).

Die Menge des Monosaccharids Glucose, welches im Duodenum der Kuh zur Absorption zur Verfügung steht, ist sehr gering, da der überwiegende Teil der Glucose in den Vormägen bereits zu kurzkettigen Fettsäuren fermentiert wurde (Kirchgeßner 2004, Loeffler und Gäbel 2018). Des Weiteren ist die Absorption von Glucose in die Leber gering ausgeprägt. Der Seruminsulinspiegel ist in der Früh lactation gering und damit ebenfalls die Stimulierung glycolytischer Enzyme. Glycolytische Enzyme wie die Glycokinase bilden aus Glucose Glucose-6-Phosphat und verschieben damit das Reaktionsgleichgewicht der Glucosetransporter dahin, dass vermehrt Glucose in die Zelle transportiert wird. Bei Wiederkäuern ist es die Hexokinase anstatt der Glycokinase, welche den ersten Schritt der Glycolyse einleitet. Die Hexokinase besitzt eine geringere Glucose-Affinität als die Glycokinase, wodurch ein Import von Glucose über die Glucosetransporter 2 in die Leber erschwert wird (Hayirli 2006). Mehr als 90 % des Glucosebedarfs muss der Wiederkäuer über die Gluconeogenese synthetisieren (Kirchgeßner 2004). In der Phase der Laktation erhöht sich der Bedarf an Glucose wegen der Synthese von Laktose, wodurch in der Leber über den Weg der Gluconeogenese vermehrt Glucose neu synthetisiert werden muss. Oxalacetat wird in der Phase der Laktogenese vorwiegend zur Bildung von Glucose über die Gluconeogenese für den Milchinhaltstoff Laktose verbraucht. Die Verfügbarkeit von Oxalacetat für den Lipidstoffwechsel ist somit limitiert (Abuajamieh et al. 2016). Für die Gluconeogenese wird in erster Linie die aus der Fermentation von Kohlenhydraten im Pansen

entstandene kurzkettige Fettsäure Propionat genutzt (Bergman 1990, Drackley et al. 2005). Propionat wirkt antiketotisch, da es direkt in den Tricarbonsäurezyklus eingeschleust werden kann und zu Oxalacetat umgewandelt wird (Grummer 1993). Die arterielle Konzentration an Glucose und Laktat ist in der Laktation geringer als in der Trockenstehzeit. In der Laktation ist gegenüber der Trockenstehzeit ein höherer Output an Ketonkörpern und Glucose aus der Leber, sowie eine erhöhte hepatische Aufnahme von Propionat und Laktat zu beobachten (Lomax und Baird 1983). Eine geringe Plasmakonzentration von Glucose führt zu einer geringeren Insulinfreisetzung, was wiederum eine vermehrte Freisetzung von Fetten aus dem Fettgewebe und Abtransport in die Leber bedingt (Grummer 1993).

1.2.2 Fibroblast Growth Factor 21

Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) ist ein hormoneller Faktor, dessen Bedeutung in erster Linie in der metabolischen Anpassung im Energiemangel liegt (Badman et al. 2007). Er stimuliert im Energiemangel in der Leber die Fettsäureoxidation, die Gluconeogenese und die Ketogenese (Badman et al. 2007, Xu et al. 2009). Zu der Familie der FGF zählen insgesamt 22 Proteine, wobei FGF19, 21 und 23 die bekanntesten sind. *Fibroblast Growth Factor 21* wird vorwiegend in der Leber sezerniert und bewirkt einen metabolischen Effekt in Geweben, die die Co-Rezeptorproteine Klotho oder β -Klotho exprimieren (Zhang et al. 2008, Schoenberg et al. 2011, Wan et al. 2014). Die Expression von FGF21 in der Leber ist stark beeinflusst durch Energiemangel und somit über den PPAR α (Badman et al. 2007). In der Phase des Hungers bzw. der NEB und einer ketotischen Stoffwechsellage steigt die FGF21-Konzentration in der Leber an und senkt sich durch Energiezufuhr über die Nahrung wieder ab (Badman et al. 2007, Xu et al. 2015). Aber auch Entzündung (Akbar et al. 2015) und Stress des ER (ER-Stress, Wan et al. 2014) beeinflussen die FGF21-Plasmakonzentration.

Im peripartalen Zeitraum ist die Milchkuh mit einer NEB konfrontiert, welche den Anstieg von NEFA und Ketonkörpern wie BHBA bedingt. Am Tag der Kalbung ist daher die Konzentration von FGF21 am höchsten und sinkt in den darauf folgenden drei Wochen ab, jedoch nicht auf das gleiche Level wie vor der Kalbung (Schoenberg et al. 2011). Ebenfalls sind hepatische Gene der Fettsäureoxidation, der Gluconeo-

genese und der Ketogenese bei Kühen in der ersten bis zur fünften Woche nach der Kalbung erhöht im Vergleich zur Trächtigkeit oder späten Laktation (Schlegel et al. 2013).

In der Früh-laktation spielt FGF21 eine wichtige Rolle als endokriner Regulator im Lipidstoffwechsel der Leber, da er in der Phase der NEB dazu dient, durch Stimulierung unterschiedlicher Prozesse Energie bereit zu stellen (Badman et al. 2007). In Zellmodellen konnte durch FGF21 eine gesteigerte Glucoseaufnahme in die Zelle gezeigt werden, wodurch Energie bereitgestellt wird (Kharitonov et al. 2005, Zhang et al. 2008). Die Verbesserung der Insulinsensitivität durch FGF21 und damit eine Verbesserung der Glucoseaufnahme in die Zelle bei der Kuh in der Früh-laktation konnte allerdings noch nicht gezeigt werden (Krumm et al. 2019). Über den PPAR α -Weg wird die Konzentration von FGF21 gesteigert, FGF21 steigert die Transkription von PPAR α -Zielgenen, welche in den energieliefernden Prozessen der β -Oxidation und der Ketogenese beteiligt sind (Badman et al. 2007, Maratos-Flier 2017). Dadurch wird die Serum- und die Leberkonzentration an TAG gesenkt und die Bildung einer Fettleber verhindert. Zusätzlich zur Steigerung des Fettabbaus findet eine Hemmung der Fettsynthese durch einen inhibitorischen Effekt von FGF21 auf SREBF statt (Huang et al. 2017). Auf Genebene konnten diese Effekte bei der Milchkuh bisher nicht gezeigt werden, allerdings konnten durch FGF21 geringere Plasmakonzentrationen von Fettsäuren und geringere Leberkonzentrationen von TAG beobachtet werden (Caixeta et al. 2019). Des Weiteren reguliert FGF21 den Energiehaushalt, indem FGF21 die *messenger(m)RNA*-Konzentrationen von Neuropeptiden des Hungergefühls steigert und damit einen direkten Einfluss auf die Trockenmasseaufnahme ausübt (Xu et al. 2015).

In der Studie von Gross et al. (2013) wurde gezeigt, dass eine durch Futterrestriktion hervorgerufene NEB zu einem späteren Zeitpunkt der Laktation nicht zu den gleichen Effekten wie zum Zeitpunkt um die Kalbung führte. Die Konzentrationen von NEFA und BHBA im Plasma sowie der Gehalt an TAG in der Leber waren nicht erhöht (Gross et al. 2013). Demnach ist anzunehmen, dass die Leber in der Zeit der frühen Laktation auf Grund von Stressfaktoren weniger gut an eine Situation der NEB angepasst ist als zu einem späteren Zeitpunkt der Laktation. Solche potentiellen Stressfaktoren könnten das Vorliegen einer Entzündung, das Auftreten von oxidativem Stress oder ER-Stress sein. *Fibroblast Growth Factor 21* kann sowohl

über ER-Stress induziert werden (Schaap et al. 2013, Jiang et al. 2014) als auch diesen abmildern, wie zum Beispiel über einen negativen *feedback loop* des ER-Stress-ATF4-FGF21-Wegs (Maruyama et al. 2018).

1.3 Das Antioxidative System

Das antioxidative System ist ein Mechanismus des Körpers, physiologisch oder pathologisch entstandene ROS oder reaktive Stickstoffspezies zu eliminieren. In der mitochondrialen Atmungskette oder als Nebenprodukte in Reaktionen von Enzymen mit Sauerstoff entstehen endogen ROS. Reaktive Stickstoffspezies entstehen bei der Synthese von Stickoxid (Surh et al. 2008, Ma 2013). Exogen wird die Bildung von ROS unter anderem durch UV-Strahlung induziert (Jung und Kwak 2010). Auf Grund eines ungepaarten Elektrons sind ROS besonders reaktiv und bilden Schäden an DNA, Proteinen und Fetten, darüber hinaus stehen sie in Zusammenhang mit der Entstehung von inflammatorischen Krankheiten (Jung und Kwak 2010, Kizil et al. 2007). Eine stark erhöhte Fettfreisetzung auf Grund des Energiedefizits während der peripartalen Zeit, Infektionskrankheiten wie Mastitis und LPS führen zur vermehrten Bildung von ROS bei der Kuh (Konvicná et al. 2015, Magata et al. 2017).

Um sich gegen Schäden von ROS zu schützen, besitzt der Körper das antioxidative System. Dieses besteht aus einem nicht-enzymatischen und einem enzymatischen System sowie metallbindenden Proteinen. Glutathion und Thioredoxin neutralisieren ROS direkt. Weiterhin zählen Tocopherole, Vitamin C und Harnsäure zu den direkten Antioxidantien (Bernabucci et al. 2005, Jung und Kwak 2010, Ma 2013). Diese werden zum Teil über das Futter aufgenommen. Vor allem Tocopherole und β -Carotin spielen in der Fütterung von Milchkühen eine Rolle (Kizil et al. 2007, Spears und Weiss 2008). Superoxid Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathion Peroxidase (GPX) und NADPH-Quinon Oxidoreduktase (NQO) wirken als Enzyme indirekt im antioxidativen System. Superoxidanionen werden über die SOD in Hydrogenperoxid und Sauerstoff umgewandelt. Die vor allem in der Leber vorkommende CAT wandelt zwei Moleküle Hydrogenperoxid zu zwei Molekülen Wasser und einem Sauerstoffmolekül um. Als Selenoproteine zählen die fünf Isoformen der GPX, welche Hydrogenperoxid und Fettsäureradikale unter Verbrauch von Glutathion reduzieren können. Das Flavoprotein NQO wirkt über ein Redox-

system mit Quinon am antioxidativen System mit (Jung und Kwak 2010, Ma 2013). Zu den metallbindenden Proteinen des antioxidativen Systems zählt unter anderem Metallothionin-1A (MT-1A), welches Schwermetallvergiftungen verhindert (Spears und Weiss 2008).

Im Normalzustand besteht ein Gleichgewicht zwischen dem Vorkommen von ROS und verfügbaren Antioxidantien. Im peripartalen Zeitraum allerdings, in der die hochleistende Milchkuh mit der Adaptation an Kalbung und anschließender Laktogenese sowie NEB und Entzündung konfrontiert ist, gerät dieses Gleichgewicht in ein Ungleichgewicht zugunsten der ROS. Aus dem Anstieg der ROS und dem Absinken der Konzentration an Antioxidantien resultiert oxidativer Stress (Kizil et al. 2007, Jung und Kwak 2010).

Der Transkriptionsfaktor *nuclear factor erythroid 2(NF-E2)-related factor* (Nrf2) reguliert eine Vielzahl an antioxidativen Genen und Genen der Phase 2 Detoxifizierung und aktiviert somit das antioxidative System (Surh et al. 2008, Jung und Kwak 2010). Der Transkriptionsfaktor Nrf2 ist ein bZip-Transkriptionsfaktor der Familie *cap'n'collar* (CNP), der aus sechs Untereinheiten, den sogenannten *Nrf2-ECH homology* (Neh1 bis 6), besteht. Die Untereinheit Neh1 bildet die *basic leucine zipper*-Domäne, welche für die Bindung an *antioxidant response elements* (ARE), die in vielen antioxidativen Genen im Promotorbereich lokalisiert sind, verantwortlich ist. Zusätzlich helfen bei großen Proteinen der CNC-bZip-Familie sogenannte Maf-Proteine (*musculoaponeurotic fibrosarcoma proteins*) bei der Bindung an ARE aus. Als Inhibitorprotein von Nrf2 dient *kelch-like ECH associated protein* (Keap 1), welches mit der *Kelch-repeat, double glycine repeat* (DGR)-Domäne an Neh2 bindet. Insgesamt bilden die drei Untereinheiten *bric-à-bric, tramtrack, broad complex* (BTB)-Domäne, DGR-Domäne und das Verbindungsstück *intervening region* (IVR)-Domäne das Keap1 (Ma 2013). Der Transkriptionsfaktor Nrf2 ist im physiologischen Zustand durch die Bindung von Keap1 inaktiviert. Das Keap 1 dient zusammen mit Cullin 3 als Schutz vor dem Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und als Sensor für oxidativen Stress in der Zelle. Bei oxidativem Stress löst sich Keap1, wodurch Nrf2 in den Zellkern wandert und dort zusammen mit den Maf-Proteinen an ARE oder an *electrophile response elements* (EpRE) bindet, woraufhin die Transkription von Zielgenen eingeleitet wird (Surh et al. 2008, Ma 2013). Die restlichen Untereinheiten von Nrf2 dienen als Koaktivatoren (Jung und Kwak 2010). Zusammenfassend wird

die Transkription antioxidativer Gene über vier Systeme reguliert: Nrf2, Keap1, Maf-Proteine und den in der Zielgenesequenz vorhandenen ARE (Ma 2013).

Der Masterregulator Nrf2 steht ebenfalls in Verbindung mit weiteren Systemen des Organismus. Er wirkt anti-inflammatorisch und damit inhibierend auf den NF- κ B-Weg und die Produktion pro-inflammatorischer Cytokine. Des Weiteren wird Nrf2 im Zusammenhang mit ER-Stress und der UPR über PERK aktiviert (Ma 2013). Bei allen Reaktionswegen, in denen ROS entstehen, wird Nrf2 stimuliert (Ma 2013). Das Nrf2-System kann ebenfalls über Polyphenole, welche in dem Fall als indirekte Antioxidantien agieren, aktiviert werden. Polyphenole erhöhen die zelluläre antioxidative Kapazität, indem sie die Bindung von Keap1 an Nrf2 lösen, somit Nrf2 aktivieren und die Expression von Nrf2-Zielgenen steigern. Zu den indirekten Antioxidantien, welche aktivierend auf das Nrf2-System wirken, zählen zum Beispiel Epigallocatechin Gallat aus Grünem Tee, Kurkuma, Resveratrol und auch β -Carotin (Surh et al. 2008, Jung und Kwak 2010).

1.4 Entzündung

Die hochleistende Milchkuh ist im peripartalen Zeitraum nicht nur mit metabolischen, sondern auch mit inflammatorischen Prozessen konfrontiert. Eine Entzündung erhöht das Risiko für weitere Krankheiten und senkt die Milchleistung (Bertoni et al. 2008, Abuajamieh et al. 2016). Auslöser einer Entzündung können externe Erreger im Stall oder Futter sein, aber auch durch endogene Prozesse kann eine Entzündung hervorgerufen werden. Der erhöhte Energiebedarf der Kuh in der Früh-laktation bedingt eine energiereiche Fütterung, dabei können leicht verdauliche Kohlenhydrate aus Getreide zu einer Absenkung des pH-Wertes im Pansen führen. Sinkt der pH-Wert unter 6 spricht man von einer Pansenacidose (Kirchgeßner 2004). Im weiteren Verlauf verändert sich die Pansenmikroflora und der pH-Wert fällt weiter ab. Ein saurer pH-Wert schädigt das Pansenepithel und stört dessen Barrierefunktion. Lipopolysaccharide, Bestandteil gramnegativer Bakterien, können unter diesen Umständen die Epithelbarriere des Pansens durchdringen und lösen eine Entzündung in der Kuh aus. Bei einer Mastitis kann es ebenfalls zum Eindringen von LPS in den Organismus kommen und damit eine Immunantwort ausgelöst werden,

durch Freisetzung von inflammatorischen Cytokinen und Chemokinen (Gozho et al. 2005, Bradford et al. 2015, Abuajamieh et al. 2016, Magata et al. 2017).

Die Entzündungsreaktion soll dem Körper helfen, sich bestimmten Situationen anzupassen und sie zu bewältigen, mit dem Ziel die Homöostase wieder zu erlangen. Rötung, Schwellung, Erwärmung und Schmerz sind klassische Anzeichen einer Inflammation (Bradford et al. 2015). Die Immunabwehr des Körpers erkennt und beseitigt sterbende Zellen. Zellen werden nicht nur als Folge einer Immunreaktion beseitigt oder aber auf Grund dessen, dass sie körperfremd sind. Zellen werden auch aus Gründen wie Zellregulation oder Umbauprozessen, wie sie während der Trächtigkeit und der Gebärmutterrückbildung auftreten, abgebaut (Ohishi et al. 2016, Loeffler und Gäbel 2018).

Das Immunsystem besteht nach einer anatomischen Barriere aus einer zunächst eintretenden angeborenen und folgend einer erworbenen Reaktion, die sich jeweils weiter in humoraler und zellvermittelter Reaktion spezialisieren. Die Kommunikation des Systems findet über Cytokine statt, dazu zählen Interferone, Chemokine (CCL), TNF, IL und koloniestimulierende Faktoren (Bertoni et al. 2008, Bradford et al. 2015, Loeffler und Gäbel 2018). Beim Auftreten einer Entzündung steigt neben der Expression und Freisetzung der Cytokine zusätzlich auch die der Eicosanoide. Diese inflammatorischen Mediatoren sorgen für eine Steigerung des Blutflusses, erhöhte Herzfrequenz, Fieber und Appetitlosigkeit (Bradford et al. 2015).

Nach Auslösung der angeborenen Immunantwort tritt eine Aktivierungskaskade von Enzymen, deren Aufgaben Bakteriolyse, Chemotaxis und Opsonisierung sind, in Gang (Ceciliani et al. 2012, Loeffler und Gäbel 2018). Die angeborene Immunantwort, bestehend aus Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen, erkennt molekular fremde Mikroorganismenbestandteile, sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), mit Hilfe von *pattern-recognition receptors* (PRRs). Diese Rezeptoren sind ebenfalls in der Lage immunstimulatorische Produkte aus beschädigtem Gewebe oder nekrotischen Zellen über *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) zu erkennen. Die PRRs untergliedern sich in die Hauptkomponenten *Toll-like receptors* (TLRs), *RIG-I-like receptors* (RLRs) und *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors* (NLRs) (Ceciliani et al. 2012, Cao 2016). Granulozyten, welche neben den Makrophagen und den dendritischen Zellen zu der angeborenen zellvermittelten Immunantwort zählen, sind in der Lage,

toxische Sauerstoffverbindungen zu produzieren. Darüber werden NADPH-Oxidase und SOD aktiviert und somit das antioxidative System miteinbezogen. Makrophagen und Mastzellen bilden Entzündungsmediatoren wie Histamine, Prostaglandine (PTG) und Leukotriene, die wiederum IL-8 und TNF- α freisetzen (Bradford et al. 2015, Loeffler und Gäbel 2018).

Über die Aktivierung von TLRs werden intrazelluläre Signalwege eingeleitet, wie die Expression von Interferonen oder von weiteren pro-inflammatorischen Cytokinen über den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Baeuerle und Henkel 1994, Cao 2016). NF- κ B spielt in der Immunhomöostase, sowie der T- und B-Zellenfunktion eine wichtige Rolle. Auslöser der Aktivierung von NF- κ B sind neben Cytokinen, wie TNF oder IL-1, auch LPS und viele weitere Substanzen (Caamaño und Hunter 2002). Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt über eine Kaskade von Kinasen. Im Cytoplasma liegt der Transkriptionsfaktor NF- κ B inaktiv gebunden an den inhibitorischen *inhibitor of kappa B* (I κ B) Proteinen vor. Über einen inflammatorischen Stimulus werden die Isoformen der I κ B durch den kanonischen *inhibitor of kappa kinase* (I κ K)-Komplex phosphoryliert, wodurch die Translokation von NF- κ B in den Zellkern stattfindet und Gene der Inflammation transkribiert werden. Man unterscheidet zwei Multiproteinkomplexe der I κ K, den kanonischen I κ K-Komplex mit I κ K2 (I κ K β) und den nicht-kanonischen I κ K-Komplex mit I κ K1 (I κ K α). Neben diesem schnell agierenden kanonischen Weg über I κ K β , ist der zweite Weg über I κ K α langsamer. Dieser nicht-kanonische Weg zeichnet sich durch Ausbildung der Lymphorgane aus (Hoffmann und Baltimore 2006).

Einen weiteren inflammatorischen Signalweg stellt die Kaskade über die c-Jun NH₂-terminale Kinase (JNK) dar. Dieser Weg wird durch die sogenannten *unfolded protein response* (UPR), welche in einem späteren Kapitel genauer erläutert werden soll, ausgelöst. Ebenfalls können ROS aus den Mitochondrien und die PRRs den Signalweg der JNK auslösen. Dabei wird c-Jun durch JNK phosphoryliert, wandert in den Zellkern und bildet mit c-Fos den Transkriptionsfaktor *activator protein 1* (AP-1). Dieser leitet die Transkription inflammatorischer Gene ein (Hoffmann und Baltimore 2006, Bradford et al. 2015).

Die erworbene Immunantwort umfasst die Proliferation von B- und T-Zellen. In der erworbenen humoralen Immunfunktion werden über B-Lymphozyten Immunglobuline gebildet (Delves und Roitt 2000, Loeffler und Gäbel 2018). Diese sind in hohen

Konzentrationen in der Kolostralmilch als Schutz für den Nachwuchs vorhanden (Maunsell et al. 1998). Der Körper reagiert auf Ebene der erworbenen und zellvermittelten Immunantwort ebenfalls mit T-Lymphozyten (Delves und Roitt 2000).

Bei schwerer Entzündung bilden eine größere Anzahl an Makrophagen verstärkt die Cytokine IL-1, IL-6 und TNF- α . Interleukin-6 ist Hauptauslöser der sogenannte Akute-Phase-Reaktion (APR) (Ceciliani et al. 2012, Loeffler und Gäbel 2018).

1.4.1 Die Akute-Phase-Reaktion

In der Leber wird durch pro-inflammatorische Cytokine die APR ausgelöst. Als APR wird die systemische und klinische Veränderung, welche in der frühen Phase einer Infektionskrankheit oder eines Traumas beobachtet werden kann, bezeichnet. Sie ist eine unspezifische Reaktion des Organismus auf Verletzungen, bakterielle oder parasitäre Infektionen (Fleck 1989). Während der APR nimmt die Konzentration an positiven Akute-Phase-Proteinen (APP) wie Ceruloplasmin (CP), C-reaktives Protein (CRP), Haptoglobin (HP) und Serum Amyloid A (SAA) innerhalb weniger Stunden zu. Die Konzentration von leberspezifischen Proteinen wie Alb, Retinol-bindendes Protein (RBP) und Transthyretin (TTR), auch als negative APP bezeichnet, nimmt unmittelbar nach Auslösung der APR ab (Fleck 1989, Ceciliani et al. 2012, Trevisi et al. 2013).

In den ersten Monaten der Laktation zeigt sich ein Zusammenhang zwischen der Inflammation und APP und einer Minderung der Milchleistung auf Grund des Energiebedarfs für die Entzündung (Bertoni et al. 2008). Die Immunantwort ist energieaufwendig. Glucose ist für viele Immunzellen der wichtigste Energielieferant. Eine Prioritätsänderung für die Nutzung von Glucose in der Immunantwort erfolgt durch eine Insulinresistenz, welche direkt über inflammatorische Signale induziert werden kann. Folge einer Insulinresistenz bei der Kuh ist die Mobilisation von Fetten aus dem Fettgewebe als weitere Energielieferanten (Bradford et al. 2015). Um während einer Entzündung Energie bereit zu stellen, werden neben Fettdepots auch Muskeln abgebaut, um Fette und Proteine zur Energiegewinnung über β -Oxidation und Gluconeogenese zur Verfügung zu stellen (Ceciliani et al. 2012). Die Minderung der Synthese von negativen APP in der Leber steigert dabei zusätzlich den Pool

freier Aminosäuren, welche in die Gluconeogenese eingeschleust oder als Bausteine für positive APP genutzt werden können (Ceciliani et al. 2012).

Mediatoren des Immunsystems und der APR sind in den ersten Tagen nach der Kalbung erhöht, auch ohne das Auftreten einer Krankheit (Bionaz et al. 2007). Durch Infektionen oder andere Krankheiten kann das Ausmaß der APR verstärkt werden. Infektionskrankheiten wie Mastitis und Metritis, metabolische Dysbalancen wie Pansenacidose und Ketose oder eine verminderte Trockenmasseaufnahme stören die Epithelbarriere der Haut oder des Pansens und ermöglichen damit das Eindringen von LPS in die Blutbahn. Eine erhöhte Plasmakonzentration von LPS führt zu einem Anstieg von APP wie SAA und HP (Gozho et al. 2005, Abuajamieh et al. 2016, Magata et al. 2017).

In einer Untersuchung von Abuajamieh und Kollegen (2016) konnte ein Anstieg von SAA und HP festgestellt werden durch LPS im Blut der Kühe, allerdings ohne das Auftreten von Mastitis oder Metritis. Die Arbeitsgruppe vermutet, dass durch eine geringere Trockenmasseaufnahme der Tiere direkt vor der Kalbung nicht nur das Risiko einer Ketose zunimmt, sondern auch die Pansenpermeabilität ansteigt. Dadurch ist es möglich, dass LPS das Pansenepithel durchdringen und eine Entzündung hervorrufen (Abuajamieh et al. 2016). Die pro-inflammatorischen Cytokine IL-1 und TNF führen zu einer erhöhten Synthese einiger APP, der Hauptinitiator der APR in der Leber ist IL-6 (Fleck 1989).

Einige Studien konnten bisher nachweisen, dass ein Zusammenhang zwischen einer Fettleber und einer Entzündungssituation besteht. Die Injektion von TNF- α bei Kühen in verschiedenen Phasen der Laktation erhöhte die NEFA-Plasmakonzentration, die Leberfettgehalte, Parameter des oxidativen Stresses und APP (Kushibiki et al. 2003, Bradford et al. 2009). Des Weiteren führte die Behandlung zu einer geringeren Trockenmasseaufnahme und einer verminderten Milchleistung. Bertoni et al. (2008) vermuten einen Zusammenhang zwischen einem geringen Leberaktivitätsindex und einem erhöhten Inflammationsstatus in den ersten Monaten der Laktation, einer Minderung der regulären Leberfunktion sowie einer Steigerung der NEB. Der Leberaktivitätsindex wird anhand des negativen APP Paraoxonase bemessen (Bionaz et al. 2007).

1.5 Das endoplasmatische Retikulum und seine Homöostase

Die kleinste Einheit des Organismus ist die Zelle, welche aus den Zellorganellen und dem Zytosol aufgebaut ist. Das ER ist ein Zellorganell aus Doppellamellen, der Intramembranraum steht in direkter Verbindung mit dem Zellkern (Loeffler und Gäbel 2018). Die Funktionen des ER sind (a) Synthese, Faltung, Modifikation und Transport von Proteinen, (b) Synthese und Transport von Phospholipiden und Steroiden, (c) Speicherung und Regulation von Calciumionen. Man differenziert zwischen dem glatten und dem mit Ribosomen besetzten rauhen ER. Das glatte ER ist besonders in Zellen mit intensivem Stoffwechsel vorliegend. Das raue ER kommt vermehrt in Zellen mit hoher Proteinsynthese vor (Bravo et al. 2013). Die Proteinsynthese beginnt mit der Translation einer mRNA, wodurch eine Aminosäurekette, die Primärstruktur, entsteht. Damit Proteine ihre Funktion ausüben können, ist die dreidimensionale Struktur, welche die Aminosäurekette nach der ribosomalen Synthese erlangt, von großer Bedeutung (Amm et al. 2014). Die Ausbildung der Tertiärstruktur von Proteinen erfolgt ko- oder posttranslational. Kotranslational sind Chaperone und Faltungsenzyme beteiligt, die während der Translation und der Translokation bereits aktiv sind (Ellgaard und Helenius 2003). Für den kotranslationalen Transport binden *signal recognition particle* (SRP) an einer bestimmten Sequenz von Polypeptidketten, diese gelangen über den SRP-Rezeptor zur ER-Membran. Posttranslational werden Disulfidbrückenbindungen über Thioreduktasen wie Protein Disulfid Isomerase (PDI) und ERp57, die auch als Foldasen bezeichnet werden, katalysiert. *Glucose-regulated protein 78* (GRP78) ist ein Chaperon der *heat shock protein* (Hsp) Familie und detektiert ungefaltete Proteine, stabilisiert diese und wirkt in der posttranslationalen Translokation mit (Schröder und Kaufman 2005, Bravo et al. 2013). Proteine übernehmen im Körper unterschiedliche Aufgaben, wie zum Beispiel Signalübertragung, Transport oder enzymatische Reaktionen (Amm et al. 2014).

Die Funktionalität von Proteinen muss gesichert sein, damit es zu keinen Fehlreaktionen und damit Erkrankungen wie Erblindung, Diabetes oder Krebs kommt (Walter und Ron 2011, Amm et al. 2014). Zum einen dient der Protein *Turnover* einem regelmäßigen Auf- und Abbau von Proteinen, damit Fehlfunktionen minimiert werden (Attaix et al. 2005). Zum anderen unterstehen Proteine in ihrer Synthese einer Qualitätskontrolle. Während der Proteinsynthese kann es zu Fehlfaltungen

kommen. Mutationen, Hitze, ROS, Schwermetalle oder andere Stressreaktionen des Körpers können ebenfalls zu einer fehlerhaften Proteinfaltung beitragen (Buchberger et al. 2010, Amm et al. 2014). Störungen der ER-Funktion führen nicht nur zu Beeinträchtigungen der Proteinfaltung, sondern auch zu einer vermehrten Calciumfreisetzung aus dem ER, was zu oxidativem Stress führt und die Entzündungsreaktion über den JNK-Signalweg auslöst (Bradford et al. 2015).

Die Qualitätskontrolle des ER soll die Gefahr von Fehlfaltungen minimieren und die Proteinhomöostase aufrecht erhalten. Die Überwachung der Proteinqualität übernehmen Chaperone und zwei Abbausysteme, das UPS (oder *ER-associated degradation* (ERAD)) und die vakuoläre (lysosomale) Proteolyse (auch als *Macroautophagy* bezeichnet) (Bravo et al. 2013, Amm et al. 2014).

Zu den Chaperonen der ER-Qualitätskontrolle zählen BiP (*immunoglobulin heavy chain binding protein*), Calnexin, Calreticulin, GRP94, PDI, ERp57 und *ER degradation-enhancing 1,2-mannosidase-like protein* (EDEP). Sie überwachen, dass ausschließlich korrekt gefaltete Proteine das ER verlassen, während fehlgefaltete Proteine zurückgehalten und abgebaut werden (Ellgaard und Helenius 2003). Retrotranslokation in das Cytoplasma, kovalente Bindung mehrerer Moleküle Ubiquitin und proteasomaler Abbau fehlgefalteter Proteine sind die Schritte der ERAD zum Abbau fehlgefalteter Proteine (Ellgaard und Helenius 2003, Bravo et al. 2013, Amm et al. 2014).

Ist die Homöostase im ER nicht mehr aufrechtzuerhalten bzw. wiederherstellbar, kommt es zum sogenannten ER-Stress und der Auslösung der UPR.

1.5.1 Stress des endoplasmatischen Retikulums

Der Körper ist bestrebt, stets in einem Zustand der Homöostase zu stehen. Bei Entstehung eines Ungleichgewichts zwischen der Proteinfaltungskapazität im ER und der Proteinbeladung, mit der Folge, dass sich ungefaltete oder fehlgefaltete Proteine im ER Lumen anreichern, spricht man vom sogenannten ER-Stress (Cnop et al. 2012). ER-Stress kann in Folge eine Steatose auslösen. Der Transkriptionsfaktor SREBF wird gespalten und damit Lipogenese und Cholesterolsynthese gesteigert. Des Weiteren beeinflusst hepatischer ER-Stress die VLDL-Produktion durch

Verminderung der ApoB-Synthese (Cnop et al. 2012). Es wird vermutet, dass ER-Stress bei der Milchkuh im peripartalen Zeitraum ebenfalls involviert ist in der Ausbildung Leber-assoziiierter Erkrankungen, wie Fettleber, Ketose, Insulinresistenz und Entzündung (Ringseis et al. 2014). Gestörte ER-Faltungskapazität durch vermehrte Proteinsynthese, Akkumulation fehlgefalteter Proteine, geringer Calciumkonzentration im ER oder Veränderungen im Redoxstatus lösen die Reaktion der UPR aus (Zhang et al. 2014).

Die UPR zielt darauf ab, die Balance zwischen Proteinbeladung und Faltungskapazität im ER wieder herzustellen (Ron und Walter 2007, Cnop et al. 2012). Dazu werden durch die UPR unterschiedliche Strategien parallel verfolgt (Abb. 1). Zum einen steigt die Expression von Chaperonen, temporär wird die Translation eingestellt durch Reduktion der Proteinaufnahme in das ER und das ER Lumen wird durch die Synthese von Membranlipiden vergrößert. Des Weiteren kommt es zu der Aktivierung von ERAD (Schröder und Kaufman 2005, Bravo et al. 2013).

Die UPR gliedert sich in drei Reaktionshauptwege, *protein kinase ribonuclein acid (RNA)-like ER kinase* (PERK), *inositol-requiring enzyme-1* (IRE-1) und *activating transcriptionfactor* (ATF)-6, welche alle allein oder in Kombination zur Produktion von b-ZIP Transkriptionsfaktoren führen (Walter und Ron 2011, Bravo et al. 2013). Diese drei Proteine liegen im inaktiven Zustand an dem intraluminalen Chaperon BiP (GRP78) gebunden vor. Bei ER-Stress löst sich BiP von diesen Proteinen ab (Kaufman 1999, Bravo et al. 2013) und die drei Hauptwege der UPR werden aktiviert (Walter und Ron 2011, Bravo et al. 2013). BiP bindet vermehrt an fehlgefaltete Proteine im Lumen nach Auslösung von ER-Stress (Cnop et al. 2012).

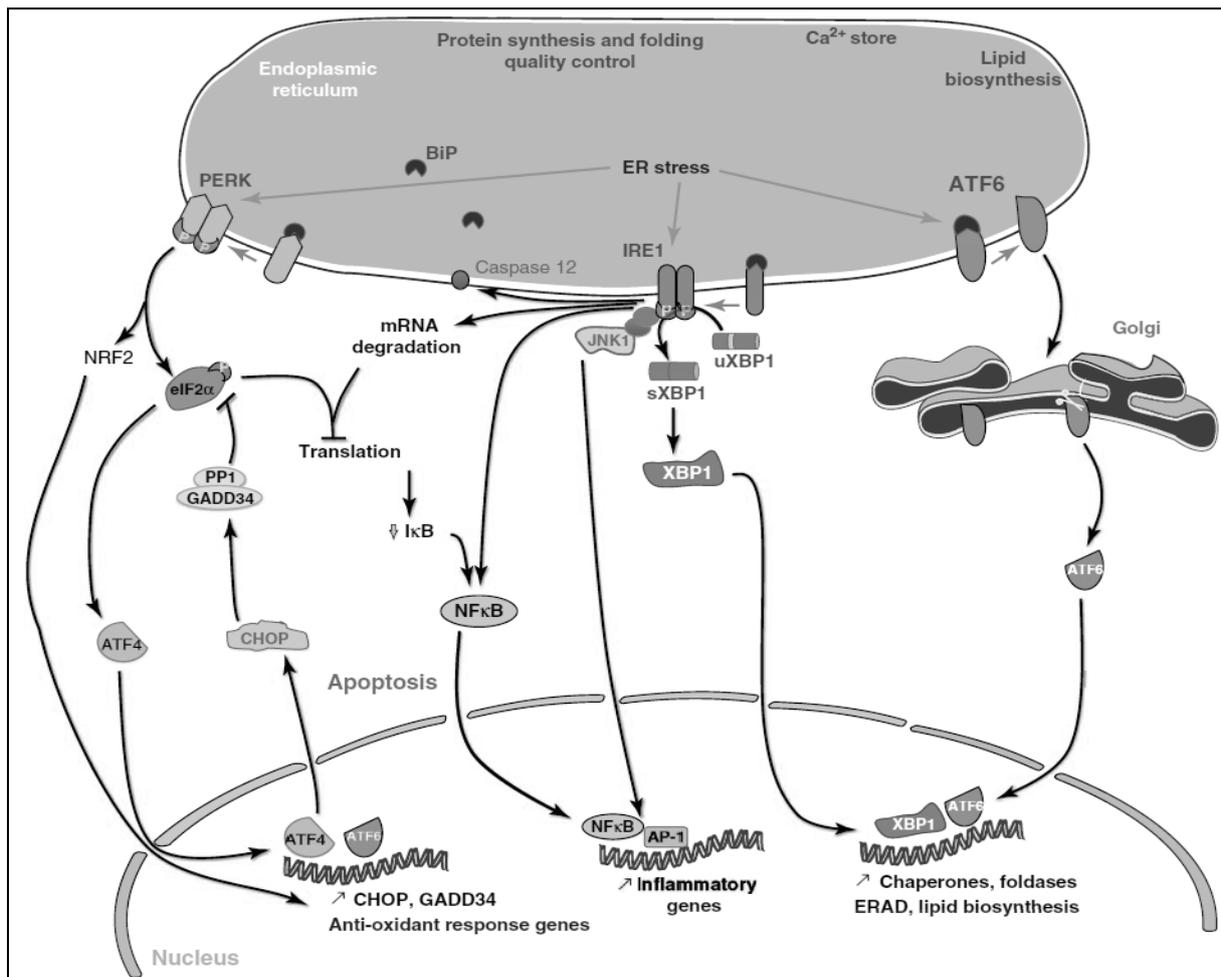


Abb. 1: Signalwege des ER-Stress (modifiziert nach Cnop et al. 2012). AP-1 = *activator protein-1*, ATF4 = *activating transcriptionfactor 4*, ATF6 = *activating transcriptionfactor 6*, BiP = *immunoglobulin heavy chain binding protein*, CHOP = *C/EBP homologous protein*, eIF2 α = *eukaryotic initiation factor 2 alpha*, ER = endoplasmatisches Retikulum, GADD34 = *growth arrest and DNA damage inducible 34*, I κ B = *inhibitor of kappa B*, IRE1 = *inositol-requiring enzyme-1*, JNK1 = *c-Jun NH₂-terminale Kinase*, NF κ B = *nuklear factor kappa B*, Nrf2 = *nuclear factor erythroid 2 related factor*, PERK = *protein kinase ribonuclein acid-like ER kinase*, PP1 = *Protein Phosphatase 1*, u/sXBP1 = *unspliced/spliced X-box-binding protein-1*.

Über Aktivierung der transmembranen PERK unter ER-Stress finden eine Autophosphorylierung sowie eine Phosphorylierung von *eukaryotic initiation factor 2 alpha* (eIF2 α) zu p-eIF2 α statt, wodurch sich eIF2 α und damit die mRNA Translation reduzieren. Ebenfalls kommt es zur Herabsetzung der Proteinsynthese und der Beladung des ER. Durch Abschwächung der Proteintranslation wird das ER entlastet (Cnop et al. 2012, Bravo et al. 2013). In Folge der Reduktion von eIF2 α wird ATF4 und dessen Zielgene ATF3, *C/EBP homologous protein* (CHOP)/*DNA-damage-inducible transcript 3* (DDIT3) und *growth arrest and DNA damage inducible 34*

(GADD34) aktiviert. Der Transkriptionsfaktor CHOP reguliert Gene der Apoptose, damit kann die UPR über PERK den Zelltod einleiten. Über ATF4 und CHOP wird ebenfalls FGF21 induziert (1.2.2; Cnop et al. 2012, Wan et al. 2014).

Des Weiteren wird das antioxidative System aktiviert (Schröder und Kaufman 2005, Walter und Ron 2011). Wie in Kapitel 1.3 beschrieben liegt Nrf2 unter physiologischen Bedingungen an Keap1 gebunden vor. Unter ER-Stress phosphoryliert PERK Nrf2, wodurch Keap1 abdissoziiert, Nrf2 in den Nukleus wandert und über ARE die Transkription antioxidativer Gene einleitet (Schröder und Kaufman 2005, Bravo et al. 2013). Die Aktivierung von Nrf2 soll in enger Zusammenarbeit die UPR unterstützen durch Kontrolle des Redox- und Energiestatus sowie der Protein-homöostase (Smith et al. 2016). Die Phosphorylierung von eIF2 α verhindert die Synthese von I κ B, welche Inhibitor von NF- κ B ist (siehe 1.4). Damit wird über den PERK-Weg der Signalweg von NF- κ B aktiviert, welcher die Expression von Genen der Entzündung einleitet (Schröder und Kaufman 2005, Cnop et al. 2012).

Die bifunktionale Transmembrankinase oder Endoribonuklease IRE1 setzt die Auslösung der UPR in non-konventionelles *splicing* um. Nachdem IRE1 über Konformationsänderung aktiviert wurde, spaltet es die mRNA von *X-box-binding protein-1* (XBP1), ein UPR-spezifischer Transkriptionsfaktor. Dabei wird ein bestimmtes Intron herausgetrennt und die Exonenden über Ligasen wieder verknüpft, wodurch XBP1s entsteht (Walter und Ron 2011, Bravo et al. 2013). Dieses leitet die Transkription von Chaperonen und Genen der ERAD ein, wodurch die Faltungskapazität und die Phospholipidsynthese zur Vergrößerung des ER-Lumens ansteigen (Harding et al. 1999, Zhang et al. 2014). Des Weiteren aktiviert IRE1 die Signalwege von JNK und NF- κ B (Cnop et al. 2012, Bravo et al. 2013; Kapitel 1.4).

Der Transkriptionsfaktor ATF6 ist ein ER-gebundenes Transmembranprotein. Unter einer Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen wird ATF6 in Vesikel abgeschnürt und wandert zum Golgi-Apparat, wo von den Proteasen S1P und S2P das N-terminale cytosolische Fragment ATF6(N) freigesetzt wird. Der gleiche Mechanismus ist ebenfalls bei der Aktivierung des Transkriptionsfaktors SREBF von Bedeutung (Bravo et al. 2013; Kapitel 1.2.1). ATF6(N) wandert in den Nukleus und aktiviert Zielgene der UPR. Bekannte Zielgene von ATF6 sind die Chaperone der Proteinfaltung BiP, PDI und GRP94 (Walter und Ron 2011, Schröder und Kaufman 2005). Ebenfalls findet über den ATF6-Weg die Transkription von CHOP, XBP1 und

DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C3 (DNAJC3) statt. Die Aktivierung des UPR-Zweigs ATF6 führt zu einer ER-Volumenvergrößerung (Bravo et al. 2013).

Die UPR interagiert in ihren drei Hauptsignalwegen nicht nur mit dem Immunsystem und dem antioxidativen System, sondern nimmt ebenfalls Einfluss auf den Lipidmetabolismus. Eine Inhibierung von PERK führt zu einer geringeren Expression von FAS. IRE1 ist bei der Apolipoproteinsekretion, vor allem hepatischer VLDL, von Bedeutung. Ein Absinken der ATF4-Konzentration hat eine Minderung der Expression von SREBF-1c, ACC und FAS in Leber und Fettgewebe zur Folge (Cnop et al. 2012, Zhang et al. 2014). Die Lipogenese wird durch ER-Stress stimuliert, um somit Lipide für die Vergrößerung des ER bereit zu stellen (Bravo et al. 2013).

Schafft der Organismus es nicht, den ER-Stress zu bewältigen und die Homöostase in der Zelle wieder herzustellen, leitet die Zelle den Zelltod ein (Walter und Ron 2011, Smith et al. 2016). Dabei kann das Signal für den Zelltod über den extrinsischen oder den intrinsischen Weg ausgelöst werden. Extrinsisch wird eine Kaskade von Caspasen (CASP) von CASP8 ausgelöst (Schröder und Kaufman 2005). Intrinsisch kann die Apoptose über den PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP Signalweg (Walter und Ron 2011), über den IRE-Signalweg durch Aktivierung von JNK (Bravo et al. 2013) oder durch Störung der Calciumhomöostase eingeleitet werden (Zhang et al. 2014). Ein weiterer pro-apoptotischer Befehl wird über IRE1 in Koordination mit ER-lokalisierten *B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)*-Proteinen, wozu *Bcl-2 Associated X Apoptoseregulator (BAX)* und *Bcl-2-Antagonist/killer 1 (Bak)* zählen, ausgelöst (Cnop et al. 2012, Zhang et al. 2014).

1.6 Polyphenole und ihre biologische Wirkung

Polyphenole sind in den unterschiedlichsten Pflanzen vorzufinden. Sie zählen zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und fungieren in der Pflanze unter anderem als Farbpigmente, Phytohormone und Phytoalexine. Sie dienen auch als Reduktionsmittel, was ihnen antioxidative Eigenschaften verleiht (Bravo 1998).

Die Pflanze baut aus der Grundsubstanz L-Phenylalanin Phenol auf, woraus durch weitere Reaktionsschritte Phenolsäuren, Flavonoide oder phenolische Verbindungen (Lignane, Stilbene, Cumarine, Tannine) entstehen. Flavonoide bilden die größte Gruppe der Phenole. Grundgerüst der Flavonoide ist das aus Phenol entstandene Chalcon mit der Grundstruktur C₆-C₃-C₆. Dabei werden zwei aromatische Ringe (A und B) gebildet, die über eine dreifache Carbonbrücke (C) miteinander verbunden sind (Abb. 2). Flavonoide untergliedern sich in folgende Gruppen: Flavone, Flavonole, Flavanole, Flavanone, Isoflavone und Anthocyanidine (Bravo 1998, Balasundram et al. 2006, Marín et al. 2015).

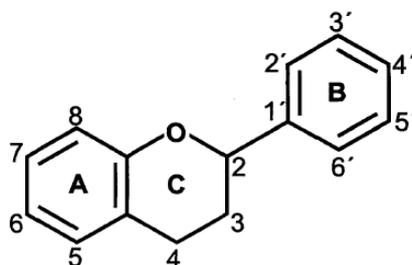


Abb. 2: Grundstruktur und Nomenklatur eines Flavonoid (Bravo 1998)

In der jeweiligen Untergruppe werden weitere Verbindungen differenziert, welche sich in Zahl und Anordnung der Substituenten, Oxidationsgrad des C-Ringes sowie Art und Stellung der Zuckerreste unterscheiden. Phenolische Naturstoffe liegen meist als Glykoside vor, wodurch sich die Wasserlöslichkeit der sonst meist hydrophoben Verbindungen der Flavonoide erhöht (Manach et al. 2004, Ebermann und Elmadfa 2011). Die große Vielfalt der Polyphenole erschwert es, einzelne polyphenolhaltige Pflanzenprodukte direkt in ihren Eigenschaften miteinander vergleichen zu können. Des Weiteren werden Konzentration und Zusammensetzung der Polyphenole in einem Pflanzenprodukt durch Faktoren wie Sorte, Produktionsjahr, -ort und Reifegrad beeinflusst (Bravo 1998, Shi et al. 2003).

Pflanzen enthalten neben Flavonoiden weitere phenolische Verbindungen, wozu die Tannine zählen. Sie sind zum Beispiel in der Verarbeitung von Tee wichtige Komponenten des Teearomas und der Teegerbstoffe (Ebermann und Elmadfa 2011). Tannine besitzen im Gegensatz zu den Flavonoiden ein relativ schweres Molekulargewicht. Tannine unterteilen sich in hydrolysierbare und kondensierte Tannine. Hydrolysierbare Tannine sind Ester der Gallussäuren, kondensierte Tannine hingegen sind auch als Proanthocyanidine bekannt (Bravo 1998, Balasundram et al. 2006). Kondensierte Proanthocyanidine sind Biopolymere bestehend aus dem Monomer Flavan-3-ol (Catechinen) (Steinegger und Hänsel 1992). Tanninen wird die Eigenschaft zugeschrieben, die Verdaulichkeit von Proteinen (Bravo 1998, Ferguson 2001) und kurzkettigen Fettsäuren im Pansen sowie die Absorption von Mineralstoffen herabzusetzen durch die Bildung schwerlöslicher Komplexe (Bravo 1998, Makkar 2003b, Karamać 2009, Yisehak et al. 2012). Des Weiteren werden tanninhaltigen Futtermitteln adstringierende Effekte und bitterer Geschmack bei der Nahrungsaufnahme zugeschrieben (Makkar et al. 1995). Aus der Literatur ist bekannt, dass Tannine die Lebendmassezunahme von Nutztieren negativ beeinflussen können (Makkar 2003b, Mahgoub et al. 2008, Oliveira et al. 2010, Viveros et al. 2011, Saminathan et al. 2015). Eine geringere Futteraufnahme auf Grund des unangenehmen Geschmacks und die Minderung der Verdaulichkeit im Pansen sind dafür zu nennende Gründe (Makkar 2003b).

Polyphenolen werden als präventive Nährstoffe anti-inflammatorische, antioxidative, vasodilatatorische, chemopräventive und neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben (Bravo 1998, Balasundram et al. 2006, Hanhineva et al. 2010). Durch ihre Fähigkeit, freie Radikale zu binden, Wasserstoffatome oder Elektronen abzugeben und Chelatkomplexe mit Metallkationen zu bilden begründet sich die antioxidative Eigenschaft der Phenole. Die antioxidative Kapazität steigt mit steigendem Grad der Hydroxylierung der Phenole (Balasundram et al. 2006). Polyphenole greifen ebenfalls in den Glucose- und den Fettstoffwechsel ein, indem sie unter anderem die Insulinsekretion und -sensitivität steigern oder einen hypocholesterinämischen Effekt aufzeigen (Bravo 1998, Hanhineva et al. 2010).

Die positiven Eigenschaften der Polyphenole auf den Organismus sind abhängig von deren Bioverfügbarkeit. Diese hängt im Allgemeinen von Faktoren wie der Nahrungsquelle, deren Qualität und dem physiologischen Zustand bzw.

Gesundheitsstatus des Tieres selbst ab. Die Absorption und die Metabolisierung von Polyphenolen sind zusätzlich von Eigenschaften wie deren Struktur und die der Konjugate, dem Grad der Glykosylierung, der Molekülgröße und der Löslichkeit abhängig (Bravo 1998, Balasundram et al. 2006, Lewandowska et al. 2013). In einigen Zellmodellen und Versuchen mit Monogastern konnte bereits gezeigt werden, dass Polyphenole über die Epithelzellen durch passive Diffusion oder erleichterte Diffusion durch Carrier in die Blutbahn gelangen. Nach Absorption der Polyphenole können diese im Organismus zum Beispiel antioxidativ oder anti-inflammatorisch wirken (Gessner et al. 2016, Wein et al. 2016). Verbindungen, welche nicht über die Darmwand absorbiert werden und diejenigen, welche über die Galle aus der Leber in den Darm zurück fließen, erreichen das Colon und werden dort von Enzymen der Mikrobiota verstoffwechselt (Scalbert & Williamson 2000, Yang et al. 2001b, Hollman 2001).

Die Kuh als Wiederkäuer besitzt einen zusammengesetzten Magen aus den drei Vormägen Pansen, Retikulum, Omasum und dem Drüsenmagen Abomasum (Loeffler und Gäbel 2018). Positive Eigenschaften von Polyphenolen, welche zumeist in Zellmodellen oder monogastrischen Tiermodellen beobachtet wurden, können andere Auswirkungen auf Wiederkäuer haben als auf monogastrische Tiere auf Grund der bakteriellen Fermentation im Pansen (Ishida et al. 2015, Wein et al. 2016). Daher ist zum Beispiel der negativ ausgeübte Effekt der Tannine beim Monogaster, die Proteinverdaulichkeit herabzusetzen, für den Wiederkäuer von Vorteil. Tannine erhöhen für Wiederkäuer die Verdaulichkeit von Proteinen in dem Sinne, dass das Protein im Pansen zu einem geringeren Anteil abgebaut wird und somit im Duodenum mehr nutzbares Rohprotein (nXP) direkt dem Tier zur Verfügung steht (Kronberg und Schauer 2013). Bei Wiederkäuern können die gleichen positiven Eigenschaften von Polyphenolen, wie die Wirkung als Antioxidans, erwartet werden, wie sie bereits in monogastrischen Modellen aufgezeigt worden sind, wenn eine Absorption von Polyphenolen oder deren Metaboliten stattgefunden hat. Entscheidend ist hierbei der Eintritt der Polyphenole in die Blutbahn (Wein et al. 2016).

Eine antioxidative Wirkung von Polyphenolen nach der Pansenpassage konnte bereits bei Wiederkäuern aufgezeigt werden (Gladine et al. 2007). In diversen Studien konnten positive Effekte von Polyphenolen auf die Gesundheit und die

Leistung verschiedener Nutztiere nachgewiesen werden. Oliveira et al. (2010) konnten bei einer Fütterung von Polyphenolen aus Granatapfel an Holstein-Kälber einen Anstieg der Cytokine Interferon- γ und IL-4 feststellen, was zu einer Verbesserung der humoralen und zellvermittelten Immunität der Kälber führte und somit ihre Immunkompetenz stärkte. Eine Absenkung der APP-Konzentration im Plasma in der Früh lactation von Kühen konnte bei einer Fütterung von Traubenkern- und Traubentrestereextrakt (Gessner et al. 2017) sowie bei einer Fütterung eines Polyphenolmixes (100 g/Tier und Tag) an Färsen beobachtet werden (De Nardi et al. 2014).

1.7 Einsatz von Grüntee-Extrakt

Als Tee wird ein Getränk bezeichnet, welches aus Blättern und Knospen des Teestrauchs *Camellia sinensis* var. *sinensis* zubereitet wird. Geerntet werden die jungen Blätter und Knospen, welche die beste Teequalität erbringen. Im Laufe des Wachstums eines Blattes steigt der Gehalt an Lignin und Gerbstoffen, wodurch später ein anderer Teegeschmack entsteht. Das Getränk charakterisiert sich nach Sorte, Region, Art der Ernte und speziellen Technologien der Behandlung der Blätter nach der Ernte. Demnach können drei Hauptkategorien unterteilt werden: Schwarztee, Oolong-Tee und Grüntee (Graham 1991, Khokhar und Magnusdottir 2002, Ebermann und Elmadfa 2011).

Bei der Herstellung von Grüntee werden die geernteten frischen Blätter ohne Welken mit Wasserdampf behandelt, um die enthaltenen Enzyme zu inaktivieren und eine Fermentation zu verhindern. Da ohne eine Fermentation das Farbpigment Chlorophyll nicht oxidativ abgebaut wird, bleibt beim Grüntee die typisch grüne Farbe im Endprodukt erhalten. Mit Hilfe von mechanischem Rollen brechen die Blattzellen auf, abschließend findet eine Trocknung statt, um das Produkt lagerfähig zu machen (Graham 1991, Ebermann und Elmadfa 2011).

Die Inhaltsstoffe von Teeblatt und Blattknospe setzen sich wie folgt zusammen: 30-36 % phenolische Inhaltsstoffe, 20-25 % Kohlenhydrate, 17-19 % Proteine und Aminosäuren, 12 % Alkaloide, 2-16 % Lipide und etwa 3 % Mineralstoffe. Catechine, welche vorwiegend in Blättern vorkommen, zählen zu den Flavanolen. Auf Grund der

Stereometrie unterscheidet man Catechin und Epicatechin. Ist eine Hydroxylgruppe zusätzlich am Ring B addiert, spricht man von Gallocatechin und Epigallocatechin (Graham 1991). Phenolische Verbindungen im Teeblatt sind vorwiegend (+)-Catechin (1-2 %), (-)-Epicatechin (0,1-3 %), (-)-Epicatechin Gallat (3-6 %), (+)-Gallocatechin (1-3 %), (-)-Epigallocatechin (0,1-6 %) und Epigallocatechin Gallat (7-13 %; EGCG) (Graham 1991, Abb. 3). Die Gehalte variieren je nach Sorte und Jahreszeit. Vor allem die Blattknospen und die jungen Blätter sind reich an EGCG (Graham 1991), welches die stärkste Bioaktivität aufweist (Miyoshi et al. 2015, Hayakawa et al. 2016). Den Polyphenolen im Grünen Tee, vor allem den Catechinen, werden protektive Eigenschaften gegen Krebs, Obesität, Diabetes, Artherosklerose, neurodegenerativen Erkrankungen, Hepatitis, Allergien sowie bakteriellen und viralen Infektionen zugeschrieben (Miyoshi et al. 2015, Hayakawa et al. 2016, Ohishi et al. 2016).

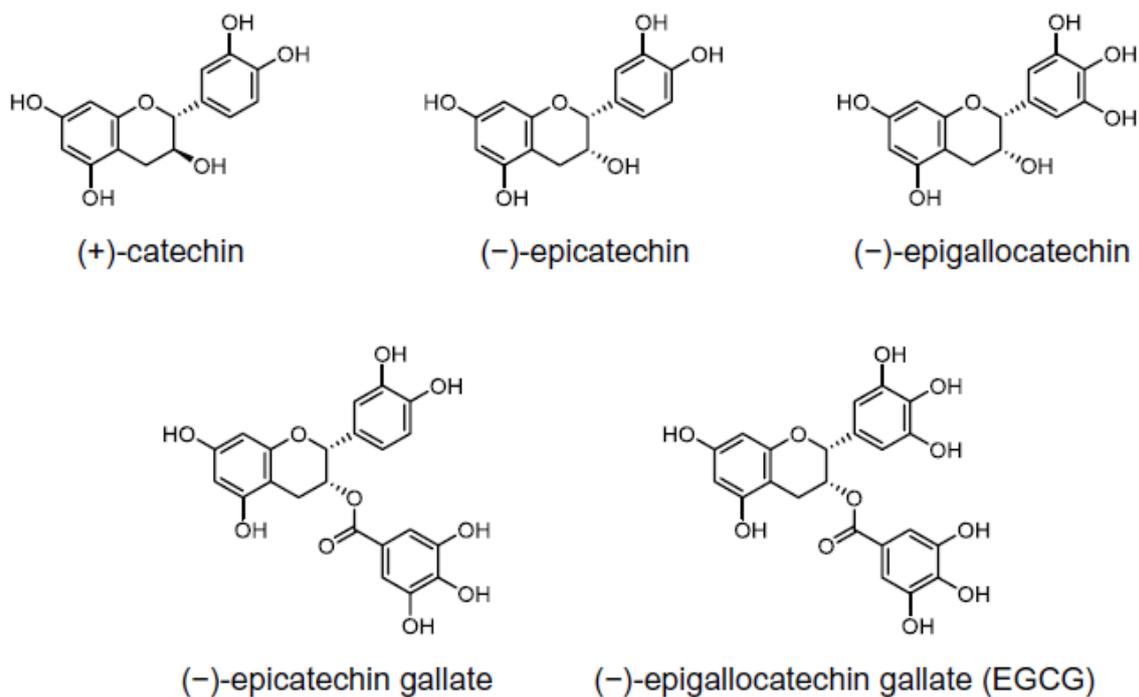


Abb. 3: Struktur der Flavanole in Grünem Tee (Miyoshi et al. 2015)

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die peripartale Phase der Milchkuh ist gekennzeichnet durch physiologische Veränderungen und metabolischen Anpassungen an diese (Grummer 1993, Bell et al. 1995, Drackley et al. 2005, Ringseis et al. 2014, Bradford et al. 2015, Gessner et al. 2016). Bereits gegen Ende der Trächtigkeit nimmt die Trockenmasseaufnahme der Kuh ab, in den ersten Tagen nach der Geburt des Kalbes ist die Trockenmasseaufnahme weiterhin reduziert. Eine geringe Trockenmasseaufnahme und ein Anstieg des Energiebedarfs auf Grund der eintretenden Laktation führen zu einer NEB (Grummer 1993, Drackley et al. 2005). Aus dem Fettgewebe werden NEFA mobilisiert und in der Leber oxidiert. Der Körper benötigt für die Laktosebildung als Grundsubstanz Glucose, welche in der Gluconeogenese mit Hilfe von Oxalacetat gebildet wird (Drackley et al. 2001, Drackley et al. 2005). Die Verfügbarkeit von Oxalacetat limitiert die Kapazität der Lipidoxidation zur Energiegewinnung, was zu einer vermehrten Bildung von Ketonkörpern führt (Grummer 1993, Drackley et al. 2001, Grummer 2008). Eine hohe Plasmakonzentration von BHBA ist Anzeiger einer Ketose (Li et al. 2016). Während des Metabolismus in der Leber entstehen vermehrt ROS, welche oxidativen Stress auslösen (Bernabucci et al. 2005, Li et al. 2016). Des Weiteren ist bei der Kuh der Lipidexport aus der Leber begrenzt, wodurch es bei einer enormen Anflut von NEFA in die Leber durch deren Reveresterung zur Bildung einer Fettleber kommt (Grummer 1993, Gruffat et al. 1996).

Durch die Geburt, die Gebärmutterinvolution und das Einsetzen der Laktation ist die Kuh anfälliger für Krankheiten wie Endometritis oder Mastitis, welche eine Entzündung hervorrufen (Bradford et al. 2015). LPS, Membranbestandteile Gramnegativer Bakterien, lösen ebenfalls nach Durchdringen des Epithels eine Entzündung aus (Magata et al. 2017). Die Leber frühlaktierender Kühe ist mit inflammatorischen Herausforderungen von mikrobiellen Komponenten, proinflammatorischen Cytokinen und ROS konfrontiert und entwickelt einen entzündungsähnlichen Zustand (Drackley et al. 2005, Bionaz et al. 2007). In der Leber kommt es zur Auslösung der APR. Dabei werden vermehrt positive APP, wie SAA, HP und CRP, gebildet und die Konzentration negativer APP (RBP, Alb) nimmt ab (Drackley et al. 2005, Bionaz et al. 2007, Bertoni et al. 2008).

Die Proteinbiosynthese findet im ER statt. Nach der Synthese der Polypeptidketten werden diese in ihre dreidimensionale Struktur gefaltet und ko- oder posttranslational modifiziert, z.B. durch Glycosylierung, Hydroxylierung, Faltung oder Disulfidbrückenbildung (Han und Kaufman 2016). Metabolischer Stress, Entzündung und die daraus resultierende Bildung von ROS können die Homöostase des ER stören und ER-Stress auslösen (Gessner et al. 2014, Ringseis et al. 2014). Mit Hilfe der UPR wird versucht, ein Gleichgewicht zwischen Proteinfaltungskapazität und Proteinbeladung herzustellen. Gelingt dies nicht, wird die Apoptose der Zelle eingeleitet (Cnop et al. 2012). Die Aktivierung der UPR greift auch in den Lipidstoffwechsel ein und begünstigt die Ausbildung einer Fettleber (Ringseis et al. 2014, Han und Kaufman 2016).

Polyphenole, welche zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zählen, sind u.a. für ihre antioxidative Eigenschaft bekannt (Vinson et al. 1995, Cao et al. 1996, Bravo 1998). Grüner Tee (*Camellia sinensis*) enthält eine Vielzahl an Polyphenolen, denen bereits in verschiedenen Studien positive Eigenschaften auf die Physiologie des Körpers zugeschrieben werden konnten (Miyoshi et al. 2015, Ohishi et al. 2016, Hayakawa et al. 2016). Das Polyphenol EGCG aus Grünem Tee ist in der Lage, das Nrf2-ARE Signalsystem zu aktivieren und damit die Transkription von antioxidativen Enzymen wie SOD, Thioredoxin und Glutathion Reduktase (Chen et al. 2000, Surh et al. 2008, Smith et al. 2016). Des Weiteren entschärft EGCG ROS und nimmt dadurch Einfluss auf die Entzündung und in Folge dessen auf Entzündungsmediatoren wie TNF- α und Cyclooxygenase(COX)-2 (Abe et al. 2005, Suzuki et al. 2012, Miyoshi et al. 2015, Hayakawa et al. 2016, Ohishi et al. 2016). Zusätzlich erfolgt eine Inhibierung von NF- κ B über die Blockierung von I κ K durch EGCG (Yang et al. 2001a). Metabolischer Stress und Entzündung, die in der peripartalen Phase auftreten, sind Auslöser für ER-Stress (Gessner et al. 2014, Ringseis et al. 2014). In Zell- und Tiermodellen konnte unter Einsatz von Grünem Tee eine Steigerung der Lipidoxidation und eine Senkung der Lipidsynthese beobachtet werden (Suzuki et al. 2012, Miyoshi et al. 2015, Hayakawa et al. 2016, Ohishi et al. 2016). Eine Steigerung der Lipidoxidation in der peripartalen Phase könnte einer gesteigerten Reveresterung von NEFA in der Leber entgegen wirken und somit eine Fettleberbildung verhindern. Eine Verminderung von metabolischem Stress und Entzündung durch den Einsatz von Grünem Tee würde die Entstehung von ER-Stress verringern.

Unter dem Einsatz der Polyphenolpräparate Traubenkern- und Traubentrestereextrakt sowie eines Gemisches aus Grünem Tee und Kurkuma konnten bereits positive Effekte auf metabolischen Stress, Entzündung und ER-Stress bei Kühen im peripartalen Zeitraum beobachtet werden (Gessner et al. 2015, Winkler et al. 2015, Gessner et al. 2017). Eine Transkriptomanalyse bei laktierenden Kühen zeigte eine Absenkung der hepatischen Genexpression von UPR-Zielgenen unter Einsatz eines Polyphenolpräparates (Gessner et al. 2017). In der Studie von Winkler et al. (2015) konnte bei Milchkühen unter Supplementierung eines Gemisches aus Grünem Tee- und Kurkumaextrakt gezeigt werden, dass in Woche 1 und 3 p.p. in der Behandlungsgruppe geringere hepatische Konzentrationen von TAG und Chol nachzuweisen waren als in der Kontrollgruppe. Da in dem Versuch von Winkler et al. (2015) ein polyphenolhaltiges Mischpräparat eingesetzt worden war, sind die Ergebnisse nicht eindeutig auf Grünen Tee oder Kurkuma zurückzuführen. In der vorliegenden Arbeit wird die Hypothese untersucht, dass der Einsatz von reinem Grüntee-Extrakt (GTE) in der peripartalen Phase von Kühen oxidativen Stress und Entzündung vermindert sowie durch zusätzlichen Einfluss auf den hepatischen Fettmetabolismus das Auftreten von ER-Stress verringert. Dazu wurden bei Deutsch Holstein Kühen unter Einsatz von GTE Plasmaparameter und hepatische Genexpressionen des oxidativen Systems, der Entzündung und Zielgene der UPR in der Leber analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte und Verbrauchsmaterial	Hersteller
Bioanalyser Agilent 2100	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Biopsienadel 14G	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland
Cary [®] 50 Bio UV-Visible Spectrophotometer	Varian Medical Systems, Darmstadt, Deutschland
Chromatografieampullen, 1,5 ml, Braunglas	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eppendorf Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Fischgräten-Melkstand 8er / Side-by-Side-Melkstand 10er	GEA Farm Technologies, Bönen, Deutschland
Fotografie Gelelektrophorese	Gene Flash Syngene bio imagine, England
Fotografie Gelelektrophorese - Drucker	Mitsubishi Electric, Video Copy, Malaysia
Futtermischwagen	BvL Maschinenfabrik GmbH & Co. KG, Emsbüren, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Gelkammer	Trans-Blot [®] Cell, BIO RAD, USA
Genesys 10 UV Scanning Photometer	Thermo Fisher Scientific, USA
Halb-Mikro-Küvetten, Polystyrol	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Heizblock	SC-3 Sample Concentrator, Techne, USA
Heraeus Fresco 21 centrifuge	Thermo Scientific, Osterode, Deutschland
HPLC Vorsäule LiChroCART 4-4	Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland
LiChrospher 100 DIOL	
HPLC Vorsäule RP 18	Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Autosampler LaChrom L-2200	Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Autosampler LaChrom L-7200	Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Detektor LaChrom Fluoreszenz Detektor L-7485	Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Detektor UV-VIS Detector LaChrom Elite L-2420	Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Pumpe LaChrom Elite L-2130	Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Pumpe LaChrom L-7100	Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Säule LiChroCART 125-4	Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland
LiChrospher 100 DIOL	
HPLC-Säule Luna 5u C18(2)	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
HPLC-Säulenofen Jetstream 2 Plus	Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland

Geräte und Verbrauchsmaterial	Hersteller
HPLC-Säulenofen LaChrom L-7360	Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland
Infrarotspektrophotometrie Milko Scan FT6000	Foss Analytical A/S, Hillerød, Dänemark
Inkubationsbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Inkubator	Thermo Scientific Heraeus Incubator, Deutschland
Kolbenhubpipetten Research®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
Melksystem Dairy Plan C21	GEA Farm Technologies, Bönen, Deutschland
Mikroeinsätze für Chromatografieampullen	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mikroplattenleser Tecan Infinite® M200 MS3 digital	Tecan, Männedorf, Schweiz
Multipette®	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
NanoQuant-Platte, 16 Flat Bottom black Quarz/Alu	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Parafilm	Tecan, Männedorf, Schweiz
Pipettenspitzen, 25, 200, 1000 µl	American Can Company, Wisconsin, USA
Probenkonzentrator Type 5000 6201	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagenzgläser mit Glasstopfen	Liebisch Labortechnik, Bielefeld, Deutschland
Reagenzglasschüttler REAX 2000	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Reagenzglasschüttler Vortex Genius	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Reaktionsgefäße, 0,1 mL	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Rotationsmischer Mixer 5432	STRIP Tubes für Rotor-Gene, LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
Rotorgene 6000 System (PCR)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
SafeSeal Gefäß 1,5 ml	Corbett Research, Mortlake, Australien
Schraubverschluss für Chromatografieampullen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Schüttler IKA MS3 digital	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Schüttler KS-15	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Schüttler TS1 Thermo Shaker	Edmund Bühler GmbH, Tübingen, Deutschland
Skalpellklingen aus Carbon-Stahl Fig. 11 steril	Biometra, Göttingen, Deutschland
S-Monovette® 9 ml LH	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Spezialständer zum Kochen der Eppendorf-Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	Eigenproduktion des Instituts für Tierernährung und Ernährungsphysiologie der JLU Gießen,

Geräte und Verbrauchsmaterial	Hersteller
Stainless Steel Beads (5 mm)	Deutschland Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Stromquelle Gelelektrophorese	Bio Rad Power Pac 200, USA
Thermoblock	Accu Block, Digital Dry bath, Labnet International Inc., USA
Thermoblock Digital Heatblock	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Thermocycler T professional Basic	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermoschüttler	eppendorf Thermomixer comfort, Hamburg, Deutschland
TissueLyser II	Retsch GmbH, QIAGEN, Haan, Deutschland
Trockenschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Ultraschallbad Bandelin Sonorex	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Verschlussklammern für Reagenzgläser	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Verwiegetröge	Roughage Intake Control, Insentec B.V., Marknesse, Niederlande
Vortex	Heidolph REAX 2000, Deutschland
Wasserbad Julabo UC - BA/5	Julabo Labortechnik GmbH, Deutschland
Zentrifugalverdampfer eppendorf Concentrator Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Labofuge 400R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus sepatech, Thermo Scientific, Deutschland
Zentrifuge Mikro 20	Hettich AG, Bäch, Schweiz
Zentrifuge Ministar	VWR Galaxy Ministar, Korea

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1,1,3,3,-Tetraethoxypropan, $\geq 96\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz (ABTS), $> 98\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-4-methylphenol (BHT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
2-Propanol, $\geq 99,8\%$	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
2-Thiobarbitursäure (TBA), $> 98\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
5 x Reaction Buffer for qPCR	Thermo Scientific, Vilnius, Litauen
6 x DNA LoadingDye	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox), 98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Aceton, 70%	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Agarose	peqGOLD Universal Agarose, peqlab, Erlangen, Deutschland
Bidestilliertes Wasser	Eigenproduktion, Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie, JLU Gießen, Deutschland
Chloroform, $\geq 99,8\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Contronorm [®] PLUS	Analyticon Biotechnologies AG, Lichtenfels, Deutschland
Desoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Diethylpyrocarbonat(DEPC), $\geq 97\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
DNA-Polymerisationsmix	Gene Craft, Lüdinghausen, Deutschland
Essigsäure ROTIPURAN [®] (Eisessig), 100%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol ROTIPURAN [®] , $\geq 99,8\%$, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, $\geq 99,8\%$, ca. 1% MEK vergällt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, 70%	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) – Monovetten	S-Monovette [®] , Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (Na ₂ EDTA x H ₂ O), ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Folin-Ciocalteu's Phenol Reagent	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Gallussäure, 98 %	ACROS Organics, New Jersey, USA
GelRed [™] Nucleic Acid Gel Stain, 10000X in Water	Biotium, Hayward, Kalifornien
GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Glycerol, ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin, 98,5 – 101,0 %	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Salzsäure	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Isocain, Procainhydrochlorid/Epinephrin	Selectavet, Weyarn/Holzolling, Deutschland
Kaliumperoxidsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
KAPA SYBER [®] FAST qPCR Universal Master Mix	KAPA Biosystems/Peqlab, Erlangen, Deutschland
Methanol, HPLC Grade	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methanol, HPLC-Grade	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid, ≥ 99,8 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid, ≥ 99,5 %	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat, ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
n-Hexan	Honeywell, Deutschland
n-Hexan Rotisol [®] HPLC	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Oligo-dT18-Primer	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
ortho-Phosphorsäure, 85 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Oxytetracyclinhaltiges Blauspray	Bayer Health Care AG, Leverkusen, Deutschland
Polyvinylpyrrolidon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Procamidol [®]	Richter Pharma, Wels, Österreich
Propylenglycol	Raiffeisen Waren-Zentrale, RWZ Rockenhausen, Deutschland
Pyrogallol, ≥ 99,0 %	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Retinol synthetisch, ≥95 % (HPLC), kristallin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
RevertAid Reverse Transcriptase, 200 U/μL	Thermo Scientific, Litauen
Rifen [®]	Richter Pharma, Wels, Österreich
β-Carotin, ≥ 97 % (UV)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tetraethoxy-Propane(TEP)-Standard, 97 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Thiobarbitursäure, ≥ 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Triglycerid-Stammlösung	Analyticon Biotechnologies AG, Lichtenfels, Deutschland
Tris	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Triton X-100	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
TRIzol [®] Reagent	Ambion [®] , Thermo Fisher Scientific, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
Trolox, $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
α -Tocopherol synthetisch, $\geq 96\%$ (HPLC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
γ -Tocopherol, $\geq 96\%$ (HPLC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
δ -Tocopherol, $\geq 96\%$ (HPLC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

2.1.3 Medien und Puffer

ABTS, 14 mM	76,82 mg ABTS auf 10 mL bidest. Wasser
Aceton, 70 %	75,04 mL Aceton (99 %) in 24,99 mL destilliertem Wasser lösen
Butanol-HCl	95:5 v/v
DEPC-Wasser	0,1 % (v/v) Diethyldicarbonat in Wasser, autoklaviert
Ethanol, 75 %	37,5 mL Ethanol (> 99 %) + 12,5 mL DEPC-Wasser
Ethanol/Wasser-Gemisch für Trolox- Standardkurve	Verhältnis 25:75
Ethanol/Wasser-Gemisch zur TBARS- Analyse	420 mL Ethanol (99,8%) auf 1 L bidest. Wasser
Ethanol-Pyrogallol-Gemisch Ferric Reagenz	Ethanol (vergällt)+ 1 % Pyrogallol 2% Eisenammoniumsulfat in 2 N HCl
Folin-Ciocalteu's Phenol Reagent 2N	Verdünnung 1+1 mit destilliertem Wasser
Gallussäurestandard	Verdünnung 1:10 mit destilliertem Wasser
Kaliumperoxidsulfat, 4,9 mM	132,45 mg Kaliumperoxidsulfat auf 100 mL bidest. Wasser
Methanolische Natronlauge Natriumcarbonat, 0,7 M	9 mL 1 M NaOH in 100 mL Methanol 74,193 g Natriumcarbonat in 1 L destilliertem Wasser lösen

Natronlauge, 1 M	39,99 g NaOH in 1 L destilliertem Wasser
Ortho-Phosphorsäure, 0,44 M	10 mL ortho-Phosphorsäure (85%) in 1 L bidest. Wasser
TAE-Puffer (pH 8,3), 50x	2 M Tris 1 M Acetat 50 mM EDTA
TBA-Reagenz, 0,6 %	0,6 g Thiobarbitursäure auf 100 mL bidest. Wasser, täglich frisch ansetzen
TEP-Standard	50 µL TEP auf 25 mL Ethanol/Wasser-Gemisch
Trolox-Stammlösung, 1 mM	25 mg Trolox, 25 mL Ethanol, in 100 mL bidest. Wasser

2.1.4 Enzymatische Testsätze

Autokit 3-HB R1 und R2 Set, Ketone Body Calibrator 300 Cholesterin CHOL, Monoreagenz, CHOD-PAP	Wako Chemicals, Neuss, Deutschland Analyticon Biotechnologies AG, Lichtenfels, Deutschland
Fluitest [®] ALB BCG, Monoreagenz, Bromcresolgrün Methode	Analyticon Biotechnologies AG, Lichtenfels, Deutschland
Fluitest [®] TG, Monoreagenz, GPO-PAP	Analyticon Biotechnologies AG, Lichtenfels, Deutschland
NEFA-HR(2) R1 und R2 Set, NEFA Standard, ACS-ACOD-Methode	Wako Chemicals, Neuss, Deutschland

2.1.5 Enzym-linked Immunosorbent Assay

Bovine HP (Haptoglobin) ELISA Kit	EB0011, Fine Test, Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln, Deutschland
Bovine Retinol-binding protein 4 ELISA Kit	E0929b, EIAab [®] , Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln, Deutschland
Bovine SAA (Serum amyloid A protein) ELISA Kit	EB0015, Fine Test, Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln, Deutschland

2.1.6 Oligonukleotide

Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bestellt. Die Primer wurden salzfrei geliefert und nach Herstellerprotokoll mit sterilem DEPC-Wasser eluiert. Anschließend wurden sie in der Analytik 1:10 verdünnt verwendet.

Tabelle 1: Eigenschaften der im Versuch verwendeten Oligonukleotide

Gen	Sequenz Forward (5'→ 3') Reverse (5'→ 3')	T _A , °C	Produkt- länge, bp	NCBI Genbank	Primer- effizienz	Steigung	Bestimmt- heitsmaß
<i>Referenzgene</i>							
<i>EEF1A1</i>	GTCAAAGATGTCCGTCCGTGGC TGGCAGCGTCACCAGATTTCA	60	253	NM_174535.2	1,95	-3,35	1,00
<i>H3F3A</i>	CTGTGGCACTCCGTGAAATTA ACTTGCCTCCTGCAAAGCAC	60	154	NM_001014389.2	1,94	-3,48	1,00
<i>RPL12</i>	GGCAACTGGTGATTGGAAGG TCTGCTTCTTTCTGTCCCTTGG	60	143	NM_205797.1	1,90	-3,59	1,00
<i>Zielgene</i>							
<i>ACACA</i>	CTCTTCCGACAGGTTCAAGC AGTCCCCGCACTCACATAAC	60	270	NM_174224	2,03	-3,26	1,00

Gen	Sequenz Forward (5'→ 3') Reverse (5'→ 3')	T _A , °C	Produkt- länge, bp	NCBI Genbank	Primer- effizienz	Steigung	Bestimmt- heitsmaß
<i>ACADM</i>	GCGAGTACCCTGTCCCATTA CCTCAGTCATTCTCCCCAAA	57	243	NM_001075235.1	1,92	-3,53	0,99
<i>ACAT1</i>	TGCGCCTGCATATGCTGTTCT AGCACCTCCTCCTCCGTTGC	62	277	NM_001046075.1	1,94	-3,47	1,00
<i>ACOX1</i>	TCAGCCGTAGCCAGCGTTAC GTCTGGGCGTAGGTGCCAAT	60	256	NM_001035289.3	1,92	-3,53	0,99
<i>APOB</i>	CGACCATCACCGTGCCCGAG ACAAGGGCGAGGCCACCTCA	64	123	XM_010817552.1	1,97	-3,40	0,98
<i>ATF4</i>	TGGTCTCAGACAACAGCAAG AGCTCATCTGGCATGGTTTC	59	130	NM_001034342.2	1,95	-3,46	0,98
<i>BAK1</i>	TACTTCACCAAGATCGCGTC ACGATGGCTACGCTCTTGAT	59	254	NM_001077918.1	1,97	-3,39	0,98
<i>BAX</i>	TCTGACGGCAACTTCAACTG ATGGTCACTGTCTGCCATGT	59	224	NM_173894.1	1,90	-3,58	1,00
<i>CASP3</i>	AGCACCTGGTTACTTTTCCTGG CCGAGTAAGAATGTGCATGAGC	59	118	NM_001077840.1	2,02	-3,27	0,99

Gen	Sequenz Forward (5'→ 3') Reverse (5'→ 3')	T _A , °C	Produkt- länge, bp	NCBI Genbank	Primer- effizienz	Steigung	Bestimmt- heitsmaß
<i>CASP8</i>	TACCAGCGAGGAGGAGATGAAG CATCCAGCTTACATTTGGCAATC	59	164	NM_001045970.2	1,91	-3,55	0,99
<i>CAT</i>	TGGGACCCA ACTATCTCCAG AAGTGGGTCCTGTGTTCCAG	59	178	NM_001035386.2	1,92	-3,52	1,00
<i>CCL2</i>	TCACAGTAGCTGCCTTCAGCA ACCCATTTCTGCTTGGGGTCT	60	214	NM_174006.2	1,91	-3,55	1,00
<i>CP</i>	CGGTGGAGGTGGAATGGGAT TGTGCTGTCAGTGAATTGCCG	59	161	NM_001256556.1	1,96	-3,42	0,99
<i>CPT1A</i>	CGTCGCTCGCTCACTCGG CGGAGGTCGATCCCATCTGGA	60	137	NM_001304989.2	2,07	-3,16	0,98
<i>CRP</i>	GGCCAGACAGACTTGCATAAGAAGG GGGTTCCGGCCAGCTCTGTG	60	142	NM_001144097.1	1,96	-3,43	1,00
<i>DDIT3</i>	AGTCACTGCCTTTCTCCTTC TCTTCCTCCTTGTTTCCAGG	59	133	NM_001078163.1	1,92	-3,53	0,99
<i>DNAJC3</i>	GTACGAAGGTGCTGAATGTG ATCAGGGTCACCATCTACTG	59	133	NM_174756.3	1,92	-3,54	0,99

Gen	Sequenz Forward (5' → 3') Reverse (5' → 3')	T _A , °C	Produkt- länge, bp	NCBI Genbank	Primer- effizienz	Steigung	Bestimmt- heitsmaß
<i>EDEM1</i>	CCCCTACCCTCGGGTGAATCT GTGGAATCCCCCAGCAGTCG	60	126	NM_001103092.2	1,91	-3,54	0,99
<i>FASN</i>	GCTGAGCCTGATGCGTCTGAGC GGATGGCAGTGAGGCTCACGAA	64	138	NM_001012669.1	1,96	-3,41	0,99
<i>FGF21</i>	TGTGGGTCCCTGTGCTGGCT CCACTGTGCCATCGGCCCTG	65	171	XM_001789587.1	1,89	-3,63	0,99
<i>GPAT</i>	GGTGTAAGCATGCCACCGAG CAGCACCTTCCCACAAAGGG	60	124	NM_001012282.1	1,89	-3,63	0,99
<i>GPX1</i>	GCTCTGGATTCGGAAACGGA GAGGACAGGTTGAAGGGCTC	59	134	NM_174076.3	1,89	-3,61	1,00
<i>HERPUD1</i>	CCGTGTTTCTCAGTATCCTC TCTTGATTCACAGCCTCCTG	59	169	NM_001102265.2	1,96	-3,42	0,99
<i>HMGCL</i>	AGAAGCCACCAGCTTCGTGT GCGACTTTAGCCGGGGAGAT	60	345	NM_001075132.1	1,89	-3,61	1,00
<i>HMGCS2</i>	GCCCAATATGTGGACCAAAC ATGGTCTCAGTGCCCACTTC	60	209	NM_001045883.1	1,91	-3,56	1,00

Gen	Sequenz Forward (5'→ 3') Reverse (5'→ 3')	T _A , °C	Produkt- länge, bp	NCBI Genbank	Primer- effizienz	Steigung	Bestimmt- heitsmaß
<i>HP</i>	TGAGGCAGTGTGCGGGAAGCC AGCGTGGCTCCCGAGATGAGGTT	60	138	NM_001040470.2	1,93	-3,51	0,98
<i>HSPA5</i>	CAAGTTGATGTTGGAGGTGG AAGCCTCAGCAGTTTCCTTC	59	94	NM_001075148.1	1,89	-3,62	0,98
<i>IL-1β</i>	GCAGCTGGAGGAAGTAGACCCC TGTCCCAGGAAGACGGGCCTTT	60	168	NM_174093.1	2,09	-3,12	1,00
<i>IL-8</i>	CTGCAGTTCTGTCAAGAATGA CTCTTCACAAATACCTGCACA	56	220	NM_173925.2	1,99	-3,35	0,99
<i>MT1A</i>	ATCCGACCAGTGGATCTGCTTTGCC AGACACAGCCCTGGGCACACT	63	209	NM_001040492.2	1,98	-3,37	0,99
<i>MTTP</i>	GCACCGAGAGCGTTATCCTCCA GGAGTGTGGTGGCGGCAAGG	64	378	NM_001101834.1	1,96	-3,42	1,00
<i>NQO1</i>	GGTGCTCATAGGGGAGTACGC CGGGAGTGTGCCCAATGCTAT	60	236	NM_001034535.1	1,90	-3,59	0,99
<i>PDIA4</i>	AGGTTTGACGTGAGTGGCTA CATCGAAGTTGTCCTTGGTC	59	175	NM_001045879.2	2,04	-3,23	0,99

Gen	Sequenz Forward (5'→ 3') Reverse (5'→ 3')	T _A , °C	Produkt- länge, bp	NCBI Genbank	Primer- effizienz	Steigung	Bestimmt- heitsmaß
<i>PTGS2</i>	CGCACCTCACCAAACGGTC ACTGCTAGGCTTCTACAGTTCGG	60	116	NM_174445.2	1,92	-3,53	1,00
<i>RBP4</i>	GGGCGTAGCGTCCTTTCTCC GGGTCTCGGGCAAACACGAA	60	150	NM_001040475.2	1,98	-3,38	1,00
<i>SAA3</i>	CCTCAAGGAAGCTGGTCAAGGGGCT CAGGCACCCCCAGGTCCCCT	61	141	NM_181016.3	1,94	-3,47	0,99
<i>SLC27A1</i>	CTGAGGTGGAAGGCGTGCTA TCCTCGTACAGTGCGTTGGG	60	148	NM_001033625.2	2,10	-3,11	0,98
<i>SOD1</i>	TGTTGCCATCGTGGATATTG CAGCGTTGCCAGTCTTTGTA	56	143	NM_174615.2	1,92	-3,54	1,00
<i>SREBF1</i>	AACGCCATCGAGAAACGCTA CTTTTGTGGACAGCAGTGCG	59	197	NM_001113302.1	1,91	-3,55	1,00
<i>TNF</i>	GCCCCAGGGCTCCAGAAGTT GCCACCTGGGGACTGCTCTTCC	64	134	NM_173966.3	1,91	-3,56	0,98
<i>TTR</i>	TCACTTGGCATCTCCCCGTTC AGGGCGGTGGTAGAGTAGGAG	59	122	NM_173967.3	1,97	-3,39	1,00

Gen	Sequenz Forward (5'→ 3') Reverse (5'→ 3')	T _A , °C	Produkt- länge, bp	NCBI Genbank	Primer- effizienz	Steigung	Bestimmt- heitsmaß
<i>UGT1A1</i>	GCTCGTCAAGTGGCTGCCCCA TCCCCGGGTCTCCATGCGCT	61	175	NM_001105636.1	1,89	-3,63	1,00
<i>XBP1s</i>	GCTGAGTCCGCAGCAGGTG AGGGATGGAGAAGGGGAGGC	61	236	NM_001271737.1	2,08	-3,15	0,99

T_A = Annealingtemperatur; ACACA = Acetyl-CoA Carboxylase α , ACADM = Acyl-CoA Dehydrogenase *medium chain*, ACAT1 = Acetyl-CoA Acetyltransferase 1, ACOX1 = Acyl-CoA Oxidase 1, ApoB = Apolipoprotein B, ATF4 = Activating Transcription Factor 4, BAK1 = BCL2-Antagonist/killer 1, BAX = BCL2 Associated X, Apoptoseregulator, CASP3 = Caspase 3, CASP8 = Caspase 8, CP = Ceruloplasmin, CAT = Catalase, CCL2 = *C-C motif chemokine ligand 2*, CPT1A = Carnitin Palmitoyltransferase 1A, CRP = C-reaktives Protein, DNAJC3 = *DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C3*, DDIT3 = *DNA-damage-inducible transcript 3*, EDEM1 = *ER degradation enhancing alpha-mannosidase like protein 1*, EEF1A1 = *Eukaryotic translation elongation factor 1 Alpha 1*, FASN = Fettsäuresynthase, FGF21 = *fibroblast growth factor 21*, GPAT = Glycerol-3-phosphate Acyltransferase mitochondrial, GPX1 = Glutathionperoxidase 1, H3F3A = *H3 histone family member 3A*, HERPUD1 = Homocysteine inducible *ER protein with ubiquitin like domain 1*, HMGCL = 3-Hydroxymethyl-3-methylglutaryl-CoA Lyase, HMGCS2 = 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Synthase 2, HP = Haptoglobin, HSPA5 = *heat shock protein family A (Hsp70) member 5*, IL-1 β = Interleukin 1 beta, IL-8 = Interleukin 8, MT1A = Metallothionein-1A, MTTP = Microsomal Triglyceride Transfer Protein, NQO1 = *NAD(P)H-Quinon oxidoreductase 1*, PDIA4 = *protein disulfide isomerase family A, member 4*, PTGS2 = *prostaglandin-endoperoxide synthase 2*, RBP4 = retinol-bindendes Protein 4, RPL12 = *Ribosomal protein L12*, SAA3 = Serum Amyloid A 3, SLC27A1 = *solute carrier family 27 (Fettsäuretransporter) member 1*, SOD1 = Superoxid-Dismutase 1, SREBF1 = *Sterol regulatory element binding transcription factor 1*, TNF = Tumor Nekrose Faktor, TTR = Transthyretin, UGT1A1 = UDP-Glucuronosyltransferase familiy1(A1), XBP1s = *X-box binding protein 1, spliced*.

2.2 Tierversuch

In Kooperation mit der Lehr- und Versuchsanstalt für Viehhaltung, Hofgut Neumühle in Münchweiler an der Alsenz wurde im Bereich Rinderhaltung unter der Leitung von Herrn Dr. Koch ein Fütterungsversuch durchgeführt. Der Versuch fand in dem Zeitraum von Juni 2015 bis Dezember 2016 statt. Der Versuch wurde von der zuständigen Veterinärbehörde des Landesuntersuchungsamts Rheinland-Pfalz genehmigt (Aktenzeichen 23 177-07/G 15-20.040) und fand unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes statt.

2.2.1 Versuchstiere, Fütterung und Versuchsdesign

Für den Versuch standen 30 multipare Tiere der Rasse Deutsch Holstein mit einer mittleren Laktationsnummer von $3,06 \pm 1,31$ zur Verfügung. Die Tiere wurden in zwei Gruppen mit jeweils 15 Tieren (Kontroll- und Behandlungsgruppe) eingeteilt. Ein Unterschied in der Vorlaktationsleistung war nicht vorhanden (Tabelle 2). Dabei wurden die Parameter Milchmenge, Milchfettgehalt, Milchproteingehalt, Ausgangsgewicht und die Laktationsnummer der Tiere berücksichtigt. Im Mittel wog die Kontrollgruppe 3 Wochen vor der Kalbung 768 ± 73 kg mit einem mittleren *Body Condition Score* (BCS) von $3,70 \pm 0,44$ und einer mittleren Laktationsnummer von $2,80 \pm 1,01$. Die Behandlungsgruppe wog 3 Wochen a.p. im Mittel 777 ± 79 kg mit einem mittleren BCS von $3,46 \pm 0,32$ und einer mittleren Laktationsnummer von $3,33 \pm 1,54$.

Die Tiere wurden in einem Liegeboxenlaufstall mit Tiefboxen gehalten. Verwiegetröge in dem Liegeboxenlaufstall ermöglichten eine Aufzeichnung der tierindividuellen Trockenmasseaufnahme. Eine Befüllung der Tröge fand täglich (7.00 Uhr) durch einen selbstfahrenden Futtermischwagen statt. Ein Selektionsgang nach dem Melken ermöglichte es, die Tiere zu separieren und dadurch ein kontrolliertes Verabreichen des Zusatzfutters für den Fütterungsversuch sicherzustellen. Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung. Fünf Tage vor und nach der Abkalbung wurden die Kühe separat in einer Abkalbebox bzw. Strohbox aufgestallt, wo keine Aufzeichnung der Trockenmasseaufnahme erfolgte.

Der Versuchszeitraum begann sieben Tage vor der Kalbung und dauerte bis 50 Tage nach der Kalbung an. Bereits ab Tag 21 a.p. wurde eine Totale Misch Ration (TMR) nach den Empfehlungen der Gesellschaft für Ernährung (GfE 2001) zur Deckung des Energie- und Proteinbedarfs einer trockenstehenden Kuh mit einem Körpergewicht von 650 kg und einer Trockenmasseaufnahme von 12 kg/Tag(d) bereit gestellt. Nach der Kalbung wurde die TMR angepasst auf den Energie- und Proteinbedarf einer Milchleistung von 34 kg/d und einer Trockenmasseaufnahme von 22 kg/d nach den Versorgungsempfehlungen der GfE (2001, Tabelle 3). Es erfolgte eine Aufzeichnung der tierindividuellen Trockenmasseaufnahme mit Ausnahme des Zeitraums um den Abkalbetermin. In einem zweiwöchigen Rhythmus wurden Einzelfuttermittelproben der TMR an der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt (LUF) in Speyer nach VDLUFA-Methoden (VDLUFA 2007 und 2011) analysiert. Anhand der Inhaltsstoffe der Einzelfuttermittel wurde die TMR so zusammengestellt, dass eine gleichbleibende Zusammensetzung der Inhaltsstoffe gewährleistet werden konnte. Eine Mineralisierung erfolgte über Zusatz von Mineralfutter in eine Krafftuttermischung als Prämix des Laktationsfutters. Über die ersten zehn Laktationstage bekamen alle Kühe zusätzlich 250 mL Propylenglycol (Raiffeisen Waren-Zentrale, RWZ Rockenhausen) als Ketoseprophylaxe oral verabreicht.

Tabelle 2: Milchleistung und Milchzusammensetzung der Vorlaktation von Kühen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe (GTE) über die Gesamtlaktation von 305 Tagen¹

	Kontrolle	GTE	SEM	P-Wert
Milchleistung, kg/d	10.153,5	10.788,2	485,8	0,20
Fettgehalt, %	3,86	3,73	0,12	0,29
Proteingehalt, %	3,21	3,18	0,06	0,58
Fett, kg	392,1	402,4	21,3	0,63
Protein, kg	325,8	342,5	15,2	0,28

¹ Werte sind *Least-Square-Means* und Standardfehler der Mittelwerte, $n = 15$ pro Gruppe.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Totalen Mischration über die Zeit des Trockenstehens und der Laktation

	Trockensteher	Laktation
<i>Komponente, % TM</i>		
Pressschnitzel	-	14,5
Grassilage	37,7	24,4
Luzernenheu	-	1,4
Stroh	2,3	2,8
Heu	6,9	4,1
Maissilage	37,8	18,3
Krafftuttermischung ¹	14,1	34,6
Calciumcarbonat (Kalkfels)	-	0,06
Harnstoff	0,5	-
Mineralfutter K11 ²	0,8	-
Futterfett	-	0,9
<i>Energie und Inhaltsstoffe</i>		
ME, MJ/kg TM	10,5	10,9
NEL ³ , MJ/kg TM	6,4	7,0
Rohprotein, % TM	13,2	17,1
nXP ³ , % TM	13,8	15,7
Rohfaser, % TM	20,6	17,5
NDF, % TM	38,2	33,3
ADF, % TM	22,3	21,0
RNB ^{3,4} , g/kg TM	-1,0	2,3

	Trockensteher	Laktation
Calcium, g/kg TM	3,7	6,5
Phosphor, g/kg TM	3,5	4,4
Magnesium, g/kg TM	2,6	2,4
Natrium, g/kg TM	0,8	2,1
Kalium, g/kg TM	9,5	10,7

TM = Trockenmasse, ME = Metabolisierbare Energie, NEL = Nettoenergielaktation, nXP = nutzbares Rohprotein, NDF = Neutrale Detergenzfaser, ADF = Saure Detergenzfaser, RNB = Ruminale Stickstoffbilanz; ¹ Mischfutter der Firma Raiffeisen Waren-Zentrale Rhein-Main eG (Köln) bestehend aus (in Frischmasse): 6,7 MJ/kg NEL, 13,6 g/kg RNB, 174 g/kg nXP, 96 g/kg Rohfaser, 7,4 g/kg Calcium, 6,2 g/kg Phosphor, 5,2 g/kg Natrium, 3,1 g/kg Magnesium, 11,6 g/kg Kalium, 19.000 IU/kg Vitamin A, 88 mg/kg Vitamin E, 2.375 IU/kg Vitamin D3, 236 mg/kg Eisen, 109 mg/kg Mangan, 15 mg/kg Mangan(organisch), 161 mg/kg Zink, 23 mg/kg Zink(organisch), 39,9 mg/kg Kupfer, 7,0 mg/kg Kupfer(organisch), 0,9 mg/kg Molybdän, 1,9 mg/kg Jod, 1034 µg/kg Kobalt, 780 µg/kg Selen, 120 µg/kg Selen(organisch); ² Vormischung bestehend aus: 9,0 % Calcium, 9,0 % Phosphor, 9,0 % Natrium, 10,0 % Magnesium, 1.000.000 I.E Vitamin A, 150.000 I.E Vitamin D3, 6.000 mg Vitamin E (DL-Alpha-Tocopherolacetat), 10.000 mg Zink als Zinkoxid, 6.000 mg Mangan als Mangan-(II)-oxid, 1.500 mg Kupfer als Kupfer-(II)-sulfat, Pentahydrat, 60 mg Kobalt als basisches Kobalt-(II)-carbonat, 200 mg Monohydrat, Jod als Calciumjodat, wasserfrei, 53 mg Selen als Natriumselenit (RINDAMIN K11 ATG, Schaumann, Pinneberg, Deutschland); ³ berechnet nach GfE (2001); ⁴ Ruminale Stickstoffbilanz = (Rohprotein – nutzbares Rohprotein)/6,25.

Die Tiere der Versuchsgruppe (n = 15) bekamen in der Zeit von 7 Tagen vor dem berechneten Abkalbetermin bis 7 Tage p.p. GTE zusätzlich zur TMR gefüttert (Abb. 4). Dabei wurden vor der Kalbung 10 g GTE in 500 g Krafffutter gemischt und den Tieren nach dem Melkvorgang per Hand verfüttert, um zum einen die Tiere an das Präparat zu gewöhnen und zum anderen zu Beginn des Versuchs einen Plasmaspiegel von Polyphenolen oder deren Metaboliten zu erstellen. Nach der Kalbung wurde die Dosis auf 20 g GTE erhöht. Da einige Kühe nicht am errechneten Kalbetermin kalbten, betrug die tatsächliche Anzahl der Tage, an denen die Kühe GTE a.p. erhielten, $7,7 \pm 4,3$ Tage a.p. mit einer Spanne von 2 bis 16 Tagen. Die Kontrolltiere bekamen die gleiche Menge Krafffutter gefüttert ohne den GTE. Der GTE wurde von der Firma Plantextrakt GmbH & Co. KG (Artikelnummer 285123, 12. Mai 2015) bezogen. Es handelte sich bei dem Präparat um einen sprühge-

trockneten Extrakt, hergestellt aus Grünem Tee. Der Hersteller garantiert einen Mindestgehalt von 30 % Catechinen in dem Produkt. Des Weiteren enthält das Produkt 5 bis 10 % Coffein.

Der totale Phenolgehalt im GTE wurde in Doppelbestimmung durch Zugabe von Aceton extrahiert und nach einer Farbreaktion mit 2N Folin-Ciocalteu's Phenol Reagenz am Photometer über lineare Regression (0 bis 10 µg Gallussäure-äquivalent (GAE)/mL) mit Gallussäure gemessen (Singleton und Rossi 1965, Makkar 2003a). Der verwendete GTE beinhaltet 35,0 % GAE Totale Phenole in TM, davon 25,45 % GAE Tannine und 9,55 % GAE nicht-Tannin Phenole. Die Bestimmung der TM erfolgte nach offizieller Methode der VDLUFA (2007).

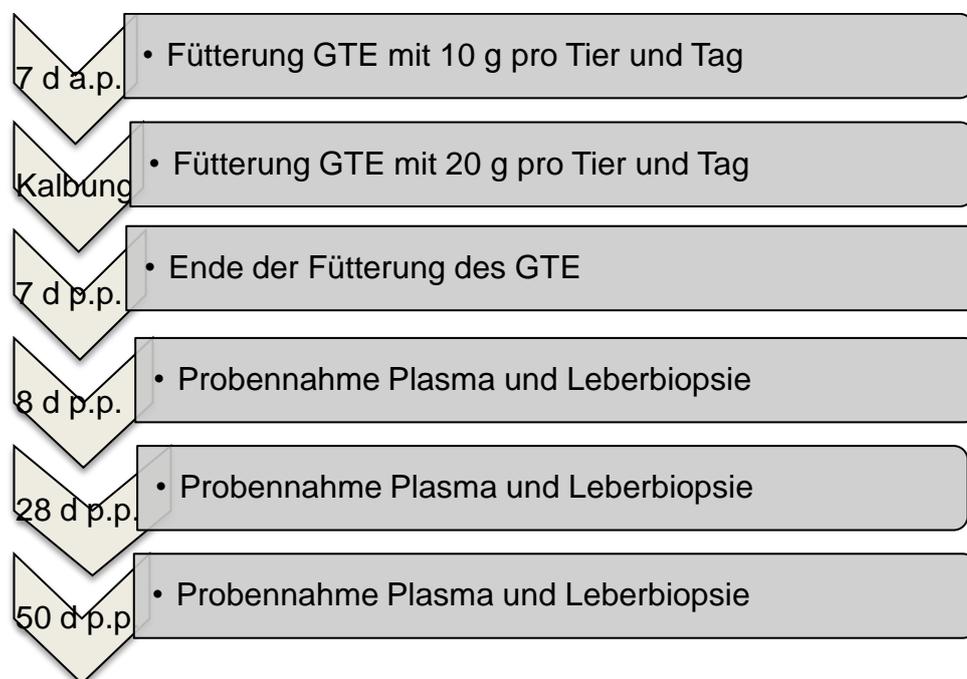


Abb. 4: Versuchsdesign des Fütterungsversuches von Grüntee-Extrakt (GTE) bei Deutsch Holstein (d Tage, a.p. *ante partum*, p.p. *post partum*)

2.2.2 Datenerhebung und Probenentnahme

Zweimal täglich wurden die Kühe in einem kombinierten Achter Fischgräten- und Zehner Side-by-Side Melkstand mit dem Melksystem der Firma GEA Farm Technologies gemolken. Dabei erfasste das Managementsystem Dairy Plan C21 von GEA die tägliche tierindividuelle Milchmenge automatisch. Neben der Milchmenge wurden auch die folgenden Merkmale zum Fressverhalten erfasst: Anzahl und Dauer

der Besuche sowie Frischmasseaufnahme. Die Trockenmasseaufnahme wurde aus der Frischmasseaufnahme und dem Trockenmassegehalt des Futters errechnet. Auf Grund von Fehlern bei der Einzeltiererkennung, Milchmengenmessung, Datenspeicherung oder Systemstörungen sowie während der Biestmilchphase und eventueller Erkrankungs- bzw. Behandlungszeiten, in denen die Kühe nicht in der Herde gemolken werden konnten, kam es vereinzelt zu fehlenden Daten. Daher wurde an solchen Tagen die Leistung über eine Berechnung der durchschnittlichen täglichen Leistung aus vorliegenden Daten des Tieres ergänzt.

Zusätzlich zu den Leistungsdaten des betriebseigenen Herdenmanagementsystems war die 305-Tage-Leistung über die Milchleistungsprüfung nach dem internationalen Regelwerk der „ADR-Richtlinie 1.1 für das Verfahren der Durchführung der Milchleistungs- und Qualitätsprüfung bei Rindern“ (ADR 2001) berechnet worden.

Die Milchinhaltsstoffe wurden aus wöchentlichen Milchproben bestimmt, welche abends und am darauffolgenden Morgen aliquot gezogen und anschließend gepoolt wurden. Die mit Bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol) versetzten Milchproben wurden mit Hilfe von Infrarotspektrophotometrie des Milko Scan FT6000 im Labor des Landeskontrollverbandes Rheinland-Pfalz-Saar (Bad Kreuznach, Deutschland) auf ihren Fett-, Protein-, Laktose- und Harnstoffgehalt sowie auf Zellzahl hin untersucht. Die Milchinhaltsstoffe Fett, Protein und Laktose wurden ebenfalls im Rahmen der Milchleistungsprüfung erfasst. Die Energie-korrigierte Milchleistung (ECM) wurde nach GfE (2001) mit einem zugrunde gelegten Fettgehalt von 4,0 % und einem Proteingehalt von 3,4 % wie folgt berechnet:

$$\text{ECM(kg)} = \text{Milch(kg)} * \left[\frac{0,38 * \text{Fettgehalt (\%)} + 0,21 * \text{Proteingehalt (\%)} + 1,05}{3,28} \right]$$

Die Energiebilanz wurde aus der Differenz von Energieaufnahme und Energiebedarf für Erhaltung und Leistung berechnet. Für die Leistung wurde der Faktor 3,3 MJ NEL/kg verwendet auf Basis von einem mittleren Energiegehalt der Milch von 3,1 MJ/kg und einem mittleren Fettgehalt von 4,0 % (Kirchgeßner 2004).

Energiegehalt der Milch (MJ/kg)=0,38*Fettgehalt(%)+0,21*Proteingehalt(%)+0,95

Energiebilanz (MJ NEL/d)=Nettoenergieaufnahme -
0,293*Gewicht (kg)^{0,75} +
3,3 MJ NEL/kg*Energie-korrigierte Milchmenge(kg/d)

Nach Durchlaufen des Melkstandes erfasste eine Tierwaage das Gewicht der Tiere.

Blut- und Leberproben wurden zu den Zeitpunkten 8 d p.p., 28 d p.p. und 50 d p.p. gezogen (Abb. 4, S. 50). Die Gewinnung der Blutproben erfolgte nach dem Morgenmelken ab 7.00 Uhr aus der Halsvene (*Vena jugularis*) mit 10 mL Blut in EDTA-Monovetten. Die Blutproben wurden anschließend bei 1.800 g für 10 min zentrifugiert und das gewonnene Plasma bei -20° C gelagert.

Für die Leberbiopsie wurden die Tiere zunächst im Fressgitter fixiert, die Hautstelle zwischen der 11. und 12. Rippe auf der rechten Seite der Kuh auf der Linie zwischen proximalem Ende der Elle (*Olecranon*) und Hüfthöcker (*Tuber coxae*) rasiert und desinfiziert. Anschließend wurde den Tieren 5 mL Isocain subkutan zur lokalen Betäubung injiziert. Mit einem Skalpell erfolgte eine kleine Inzision, um anschließend etwa 200 mg Lebergewebe mit einer sterilen Biopsienadel entnehmen zu können. Die Proben wurden unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80° C gelagert. Nach der Biopsie fand an der punktierten Stelle mit antiseptischen Spray (Oxytetracycline spray blue) eine Nachbehandlung statt und einmalig eine Verabreichung von Schmerzmittel (Rifen). Es folgte eine Überwachung der Körpertemperatur über die nächsten drei Tage.

2.2.3 Analyse von Fettstoffwechselfparametern

2.2.3.1 Triacylglyceride und Cholesterol

In den Leber- und Plasmaproben der Tiere wurden zu den unterschiedlichen Beprobungszeitpunkten die TAG- und die Chol-Konzentration über eine enzymatische Messung mittels Testkit Fluitest[®] TG (Analyticon) bzw. Fluitest[®] CHOL (Analyticon) bestimmt. Das TG-Reagenz beinhaltet die Enzyme Lipoproteinlipase, Glycerolkinase und Glycerol-3P-Oxidase, welche in mehreren Schritten aus TAG Wasserstoffperoxid freisetzen. Dieses bildet über einen weiteren Reaktionsschritt eine photometrisch detektierbare Phenazonverbindung. Mit Hilfe des Chol-Testkit entsteht ebenfalls über mehrere Reaktionsschritte das Produkt Wasserstoffperoxid, welches mit einem weiteren Substrat des Testkits einen roten, photometrisch detektierbaren Farbstoff (Chinonimin) entstehen lässt.

Es wurden 0,075 g gefrorene Leber (-80° C) in 2 mL Reaktionsgefäße mit 1,5 mL n-Hexan:Isopropanol (3:2, vol/vol, Hara und Radin 1978) mittels Tissuelyser bei 30 Hz für 3 min homogenisiert und anschließend unter ständigem Schwenken und Lichtausschluss über Nacht inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 1.900 g, Raumtemperatur) wurde der Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Ein entsprechender Teil des Leberextraktes wurde bei 37° C unter Stickstoffzufuhr eingedampft und in 25 µL Triton X-100:Chloroform (1:1) aufgenommen (De Hoff et al. 1978, Eder und Kirchgeßner 1994). Zur vollständigen Verflüchtigung des Chloroforms wurden die Proben über Nacht offen unter einem Abzug gelagert und am nächsten Tag für eine Stunde bei 45° C in den Zentrifugalverdampfer gestellt. Der Rückstand der Lipidextraktion wurde mit 500 µL TG- bzw. Chol-Reagenz versetzt, gemischt und 15 min bei 37° C inkubiert. Nach erneutem Mischen erfolgte die photometrische Messung mit Cary 50 und der Software Cary WinUV - *Advanced Reads 3.0* bei 500 nm. Standard (Reagenz 4, Analyticon), Blindwert (reines Reaktionsreagenz 1) und eine Kontrolle (Contronorm, Analyticon) wurden stets mitgeführt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach linearer Regression.

Die Konzentrationen von TAG und Chol in den Plasmaproben wurden nach Angaben des Testkits in Einfachbestimmung gemessen. Es wurden 50 µL Probenvolumen eingesetzt und das Volumen des Reagenz auf 500 µL angepasst. Standard, Blindwert und Kontrolle wurden mitgeführt. Die Messung und Auswertung erfolgte

analog zu den Lipidextrakten der Leber. Die intra-Koeffizienten der durchgeführten Analysen (n) betragen: 10,2 % für TAG in der Leber (n = 4), 7,2 % für Chol in der Leber (n = 3), 4,8 % für TAG im Plasma (n = 3) und 6,0 % für Chol im Plasma (n = 3).

2.2.3.2 Nicht-veresterte Fettsäuren und β -Hydroxybutyrat

Die Bestimmung der NEFA-Konzentration in den Plasmaproben erfolgte mittels Testsatz (Wako Chemicals). Das Prinzip beruht darauf, dass NEFA durch Acyl-CoA Synthetase und den Coenzymen Adenosin-5-Triphosphat-Dinatriumsalz (ATP) und CoA zu Acyl-CoA, AMP und Phosphorsäure umgesetzt werden. Acyl-CoA kann von Acyl-CoA-Oxidase weiter zu 2,3-trans-Enoyl-CoA und Wasserstoffperoxid umgewandelt werden. Mit Hilfe der Peroxidase, 3-Methyl-N-(β -Hydroxyethyl)-Anilin und 4-Aminoantipyrin kann durch oxidative Kopplung ein blau-violetter Farbstoff gebildet werden. Dieser ist photometrisch bei 546 nm messbar. Die Analyse der NEFA-Konzentration im Plasma erfolgte in Einfachbestimmung nach Herstellerprotokoll. Zur Berechnung der NEFA-Konzentration wurde eine Kalibrationsgerade (0 bis 1000 μ M) aus einer 1 mM Stammlösung und destilliertem Wasser angefertigt.

Die Bestimmung der BHBA-Konzentration im Plasma erfolgte mittels Testkit (Wako Chemical), welcher auf einer zyklisch-enzymatischen Methode basiert. In Gegenwart von Acetoacetatdecarboxylase wird zunächst vorhandenes sowie in der Reaktion von BHBA-Dehydrogenase neu entstandenes Acetoacetat zu Aceton abgebaut. Anschließend wird BHBA von BHBA-Dehydrogenase zu Acetessigsäure und Thio-NADH umgewandelt. Die Umsatzrate der Bildung von Thio-NADH kann photometrisch bei 405 nm gemessen werden und daraus Rückschlüsse auf die BHBA-Konzentration gemacht werden. Die Analyse der BHBA-Konzentration im Plasma erfolgte in Einfachbestimmung nach Herstellerprotokoll. Es wurde eine Kalibrationsgerade (0 bis 300 μ M) aus einer 300 μ M Stammlösung und physiologischer Kochsalzlösung erstellt. Die BHBA-Konzentration wurde über lineare Regression errechnet. Die intra-Koeffizienten der durchgeführten Analysen (n) betragen: 2,0 % für NEFA (n = 5) und 2,4 % für BHBA (n = 4).

2.2.4 Analyse von Parametern des antioxidativen Systems und von Retinol

2.2.4.1 Retinol, β -Carotin, α - und γ -Tocopherol

Mit Hilfe der *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) wurden die Konzentrationen von β -Carotin, Retinol, α - und γ -Tocopherol im Plasma analysiert. Die Einstellungen zur HPLC sind nachfolgender Tabelle zu entnehmen (Tabelle 4). Die Schritte der Probenextraktion erfolgten auf Grund der Lichtempfindlichkeit von Vitaminen und β -Carotin unter Lichtausschluss. Die Messungen fanden in braunen Gefäßen in Doppelbestimmung statt. Zur Qualitätssicherung wurden täglich eine Poolprobe und ein Blindwert neu erstellt und mitgeführt.

Zunächst wurde die Genauigkeit zweier unterschiedlicher Extraktionsmethoden überprüft, das direkte Ausschütteln (modifiziert nach Höhler et al. 1998, Kand'ár et al. 2013) und die Verseifung nach Balz et al. (1993). Dabei erwies letztere Methode eine höhere Reproduzierbarkeit. Hierfür wurden 200 μ L Plasma mit 1000 μ L Ethanol, welches 1 % Pyrogallol als Oxidationsschutz enthielt, und 150 μ L gesättigte Natronlauge für 30 min im Thermoblock bei 70° C unter Stickstoffatmosphäre verseift. Anschließend wurden die Proben mit 2 mL Hexan (0,05 % BHT) und 1 mL bidest. Wasser versetzt, gewirrt und für 5 min bei 10° C und 21.000 g zentrifugiert. Nach Erreichen der Raumtemperatur wurden 600 μ L der Hexanphase für die Konzentrationsbestimmung von Retinol und Tocopherol bzw. 200 μ L für die von β -Carotin abgenommen. Der restliche Überstand wurde als Rückstellprobe bei -80° C gelagert. Für die Retinol- und Tocopherolmessung wurde die Hexanphase bei 40° C unter Stickstoff eingedampft, in Methanol mit 0,05 % BHT aufgenommen und mittels HPLC gemessen. Für die β -Carotin-Bestimmung wurde die Hexanphase direkt eingespritzt. Die Konzentrationen von Retinol, α - und γ -Tocopherol sowie β -Carotin in den Plasmaproben wurden mittels linearer Regression berechnet. Die intra-Koeffizienten der durchgeführten Analysen (n) betragen: 4,2 % für Retinol (n = 2), 3,4 % für β -Carotin (n = 3), 4,4 % für α -Tocopherol (n = 2) und 8,1 % für γ -Tocopherol (n = 2).

Tabelle 4: HPLC-Parameter zur Bestimmung von Retinol, Tocopherolen und β -Carotin im Plasma

Parameter	Einstellung
<i>Bestimmung Retinol und Tocopherole</i>	
Pumpe	L-7100 (LaChrom)
Säulenofen	L-7360 (LaChrom), Jet Stream Plus
Autosampler	L-7200 (LaChrom)
Detektor	Fluorescence Detector L-7480 (LaChrom)
Auswertung	EZChrom Elite Version 3.3.1
Säule	Phenomenex Luna 5 μ C18(2); 150*4,6mm (S/No 681886-19)
Vorsäule	RP18e (Merck 50962), 4-4, 5 μ m
Detektoreinstellung	Retinol = EM 475 nm; EX 325 nm Tocopherole = EM 325 nm; EX 295 nm
Fließmittel	MeOH/H ₂ O 98+2
Probenschleife/Injektionsvolumen	100 μ L/50 μ L
Flow	1,5 mL/min
Druck	60 bar
Temperatur Säulenofen	40° C
Analysenzeit	7,6 min
Retentionszeiten	Retinol: 2,0 min, Tocopherol (delta): 4,0 min, Tocopherol (gamma): 5,0 min, Tocopherol (alpha): 5,7 min

Parameter	Einstellung
<i>Bestimmung β-Carotin</i>	
Pumpe	L-2130
Säulenofen	Jetstream Plus
Autosampler	L-2200
Detektor	UV-VIS-Detektor L-2420
Auswertung	EZChrom Elite Version 3.3.1
Säule	LiChroCART DIOL 125-4 (Art.Nr. 50826)
Vorsäule	LiChroCART DIOL 4-4 (Art.Nr. 50960)
Detektoreinstellung	Wellenlänge: 455 nm
Fließmittel	Hexan (0,05 % ACN)/Isopropanol 90+10
Probenschleife/Injektionsvolumen	100 μ L/25 μ L Injektion
Flow	1 mLmin
Druck	23 bar
Temperatur Säulenofen	30° C
Analysenzeit	6 min
Retentionszeit	2,25 min

2.2.4.2 Trolox äquivalente antioxidative Kapazität

Die *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC) wurde nach der Methode von Re et al. (1999) gemessen. Dazu wurde 14 mM 2,2'-Azino-di-(3-Etylbenzthiazolin Sulfonat) (ABTS) mit 4,9 mM Kaliumperoxidsulfat (1+1, v/v) gemischt und für 12 h bei Raumtemperatur inkubiert, um das radikalische Kation ABTS⁺ herzustellen. Dieses besitzt eine detektierbare blau-grüne Farbe. Nach Abschluss der Reaktion zu ABTS⁺

wurde die Lösung 1:90 mit Wasser verdünnt. Die in den Proben enthaltenen Antioxidantien verursachen proportional zu ihrer Konzentration eine Unterdrückung der Färbung.

Jeweils 10 μL der Proben in Dreifachbestimmung, der Standard und ein Blindwert (Wasser) wurden auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und je 300 μL der ABTS+-Lösung hinzugegeben. Die Ansätze wurden gemischt und nach 6 min Inkubationszeit mit dem Mikroplattenleser Tecan Infinite[®] M200 bei 734 nm gemessen. Die TEAC wurde anschließend mittels linearer Regression über eine Kalibrationsgerade (0 bis 750 μM) aus dem Trolox-Standard berechnet. Der intra-Koeffizient für diese Analyse betrug 1,9 % ($n = 10$).

2.2.4.3 Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen

In den Plasmaproben wurden die Konzentrationen der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) nach einer modifizierten Methode von Sidwell et al. (1954) bestimmt. Das Reaktionsprinzip besteht darin, Carbonylverbindungen der Lipidperoxidation mit TBA zu rot gefärbten Trimethin-Farbstoffen reagieren zu lassen, deren Konzentration photometrisch bei 532 nm messbar ist.

Zur Herstellung einer Kalibrationsgeraden wurde TEP verwendet. Aus einer zunächst hergestellten Stammlösung A mit 50 μL TEP in 25 mL Ethanol/Wasser-Gemisch wurde eine Verdünnung mit 300 μL Stammlösung A in 20 mL Ethanol/Wasser-Gemisch (Stammlösung B) angesetzt.

Die Proben und die Kalibrationsgerade wurden mit TBA-Reagenz (0,6%), ortho-Phosphorsäure (0,44 M) und bidest. Wasser versetzt, anschließend für eine Stunde bei 100° C erwärmt. Das Stoppen der Reaktion erfolgte auf Eis und durch Zugabe von methanolischer Natronlauge. Die Konzentration der TBARS wurde in einem Aliquot des Überstands in Dreifachbestimmung mittels Fluoreszenz mit dem Tecan Infinite[®] M200 mit einer Exzitationswellenlänge von 532 nm und einer Emissionswellenlänge von 560 nm gemessen. Aus der Kalibrationsgerade konnte die Konzentration der TBARS errechnet werden. Der intra-Koeffizient für diese Analyse betrug 1,1 % ($n = 4$).

2.2.5 Analyse von Akute-Phase-Proteinen

Die Bestimmung der Plasmakonzentrationen der vier APP erfolgte mit spezifischen ELISA in Einfachbestimmung.

Für die Messung von SAA im Plasma wurde ein boviner ELISA (EB0015, Hölzel) verwendet. Dieser basiert auf der kompetitiven-ELISA Detektionsmethode, bei der vorhandenes SAA der Probe um Bindungsstellen an spezifischen Antikörpern konkurriert. Nach mehreren Waschschritten findet letztlich eine Enzym-Substrat Reaktion mit *Horseradish-Peroxidase* (HRP) und dem Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) statt, wodurch ein Farbprodukt entsteht. Dieses kann photometrisch bei einer Hauptwellenlänge von 450 nm und einer Nebenwellenlänge von 630 nm gemessen werden. Diese Referenzmessung wurde durchgeführt, da eine ermittelte Δ Extinktion bei ELISA-Messungen in ihrer Varianz kleiner und somit besser zur Auswertung geeignet ist. Damit können Fehler durch eventuelle Verschmutzungen reduziert werden. Die Proben wurden auf Grund ihrer unterschiedlichen Konzentration im Laufe der Analyse mit unterschiedlichen Verdünnungen (200; 50; 33,3; 25) eingesetzt. Die Durchführung der Messung der Plasmakonzentration von SAA mit ELISA erfolgte nach Herstellerprotokoll. Die Konzentration c wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta\text{Extinktion} = \frac{\text{Extinktion}_{\text{Probe}}(450 \text{ nm} - 630 \text{ nm})}{\text{Extinktion}_{\text{Blindwert}}(450 \text{ nm} - 630 \text{ nm})}$$

$$c \text{ (ng/mL)} = 10^{(\log((\Delta\text{Extinktion}) - \text{Achsenabschnitt}) / \text{Steigung})} * \text{Verdünnung}$$

Die Messung der HP-Konzentration im Plasma erfolgte mittels speziesspezifischem Sandwich-ELISA (EB0011, Hölzel). Dabei bindet in der Probe vorhandenes HP an Anti-HP-Antikörper. Nach mehreren Zwischenschritten entsteht über die Reaktion mit HRP und TMP ein bei 450 nm photometrisch messbarer Farbstoff. Die Plasmaproben wurden zunächst 1:20 verdünnt, wiederholte Messungen mit Verdünnungsfaktoren 40 oder 53 durchgeführt. Der ELISA wurde nach Herstellerprotokoll verwendet. Die Konzentration c berechnete sich wie folgt:

$$\Delta Extinction = Extinktion_{probe}(450\text{ nm} - 630\text{ nm}) \\ - Extinktion_{Blinwert}(450\text{ nm} - 630\text{ nm})$$

$$\log[c(\mu\text{g}/\text{mL})] = [\log(\Delta Extinktion) - \text{Achsenabschnitt}] / \text{Steigung}$$

$$c(\mu\text{g}/\text{mL}) = 10^{\log(c(\mu\text{g}/\text{mL}))} * \text{Verdünnung}$$

Die Konzentration von RBP 4 (E0929b, Hölzel) im Plasma wurde ebenfalls mittels kompetitiver-ELISA Detektionsmethode gemessen. Die Plasmaproben wurden 1:500 verdünnt. Die Analyse erfolgte nach Herstellerprotokoll. Die Berechnung der Plasmakonzentration von RBP gleicht der Berechnung der HP-Konzentration.

Die Konzentration des negativen APP Alb wurde im Plasma mittels Bromcresolgrünmethode (Schirardin und Ney 1972) bestimmt. Die Analyse erfolgte in Einfachbestimmung nach Herstellerprotokoll. Das verwendete Probenvolumen betrug 5 μL . Die photometrische Messung wurde mittels CaryWin bei 620 nm gemessen.

Die intra-Koeffizienten der durchgeführten Analyse (n) betragen: 9,1 % für SAA (n = 4), 10,0 % für HP (n = 3), 1,4 % für RBP4 (n = 2) und 1,8 % für Alb (n = 3).

2.2.6 Analyse der Expression von Genen des Lipidstoffwechsels, der β -Oxidation, der Inflammation und der UPR

In Leberbiopsaten von laktierenden Holsteinkühen wurden die Expressionen verschiedener Gene, welche in Zusammenhang mit dem Fettstoffwechsel, oxidativem Stress, ER-Stress oder Inflammation stehen, mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) untersucht. Dazu wurde nach RNA-Isolation zunächst komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) synthetisiert, um diese mit Hilfe genspezifischer Primer auf die Intensität der Genexpression zu testen. Hierbei lag ein Datensatz von 30 Tieren mit drei Zeitpunkten zu Grunde. Bei allen Arbeitsschritten in dieser Analyse wurde mit Sorgfalt darauf geachtet, dass die Proben nicht mit fremder RNA kontaminiert wurden. Alle verwendeten Materialien waren autoklaviert. Der Arbeitsbereich und das Besteck wurden zu Beginn und bei der Einwaage nach jedem Tier mit 70 %-igem Ethanol gereinigt. Die Proben wurden während der Bearbeitung auf Eis gehalten und zwischen den Teilschritten bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. In den nachfolgenden Schritten wurden sowohl die Proben als auch die Reagenzien, nach eventuell nötigem Auftauen, zunächst gemischt und anschließend kurz zentrifugiert.

2.2.6.1 RNA-Isolation und Konzentrationsmessung

Zur RNA-Isolation wurden 15 mg Lebergewebe mit TRIzol[®] Reagent nach Herstellerprotokoll verwendet. Anschließend folgte die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration (Nukleinsäurequantifizierung) mit dem Mikroplatten-Reader Tecan Infinite[®] M200 und dem Programm Tecan-I-Control bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm gemessen, um mit einem Verhältnis der beiden Absorptionen, die Qualität der RNA bestimmen zu können. Eine gute Qualität liegt in einem Bereich zwischen 1,8 - 2,0. Anhand der gemessenen Konzentration wurde mit einer festgelegten Zielkonzentration von 500 ng/ μL RNA ein Verdünnungsfaktor für die Probe errechnet, die RNA-Proben entsprechend verdünnt und erneut gemessen.

Neben dem Verhältnis der Wellenlängen erfolgte zusätzlich die Bestimmung der RNA-Qualität mittels Bioanalyser Agilent 2100 über die Messung der RNA-Integritätsnummer, ein Maß für den Abbau der RNA. Dazu wurde das Nano Kit Agilent RNA 6000 verwendet. Dabei sollte die Maßzahl bei zehn liegen.

2.2.6.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese ist ein selektives Umschreiben der Gesamt-RNA, wobei als Produkt ein Hybrid aus mRNA und cDNA entsteht, welches in der PCR mit genspezifischen Primern verwendet werden kann. Zur cDNA-Synthese wurde ein Ansatz von 2,4 µg RNA genutzt. Nach Verdünnung der entsprechenden Menge RNA mit vorgelegtem DEPC-Wasser wurde die Probe mit einem Mastermix bestehend aus 19,9 µL DEPC-Wasser, 10 µL 5-fach Reaction Buffer, 2,5 µL 10 mM dNTPs, 2 µL 100 µM Oligo-dT18-Primer sowie 0,6 µL des Enzyms Reverse Transkriptase versetzt. Die Proben wurden nach dem Mischen in einen Biometra Thermal Cycler für 60 min bei 42 °C eingestellt. Es folgte eine Inaktivierung für 10 min bei 70 °C und ein Herunterkühlen auf 4 °C für mindestens 10 min. Abschließend wurden die Proben 1:4 mit DEPC-Wasser verdünnt, zusätzlich ein Pool aus allen cDNA-Proben angefertigt und bei -20° C gelagert.

2.2.6.3 Primer

Die genspezifischen Primer wurden unter Nutzung von NCBI Primer-BLAST neu designt (Thornton und Basu 2011, Ye et al. 2012) und in den Programmen Beacon Designer Free Edition und UNA Fold Integrated DNA Technologies getestet (Thornton und Basu 2011). Die Primerbestellungen der Referenz- und Zielgene erfolgte über Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland). Die Primer wurden mit DEPC-Wasser zu einer Konzentration von 100 pmol/µL eluiert und bei -20 °C gelagert. Genauere Informationen zu den Primern sind aus Abschnitt 2.1.6 zu entnehmen.

Die neuen Primer wurden mit den Probenpool des Datensatzes in der PCR auf ihre Effizienz und anschließend das entstandene Produkt der Schmelzkurve in der Gelelektrophorese (2.2.6.5) auf dessen Größe getestet. Die Verdünnungsreihen der Poolproben diente zur Bestimmung einer Primereffizienz, welche idealerweise bei zwei liegt. Dies sagt aus, dass in einem Zyklus das RNA-Segment verdoppelt wurde. Die Primereffizienz berechnet sich mit folgender Formel:

$$\text{Primereffizienz} = 10^{-\frac{1}{\text{Steigung}}}$$

Die Steigung ergibt sich aus der Geraden der ct-Werte gegen den Logarithmus der Konzentration. Die Primereffizienz ist ein Qualitätsmaß des Primers und ist von der

Probenart abhängig. Sie wird zur Berechnung der Genexpression genutzt. Die ermittelten Effizienzen der verwendeten Primer sind der Tabelle 1 (Absatz 2.1.6) zu entnehmen. In der vorliegenden Arbeit wurde der theoretische Wert von zwei verwendet.

2.2.6.4 Polymerasekettenreaktion

Die PCR wurde in 0,1 mL Reaktionsgefäßen mit einem Rotorgene 6000 System durchgeführt. Jeder Lauf beinhaltete Probenpool sowie *No Template Control* (NTC). Die Verwendung der Primer erfolgte in einer Konzentration von 10 µM für den Mastermix.

Es wurden 2 µL cDNA und 8 µL eines Mastermixes, welcher aus 5 µL des Farbstoffs KAPA SYBER® FAST qPCR Universal Master Mix, 0,2 µL von je einem 10 µM *forward* und *reverse* Primer des entsprechenden Gens (2.1.6) und 2,6 µL DEPC-Wasser bestand, in das Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend erfolgte die PCR mit ca. 35 Zyklen, die sich wie folgt zusammen setzen:

1. Aktivierungsphase: 95° C für 3 min
2. Zyklus:
 - a. Denaturierung: 95° C für 5 s
 - b. Annealing: primerspezifische Annealingtemperatur (2.1.6) für 20 s
 - c. Elongation: 72° C für 1 s
3. Schmelzen: von 50° C auf 95° C, mit $\Delta 1^\circ \text{C}$ in 5 s

Je nach Anstieg der Produktkurve wurde die Zyklusphase angepasst.

2.2.6.5 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Überprüfung der Größe des in der PCR entstandenen Produktes.

Zunächst erfolgte die Herstellung eines 1,5 %-igen Gels aus 2,25 g Agarose und 150 mL des Elektrolysepuffers 1xTAE. Dazu wurde das Gemisch bis zur vollständigen Lösung der Agarose gekocht und bei einer Temperatur von 70° C mit 3 µL des DNA-Farbstoffs *GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain* versetzt, geschwenkt und

in einen mit Ethanol gereinigten Gelschlitten gegossen. Ein Kamm diente zur Herstellung von Taschen in dem Gel für die spätere Befüllung mit Proben. Nach Aushärtung folgte die Entnahme und Überführung des Gels in eine mit Puffer (1xTAE) gefüllte Kammer. Für 10 min equilibrierte das Gel darin bis die Proben mit je 7 μ L und die Leiter mit 4 μ L pro Tasche aufgetragen wurden. Die Proben wurden zuvor mit 4 μ L Ladepuffer und 10 μ L DEPC-Wasser gemischt. Die Auftrennung dauerte ca. 2 h. Die Stromspannung für das Gel betrug 120 Volt mit bis zu 150 mA. Sobald die Banden vollständig aufgetrennt waren, wurde das Gel aus der Kammer entnommen, das Ergebnis fotografiert und ausgedruckt. Anhand der Bandenhöhe ließ sich die Größe des PCR-Produkts ablesen.

2.2.6.6 Auswertung

Die Auswertung der PCR-Läufe erfolgte mit der Rotorgene Software 5.0 (Corbett Research). Mit einer Produktkurve und einem *Threshold* von 0,06 Norm. Fluoreszenz konnte ein *Cycle-Threshold*(ct)-Wert der Proben erstellt werden. Der ct-Wert gibt an, wie viele Zyklen nötig sind, bis das Fluoreszenzsignal eine bestimmte Schwelle, den *Threshold*, überwindet. An Hand der Poolverdünnungsreihe und des NTC wurde eine erste Abschätzung der Qualität des Laufes gemacht. Ein Anstieg des NTC sowohl in der Produkt- als auch in der Schmelzkurve zeigt eine Dimerbildung oder eine Verunreinigung an. Die Verteilung der Proben wurde betrachtet.

Die erhaltenen Rohdaten, die ct-Werte, wurden mit der Methode nach Vandesompele et al. (2002) normalisiert und mit dem Ausreißertest Cook's Distance bereinigt und in dem Programm R statistisch ausgewertet, wobei die Expression in Relation zur Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 8 d p.p. ausgedrückt wurde. Als Referenz dienten die drei stabilsten Gene *EEF1A1*, *H3F3A* und *RPL12*. Sie wurden über das Programm GeNorm calculation tool ermittelt. Dabei betrug die gesamte Expressionsstabilität (M-Werte) der 3 stabilsten Referenzgene 0,317 und im einzelnen M-Wert (*EEF1A1*) = 0,311, M-Wert (*H3F3A*) = 0,319 und M-Wert (*RPL12*) = 0,324 mit einem Variationswert von 0,095 gemäß GeNorm.

2.3 Statistische Auswertung

Aus den Mehrfachbestimmungen der Analysen wurden zunächst Mittelwerte mit Hilfe von Microsoft Excel 2007 gebildet. Die Daten wurden mittels Residualanalyse auf Normalverteilung durch Shapiro-Wilk getestet und die Varianzhomogenität mit Bartlett-Test überprüft. Die statistische Auswertung der Daten fand mittels einem Linear-gemischten Modell unter Verwendung der Pakete nlme, lsmeans, multcomp, lattice und predictmeans im Programm R der Version 3.4.2 (R Development Core Team 2017) statt, wobei die Kuhnummer als zufälliger Effekt, die Gruppe (Kontrollgruppe oder GTE), der Probenzeitpunkt (8 d p.p., 28 d p.p., 50 d p.p.) und die Parität (2-3 Laktationen (n = 19) oder > 3 Laktationen (n = 11)) als wiederholte Effekte eingingen. Anschließend wurde eine ANOVA durchgeführt.

Auf statistische Signifikanz wurden der Behandlungseffekt, der Zeitverlauf, deren Interaktion sowie die Parität untersucht. Das Signifikanzniveau α wurde auf 5 % festgesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Leistungsdaten

Die Auswertung der Leistungsdaten der Kühe erfolgte für den Zeitraum von 2 bis 7 Wochen nach der Kalbung (Tabelle 5). Die Trockenmasseaufnahme, die Nettoenergieaufnahme und die Milchleistung unterschieden sich nicht signifikant zwischen der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe. Eine signifikante Reduktion der ECM sowie eine tendenziell weniger stark negative Energiebilanz ($P = 0,06$) waren in der GTE-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe zu beobachten.

Die Fettmenge in der Milch war über den Zeitraum von 2 bis 7 Wochen nach der Kalbung in der Behandlungsgruppe niedriger als in der Kontrollgruppe. Die Behandlungsgruppe wies geringere Laktosegehalte in der Milch auf als die Kontrollgruppe. Eine signifikante Interaktion zwischen der Supplementation mit GTE und dem Beprobungszeitpunkt nach der Kalbung trat bei den Kühen im Fett- und Proteingehalt der Milch sowie bei der Proteinmenge der Milch auf (Tabelle 5). Der Milchfettgehalt war in den Wochen 2, 3, 5 und 6 in der Gruppe mit GTE-Supplementation niedriger als in der Kontrollgruppe (Tabelle 6). Der Milchproteingehalt unterschied sich zu den einzelnen Wochen nicht zwischen den beiden Gruppen, dennoch konnte eine Interaktion aufgezeigt werden. Im Verlauf der Versuchsdauer nahm der Proteingehalt in der Milch in der Behandlungsgruppe schneller ab als in der Kontrollgruppe. Die Proteinmenge in der Milch war in den Wochen 5 und 7 nach der Kalbung in der Gruppe mit GTE-Supplementation niedriger als in der Kontrollgruppe.

Die Leistungsparameter zeigten eine hoch signifikante Veränderung über den Zeitverlauf von Woche 2 bis Woche 7 nach der Kalbung (Tabelle 5). Aus Tabelle 6 ist zu entnehmen, dass im Verlauf der Wochen nach der Kalbung in beiden Gruppen die Trockenmasseaufnahme und die Milchleistung stetig zunahmen. Innerhalb der einzelnen Wochen unterschieden sich die beiden zuvor genannten Parameter nicht. Die ECM ($P = 0,08$) und die Fettmenge in der Milch ($P = 0,07$) wiesen in der Tendenz eine Veränderung über den Zeitverlauf auf. Die Proteinmenge der Milch blieb unverändert über den Untersuchungszeitraum.

In Betrachtung der Leistungsparameter über die gesamte Laktationsperiode von 305 Tagen waren weder in der Milchleistung noch in den Milchinhaltsstoffen Fett und Protein signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der mit GTE supplementierten Behandlungsgruppe zu beobachten (Tabelle 7).

Tabelle 5: Futteraufnahme, Milchleistung und Milchinhaltsstoffe von Kühen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe (GTE) über den Zeitraum von Woche 2 bis 7 nach der Kalbung¹

Parameter	Woche 2 - 7			P-Wert			Parität
	Kontrolle	GTE	SEM	GTE	Zeit	GTE x Zeit	
Trockenmasseaufnahme, kg/d	20,2	19,8	0,65	0,67	< 0,001	0,06	0,45
Nettoenergieaufnahme, MJ/d	140,9	138,1	4,50	0,67	< 0,001	0,06	0,45
Energiebilanz, MJ NEL/d	- 45,1	- 35,0	7,02	0,06	< 0,001	0,72	0,44
Milchleistung, kg/d	46,1	43,9	1,50	0,17	< 0,001	0,21	0,70
ECM ² , kg/d	46,6 ^a	40,7 ^b	1,68	0,002	0,08	0,91	0,53
Fettgehalt, %	4,29 ^a	3,68 ^b	0,18	< 0,001	< 0,001	0,003	0,89
Proteingehalt, %	3,05	3,08	0,07	0,92	< 0,001	0,02	0,54
Laktosegehalt, %	4,83 ^a	4,75 ^b	0,03	0,026	0,015	0,34	0,44
Fett, kg/d	1,96 ^a	1,58 ^b	0,10	< 0,001	0,07	0,13	0,74
Protein, kg/d	1,40	1,34	0,05	0,16	0,36	0,031	0,33

¹ Werte sind *Least-Square-Means* und Standardfehler der Mittelwerte, $n = 15$ pro Gruppe; ² ECM = Energie-korrigierte Milch, berechnet mit 4,0 % Fett- und 3,4 % Proteingehalt; ^{a,b} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben zeigen eine Signifikanz innerhalb des Zeitpunktes an ($P < 0,05$).

Tabelle 6: Futteraufnahme und Milchleistung über den Zeitraum von Woche 2 bis 7 nach der Kalbung von Kühen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe (GTE)¹

wk	Trockenmasseaufnahme, kg/d			Milchleistung, kg/d			Fettgehalt, %			Proteingehalt, %			Protein, kg/d		
	Kon	GTE	SEM	Kon	GTE	SEM	Kon	GTE	SEM	Kon	GTE	SEM	Kon	GTE	SEM
2	15,3	16,1	0,85	41,1	40,2	1,79	4,97 ^a	3,57 ^b	0,25	3,34	3,53	0,09	1,37	1,39	0,06
3	18,6	18,7	0,83	44,3	42,7	1,79	4,69 ^a	4,06 ^b	0,26	3,16	3,14	0,09	1,38	1,33	0,06
4	19,7	19,3	0,83	46,6	44,3	1,79	4,34	3,90	0,26	3,01	2,97	0,09	1,39	1,28	0,06
5	20,4	19,3	0,84	47,6	45,0	1,79	4,14 ^a	3,54 ^b	0,26	2,93	2,80	0,09	1,41 ^a	1,26 ^b	0,06
6	21,2	21,1	0,84	49,0	45,3	1,79	3,85 ^a	3,29 ^b	0,25	2,86	2,91	0,09	1,39	1,31	0,06
7	21,2	22,0	0,84	48,2	45,0	1,79	3,71	3,47	0,26	2,91	2,85	0,09	1,41 ^a	1,28 ^b	0,06

¹ Werte sind *Least-Square-Means* und Standardfehler der Mittelwerte, $n = 15$ pro Gruppe; ^{a,b} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben zeigen eine Signifikanz innerhalb des Zeitpunktes an ($P < 0,05$); wk = Woche.

Tabelle 7: Milchleistung und Milchzusammensetzung der aktuellen Laktation von Kühen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe (GTE) über die Gesamtlaktation von 305 Tagen¹

	Kontrolle	GTE	SEM	P-Wert
Milchleistung, kg/d	10.999,8	10.923,7	350,9	0,84
Fettgehalt, %	3,88	3,87	0,12	0,95
Proteingehalt, %	3,21	3,27	0,08	0,42
Fett, kg	430,4	427,6	16,9	0,87
Protein, kg	355,6	361,5	12,1	0,64

¹ Werte sind *Least-Square-Means* und Standardfehler der Mittelwerte, $n = 15$ pro Gruppe.

3.2 Parameter des Lipidstoffwechsels

Die TAG-Konzentration in der Leber war in der Tendenz ($P=0,07$) in der Behandlungsgruppe niedriger als in der Kontrollgruppe (Tabelle 8). Zum Zeitpunkt 28 d p.p. war die TAG-Konzentration in der Leber in der Gruppe mit GTE-Supplementation signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Ein Einfluss der Behandlung auf die Chol-Konzentration in der Leber war nicht zu beobachten. Der Faktor Zeit nahm einen hoch signifikanten Einfluss auf die hepatischen Konzentrationen von TAG und Chol, wobei die Konzentrationen von TAG und Chol zu den Zeitpunkten 8 d p.p. und 28 d p.p. höher waren als zum Zeitpunkt 50 d p.p. Eine Interaktion von Behandlung und Zeit auf die hepatischen TAG- und Chol-Konzentrationen war nicht zu beobachten.

Bei den Kühen, die GTE erhielten, waren die TAG- und Chol-Konzentrationen im Plasma niedriger als bei den Kontrolltieren (Tabelle 8). Die Behandlungsgruppe hatte zu den Zeitpunkten 8 d p.p. und 50 d p.p. signifikant niedrigere TAG-Konzentrationen im Plasma als die Kontrollgruppe. Eine Interaktion der Faktoren Behandlung und Zeit war bei der Plasmakonzentration von Chol zu beobachten, zu den beiden Zeitpunkten 28 d p.p. und 50 d p.p. waren die Plasmakonzentrationen von Chol in der Gruppe mit GTE-Supplementation niedriger als in der Kontrollgruppe. Ein Unterschied in den Konzentrationen von NEFA und BHBA im Plasma war zwischen den beiden Gruppen nicht vorhanden.

Die Plasmakonzentrationen von TAG und Chol stiegen über den Zeitverlauf an (Tabelle 8). Die Plasmakonzentrationen von NEFA und BHBA sanken von Woche eins zu Woche sieben nach der Kalbung ab (Tabelle 8).

Tabelle 8: Lipidkonzentrationen in Leber und Plasma sowie metabolische Parameter im Plasma von Kühen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe (GTE)¹

	8 d p.p.			28 d p.p.			50 d p.p.			P-Wert			
	Kon	GTE	SEM	Kon	GTE	SEM	Kon	GTE	SEM	GTE	Zeit	GTE x Zeit	Parität
Lipidkonzentration der Leber													
TAG, mg/g FM	32,8	22,6	5,60	32,9 ^a	19,7 ^b	5,60	13,3	8,3	5,70	0,07	< 0,001	0,24	0,57
Chol, mg/g FM	2,91	2,71	0,23	3,01	2,81	0,23	2,19	2,29	0,24	0,62	< 0,001	0,43	0,74
Lipidkonzentration und metabolische Parameter im Plasma													
TAG, mg/dL	8,74 ^a	7,04 ^b	0,58	9,59	8,41	0,60	11,3 ^a	8,8 ^b	0,59	< 0,001	< 0,001	0,20	0,52
Chol, mg/dL	79,9	68,8	9,35	136 ^a	116 ^b	9,48	194 ^a	158 ^b	9,43	0,003	< 0,001	0,007	0,017
NEFA, mM	0,52	0,43	0,06	0,38	0,36	0,07	0,30	0,20	0,07	0,17	< 0,001	0,48	0,66
BHBA, mM	0,97	1,03	0,15	0,98	0,88	0,15	0,68	0,68	0,15	0,87	0,004	0,68	0,71

¹ Werte sind *Least-Square-Means* und Standardfehler der Mittelwerte, $n = 15$ pro Gruppe; ^{a,b} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben zeigen eine Signifikanz innerhalb des Zeitpunktes an ($P < 0,05$); d p.p. = Tage *post partum*, TAG = Triacylglycerol, Chol = Cholesterol, FM = Frischmasse, NEFA = Nicht-veresterte Fettsäuren, BHBA = β -Hydroxybuttersäure.

3.3 Parameter des antioxidativen Systems

Für die Beurteilung des antioxidativen Status der Kühe wurden im Plasma die Konzentrationen der fettlöslichen Vitamine α -Tocopherol und γ -Tocopherol sowie von β -Carotin, TBARS und TEAC analysiert. Für die Parameter α - und γ -Tocopherol sowie β -Carotin wurden die Konzentrationen zusätzlich auf die Summe der Konzentrationen von TAG und Chol im Plasma bezogen berechnet, da fettlösliche Vitamine und β -Carotin im Plasma vorrangig in Lipoproteinen lokalisiert sind (Li et al. 2016). Bei den Tieren, die GTE erhielten, zeigte sich eine signifikante Interaktion der Behandlung mit der Zeit auf die Konzentrationen von α -Tocopherol und β -Carotin im Plasma der Milchkühe (Tabelle 9). Die Behandlungsgruppe hatte zu den Zeitpunkten 28 d p.p. und 50 d p.p. niedrigere α -Tocopherolkonzentrationen im Plasma als die Kontrollgruppe. Die β -Carotinkonzentration im Plasma unterschied sich zu allen drei Untersuchungszeitpunkten zwischen den Gruppen, wobei die Kontrollgruppe höhere Werte aufwies als die Gruppe mit GTE-Supplementation. In der Tendenz ($P = 0,056$) war eine Interaktion zwischen den Faktoren Behandlung und Zeit auf die Plasmakonzentration von γ -Tocopherol zu beobachten. Zu den Zeitpunkten 28 d p.p. und 50 d p.p. waren die Plasmakonzentrationen von γ -Tocopherol bei den Tieren, die GTE erhielten, niedriger als bei den Kontrolltieren. Bezogen auf die Summe der Konzentrationen von TAG und Chol im Plasma minderten sich die Differenzen der Konzentrationen von α - und γ -Tocopherol zwischen den beiden Gruppen, wodurch kein signifikanter Haupteffekt der Behandlung mehr vorhanden war. Bei der β -Carotinkonzentration im Plasma, bezogen auf die Summe der Konzentrationen von TAG und Chol, blieb ein signifikanter Effekt der Behandlung bestehen, allerdings war lediglich zu den Zeitpunkten 8 d p.p. und 50 d p.p. die Plasmakonzentration von β -Carotin in der Kontrollgruppe höher als in der Gruppe mit GTE-Supplementation (Tabelle 9).

Tiere, die mit GTE supplementiert wurden, zeigten in der Tendenz ($P = 0,06$) eine geringere Plasmakonzentration der TBARS als die Kontrolltiere auf (Tabelle 9). Zum Zeitpunkt 50 d p.p. war die Konzentration der TBARS im Plasma in der Behandlungsgruppe signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Bei der Plasmakonzentration der TBARS, bezogen auf die Summe der Konzentrationen von TAG und Chol im Plasma, war jedoch kein Unterschied zwischen den Gruppen zu

beobachten. Ein Unterschied der TEAC im Plasma über den Zeitraum von sieben Wochen war zwischen den beiden Gruppen nicht vorhanden (Tabelle 9).

Über die Versuchsdauer stiegen die Plasmakonzentrationen von α - und γ -Tocopherol sowie von β -Carotin an, bezogen auf die Summe der Konzentrationen von TAG und Chol im Plasma war hingegen in der α -Tocopherolkonzentration im Plasma kein Zeiteffekt vorhanden (Tabelle 9). Die Plasmakonzentration der TBARS zeigte keine Veränderung über den Zeitraum der sieben Wochen. Bezogen auf die Summe der Konzentrationen von TAG und Chol im Plasma war allerdings ein signifikanter Effekt der Zeit zu beobachten, die Plasmakonzentration der TBARS sank über die Versuchsdauer ab. Im Vergleich zu den beiden Zeitpunkten 8 d p.p. und 28 d p.p. war die TEAC zum Zeitpunkt 50 d p.p. signifikant erhöht.

Tabelle 9: Antioxidative Plasmaparameter von Kühen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe (GTE)¹

	8 d p.p.			28 d p.p.			50 d p.p.			P-Wert			
	Kon	GTE	SEM	Kon	GTE	SEM	Kon	GTE	SEM	GTE	Zeit	GTE x Zeit	Parität
α-Tocopherol, μM	5,98	4,69	0,82	10,2 ^a	7,63 ^b	0,83	14,2 ^a	10,8 ^b	0,84	0,002	< 0,001	0,011	0,63
γ-Tocopherol, μM	0,13	0,09	0,03	0,31 ^a	0,23 ^b	0,03	0,38 ^a	0,27 ^b	0,03	0,001	< 0,001	0,056	0,59
β-Carotin, μM	11,7 ^a	7,92 ^b	1,68	16,6 ^a	12,0 ^b	1,66	26,3 ^a	15,5 ^b	1,71	< 0,001	< 0,001	0,001	0,78
TBARS, μM	0,73	0,68	0,05	0,76	0,72	0,05	0,81 ^a	0,68 ^b	0,06	0,06	0,38	0,26	0,83
α-Tocopherol ² , μmol/g	6,55	6,35	0,50	7,10 ^a	6,08 ^b	0,50	7,02	6,59	0,51	0,21	0,43	0,32	0,29
γ-Tocopherol ² , μmol/g	0,14	0,12	0,02	0,20	0,17	0,02	0,19	0,17	0,02	0,13	< 0,001	0,94	0,15
β-Carotin ² , μmol/g	13,5 ^a	10,8 ^b	1,18	10,9	9,51	1,20	13,7 ^a	9,78 ^b	1,18	0,007	0,036	0,29	0,05
TBARS ² , μmol/g	0,83	0,95	0,07	0,52	0,56	0,07	0,40	0,43	0,07	0,18	< 0,001	0,45	0,19
TEAC, mM	3,50	3,67	0,14	3,70	3,79	0,14	3,96	3,96	0,14	0,25	< 0,001	0,55	0,24

¹ Werte sind *Least-Square-Means* und Standardfehler der Mittelwerte, $n = 15$ pro Gruppe; ² bezogen auf Triacylglycerid- und Cholesterolkonzentration im Plasma; ^{a,b} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben zeigen eine Signifikanz innerhalb des Zeitpunktes an ($P < 0,05$); d p.p. = Tage *post partum*, TBARS = Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen, TEAC = *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*.

3.4 Proteine der Akute-Phase-Reaktion

Die Supplementation mit GTE zeigte eine signifikante Auswirkung auf die Plasmakonzentrationen von SAA und Retinol (Tabelle 10). Die Tiere, die GTE erhielten, wiesen zu den Zeitpunkten 8 d p.p. und 28 d p.p. signifikant geringere SAA-Konzentrationen im Plasma gegenüber den Kontrolltieren auf. Die Retinolkonzentration im Plasma war in der Gruppe mit GTE-Behandlung über den Zeitraum signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Die Konzentrationen der übrigen gemessenen APP sowie die Retinolkonzentration, bezogen auf die Summe der Konzentrationen von TAG und Chol im Plasma, zeigten keinen Effekt einer Behandlung auf.

Über den Zeitverlauf sank die Konzentration von SAA im Plasma von Tag 28 p.p. zu Tag 50 p.p. ab, beide Zeitpunkte unterschieden sich nicht signifikant vom Zeitpunkt 8 d p.p. (Tabelle 10). Die HP-Konzentration im Plasma stieg von Tag 8 p.p. zu Tag 28 p.p. an und fiel anschließend am Tag 50 p.p. ab. Die Plasmakonzentration von Alb war an Tag 8 p.p. niedriger als an Tag 50 p.p. Die Alb-Konzentrationen im Plasma zu den beiden Zeitpunkten 8 d p.p. und 50 d p.p. unterschieden sich nicht vom Zeitpunkt 28 d p.p. Ein Effekt der Zeit auf die Plasmakonzentration von RBP4 war nicht vorhanden. Die Retinolkonzentration stieg signifikant über die drei Zeitpunkte an.

Bei den Konzentrationen der APP zeigte sich zwischen Behandlung und Zeit keine Interaktion (Tabelle 10).

Tabelle 10: Konzentration der Akute-Phase-Proteine und der negativen Akute-Phase-Proteine im Plasma von Kühen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe (GTE)¹

	8 d p.p.			28 d p.p.			50 d p.p.			<i>P</i> -Wert			
	Kon	GTE	SEM	Kon	GTE	SEM	Kon	GTE	SEM	GTE	Zeit	GTE x Zeit	Parität
SAA, mg/L	0,33 ^a	0,26 ^b	0,02	0,33 ^a	0,27 ^b	0,02	0,29	0,25	0,02	0,007	0,029	0,52	0,41
HP, mg/mL	0,37	0,37	0,17	0,43	0,42	0,17	0,42	0,41	0,17	0,86	0,022	0,94	0,19
Alb, g/dL	2,83	2,70	0,14	2,98	2,87	0,14	3,08	3,00	0,14	0,23	0,003	0,94	0,30
RBP4, µg/mL	1,59	1,66	0,15	1,57	1,64	0,15	1,76	1,76	0,15	0,22	0,08	0,87	< 0,001
Retinol, µM	0,72	0,71	0,07	1,01 ^a	0,84 ^b	0,07	1,14	1,03	0,07	0,012	< 0,001	0,23	0,031
Retinol ² , µmol/g	0,80	0,88	0,06	0,67	0,70	0,06	0,54	0,64	0,06	0,11	< 0,001	0,53	0,92

¹ Werte sind *Least-Square-Means* und Standardfehler der Mittelwerte, $n = 15$ pro Gruppe; ² bezogen auf Triacylglycerid- und Cholesterolkonzentration im Plasma; ^{a,b} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben zeigen eine Signifikanz innerhalb des Zeitpunktes an ($P < 0,05$); d p.p. = Tage *post partum*, Alb = Albumin, SAA = Serum Amyloid A, HP = Haptoglobin, RBP4 = Retinolbindendes Protein 4.

3.5 Hepatische Expressionen von Genen des Lipidstoffwechsels, der β -Oxidation, der Inflammation, der Nrf2-Zielgene und der UPR

Von den gemessenen Expressionen der Gene der Lipogenese in der Leber zeigte lediglich die Expression des Gens GPAT einen signifikanten Einfluss von einer Supplementation mit GTE (Tabelle 11). Dabei war über den Zeitraum von sieben Wochen nach der Kalbung die hepatische Expression der GPAT in der Behandlungsgruppe niedriger als in der Kontrollgruppe. Die hepatischen Expressionen der Gene der Enzyme ACACA, FASN, des Transporters SLC27A1 und des Transkriptionsfaktors SREBF1 blieben von der Supplementation mit GTE unbeeinflusst. Über den Zeitverlauf von sieben Wochen nach der Kalbung war eine Steigerung in den Expressionen der Gene der Lipogenese in der Leber von Tag 8 p.p. zu Tag 50 p.p. zu erkennen, mit Ausnahme der Expression des Gens SLC27A1. Die größte Steigerung wies die hepatische mRNA-Konzentration des Enzyms der Fettsäuresynthese ACACA auf, welche von Tag 8 p.p. zu Tag 28 p.p. und nochmals zu Tag 50 p.p. signifikant anstieg. Eine Interaktion zwischen Behandlung und Zeit in den Expressionen der Gene der Lipogenese in der Leber war nicht vorhanden.

Für die Beurteilung des Lipidexports der Leber wurden die Expressionen der Gene MTTP und ApoB gemessen (Tabelle 11). Zwischen den beiden Gruppen war kein Unterschied der Expression des Gens MTTP in der Leber vorhanden. Bei der mRNA-Konzentration von ApoB in der Leber war ein tendenzieller Effekt ($P = 0,09$) der GTE-Supplementation zu beobachten, die Behandlungsgruppe hatte eine niedrigere Expression des Gens ApoB als die Kontrollgruppe. Die Expression des Gens MTTP in der Leber blieb unverändert über den Zeitraum des Versuchs. Die hepatische Expression des Gens ApoB nahm von Tag 8 p.p. zu Tag 28 p.p. signifikant zu und blieb bis zu Tag 50 p.p. unverändert. Eine Interaktion zwischen Behandlung und Zeit in der hepatischen Expression der Gene der VLDL-Bildung war nicht vorhanden.

Die Supplementation mit GTE wies einen signifikanten Einfluss auf die hepatische Expression des Gens ACOX und einen tendenziellen Einfluss ($P = 0,06$) auf die hepatische Expression des Gens CPT1A auf (Tabelle 11). Zu allen drei Zeitpunkten lag die Expression des Gens ACOX in der Leber in der Behandlungsgruppe niedriger als in der Kontrollgruppe. Die mRNA-Konzentration der CPT1A in der Leber war zum Zeitpunkt 8 d p.p. in der Gruppe mit GTE-Supplementation niedriger als in der

Kontrollgruppe. Die Expression des Gens CPT1A in der Leber stieg von Tag 8 p.p. zu Tag 28 p.p. an und sank an Tag 50 p.p. wieder in den Konzentrationsbereich von Tag 8 p.p. ab. Eine Interaktion zwischen Behandlung und Zeit war bei den Expressionen der Gene der β -Oxidation nicht zu beobachten.

In dem vorliegenden Versuch nahm über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet die Supplementation mit GTE keinen signifikanten Einfluss auf die Expressionen der Gene der Ketogenese in der Leber (Tabelle 11). Jedoch war die Expression des Gens ACAT1 in der Leber zum Zeitpunkt 50 d p.p. in der Gruppe mit GTE-Supplementation niedriger als in der Kontrollgruppe. Ein Effekt der Zeit war in der Expression des Gens HMGCS2 in der Leber vorhanden, jedoch nicht bei den Expressionen der Gene ACAT1 und HMGCL. Die hepatische Expression des Gens HMGCS2 stieg von Tag 8 p.p. zu Tag 50 p.p. in beiden Gruppen an. Wie bereits in den vorherigen genannten Ergebnissen der Expression hepatischer Gene zeigte sich auch in der Expression der drei untersuchten Gene der Ketogenese in der Leber keine Interaktion zwischen Behandlung und Zeit.

Zur Beurteilung der UPR wurden die folgenden 13 mRNA-Konzentrationen in der Leber an den drei Beprobungszeitpunkten gemessen: ATF4, BAK1, BAX, CASP3, CASP8, DDIT3, DNAJC3, EDEM1, FGF21, HERPUD1, HSPA5, PDIA4 und XBP1s (Tabelle 11). Dabei zeigte sich über den gesamten Versuchszeitraum ein tendenzieller Effekt der Supplementation mit GTE in der hepatischen Expression des Gens CASP3 ($P = 0,06$). In der ersten Laktationswoche waren die hepatischen Expressionen der Gene CASP3, DNAJC3 und HSPA5 bei den Tieren, die GTE erhielten, signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren. Die weiteren zehn untersuchten Gene der UPR blieben in ihren hepatischen Expressionen von der GTE-Supplementation unbeeinflusst. Eine Interaktion zwischen Behandlung und Zeit war bei den hepatischen Expressionen der Gene DDIT3, DNAJC3 und EDEM1 vorhanden. Dabei unterschieden sich in der Behandlungsgruppe die Expressionen der drei genannten Gene zum Zeitpunkt 28 d p.p. vom ersten Beprobungszeitpunkt, jedoch war dieser Effekt nicht in der Kontrollgruppe zu beobachten. Von Tag 8 p.p. zu Tag 28 p.p. stiegen in der Gruppe mit GTE-Supplementation die Expressionen der Gene DDIT3, DNAJC3 und EDEM1 in der Leber stärker an als in der Kontrollgruppe.

Die hepatischen Expressionen der Gene BAX, CASP8, EDEM1, FGF21 und XBP1s zeigten eine Signifikanz des Faktors Zeit auf (Tabelle 11). Die Expressionen der

UPR-Gene BAX und CASP8 stiegen von Tag 8 p.p. zu Tag 28 p.p. an, beide Beprobungszeitpunkte unterschieden sich nicht von Tag 50 p.p. Die mRNA-Konzentration von EDEM1 stieg von Tag 8 p.p. zu Tag 28 p.p. an, zum Tag 50 p.p. gab es keinen weiteren Anstieg. Die Genexpression von FGF21 sank von Tag 8 p.p. zu Tag 28 p.p. ab und verblieb auf diesem Level an Tag 50 p.p. Einen tendenziellen Einfluss der Zeit auf die hepatischen Expressionen der UPR-Zielgene zeigten CASP3 ($P = 0,06$) und DDIT3 ($P = 0,051$). Eine Interaktion von Behandlung und Zeit war bei den übrigen untersuchten Genen der UPR nicht vorhanden.

Die Expressionen folgender Gene der APR wurden in der Leber gemessen: CP, CRP, HP, SAA3, RBP4 und TTR (Tabelle 11). Die Supplementation mit GTE zeigte einen signifikanten Effekt auf die hepatische Expression des Gens CRP und einen tendenziellen Einfluss auf die hepatischen Expressionen der Gene RBP4 ($P = 0,06$) und TTR ($P = 0,09$). Die Expression des Gens CRP war in der Kontrollgruppe höher als in der Behandlungsgruppe. Die hepatischen Expressionen der Gene RBP4 und TTR waren ebenfalls in der Kontrollgruppe höher als in der Gruppe mit GTE-Supplementation. Ein Effekt der Behandlung blieb bei den Expressionen der anderen untersuchten Gene der APR in der Leber aus. Die Expressionen der Gene CRP, SAA3 und TTR in der Leber unterschieden sich signifikant zwischen den drei Beprobungszeitpunkten. Die hepatische Expression des Gens CRP stieg zunächst signifikant von Tag 8 p.p. zu Tag 28 p.p. an, die von SAA3 sank von Tag 8 p.p. zu Tag 28 p.p. ab. Ein Unterschied zwischen den ersten beiden Beprobungszeitpunkten und Tag 50 p.p. war bei den hepatischen Expressionen beider Gene nicht vorhanden. Die Expression des Gens TTR in der Leber war an Tag 50 p.p. signifikant höher als zu den ersten beiden Zeitpunkten. In der Tendenz zeigten die Expressionen der beiden Gene HP ($P = 0,06$) und RBP4 ($P = 0,05$) einen Zeiteffekt auf. Eine Interaktion zwischen Behandlung und Zeit in den Expressionen der Gene ausgewählter APP war nicht vorhanden.

Des Weiteren wurden Parameter für die Beurteilung des antioxidativen Status der Kühe untersucht (Tabelle 11). Dabei wurden die hepatischen Expressionen zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten von folgenden Genen des Nrf2-Signalweges gemessen: CAT, GPX1, MT1A, NQO1, SOD1 und UGT1A1. Die Supplementation mit GTE zeigte keine signifikanten Auswirkungen auf die Expressionen der Nrf2-Zielgene in der Leber. In Betrachtung der einzelnen Zeitpunkte war vier Wochen

nach der Kalbung ein signifikanter Unterschied in der hepatischen Expression des Gens GPX1 zu sehen, wobei die Kontrolltiere eine niedrigere Expression dieses Gens in der Leber aufwiesen als die Tiere mit GTE-Supplementation. Die Expression des Gens CAT unterschied sich zum Zeitpunkt 50 d p.p. signifikant von den ersten beiden Beprobungszeitpunkten, dabei war ein Anstieg über den Zeitverlauf zu beobachten. Ein Zeiteffekt war in der Expression des Gens MT1A in der Leber zu beobachten, zum Zeitpunkt 8 d p.p. war die Expression höher als zu den anderen beiden Zeitpunkten. Bei den übrigen untersuchten Expressionen der Gene des Nrf2-Weges war kein Zeiteffekt vorhanden. Eine Interaktion zwischen Behandlung und Zeit lag in den Expressionen der Gene aus dem Nrf2-Signalweg nicht vor.

Die Expressionen folgender inflammatorischer Gene wurden gemessen: CCL2, IL-1 β , IL-8, PTGS2 und TNF (Tabelle 11). Die Supplementation von GTE zeigte in den Expressionen inflammatorischer Gene in der Leber keinen Effekt. In den hepatischen Expressionen der Gene CCL2 und IL-8 waren im Gegensatz zu den hepatischen Expressionen der Gene IL-1 β und PTGS2 Zeiteffekte zwischen den drei Beprobungszeitpunkten zu erkennen. Die Expression des Gens CCL2 in der Leber unterschied sich signifikant zwischen dem ersten und dem letzten Beprobungszeitpunkt, ein Unterschied von 28 d p.p. zu den beiden anderen untersuchten Zeitpunkten war nicht vorhanden. Die Expression des Gens IL-8 in der Leber unterschied sich signifikant zwischen Zeitpunkt 8 d p.p. und den beiden Zeitpunkten 28 d p.p. und 50 d p.p., ein Unterschied zwischen den letzten beiden Zeitpunkten war hinsichtlich der Expression dieses Gens in der Leber nicht vorhanden. Eine Interaktion zwischen Behandlung und Zeit war in den Expressionen ausgewählter Gene der Inflammation nicht vorhanden.

Tabelle 11: Relative hepatische mRNA-Konzentrationen von Genen des metabolischen Stoffwechsels, der Inflammation, des Nrf2-Signalweges und der UPR von Kühen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe (GTE)¹

Gen ²	8 d p.p.			28 d p.p.			50 d p.p.			P-Wert			
	Kon	GTE	SEM	Kon	GTE	SEM	Kon	GTE	SEM	GTE	Zeit	GTE x Zeit	Parität
Gene der Lipogenese													
SREBF1	1,00	0,85	0,44	1,49	1,37	0,44	2,22	1,33	0,44	0,13	0,018	0,34	0,56
ACACA	1,00	0,66	0,54	1,91	1,61	0,54	2,97	2,15	0,54	0,22	< 0,001	0,69	0,55
FASN	1,00	0,77	0,59	1,31	1,88	0,59	1,48	2,36	0,59	0,48	0,03	0,34	0,12
GPAT	1,00	0,58	0,21	1,21	0,87	0,21	1,35	1,09	0,21	0,017	0,010	0,85	0,77
SLC27A1	1,00	0,95	0,19	1,08	1,26	0,19	1,12	1,12	0,19	0,90	0,14	0,48	0,37
Gene der VLDL-Bildung													
APOB	1,00	0,74	0,18	1,32	1,11	0,18	1,41	1,11	0,18	0,09	< 0,001	0,91	0,75
MTTP	1,00	0,78	0,16	1,03	0,93	0,16	0,96	0,79	0,16	0,20	0,50	0,85	0,46
β-Oxidation													
ACADM	1,00	0,69	0,19	1,05	0,95	0,19	1,06	0,96	0,19	0,21	0,27	0,57	0,51

Gen ²	8 d p.p.			28 d p.p.			50 d p.p.			P-Wert			
	Kon	GTE	SEM	Kon	GTE	SEM	Kon	GTE	SEM	GTE	Zeit	GTE x Zeit	Parität
ACOX1	1,00	0,74	1,57	1,19 ^a	0,84 ^b	1,53	1,11	0,93	1,57	0,005	0,23	0,70	0,06
CPT1A	1,00 ^a	0,64 ^b	0,17	1,14	1,03	0,14	0,92	0,68	0,14	0,06	0,002	0,33	0,84
Gene der Ketogenese													
ACAT1	1,00	0,98	0,20	0,94	0,75	0,20	1,36 ^a	0,84 ^b	0,20	0,07	0,19	0,19	0,41
HMGCS2	1,00	0,74	0,27	1,09	1,29	0,27	1,21	1,45	0,27	0,96	0,031	0,28	0,30
HMGCL	1,00	1,08	0,22	0,79	0,80	0,22	1,01	1,02	0,22	0,89	0,11	0,94	0,09
Gene der Inflammation													
CCL2	1,00	1,02	0,31	1,21	1,13	0,31	1,53	1,56	0,31	0,90	0,034	0,96	0,68
IL-1 β	1,00	1,20	0,18	0,86	1,05	0,18	0,94	1,00	0,18	0,65	0,33	0,78	0,018
IL-8	1,00	0,96	0,36	1,36	1,93	0,36	1,74	1,66	0,36	0,48	0,001	0,20	0,61
PTGS2	1,00	1,10	0,22	1,18	1,28	0,22	1,01	1,22	0,22	0,27	0,38	0,90	0,44
TNF	1,00	1,48	0,38	1,38	1,84	0,38	1,17	1,39	0,38	0,36	0,16	0,78	0,14

Gen ²	8 d p.p.			28 d p.p.			50 d p.p.			P-Wert			
	Kon	GTE	SEM	Kon	GTE	SEM	Kon	GTE	SEM	GTE	Zeit	GTE x Zeit	Parität
Gene der Akute-Phase-Reaktion													
CP	1,00	0,81	0,16	0,72	0,77	0,16	0,84	0,75	0,16	0,66	0,23	0,42	0,49
CRP	1,00	0,65	0,16	1,21	1,04	0,16	1,16	0,93	0,16	0,035	0,030	0,72	0,87
HP	1,00	0,86	0,43	0,13	0,95	0,43	0,20	0,50	0,43	0,28	0,06	0,14	0,98
SAA3	1,00	1,29	0,36	0,54	0,79	0,36	0,58	0,63	0,36	0,46	0,025	0,83	0,93
RBP4	1,00	0,92	0,10	0,87	0,73	0,10	1,00	0,87	0,10	0,06	0,05	0,89	0,10
TTR	1,00	0,99	0,17	1,16	0,95	0,12	1,53	1,30	0,12	0,09	< 0,001	0,26	0,049
Gene des Nrf2-Weges													
CAT	1,00	1,02	0,18	1,11	0,92	0,18	1,41	1,23	0,18	0,15	0,003	0,49	0,036
GPX1	1,00	1,10	0,19	0,79 ^a	1,29 ^b	0,19	1,02	1,21	0,19	0,25	0,67	0,12	0,053
MT1A	1,00	0,71	0,32	0,19	0,35	0,16	0,10	0,15	0,32	0,85	< 0,001	0,37	0,81
NQO1	1,00	0,90	0,17	0,97	0,84	0,17	1,09	0,97	0,17	0,19	0,38	0,98	0,34

Gen ²	8 d p.p.			28 d p.p.			50 d p.p.			P-Wert			
	Kon	GTE	SEM	Kon	GTE	SEM	Kon	GTE	SEM	GTE	Zeit	GTE x Zeit	Parität
SOD1	1,00	0,89	0,10	0,95	0,85	0,10	1,00	0,92	0,10	0,08	0,48	0,96	0,16
UGT1A1	1,00	0,98	0,17	0,88	0,67	0,17	1,04	0,92	0,17	0,17	0,07	0,64	0,34
Gene der UPR													
ATF4	1,00	0,87	0,08	0,96	0,98	0,08	1,04	0,99	0,08	0,36	0,41	0,49	0,98
BAK1	1,00	1,32	0,32	0,76	1,27	0,32	0,90	1,06	0,32	0,19	0,61	0,71	0,11
BAX	1,00	0,94	0,19	1,49	1,43	0,19	1,12	1,25	0,19	0,71	0,001	0,71	0,12
CASP3	1,00 ^a	0,77 ^b	0,10	0,90	0,79	0,10	0,81	0,71	0,10	0,06	0,06	0,42	0,46
CASP8	1,00	0,76	0,14	1,07	1,13	0,14	0,97	1,01	0,14	0,82	0,017	0,10	0,28
DDIT3	1,00	0,73	0,14	0,97	1,15	0,14	0,96	0,91	0,14	0,96	0,051	0,028	0,08
DNAJC3	1,00 ^a	0,57 ^b	0,16	0,86	1,01	0,16	0,81	0,81	0,16	0,34	0,21	0,006	0,79
EDEM1	1,00	0,62	0,20	1,09	1,36	0,16	1,20	1,50	0,16	0,50	0,001	0,012	0,48
FGF21	1,00	0,88	0,21	0,52	0,28	0,21	0,29	0,24	0,21	0,62	<0,001	0,72	0,001

Gen ²	8 d p.p.			28 d p.p.			50 d p.p.			P-Wert			
	Kon	GTE	SEM	Kon	GTE	SEM	Kon	GTE	SEM	GTE	Zeit	GTE x Zeit	Parität
HERPUD1	1,00	0,89	0,16	0,69	0,77	0,16	0,76	0,76	0,16	0,79	0,10	0,66	0,48
HSPA5	1,00 ^a	0,57 ^b	0,20	0,62	0,67	0,20	0,60	0,59	0,20	0,20	0,32	0,11	0,47
PDIA4	1,00	0,64	0,19	0,75	0,93	0,19	0,93	0,82	0,19	0,31	0,91	0,10	0,49
XBP1s	1,00	0,61	0,21	0,33	0,68	0,21	0,42	0,49	0,21	0,87	0,046	0,055	0,19

¹ Werte sind *Least-Square-Means* und Standardfehler der Mittelwerte relativer mRNA-Konzentration zur Kontrollgruppe Zeitpunkt 8 d p.p., $n = 15$ pro Gruppe; ² ACACA = Acetyl-CoA Carboxylase α , ACADM = Acyl-CoA Dehydrogenase *medium chain*, ACAT1 = Acetyl-CoA Acetyltransferase 1, ACOX1 = Acyl-CoA Oxidase 1, APOB = Apolipoprotein B, ATF4 = *Activating Transcription Factor 4*, BAK1 = BCL2-Antagonist/killer 1, BAX = *BCL2 Associated X, Apoptoseregulator*, CASP3 = Caspase 3, CASP8 = Caspase 8, CAT = Catalase, CCL2 = *C-C motif chemokine ligand 2*, CP = Ceruloplasmin, CPT1A = Carnitin Palmitoyltransferase 1A, CRP = C-reaktives Protein, DNAJC3 = *DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C3*, DDIT3 = *DNA-damage-inducible transcript 3*, EDEM1 = *ER degradation enhancing alpha-mannosidase like protein 1*, FASN = Fettsäuresynthase, FGF21 = *fibroblast growth factor 21*, GPAT = Glycerol-3-phosphate Acyltransferase mitochondrial, GPX1 = Glutathionperoxidase 1, HERPUD1 = *Homocysteine inducible ER protein with ubiquitin like domain 1*, HMGCL = 3-Hydroxymethyl-3-methylglutaryl-CoA Lyase, HMGCS2 = 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Synthase 2, HP = Haptoglobin, HSPA5 = *heat shock protein family A (Hsp70) member 5*, IL-1 β = Interleukin 1 beta, IL-8 = Interleukin 8, MT1A = Metallothionein-1A, MTTP = Microsomal Triglyceride Transfer Protein, NQO1 = *NAD(P)H-Quinon oxidoreductase 1*, PDIA4 = *protein disulfide isomerase family A member 4*, PTGS2 = *prostaglandin-endoperoxide synthase 2*, RBP4 = retinol-bindendes Protein 4, SAA3 = Serum Amyloid A 3, SLC27A1 = *solute carrier family 27 (Fettsäuretransporter) member 1*, SOD1 = Superoxid-Dismutase 1, SREBF1 = *Sterol regulatory element binding transcription factor 1*, TNF = Tumor Nekrose Faktor, TTR = Transthyretin, UGT1A1 = *UDP-Glucuronosyltransferase familiy1(A1)*, XBP1s = *X-box binding protein 1, spliced*; ^{a,b} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben zeigen eine Signifikanz innerhalb des Zeitpunktes an ($P < 0,05$); d p.p. = Tage *post partum*, Nrf2 = *nuclear factor E2 related factor 2*, UPR = *unfolded protein response*.

4 Diskussion

4.1 Einsatz des polyphenolhaltigen Futterzusatzstoffes Grüntee-Extrakt

Polyphenole besitzen antioxidative Eigenschaften, unterstützen dadurch das antioxidative Schutzsystem des Organismus und schwächen eine inflammatorische Reaktion ab (Anesini et al. 2008). Vor diesem Hintergrund wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Einsatz von GTE das Ausmaß von metabolischem, oxidativem, inflammatorischem und ER-Stress vermindert und zur Verbesserung des Gesundheitsstatus und der Leistungsfähigkeit der Kuh führt. In einem Fütterungsversuch wurde einer Behandlungsgruppe eine Woche vor der Kalbung 10 g GTE und in der ersten Laktationswoche 20 g GTE supplementiert, um zu untersuchen, inwiefern die darin enthaltenen Polyphenole für die besondere Situation der Milchkuh (Ringseis et al. 2014) nach der Kalbung positive Eigenschaften besitzen.

Im Durchschnitt enthält Grüner Tee 100 bis 800 mg/L Flavanole. Die Gehalte sind von vielen Umweltfaktoren, dem Ausgangsprodukt selbst und den weiteren Verarbeitungsschritten abhängig (Manach et al. 2004). Von den Polyphenolen liegen Flavanole nicht glycosyliert vor und können daher als Aglykon effizienter im Duodenum absorbiert werden als andere Polyphenolklassen. Einmal absorbiert, werden die Polyphenole über die Galle oder den Urin wieder ausgeschieden (Manach et al. 2004). Die Bioverfügbarkeit der Polyphenole ist zum einen von der Futterzusammensetzung, zum anderen aber auch von der Verdauungsphysiologie des Tieres abhängig. Beim Wiederkäuer ist mit dem Pansen eine mikrobielle Umsetzung der Futterbestandteile vorgeschaltet. Die bisher in Studien nachgewiesenen Effekte verschiedener Polyphenole in monogastrischen Tiermodellen sind daher nicht direkt übertragbar auf den Wiederkäuer. Eine intraduodenale Gabe von GTE in einer Dosis von bis zu 30 mg/kg Lebendmasse bei Milchkühen in Laktationswoche 12 besaß eine höhere Wiederfindung an Catechine im Blut als eine intraruminale Gabe von bis zu 50 mg GTE pro kg Lebendmasse (Wein et al. 2016). Die detektierbaren Konzentrationen der Flavanole des GTE im Plasma von Kühen sind bei einer intraruminalen bzw. oralen Gabe deutlich geringer als bei intraduodenaler Gabe. Des Weiteren sind die im Ausgangsprodukt enthaltenen Flavanole nicht im Plasma detektierbar, vielmehr handelt es sich um umgesetzte

Metabolite (Wein et al. 2016). Im Plasma von Schafen jedoch konnten nach einmaliger Gabe eines polyphenolhaltigen Zusatzstoffes die Ausgangsphenole und unterschiedliche Metabolite von Polyphenolen nachgewiesen werden (Gladine et al. 2007). In beiden Wiederkäuermodellen konnte eine Absorption von Polyphenolen oder deren Metaboliten nachgewiesen werden, wodurch deren positive Eigenschaften ebenfalls beim Wiederkäuer gegeben sind. Die Wiederfindung der Polyphenole im Plasma von Wiederkäuern ist vom Zeitpunkt der Probenahme und in besonderem Maße von der Dosis abhängig (Gladine et al. 2007).

4.2 Einfluss der Fütterung von Grüntee-Extrakt auf die Milchleistung

In einem Fütterungsversuch mit Kühen konnte in der Phase der Früh-laktation unter Einsatz von 1 % polyphenolhaltigem Traubenkern- und Traubentrestereextrakt eine signifikante Verbesserung der durchschnittlichen Milchleistung um 3,6 kg/d über den Zeitraum 2 bis 9 Wochen p.p. erzielt werden (Gessner et al. 2015). Ein weiterer polyphenolhaltiger Extrakt aus Grünem Tee (95 %) und Kurkuma (5 %) zeigte bei früh-laktierenden Kühen in einer Einsatzmenge von 0,175 g pro kg TM ebenfalls eine Steigerung der durchschnittlichen täglichen Milchleistung um 3,0 kg/d (Winkler et al. 2015). In dem vorliegenden Versuch konnte durch Einsatz von GTE jedoch keine signifikante Verbesserung der Milchleistung der Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe in der Früh-laktation festgestellt werden. Kolling et al. (2018) konnten ebenfalls keine Verbesserung der Milchleistung bei Kühen durch den Einsatz von reinem GTE über die ersten acht Laktationswochen beobachten. Der Einsatz weiterer sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe bei laktierenden Kühen, wie Tannine der Kastanie, Zimtaldehyd und Eugenol, zeigte in unterschiedlichen Studien keinen Effekt auf die Leistung der Tiere (Liu et al. 2013, Benchaar et al. 2008, Tager und Krause 2011, Tekippe et al. 2013).

In der ersten Phase der Laktation nimmt die produzierte Milchmenge rapide zu, bis sie anschließend langsam wieder abnimmt (Auldism et al. 1995, Liu et al. 2013, Khan et al. 2014). Der Anstieg in der Milchleistung konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachtet werden. Des Weiteren verändern sich die Milchinhaltsstoffe im Laufe der Laktation (Ng-Kwai-Hang et al. 1982, Auldism et al. 1995, Schlegel et al. 2012a). Bei den untersuchten Milchinhaltsstoffen Fett, Protein und Laktose war eine Abnahme über den Verlauf der Laktation zu beobachten.

In den ersten Tagen der Laktation sind Kühe mit verschiedenen Herausforderungen konfrontiert, wodurch sie einen entzündungsähnlichen Zustand entwickeln und dadurch anfälliger für Krankheiten und Milchleistungsminderung in der gesamten Laktation sind (Bradford et al. 2015). Eine Abschwächung des entzündungsähnlichen Zustands im peripartalen Zeitraum könnte ein möglicher Grund einer Milchleistungssteigerung unter dem Einsatz von 0,175 g Grüntee- und Kurkumaextrakt pro kg TM gewesen sein (Winkler et al. 2015). Die Immunantwort kostet den Organismus Energie in Form von Glucose. So wird bei einer Auslösung der

Immunantwort Energie an anderer Stelle eingespart, um möglichst schnell Krankheitserreger zu eliminieren (Bradford et al. 2015). Bei einer Abschwächung der Entzündung kann die in diesen Prozessen eingesparte Energie für die Milchproduktion verwendet werden. Untersuchte Expressionen von Genen der Entzündung zeigten im vorliegenden Versuch keine signifikanten Unterschiede basierend auf einer Supplementierung der Tiere mit GTE. Lediglich einzelne APP (hepatische mRNA-Konzentration von CRP, Plasmakonzentration von SAA) zeigten eine Tendenz hinsichtlich einer Verminderung einer Entzündung in der Frühlaktation der Milchkühe unter Einsatz von GTE auf. Diese Beobachtung war jedoch nicht ausreichend, um von einer Verminderung einer möglichen Entzündung durch den Einsatz von GTE in der peripartalen Phase ausgehen zu können. Eine gesteigerte Milchleistung auf Grund einer abgemilderten Entzündung unter Einsatz von GTE in der Frühlaktation lag nicht vor.

Eine geringere Belastung des Stoffwechsels der Leber im peripartalen Zeitraum unter Einsatz von polyphenolhaltigen Präparaten stellt eine weitere Möglichkeit dar, eine Milchleistungssteigerung zu erreichen (Winkler et al. 2015). Zu Beginn der Laktation ist die Trockenmasseaufnahme der Milchkuh sehr gering und für eine Abdeckung des Bedarfs an Nährstoffen und Energie nicht ausreichend, wodurch die Kuh eine NEB entwickelt (Baird 1981). Im Laufe der Laktation steigt die Trockenmasseaufnahme der Milchkühe an und damit die mit dem Futter aufgenommene Energie, womit eine in der Frühlaktation auftretende NEB ausgeglichen bis leicht positiv wird (Grummer 1993, Schlegel et al. 2012a). Wie bereits in anderen Studien beobachtet (Auld et al. 1995, Khan et al. 2014, Gessner et al. 2015, Winkler et al. 2015), zeigte sich auch in dieser Arbeit ein typisch signifikanter Effekt der Zeit auf die Trockenmasseaufnahme einschließlich Nettoenergieaufnahme. Im Laufe der Laktation nahm die Trockenmasseaufnahme von Woche 2 zu Woche 7 stetig zu.

Die Mobilisierung von Fetten aus dem Fettgewebe auf Grund einer NEB führt zu einem erhöhten NEFA-Plasmaspiegel (Zhang et al. 2016). Diese werden in der Leber zum Zwecke der Energiegewinnung über β -Oxidation und Tricarbonsäurezyklus abgebaut. Die Kapazität des Tricarbonsäurezyklus wird durch das Vorhandensein des Substrats Oxalacetat beschränkt, da dieses ebenfalls in der Gluconeogenese verbraucht wird. Auf Grund der Fermentation von Glucose durch die Mikroben im

Pansen ist der Wiederkäuer darauf angewiesen, selbst Glucose zu synthetisieren über die Gluconeogenese (Kirchgeßner 2004). Der Bedarf an Glucose steigt in der Laktation an durch die Synthese von Laktose für die Milch (Drackley et al. 2001, Drackley et al. 2005). Auf Grund der Limitierung von Oxalacetat im Tricarbonsäurezyklus durch die Gluconeogenese werden in der Leber aus Acetyl-CoA, einem Produkt der β -Oxidation, Ketonkörper als Energielieferanten gebildet (Abuajamieh et al. 2016). Von den drei Ketonkörpern BHBA, Acetoacetat und Aceton stellt mit 75 % BHBA den größten Anteil dar und ist daher als Marker für die metabolische Störung Ketose am besten geeignet (Xu et al. 2016). Bei einer BHBA-Konzentration im Plasma unter 0,60 mM liegt keine Ketose vor. Eine subklinische Ketose wird bei BHBA-Plasmakonzentrationen von 0,60 mM bis 1,20 mM diagnostiziert, ab 1,20 mM besteht eine klinische Ketose (Li et al. 2016).

In dem vorliegenden Versuch gab es einzelne Tiere, die zu bestimmten Zeitpunkten BHBA-Plasmakonzentrationen von mehr als 1,20 mM aufwiesen. Die Gruppenmittelwerte der BHBA-Konzentrationen im Plasma zu den untersuchten Zeitpunkten gaben jedoch keinen Hinweis auf eine klinische Ketose. Die Supplementation von GTE zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Plasmakonzentrationen von NEFA und BHBA. Die hepatischen Expressionen von Genen des Lipidstoffwechsels zeigten in der Summe ebenfalls nur geringe Effekte unter GTE-Supplementation. Eine verminderte Belastung des Stoffwechsels der Leber unter GTE-Supplementation in der Früh-laktation konnte daher durch die vorliegenden Daten nicht bestätigt werden.

Die Supplementation mit GTE führte zu keiner Steigerung der Milchleistung und hatte nur geringe Auswirkungen auf die Expressionen von Inflammation und des Lipidstoffwechsels in der Leber. Die Trockenmasseaufnahme und die Nettoenergieaufnahme unterschieden sich nicht zwischen den beiden Gruppen. Dennoch war die Energiebilanz in der Tendenz ($P = 0,06$) in der Behandlungsgruppe weniger stark negativ ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. Dies steht im Zusammenhang mit einer signifikant geringeren ECM und einem geringeren Milchfettgehalt bei den Tieren, welche GTE erhielten.

Die Beobachtung, dass der Einsatz von GTE den Milchfettgehalt senkte, steht im Kontrast mit den bisherigen Beobachtungen anderer Studien. Unter dem Einsatz von Saponinen aus Grünem Tee konnten Wang et al. (2017) eine Steigerung des Milchfettgehaltes gegenüber einer Kontrollgruppe aufzeigen. Der Einsatz von

Traubenkern- und Traubentrestereextrakt oder eines GTE-Gemisches zeigte bei Kühen in der Früh lactation keinen Effekt auf den Milchfettgehalt (Gessner et al. 2015, Winkler et al. 2015).

Das Milchfett der Kuh besteht aus über 400 verschiedenen Fettsäuren, wobei der Großteil verestert als TAG vorliegt und ein kleiner Teil als Phospholipide, Cholesterolester, Diacylglyceride, Monoacylglyceride und freie Fettsäuren (Harvatine et al. 2009). Das Milchfett setzt sich aus zwei unterschiedlichen Quellen zusammen und ist stark über die Fütterung beeinflussbar. Zum einen erfolgt in der Milchdrüse die *de novo*-Synthese von kurz- und mittelkettigen Fettsäuren von bis zu 14 C-Atomen aus vorwiegend Acetat und im geringeren Umfang aus β -Hydroxybutyrat, welches im Pansenepithel aus absorbiertem Butyrat entsteht. Zum anderen werden Fettsäuren von mehr als 16 C-Atomen aus dem Plasma in Form von Lipoproteinen und NEFA in die Milchdrüse aufgenommen, welche vom Futter oder aus Körpersubstanz stammen. Der Anteil an TAG, der aus Fettsäuren der Eigensynthese im Euter besteht, beträgt mehr als 50 %. Die Mobilisierung von Fettsäuren aus Körpergewebe beträgt normalerweise weniger als 10 %, nimmt jedoch mit steigender NEB zu (Bauman und Griinari 2003, Harvatine et al. 2009).

Acetat, welches in der Pansenfermentation aus Kohlenhydraten entsteht, wird für die Fettsäuresynthese im Eutergewebe benötigt. Tannine haben Einfluss auf die Fermentation im Pansen, sie senken die Bildung von Acetat (Makkar et al. 1995, Vasta et al. 2019). Diese Beobachtung konnte bei *in vitro* Versuchen festgestellt werden, die Studienlage von *in vivo* Versuchen ist gering und die Ergebnisse zum Teil unterschiedlich (Vasta et al. 2019). Unter dem Einsatz von kondensierten Tanninen konnte bei Schafen eine Senkung der Acetatproduktion im Pansen festgestellt werden (Vasta et al. 2019), verschiedene Kuhmodelle zeigten jedoch unter Einsatz von kondensierten Tanninen oder GTE keine Veränderung der Pansenfermentationsprodukte (Nishida et al. 2006, Benchaar et al. 2008, Kolling et al. 2018). In dem eingesetzten GTE sind 25,45 % Tannin-Phenole enthalten, diese Dosis ist deutlich geringer als die Dosis anderer *in vivo* Studien von Wiederkäuern, bei denen eine Acetatproduktion im Pansen vermindert werden konnte (Moate et al. 2014, Rira et al. 2015). Eine Senkung des Milchfettgehaltes unter dem eingesetzten GTE ist nicht in Zusammenhang mit einer Veränderung der Acetatproduktion im Pansen als Ausgangssubstrat für die Eigensynthese von Milchfett im Eutergewebe zu

vermuten, noch konnte eine Veränderung der Konzentration von NEFA im Plasma beobachtet werden. Eine Verminderung des Milchfettgehaltes unter GTE-Einsatz ist mit den vorliegenden Daten nur schwierig zu erklären.

4.3 Einfluss der Fütterung von Grüntee-Extrakt auf den Lipidstoffwechsel

Ein hoher Energiebedarf der hochleistenden Milchkuh zum Laktationsbeginn auf der einen Seite und eine vor und nach der Kalbung verminderte Trockenmasseaufnahme auf der anderen Seite führt zur Ausbildung einer NEB (Drackley et al. 2005). Die Trockenmasseaufnahme kann bereits 4 Wochen a.p. um bis zu 50 % absinken und dieser Zustand bis zur vierten Laktationswoche andauern (Drackley et al. 2005, Grummer 2008). Der benötigte Energiebedarf beträgt bei einer durchschnittlichen täglichen Milchleistung von 40 L das 4,5-fache des Erhaltungsbedarfs. Bei einer Energiekonzentration von 6,8 MJ/kg TM benötigt eine Kuh eine Trockenmasseaufnahme von 25 kg/d in der Früh-laktation (Loeffler und Gäbel 2018). Dies ist nicht umsetzbar und eine NEB als metabolische Konsequenz unvermeidbar (Drackley et al. 2005, Grummer 2008). In Folge einer NEB treten Ketose, Labmagenverlagerung und Veränderungen des Immunsystems auf (Drackley et al. 2005, Raboisson et al. 2014, Li et al. 2016). Aus dem Fettgewebe werden in der Phase der NEB NEFA mobilisiert (Abuajamieh et al. 2016) und über Fettsäuretransporter in die Leber transportiert (Ordovas et al. 2008). Dabei mobilisiert die Kuh bis zu 40 % körpereigener Reserven und die Plasmakonzentration der NEFA steigt enorm an (Lomax und Baird 1983, Abuajamieh et al. 2016). Im hepatischen Gewebe gehen die NEFA in drei unterschiedliche Stoffwechselwege ein, (i) der Energiegewinnung über die β -Oxidation mit anschließendem Tricarbonsäurezyklus (Grummer 1993, Hocquette und Bauchart 1999, Drackley et al. 2001, Drackley et al. 2005), (ii) der Energiegewinnung über die β -Oxidation mit anschließender Ketogenese (Abuajamieh et al. 2016, Loeffler und Gäbel 2018) oder (iii) der Reveresterung zu TAG mit anschließender Speicherung oder Export über VLDL aus der Leber (Gruffat et al. 1996, Drackley et al. 2005). Die hepatische TAG-Konzentration spiegelt dabei den NEFA-Influx wieder (Schoenberg et al. 2011).

Die Plasmakonzentration von NEFA nahm im vorliegenden Versuch signifikant im Laufe der Laktation ab. Direkt nach der Kalbung besteht die Situation einer NEB, wodurch vermehrt NEFA mobilisiert werden und in der Leber auf Grund der Limitierung des Oxalacetats zu Ketonkörpern umgewandelt oder als TAG gespeichert werden (Grummer 1993). Die Plasmakonzentration von BHBA und die hepatische Konzentration von TAG nahmen ebenfalls im Laufe der Laktation ab. Die

Konzentration der NEFA und Ketonkörper im Plasma sinkt im Laufe der Laktation wieder ab, da es zu einer Minderung der NEB kommt (Bernabucci et al. 2005, Bertoni et al. 2008, Schlegel et al. 2012b, Sun et al. 2016). Damit sinkt die TAG-Konzentration in der Leber ebenfalls ab (Drackley et al. 2005, Schlegel et al. 2012b).

In einer Studie mit frühlaktierenden Kühen zeigte der Einsatz von 175 mg Grüntee- und Kurkuma-Extrakt (147 mg GAE/g) pro kg TM eine Verminderung der NEFA-Konzentration im Plasma bei unveränderter Energiebilanz zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe (Winkler et al. 2015). Unter Fütterung von 1 % polyphenolhaltigem Traubenkern- und Traubentrestereextrakt (52 mg GAE/g) konnte in der Frühlaktation kein Effekt auf die NEFA-Konzentration im Plasma beobachtet werden (Gessner et al. 2015). Der Einsatz von Grünteessilage zeigte bei Rindern sogar einer Steigerung der NEFA-Konzentration im Plasma gegenüber der Kontrollgruppe (Nishida et al. 2006). Generell blieb jedoch in vielen Wiederkäuermodellen der Effekt einer Polyphenolfütterung auf die Plasmakonzentration von NEFA sowie der TAG-Konzentration in Plasma und Leber aus (Stoldt et al. 2015, Maciej et al. 2016, Stoldt et al. 2016a, Stoldt 2016b). In einem Review wurden verschiedene Auswirkungen sekundärer Pflanzenmetabolite auf Wiederkäuer aufgezeigt. Dabei wurde deutlich, dass der Einsatz von Polyphenolpräparaten zu widersprüchlichen Effekten führte. Eine Rolle dabei spielen Quelle, Konzentration und Struktur der Polyphenole sowie Absorption und Metabolismus der Polyphenole im Tier (Durmic und Blache 2012). Ein reiner Einsatz des Präparates GTE bei frühlaktierenden Kühen ist noch nicht untersucht worden. Im Gegensatz zu anderen Flavonoiden (Stoldt et al. 2015, Maciej et al. 2016, Stoldt et al. 2016a, Stoldt 2016b, Chedea et al. 2017), zeigte der Einsatz von GTE (10 g bzw. 20 g mit 350 mg GAE/g) im vorliegenden Versuch keinen signifikanten Effekt auf die NEFA-Konzentration im Plasma im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Plasmakonzentration von BHBA zeigte ebenfalls keinen Effekt der Supplementierung mit GTE. Insgesamt waren die Gruppenmittelwerte der Plasmakonzentration von BHBA $< 1,2$ mM, somit konnte weder in der Kontroll- noch in der Behandlungsgruppe eine Ketose nachgewiesen werden. Ketonkörper werden vermehrt in der Leber gebildet, wenn die Verfügbarkeit von Oxalacetat ein Limit erreicht hat. Dies steht in Zusammenhang mit der Oxidation von NEFA in der Leber.

In der Frühlaktation ist die hepatische Translation von Genen der Fettsäureoxidation, der Gluconeogenese und der Ketogenese erhöht (Schlegel et al. 2013). Hepatische

Genexpressionen ausgewählter Enzyme der β -Oxidation wiesen keine Veränderung über den Zeitraum von sieben Wochen p.p. auf. Lediglich in der hepatischen Genexpression von CPT1A war eine Schwankung im Laufe der Laktation zu beobachten. Eine Absenkung der Genexpressionen wäre sieben Wochen nach der Kalbung zu erwarten gewesen, da ein Zusammenhang zur NEFA-Konzentration besteht (Schlegel et al. 2013, Khan et al. 2014). Von den drei analysierten Expressionen der Gene der Ketogenese in der Leber konnte bei HMGCS2 ein Anstieg an Tag 50 p.p. im Vergleich zu Tag 8 p.p. beobachtet werden. Die Ketonkörper werden vermehrt bei einer NEB gebildet. Im Verlauf der Laktation gleicht sich die Energiebilanz aus (Grummer 1993, Drackley et al. 2005) und ein Absinken der Expression von Genen der Ketogenese wäre zu erwarten gewesen (Schlegel et al. 2013).

Die hepatischen Expressionen untersuchter Gene der β -Oxidation und der Ketogenese in der vorliegenden Arbeit waren durch eine GTE-Supplementation nur gering beeinflusst. Das initiale Enzym der β -Oxidation im Peroxisom ACOX war signifikant geringer exprimiert in der Leber der Behandlungstiere als bei den Kontrolltieren. Die hepatische Genexpression von CPT1A, welches im Falle eines Energiemangels aktiviert wird, um Fettsäuren in das Mitochondrium zur Energiegewinnung über die β -Oxidation zu transportieren (Grummer 1993), war in der Tendenz niedriger durch den Einsatz von GTE ($P = 0,06$). Damit zeichnete sich kein vermehrter Abbau von Fettsäuren in der Leber ab. Die hier beobachtete Absenkung der Expressionen des Gens ACOX der β -Oxidation in der Leber könnte eine Folge des geringeren Substratangebots der NEFA gewesen sein.

Der Export der Lipide aus der Leber findet über VLDL statt (Grummer 1993). Ein verminderter Lipidexport führt zu einer Akkumulation von Lipiden in der Leber und geringeren Plasmakonzentrationen von Lipiden. Es zeigte sich eine geringere hepatische Genexpression von ApoB zum Beginn der Laktation, die im weiteren Verlauf anstieg. Milchkühe haben zu Beginn der Laktation geringere ApoB-Konzentrationen als zu einem späteren Zeitpunkt der Laktation oder aber als Trockensteher (Gruffat et al. 1997). Durch einen limitierten Abtransport von Fetten über VLDL bei Wiederkäuern führt dies zur Speicherung von TAG im Lebergewebe (Grummer 1993). Die in der Leber gebildeten Lipide konnten über eine gesteigerte Bildung von VLDL im Laktationsverlauf (Stoldt et al. 2016b) exportiert werden und

fürten zum Anstieg der Plasmakonzentrationen von TAG und Chol im Laufe der Laktation (Grummer 1993). Die hepatische Genexpression von ApoB war in der vorliegenden Arbeit unter GTE-Einsatz in der Tendenz ($P = 0,09$) geringer exprimiert in der Behandlungsgruppe als in der Kontrollgruppe. Des Weiteren waren die Plasmakonzentrationen von TAG und Chol bei den Tieren, die GTE erhielten, niedriger als bei den Kontrolltieren. Stoldt et al. (2016b) konnten unter dem Einsatz von Quercetin im peripartalen Zeitraum keinen Effekt auf die Expression der Gene ApoB und MTP beobachten. Der Effekt des GTE auf den Lipidexport ist als eher gering einzustufen. Generell ist die Synthese und die Sekretion von VLDL für den Export von TAG aus der Leber bei Kühen gering im Vergleich zu anderen Spezies (Drackley et al. 2005).

Der enorme Influx von NEFA in die Leber, die Limitierung der Kapazität der β -Oxidation sowie der eingeschränkte Export von Fetten über VLDL bei Kühen resultiert in einer Akkumulation von Lipiden in der Leber und folglich dem Krankheitsbild der Fettleber (Grummer 1993, Bauchart 1993, Bauchart et al. 1996, Hocquette und Bauchart 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass in der ersten Laktationswoche die Konzentrationen von TAG und Chol in der Leber höher waren als zum Zeitpunkt 50 d p.p. Eine Abnahme der hepatischen Konzentration von TAG und Chol im Laktationsverlauf war ebenfalls bei Schlegel et al. (2012a, 2012b) zu beobachten. Eine Fettleber bedingt weitere gesundheitliche Problematiken der Milchkuh, wie unter anderem oxidativer Stress und Entzündung (Bertoni et al. 2008, Bradford et al. 2015, Abuajamieh et al. 2016, Magata et al. 2017). Daher ist anzustreben, die Ausprägung der NEB sowie deren Folgen in Hinblick auf Gesundheit und Leistung der Tiere zu vermindern. Diverse Studien zeigten bereits eine Reduktion der Lipidakkumulation in der Leber unter dem Einsatz von Flavonoiden. Dabei wird die β -Oxidation in der Leber angeregt und Gene des Lipidmetabolismus (FASN, HMG-CoA Reduktase, ACACA, SREBF-1 und -2) vermindert exprimiert (Suzuki et al. 2012, Miyoshi et al. 2015). Unter Einsatz von Kurkuma konnten bei Mäusen Effekte einer *High-Fat-Diet*, wie eine erhöhte NEFA-Plasmakonzentration und eine Akkumulation von TAG in der Leber, verhindert werden (Wang et al. 2016). Grüner Tee und sein Hauptpolyphenol EGCG zeigten in diversen Zell- und Mausmodellen eine Senkung der Konzentration der TAG in Plasma und Leber (Lin et al. 2007, Suzuki et al. 2012, Miyoshi et al. 2015, Liu et al. 2017, Eng et al. 2018). Der Einsatz von GTE bei Milchkühen im peripartalen

Zeitraum könnte durch eine Senkung der Konzentration von TAG in der Leber die Entstehung einer Fettleber verhindern, in der Folge könnten auch oxidativer Stress (Bernabucci et al. 2005, Li et al. 2016) und Entzündung vermindert werden (Du et al. 2017). Bei oxidativem Stress liegt eine erhöhte Konzentration an ROS vor, welche das antioxidative System aktivieren (Surh et al. 2008, Ma 2013) und zur Auslösung der Inflammation (Hoffmann und Baltimore 2006, Bradford et al. 2015) und der Entstehung von ER-Stress führen (Gessner et al. 2014, Ringseis et al. 2014). All diese Faktoren beeinflussen die Gesundheit und die Milchleistung der Kuh (Bertoni et al. 2008, Bradford et al. 2015).

Die Expressionen der Gene der Lipogenese stiegen signifikant von der ersten zur siebten Laktationswoche an. Diese Beobachtung gleicht sich mit denen der Arbeitsgruppe Khan et al. (2014). Die hepatische Expression des Gens GPAT war über den Versuchszeitraum in der Behandlungsgruppe niedriger als in der Kontrollgruppe. Die GPAT ist das erste Enzym in der Synthese von TAG und Glycerophospholipiden. Eine zu hohe Expression des Gens GPAT führt zu einer verminderten β -Oxidation sowie einer gesteigerten TAG-Synthese und steht daher in Zusammenhang mit der Entstehung einer hepatischen Steatose (Gonzalez-Baro et al. 2007, Gimeno und Cao 2008). Da die Synthese von TAG in der Leber bei Kühen sehr gering ist (Hocquette und Bauchart 1999) und die Supplementation mit GTE auf die übrigen Expressionen untersuchter Gene des Lipidmetabolismus keinen Effekt ausübte, war insgesamt ein sehr geringer bis kein Effekt der Behandlung auf den Lipidmetabolismus vorhanden. In den Untersuchungen von Stoldt et al. (2016b) war ebenfalls kein signifikanter Einfluss des Polyphenols Quercetin auf Gene des Fettsäuremetabolismus in der Leber bei Milchkühen im peripartalen Zeitraum zu beobachten.

Die Supplementation mit GTE führte zu tendenziell niedrigeren TAG-Gehalten ($P = 0,07$) in der Leber. Der Einfluss des Präparates auf Expressionen der Gene der β -Oxidation, der Ketogenese, des Lipidexports und der Lipogenese in der Leber waren eher gering. Wie bereits beschrieben, spiegelt die hepatische TAG-Konzentration den NEFA-Einstrom in die Leber wieder (Schoenberg et al. 2011). Die Plasmakonzentration der NEFA wiederum ist anhängig von der Energiebilanz. Je stärker negativ eine NEB ist, desto mehr NEFA werden aus dem Fettgewebe mobilisiert und dienen als Substrat der Reveresterung in der Leber (Bauman und

Griinari 2003, Harvatine et al. 2009). Die verminderte TAG-Konzentration in der Leber ist wahrscheinlich ein Resultat der weniger stark negativen Energiebilanz in der Gruppe mit GTE-Supplementation. Obwohl die NEFA-Konzentration im Plasma nicht signifikant von der Behandlung beeinflusst war, waren die Plasmakonzentrationen von NEFA in der ersten Laktationswoche in der Behandlungsgruppe 20 % niedriger als in der Kontrollgruppe. Dies und die verminderte Expression des Gens ACOX1 in der Leber sind vermutlich ebenfalls Folgeeffekte der weniger stark negativen Energiebilanz in der Behandlungsgruppe.

Bertoni et al. (2008) konnten bei frühlaktierenden Kühen einen negativen Zusammenhang zwischen der Plasmakonzentration von HP und den Plasmakonzentrationen von Alb, Retinol und Chol feststellen. Eine Entzündung in der Leber führt zum Anstieg positiver APP, wie zum Beispiel HP, und dem Absinken von Proteinen, welche im Normalzustand in der Leber synthetisiert werden, dazu zählt unter anderem Alb. Eine verminderte Plasmakonzentration von Chol, welches im weiteren Sinne zu den negativen APP gezählt wird, kann daher ein Marker für eine Leberschädigung oder eine Erkrankung sein (Bossaert et al. 2012, Rezamand et al. 2007), die sich im Laufe der Laktation erholt. Obwohl in der Behandlungsgruppe die Plasmakonzentrationen von Chol niedriger waren als in der Kontrollgruppe, war ein Einfluss des GTE auf die Plasmakonzentrationen und die Expressionen der Gene der APP eher gering und deutete auf keine Beeinflussung des Entzündungsprozesses hin. Die Retinolkonzentration im Plasma, welche als Indikator der RBP-Konzentration genutzt werden kann, war zwar vier Wochen nach Kalbung bei den Tieren, die GTE erhielten, geringer als bei den Kontrolltieren, jedoch steht dies im Zusammenhang mit der geringeren Plasmakonzentration von TAG und Chol bei den mit GTE supplementierten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren. Retinol kann als fettlösliches Vitamin auch über Lipoproteine transportiert werden (Abd Eldaim et al. 2010, Rezamand et al. 2012). Ein Einfluss des GTE auf die Plasmakonzentration und die Expression in der Leber von RBP4 war nicht vorhanden. Der Effekt einer verminderten Plasmakonzentration von Chol zu den Zeitpunkten 28 und 50 d.p.p. steht daher in keinem Zusammenhang mit einer Beeinflussung des Entzündungsprozesses unter dem Einsatz von GTE.

In Tiermodellen mit Mäusen und Ratten hatte der Einsatz von Grüntee den Effekt eines Chol *Clearance* im Plasma und somit einen hypocholesterinämischen Effekt.

Der Mechanismus, welcher diesem Effekt zu Grunde liegt, wurde in einem Zellmodell mit humanen HepG2-Zellen untersucht. Durch Steigerung der Expression der Gene SREBF-1 und des LDL-Rezeptors sowie der Proteinkonzentration des LDL-Rezeptors steigt der Import von Chol aus dem Plasma in die Zelle. Der gesteigerten Aufnahme des Chol in die Zelle lag in den Versuchen von Bursill et al. (2001) eine geringere intrazelluläre Konzentration von Chol zu Grunde (Bursill et al. 2001, Bursill und Roach 2006). In dem vorliegenden Versuch war jedoch weder die Konzentration von Chol in der Leber, noch die hepatische Expression des Gens SREBF1 signifikant von einem Effekt des GTE beeinflusst.

Über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR α wird über eine gesteigerte β -Oxidation und Ketogenese einer Akkumulation von TAG in der Leber entgegengewirkt (Drackley et al. 2005, Badman et al. 2007, Schlegel et al. 2012b). In der Phase einer NEB spielt der metabolische Regulationsfaktor FGF21 eine wichtige Rolle in der Unterstützung des PPAR α . In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass FGF21 über PPAR α stimuliert wird und in der Lage ist, die hepatische Konzentration von TAG, sowie die Plasmakonzentrationen von TAG, Chol und NEFA zu senken (Badman et al. 2007). Bei Kühen sind in der ersten Laktationswoche die hepatischen Expressionen der Gene PPAR α (Schlegel et al. 2012b) und FGF21 in der Leber (Schlegel et al. 2013) sowie die Plasmakonzentration von FGF21 erhöht (Schoenberg et al. 2011). Schoenberg et al. (2011) konnten ein Maximum der Plasmakonzentration von FGF21 am Tag der Kalbung beobachten, welches innerhalb der ersten Laktationswoche stark abfiel und im Laufe der Laktation kontinuierlich weiter abnahm. In der vorliegenden Arbeit war eine Abnahme der FGF21-Transkription in der Leber über die Zeit zu sehen. Die hepatische Genexpression von FGF21 korreliert positiv mit der hepatischen Expression der Gene SLC22A5, SREBF1, HMGCR und HMGCS2 (Schlegel et al. 2013). Eine Steigerung der β -Oxidation, der Gluconeogenese und der Ketogenese in der Leber in der Früh-laktation im Vergleich zur Spät-laktation konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Schlegel et al. 2013). Eine zunächst orale Gabe gefolgt von einer Infusion von FGF21 in der Früh-laktation von Kühen zeigte ein Absinken der TAG-Konzentration der Leber (Caixeta et al. 2013). Der Parameter FGF21 dient demnach auch dazu, die metabolische Situation eines Organismus einzuschätzen, da die

Plasmakonzentration von FGF21 unter Energiemangel erhöht ist (Schoenberg et al. 2011, Schlegel et al. 2013).

Durch den Einsatz von polyphenolhaltigen Präparaten konnte bei Milchkühen eine Absenkung der hepatischen mRNA-Konzentration von FGF21 beobachtet werden (Gessner et al. 2015, Winkler et al. 2015). In dem vorliegenden Versuch war keine signifikante Absenkung der mRNA-Konzentration von FGF21 unter GTE-Einsatz zu sehen. Die mit FGF21 im Zusammenhang stehenden Stoffwechselwege β -Oxidation und Ketogenese zeigten ebenfalls keine signifikante Reduktion in ihren Genexpressionen in der Leber unter GTE-Supplementation, womit ein Anstieg von FGF21 nicht zu erwarten gewesen wäre. Des Weiteren wiesen die Tiere mit GTE-Supplementation eine weniger stark negative Energiebilanz auf als die Kontrolltiere. Damit nahm der eingesetzte GTE keinen Einfluss auf das Stressgeschehen in der Früh lactation von Milchkühen gemessen am Indikator FGF21.

4.4 Einfluss der Fütterung von Grüntee-Extrakt auf das antioxidative System

Eine erhöhte Nährstoffoxidation in der Leber und Infektionskrankheiten sind unter anderem Auslöser einer vermehrten Bildung von ROS im peripartalen Zeitraum der Milchkuh (Konvicná et al. 2015, Magata et al. 2017). Das antioxidative System dient der Eliminierung solcher ROS, um Schäden im Körper zu verhindern (Ma 2013, Li et al. 2016). Ein Ungleichgewicht zwischen der Entstehung von ROS und deren Eliminierung über das antioxidative System führt zu oxidativem Stress, welcher peroxidative Schäden an Lipiden und Veränderungen der Zellmembran und der Zellkomponenten auslösen kann (Miller et al. 1993). Der Anstieg der Plasmakonzentrationen von NEFA und BHBA in der Frühlaktation bei der Kuh korreliert positiv mit dem Anstieg von Malondialdehyd (MDA), einem Parameter des oxidativen Stresses, und negativ mit den Antioxidantien Vitamin C, Vitamin E und Harnsäure (Li et al. 2016). Die Enzyme Aspartataminotransferase (AST), Alaninaminotransferase (ALT) und Laktatdehydrogenase (LDH) sind in der Frühlaktation bei Kühen, welche eine starke NEB und somit eine Ketose vorweisen, erhöht und deuten damit auf eine Schädigung der Leber hin (Li et al. 2016, Du et al. 2017). Hohe Plasmakonzentrationen von NEFA und BHBA, wie sie in der Frühlaktation unter einer NEB vorkommen, stehen somit in Zusammenhang mit Schädigung der Leber, Entzündung und oxidativem Stress in der Leber, welcher hepatische Apoptose induzieren kann (Bernabucci et al. 2005, Youssef et al. 2010, Li et al. 2016, Du et al. 2017).

Um den Zeitpunkt der Kalbung ist der oxidative Stress der Milchkuh am höchsten und dadurch die Konzentration an Antioxidantien gering (Bernabucci et al. 2005). Im Laufe der Laktation steigen die Parameter des antioxidativen Systems wieder an (Konvicná et al. 2015, Yadav et al. 2017). Über den Zeitraum der ersten sieben Laktationswochen zeigten die Plasmakonzentrationen der Tocopherole und des β -Carotins einen charakteristischen Anstieg. Dies konnte ebenfalls bei Konvicná et al. (2015) und Gessner et al. (2015) beobachtet werden.

In einem Zellmodell konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Quercetin die MDA-Konzentration, welche durch den ER-Stressinduktor Tunicamycin anstieg, herabgesetzt werden konnte. Das Flavonoid Quercetin konnte die Expression von SOD1 und CAT steigern (Suganya et al. 2014). In BME-UV1 (*bovine mammary epithelial*)-Zellen zeigte der Einsatz von EGCG eine Verbesserung des zellulären

Schutzes gegen oxidativen Stress, indem die Konzentration von reduziertem Glutathion anstieg und die Konzentration von MDA abnahm (Basiricó et al. 2019). Bei Milchkühen konnte unter Einsatz von Kräutern eine Verbesserung der antioxidativen Kapazität nachgewiesen werden (Hashemzadeh-Cigari et al. 2015). Der Einsatz von 20 % Grünteesilage bei Rindern erbrachte eine Steigerung der Plasmakonzentration von Vitamin E und der TEAC (Nishida et al. 2006).

Es wird vermutet, dass die Polyphenole im GTE das antioxidative System der Milchkühe in der peripartalen Zeit unterstützen könnten. Die Konzentrationsmessung in Gewebe und Plasma von nicht-enzymatischen Antioxidantien sowie die Aktivität enzymatischer Antioxidantien sind zwei Möglichkeiten, den antioxidativen Status eines Organismus zu beurteilen (Kizil et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden bei frühlaktierenden Kühen die Plasmakonzentrationen von β -Carotin, α - und γ -Tocopherol sowie hepatische Expressionen der Nrf2-Zielgene einer Kontroll- und einer Behandlungsgruppe mit GTE-Supplementation untersucht.

Die fettlöslichen Vitamine der Klasse der Tocopherole sind in der Biomembran verankert und neutralisieren Peroxidradikale. Dabei werden sie selbst oxidiert und in einer Folgereaktion mit dem wasserlöslichen Vitamin C recycelt (Kizil et al. 2007). Die Formen α - und γ -Tocopherol sind die relevantesten Vitamin E-Derivate in natürlichen Quellen, α -Tocopherol ist im Plasma und Gewebe die Hauptform des Vitamin E (Kono und Arai 2015). In Grünfutter enthaltenes β -Carotin reagiert als Antioxidans durch Quenchen von einzelnen Sauerstoffatomen und unterstützt das Immunsystem (Spears und Weiss 2008, Kizil et al. 2007). Ein Absinken dieser Konzentrationen im Plasma ist ein Indikator für oxidativen Stress der Kuh, wie er zum Beispiel auch im Falle einer Mastitis auftritt (Kizil et al. 2007).

Entgegen der Hypothese, dass der Einsatz von GTE eine Verbesserung des antioxidativen Status bewirkt, waren die Plasmakonzentrationen der Tocopherole und des β -Carotins in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant geringer. Da der Transport dieser Substanzen im Plasma Lipid-abhängig ist (Kono und Arai 2015), kann der hoch signifikante Unterschied dieser Antioxidantien zwischen den beiden Gruppen darauf zurückgeführt werden, dass sich die Lipide im Plasma (TAG + Chol, Li et al. 2016) beider Gruppen ebenfalls signifikant unterschieden. Tocopherole und β -Carotin werden aus den Chylomikronen im Blut über die Lipoproteinlipasen in die Zellen aufgenommen oder

aus der Leber in Form von VLDL in extrahepatische Gewebe transportiert (Kono und Arai 2015). Ein Absinken der Plasmakonzentrationen von β -Carotin, α - und γ -Tocopherol in der Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe steht daher in Zusammenhang mit der Absenkung der TAG- und Chol-Konzentrationen im Plasma unter GTE-Einsatz. In den Studien von Gessner et al. (2015) und Winkler et al. (2015) konnten ebenfalls keine Interaktionen zwischen der Supplementation eines Polyphenolpräparats und dem Verlauf der Laktation auf die Plasmakonzentrationen von β -Carotin oder α -Tocopherol beobachtet werden.

Weitere Möglichkeiten der Beurteilung des antioxidativen Systems sind die Messung von TBARS und der TEAC (Kizil et al. 2007). Bei der Messung von TBARS, welche ein Maß der oxidativen Schädigung darstellen, wird die Reaktion von MDA als Marker der Lipidoxidation zu Grunde gelegt (Jentzsch et al. 1996, Ghani et al. 2017). Die Konzentration der TBARS, bezogen auf die Plasmakonzentration von TAG und Chol, nahm im Laufe der Laktation ab. In der ersten Woche nach der Kalbung ist die Konzentration an MDA am höchsten und nimmt im Laktationsverlauf ab (Konvicná et al. 2015, Yadav et al. 2017). Diesem physiologischen Prozess liegen zum einen der Anstieg von ROS durch erhöhten Stoffwechsel auf Grund des Fötus und der Laktation und zum anderen der Vorgang der Kalbung, welcher durch erhöhte Energiegenerierung in den Mitochondrien einen erhöhten Sauerstoffbedarf hat, zu Grunde (Liu et al. 2013). Die TEAC ist ein Maß, welches die Stärke des antioxidativen Schutzes beschreibt, wobei die Konzentration von Antioxidantien, welche freie Radikale in einer bestimmten Reaktionsdauer eliminieren, von Bedeutung ist (Re et al. 1999). In der siebten Laktationswoche war ein Anstieg der TEAC zu beobachten. Gleiches konnte über den Parameter der FRAP (*ferric reducing ability of plasma*) und der TAC (*total antioxidant capacity*) bei laktierenden Kühen beobachtet werden, die höchste Kapazität lag in der größten Entfernung zum Zeitpunkt der Kalbung vor (Konvicná et al. 2015, Yadav et al. 2017). Die TEAC oder auch TAC steht im Zusammenhang mit einzelnen Antioxidantien, wie zum Beispiel den Tocopherolen. Auf Grund erhöhter ROS-Produktion um den Zeitpunkt der Kalbung ist die Konzentration an Antioxidantien vermindert und damit ist auch die TEAC verringert (Bühler et al. 2018).

Entgegen der Hypothese, dass die Supplementation von GTE das antioxidative System stärkt, war kein Einfluss der Behandlung auf die Plasmakonzentration von

TBARS oder der TEAC vorhanden. Durch den Einsatz von Polyphenolen aus Rosmarin, Trauben, Zitrusfrüchten und Ringelblumen bei Schafen oder von Grünteensilage bei Rindern konnte eine Verbesserung der TEAC beobachtet werden (Nishida et al. 2006, Gladine et al. 2007). Tannine aus Kastanien konnten bei Kühen über den Zeitraum von 3 Wochen a.p. bis 3 Wochen p.p. die Plasmakonzentration von MDA herabsetzen (Liu et al. 2013). Allerdings zeigten andere Studien bei frühlaktierenden Kühen keine Veränderung der TBARS oder der TEAC durch den Einsatz von Polyphenolen (Gessner et al. 2015, Winkler et al. 2015). Ein Ausbleiben des erwarteten Effekts auf das antioxidative System könnte in Zusammenhang mit der Quelle, der Dosis oder der Bioverfügbarkeit der Polyphenole sowie dem Gesundheitsstatus der Tiere stehen (Gessner et al. 2015, Winkler et al. 2015).

Polyphenole nehmen nicht nur selbst als Antioxidans durch Quenchen von ROS (Kizil et al. 2007), sondern auch über die Aktivierung des Nrf2-ARE-Systems am antioxidativen Schutzsystem des Körpers teil (Chen et al. 2000, Smith et al. 2016). Um den Kalbungszeitpunkt, wo oxidativer Stress stärker ausgeprägt ist, kommt es zum Anstieg von antioxidativen Enzymen, deren Transkription über den Transkriptionsfaktor Nrf2 aktiviert wird (Liu et al. 2013, Bühler et al. 2018). Ein typischer Verlauf der Expressionen der Nrf2-Zielgene in der Leber konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Gessner et al. (2013b) konnten bei Milchkühen eine Steigerung der hepatischen mRNA-Konzentration von unter anderem CAT, GPX und SOD im Verlauf von drei Wochen a.p. bis eine Woche p.p. feststellen. Im Verlauf der Laktation nahm die mRNA-Konzentration der Nrf2-Zielgene wieder ab. Tannine aus Kastanien steigerten die Plasma- und Leberaktivität von SOD und GPX bei Milchkühen über den Zeitraum von drei Wochen a.p. bis drei Wochen p.p., wobei die Autoren eine Aktivierung von Nrf2 unter dem Einsatz von Tanninen vermuteten (Liu et al. 2013). Eine Aktivierung von Nrf2-Zielgenen unter Supplementation von GTE konnte in den Expressionen in der Leber über den Verlauf der Frühaktation nicht nachgewiesen werden. Gessner et al. (2015) konnten durch Einsatz eines Traubenproduktes in der Frühaktation ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf Nrf2-Zielgene beobachten. Bei Umgehung des Fermentationsprozesses im Pansen durch intraduodenale Gabe von Quercetin konnten Stoldt et al. (2016b) ebenfalls drei Wochen vor und drei Wochen nach der Kalbung keinen signifikanten Einfluss auf die hepatischen Genexpressionen von CAT, GPX1 und SOD1 beobachten. Die Arbeitsgruppe von Gessner et al. (2013a) konnte in einem Modell

mit Absetzferkeln unter Supplementation eines Traubenpräparates ebenfalls keinen Einfluss auf das antioxidative System feststellen. Sie vermuteten, dass das eingesetzte Traubenpräparat bereits einen starken antioxidativen und anti-inflammatorischen Effekt auf das duodenale Gewebe besaß, wodurch die Entstehung von ROS und von pro-inflammatorischen Cytokinen gemindert worden war, und somit ein Anstieg der Expression der Nrf2-Zielgene in der duodenalen Mukosa ausblieb (Gessner et al. 2013a). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf oxidativen Stress unter Betrachtung von TBARS und TEAC im Plasma festgestellt werden. Des Weiteren war in den Parametern des metabolischen Stresses im Plasma (NEFA, BHBA) kein Unterschied zwischen den Gruppen vorhanden. Ein Anstieg der Expression der Nrf2-Zielgene zur Unterstützung des antioxidativen Systems zur Eliminierung von ROS war somit nicht zu erwarten.

Die Arbeitsgruppe um Oh et al. (2017) fasst die Wirkung von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf den oxidativen Status von Milchkühen in der Laktation als begrenzt zusammen. *In vivo* ist die Wirkung solcher Präparate beschränkt und auch wenn bei Zielgenen bereits positive Effekte durch den Einsatz von Teecatechinen nachgewiesen wurden, ist die in der Literatur vorhandene Datengrundlage für Milchkühe doch noch beschränkt und uneinheitlich (Oh et al. 2017). Die Beurteilung der Wirkung von Polyphenolen auf das antioxidative System der Milchkuh bedarf weiterer Untersuchungen.

4.5 Einfluss der Fütterung von Grüntee-Extrakt auf Entzündung und die APR

Im peripartalen Zeitraum ist die hochleistende Milchkuh mit Anpassungen an die Laktation und Infektionskrankheiten konfrontiert (Bradford et al. 2015). Die Funktion des Immunsystems ist in dieser Phase geschwächt (Drackley et al. 2005). Eine Ketose ist eine typische metabolische Störung bei einer NEB und steht in Zusammenhang mit erhöhten Plasmakonzentrationen von NEFA, BHBA und einer Akkumulation von TAG in der Leber. Dies wiederum führt zu einem Anstieg der hepatischen MDA-Konzentration und zu einem Absinken der hepatischen Aktivität von SOD, GPX und CAT. Hyperketonämie und erhöhte NEFA-Plasmakonzentrationen lösen oxidativen Stress aus (Li et al. 2016, Du et al. 2017). Die im oxidativen System beteiligten Antioxidantien spielen ebenfalls eine Rolle in der Unterstützung des Immunsystems (Drackley et al. 2005). Bei einem Anstieg der hepatischen MDA-Konzentration sowie bei Fettakkumulation in der Leber kommt es zum Anstieg der Plasmakonzentrationen von AST, ALT und LDH. Diese sind Marker für hepatische Schäden (Li et al. 2016, Du et al. 2017). Kühe mit einem geringen Leberfunktionsindex, welcher anhand von negativen APP gemessen wird, haben höhere Plasmakonzentrationen an NEFA, BHBA, HP, Caeruloplasmin und IL-6 in der peripartalen Zeit. Des Weiteren sind diese Tiere anfälliger für Krankheiten und erholen sich nach der Kalbung langsamer als Tiere mit einem hohen Leberfunktionsindex (Trevisi et al. 2012). Eine stärkereiche Fütterung der Milchkühe auf Grund des erhöhten Energiebedarfs in der Früh-laktation hat zur Folge, dass die LPS-Konzentration im Pansen ansteigt, was zu Mikroläsionen im Pansenepithel führt und die Plasmakonzentrationen von SAA und HP ansteigen lässt (Gozho et al. 2005, Abujamieh et al. 2016). Die im Rahmen von Krankheiten wie Mastitis und Metritis freigesetzten LPS führen zum Anstieg der Konzentrationen von ROS und inflammatorischen Cytokinen (Gozho et al. 2005, Bradford et al. 2015, Magata et al. 2017). Endometritis ist eine typische uterine Infektionskrankheit nach der Kalbung und führt zum Anstieg der Plasmakonzentrationen von SAA, HP, CRP und Caeruloplasmin (Kaya et al. 2016a, Kaya et al. 2016b). Inflammatorische Prozesse nach der Kalbung, die zur Auslösung der APR führen, stehen im Zusammenhang mit dem Ausmaß an metabolischem Stress (Ceciliani et al. 2012, Trevisi et al. 2013).

Hepatische Expressionen inflammatorischer Gene und Gene der APP sowie Plasmakonzentrationen von APP sind um die Kalbung erhöht und sinken im Verlauf

der Laktation ab (Fleck 1989, Bradford et al. 2015, Batistel et al. 2018). Im vorliegenden Versuch waren in den hepatischen Expressionen inflammatorischer Gene und von Genen der APP lediglich geringe Zeiteffekte zu beobachten. Neben einer Absenkung der hepatischen Genexpression und der Plasmakonzentration von SAA im Laktationsverlauf, wäre dieser Effekt ebenfalls für HP erwartet gewesen (Bionaz et al. 2008, Bossaert et al. 2012, Bagga et al. 2016). Die Plasmakonzentration von CP bei Milchkühen ist dagegen typischerweise relativ konstant über den peripartalen Zeitraum (Bossaert et al. 2012, Bagga et al. 2016). Die Expression des Gens CRP in der Leber stieg zunächst an bevor ein Absinken der Expression zu beobachten war. Der Grund dafür könnte der langsamere *Turnover* von CRP gegenüber zum Beispiel HP sein (Bertoni et al. 2008, Dębski et al. 2016). Die Expression der Gene, welche für negative APP transkribiert werden, und die Plasmakonzentration negativer APP zeigten insgesamt einen charakteristischen Anstieg im Laufe der Laktation auf (Rezamand et al. 2007, Bionaz et al. 2008, Abd Eldaim et al. 2010, Bossaert et al. 2012).

Das Entzündungsgeschehen nimmt einen großen Einfluss auf die Gesundheit und die Leistung der Milchkuh in der Phase der Früh-laktation (Bertoni et al. 2008, Ceciliani et al. 2012, Trevisi et al. 2012). Der Hypothese zu Folge soll ein entzündungsähnlicher Zustand der Leber unter dem Einsatz von GTE verhindert und dadurch die Gesundheit und die Leistung der Milchkuh im peripartalen Zeitraum verbessert werden.

Diverse bioaktive Pflanzeninhaltsstoffe senken bei Nutztieren, abhängig von chemischen Eigenschaften, dem Immunstatus des Tieres und der eingesetzten Dosis, die Konzentration pro-inflammatorischer Cytokine und mildern die APR ab (Oh et al. 2017). Eine Studie über Absetzferkel zeigte bereits, dass der Einsatz eines Polyphenolextraktes in Form von Traubenkern- und Traubentrestereextrakt die Transaktivierung von NF- κ B in duodенaler Mukosa verminderte. Des Weiteren konnte in dieser Studie durch den Einsatz des Präparates die Expression von CCL2, TNF- α , IL-8 und SAA in der Duodenummukosa herabgesetzt werden (Gessner et al. 2013a). Ähnliche Beobachtungen konnte die Arbeitsgruppe in einer Transkriptom-analyse in der ersten Laktationswoche eines Kuhmodells machen, bei dem bestimmte Chemokine durch den Einsatz eines Polyphenolpräparates herabgesetzt wurden (Gessner et al. 2017). Der Einfluss von EGCG aus Grünem Tee auf NF- κ B

und damit auch auf TNF- α , COX-2 und Bcl-2 konnte bereits in Rattenmodellen nachgewiesen werden (Suzuki et al. 2012, Hayakawa et al. 2016, Ohishi et al. 2016). Grüner Tee und dessen Catechine senkten in Zell- und Rattenmodellen die Konzentration von TNF- α und IL-1 β nach Auslösung der Inflammation durch Galactosamine (Abe et al. 2005, Miyoshi et al. 2015). In einem Modell mit bovinen Milchdrüsenepithelzellen senkte der Einsatz von 50 μ M EGCG über 48 h die mRNA-Konzentration von IL-1 β , IL-6 und TNF- α , nachdem diese zuvor durch dreistündige Behandlung mit 20 μ M LPS angestiegen waren (Basiricò et al. 2019).

In dem vorliegenden Versuch wurden Plasmakonzentrationen von APP, hepatische Expressionen von Genen, welche in inflammatorischen Reaktionen involviert sind, und von Genen der APP bestimmt. Dabei war zu beobachten, dass die Plasmakonzentration von SAA durch den Einsatz von GTE gesenkt werden konnte. Allerdings blieben weitere untersuchte Konzentrationen von APP im Plasma von einer Behandlung unbeeinflusst. Des Weiteren zeigte die Supplementierung der Milchkühe mit GTE keinen signifikanten Einfluss auf die hepatischen Genexpressionen der Cytokine CCL2, IL-1 β , IL-8, TNF oder des Entzündungsmediators PTGS2. Die Expression von lediglich einem Gen der APP war niedriger bei Tieren, die GTE erhielten, als bei den Kontrolltieren. Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Supplementation mit GTE nur einen sehr geringen Einfluss auf die entzündungsähnliche Situation der Kuh im peripartalen Zeitraum hat.

Durch den Einsatz eines Traubenpräparates in der Früh-laktation von Kühen konnte eine Absenkung der Plasmakonzentration von SAA und HP beobachtet werden (Gessner et al. 2017). Jedoch konnte keine Veränderung in den hepatischen Expressionen von inflammatorischen Genen festgestellt werden (Gessner et al. 2015), nur eine signifikante Steigerung der Plasmakonzentration von Retinol, welches als Indikator für RBP dient (Trevisi et al. 2012). Bei einer Fütterung von 15 % Traubentrester oder von bis zu 1200 mL Granatapfelschalenextrakt pro Kuh und Tag oder Tee Saponinen in der Ration bei Milchkühen war kein Effekt auf die Plasmakonzentration von Alb zu sehen (Abarghuei et al. 2014, Chedea et al. 2017, Wang et al. 2017). Winkler et al. (2015) konnten unter dem Einsatz von Grüntee- und Kurkumaextrakt ebenfalls keine Einflüsse auf die hepatischen Genexpressionen von CRP und TNF bei Milchkühen feststellen, jedoch war die Genexpression von HP in der Leber tendenziell vermindert ($P = 0,069$) und die Plasmakonzentration von

Retinol signifikant gesteigert worden (Winker et al. 2015). Demnach konnten unter Einsatz von polyphenolhaltigen Präparaten bisher nur geringe Einflüsse auf das Entzündungsgeschehen von Kühen beobachtet werden. Das Ausbleiben eines Effektes auf die hepatische Expression inflammatorischer Gene vermuten Gessner et al. (2015) darin, dass entweder die Dosis oder die Bioverfügbarkeit des Polyphenolpräparates zu gering war oder aber keine Entzündung in den Tiergruppen vorhanden war, auf die das Präparat hätte Einfluss nehmen können. Ähnliche Gründe könnten in dem vorliegenden Versuch zutreffend gewesen sein.

Die Vitamine E und A können das Immunsystem verbessern (Drackley et al. 2005). Die Konzentration von Retinol im Plasma stieg erwartungsgemäß in seiner absoluten Konzentration im Laufe der Laktation an (Bionaz et al. 2008, Abd Eldaim et al. 2010, Bossaert et al. 2012). Bezogen auf die Summe der Konzentrationen von TAG und Chol im Plasma war eine Abnahme der Retinolkonzentration über die Zeit zu verzeichnen, was mit dem geringen Anstieg des Retinol gegenüber dem enormen Anstieg von Chol zusammenhängt. Die Plasmakonzentration von Retinol, welches vorwiegend über RBP4 im Blut transportiert wird (Abd Eldaim et al. 2010, Rezamand et al. 2012), war im Versuchszeitraum in der Behandlungsgruppe signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Die hepatischen Genexpressionen von RBP4 und TTR waren in der Tendenz ($P = 0,06$ bzw. $P = 0,09$) in der Behandlungsgruppe niedriger als in der Kontrollgruppe. Das Protein TTR steht indirekt mit RBP4 in Verbindung, da es über Komplexbildung den Transport von Retinol unterstützt (Tothova et al. 2014). Die Plasmakonzentration von RBP4 hingegen unterschied sich nicht zwischen den beiden Gruppen. Mit dem Futter aufgenommenes β -Carotin wird in geringem Maße in den Epithelzellen zu Retinylester umgewandelt und über Lipoproteine im Blut transportiert (Kirchgeßner 2004, Berry 2005). Die Tiere, welche GTE supplementiert bekamen, hatten niedrigere Plasmakonzentrationen von β -Carotin als die Kontrolltiere. Des Weiteren waren TAG- und Chol-Konzentrationen im Plasma, beides Bestandteile der Lipoproteine (Katho 2002), in der Gruppe mit GTE-Supplementation niedriger als in der Kontrollgruppe. Bezogen auf die Summe von TAG und Chol im Plasma war in der Plasmakonzentration von Retinol kein Unterschied zwischen den Gruppen vorhanden. Die Absenkung der Retinolkonzentration im Plasma in der Behandlungsgruppe ist daher vermutlich weniger ein Ergebnis der GTE-Supplementation als ein Resultat der Veränderungen in den Plasmakonzentrationen von TAG und Chol. Damit zeigte der Parameter Retinol

keinen Effekt einer möglichen Entzündung wie es bei den Studien von Gessner et al. (2015) und Winkler et al. (2015) der Fall war. Eine Fütterung von Grünteessilage bei Rindern zeigte ebenfalls, wie im vorliegenden Versuch, keinen Effekt auf den Plasmagehalt von Retinol (Nishida et al. 2006). Diese Beobachtung bestärkt in der Summe das Fazit, dass in der Phase der Früh lactation nur ein geringer Effekt der Supplementation mit GTE auf das Entzündungsgeschehen und die APR vorhanden ist.

4.6 Einfluss der Fütterung von Grüntee-Extrakt auf ER-Stress

Im peripartalen Zeitraum kann es als Folge von metabolischem, oxidativem und inflammatorischem Stress zum Auftreten von ER-Stress kommen (Ringseis et al. 2014, Gessner et al. 2014, Du et al. 2017). Die im ER-Stress beteiligten Sensoren, Chaperone und Transkriptionsfaktoren stehen in Beziehung zu Genen des Lipidstoffwechsels. Daher führt ER-Stress zur Akkumulation von TAG in der Leber (Han und Kaufman 2016). Unter dem Einsatz verschiedener Polyphenole konnte bereits eine Verminderung von ER-Stress in HepG2-Zellen und damit ein anti-steatotischer Effekt erzielt werden (Li et al. 2017, Rafiei et al. 2018). In einem Rattenmodell erbrachte eine Fütterung von 100 mg/kg Resveratrol am Tag zusätzlich zu einer hoch kalorischen Diät eine Verminderung der hepatischen TAG-Konzentration, der TAG- und Chol-Plasmakonzentrationen sowie eine Verminderung von ER-Stress erkennbar durch geringere Konzentrationen der Proteine pPERK, ATF4, BiP und CHOP in der Leber (Pan et al. 2015). Unter dem Einsatz von 0,5 % (w/vol) GTE konnte bei Mäusen, welche eine Fett-Diät bekamen, eine Verminderung der Genexpressionen von BiP, XBP1s und ATF4 im Muskel gezeigt werden (Rodriguez et al. 2015). In einem Rattenmodell mit Nicotin-Behandlung konnte der Einsatz von 2 % GTE eine Absenkung der TAG-Konzentration im Plasma, der MDA-Konzentration im Plasma als Parameter für oxidativen Stress und eine Absenkung der Expressionen der Gene GRP78 und CHOP als Parameter für ER-Stress und Apoptose erreichen (Nacera et al. 2017).

Die Auslösung der UPR ist Folge einer Stresssituation der Leber nach der Kalbung, um anschließend ein Gleichgewicht zwischen der Proteinfaltungskapazität im ER und der Proteinbeladung wieder zu erlangen (Cnop et al. 2012, Ringseis et al. 2014). Ein Maximum von ER-Stress ist in den Wochen 1 bis 5 nach der Kalbung zu beobachten (Gessner et al. 2013a, 2014). In der vorliegenden Arbeit fielen die Expressionen der UPR-Zielgene in der Leber von der ersten zur siebten Laktationswoche mit wenigen Ausnahmen ab. Eine deutliche Abnahme der Expression in der Leber zeigte das Gen FGF21, welches in der ersten Woche nach der Kalbung die höchste Konzentration aufwies. In der Studie von Schoenberg et al. (2011) konnte bereits ein Zeitverlauf der Plasmakonzentration von FGF21 im peripartalen Zeitraum der Kuh dokumentiert werden, wobei am Tag der Kalbung ein Maximum erreicht war.

Mit dem vorliegenden Versuch sollte die Hypothese überprüft werden, dass der Einsatz von GTE die Expression von Genen der UPR in der Leber bei Kühen in der peripartalen Phase herabsetzt. Obwohl über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet kein signifikanter Effekt der Behandlung auf die Expressionen der UPR-Zielgene zu sehen war, waren unter Einsatz von GTE die hepatischen Expressionen der Gene HSPA5 und CASP3 zum Zeitpunkt 8 d p.p. niedriger als bei den Kontrolltieren. Die Expressionen der Gene DDIT3, DNAJC3 und EDEM1 zeigten eine Interaktion zwischen der Behandlung und der Zeit, dabei waren die Expressionen in der ersten Laktationswoche in der Behandlungsgruppe um ca. 30 bis 40 % niedriger als in der Kontrollgruppe. Die Proteine aus den Genen HSPA5 und DNAJC3 sind Chaperone der Qualitätskontrolle der Proteinfaltung, wobei HSPA5 als Masterregulator fungiert (Walter und Ron 2011, Cnop et al. 2012). EDEM1 ist im Abbau fehlgefalteter Proteine beteiligt (Ellgaard und Helenius 2003), CASP3 und DDIT3 spielen eine Rolle in der Apoptose, welche eingeleitet wird, wenn eine Homöostase der Zelle nicht mehr zu erreichen ist (Walter und Ron 2011, Cnop et al. 2012). Die Ergebnisse zeigen, dass die Supplementation mit GTE ER-Stress bei Kühen in der Früh lactation vermindern kann. Eine ähnliche Beobachtung machten Gessner et al. (2015) unter Verwendung von Traubenkern- und Traubentrestereextrakt in der Früh lactation, wobei ein Trend hin zu einer Absenkung der Expression von UPR-Zielgenen in der Leber zu beobachten war. In der Leber von früh lactierenden Kühen zeigte der Einsatz des Gemisches aus Grünem Tee- und Kurkumaextrakt über den Versuchszeitraum kein Absinken der Expression von UPR-Zielgenen, jedoch wurden teilweise in der ersten Laktationswoche Verminderungen der Expressionen um mehr als 40 % durch den Einsatz des Polyphenolmixes erreicht (Winkler et al. 2015). Ein deutliches Herunterregulieren von UPR-Zielgenen konnten Gessner et al. (2017) unter Einsatz von Traubenkern- und Traubentrestereextrakt in der Früh lactation in einer Transkriptomanalyse feststellen. Die Transkriptomanalyse in der Leber von früh lactierenden Kühen zeigte, dass der Einsatz von Traubenkern- und Traubentrestereextrakt viele Zielgene der UPR in der Leber herunterregulierte, unter anderem HSPA5 und DNAJC-Homologe (Gessner et al. 2017). Die vorliegenden Ergebnisse und vorangegangene Studien zeigen, dass der Einsatz von Polyphenolen das Auftreten von ER-Stress in der Leber von früh lactierenden Kühen vermindern kann und somit die Gesundheit der Tiere verbessert.

Der Einsatz von Traubenkern- und Traubentresterextrakt in der Frühlaktation bei Kühen konnte außerdem eine Minderung der hepatischen Expression von FGF21 bewirken (Gessner et al. 2015). Nicht nur über den Transkriptionsfaktor PPAR α , sondern auch durch ER-Stress kann FGF21 induziert werden (Badman et al. 2007, Wan et al. 2014). Dabei wird die Transkription von FGF21 über den Signalweg von PERK-eIF2 α -ATF4 oder aber über CHOP aktiviert (Cnop et al. 2012, Wan et al. 2014). Eine signifikante Verminderung der hepatischen Expression von FGF21 konnte unter dem Einsatz von GTE in der Frühlaktation nicht beobachtet werden. Messungen von der metabolischen Belastung der Leber (NEFA, BHBA), oxidativem Stress und Entzündungsmediatoren, welche mit ER-Stress in Zusammenhang stehen (Ringseis 2014, Han und Kaufman 2016), erbrachten nur vereinzelt signifikante Unterschiede zwischen der Behandlungs- und der Kontrollgruppe. Da FGF21 als Stressindikator dient, könnte auf Grund eines niedrigen Stressniveaus ein Anstieg dieses Parameters ausgeblieben sein.

5 Zusammenfassung

Im peripartalen Zeitraum ist die Kuh mit metabolischen und inflammatorischen Herausforderungen konfrontiert, welche zu oxidativem Stress und Stress des endoplasmatischen Retikulums (ER-Stress) führen. Polyphenole besitzen antioxidative und anti-inflammatorische Eigenschaften. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese überprüft, dass der Einsatz von polyphenolhaltigem Grüntee-Extrakt (GTE) das Ausmaß von oxidativem Stress, Entzündung und ER-Stress in der peripartalen Phase vermindert.

Insgesamt wurden 30 Deutsch Holstein Kühe in zwei Gruppen, einer Kontroll- und einer Behandlungsgruppe, mit je 15 Tieren unterteilt. Der Behandlungsgruppe wurde eine Woche vor der Kalbung 10 g GTE und eine Woche nach der Kalbung 20 g GTE zusätzlich zur Totalen-Mischration verabreicht. Leistungsdaten wurden über die ersten 7 Laktationswochen erhoben. Zu den Zeitpunkten 8 Tage, 28 Tage und 50 Tage nach der Kalbung wurden Blut- und Leberproben gezogen.

Tiere, die GTE erhielten, hatten einen geringeren Milchfettgehalt, eine geringere Energie-korrigierte Milchleistung und eine weniger stark negative Energiebilanz. Insgesamt hatte der Einsatz von GTE einen geringen Einfluss auf den Fettstoffwechsel in der peripartalen Phase. Sowohl bei den Plasmaparametern zur Beurteilung des antioxidativen Status als auch bei den Expressionen der *nuclear factor E2 related factor 2* (Nrf2)-Zielgene in der Leber war kein Unterschied zwischen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe vorhanden. Ein Effekt der GTE-Supplementation auf die hepatischen Expressionen inflammatorischer Gene und Gene der Akute-Phase-Reaktion (APR) sowie auf die Plasmakonzentrationen von Akute-Phase-Proteinen (APP) war in der Summe nicht vorhanden. Die Expressionen einzelner Gene der *unfolded protein response* (UPR) in der Leber waren in der ersten Laktationswoche in der Behandlungsgruppe niedriger als in der Kontrollgruppe.

Als Schlussfolgerung konnte in der vorliegenden Arbeit die Hypothese, dass die Supplementation mit GTE eine Verminderung von oxidativem Stress und Entzündung im peripartalen Zeitraum bewirkt, nicht bestätigt werden. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann eine Verminderung von ER-Stress in der ersten

Laktationswoche unter Supplementation von GTE vermutet werden sowie eine Verbesserung der Energiebilanz auf Grund der Verminderung des Milchfettgehaltes.

6 Summary

During the peripartal period, cows are faced with metabolic and inflammatory challenges that lead to oxidative stress and endoplasmic reticulum stress (ER stress). Polyphenols are secondary plant metabolites that have antioxidant and anti-inflammatory effects. In the present study, effects of green tea extract (GTE) on oxidative stress, inflammation and ER stress, during the peripartal phase were examined.

To check this hypothesis, 30 German Holstein cows were divided equally among the control group and the treatment group. Cows in the treatment group were fed 10 g GTE one week before calving and 20 g GTE one week after calving in addition to the total mixed ratio. Performance data were collected during the first seven weeks of lactation. Blood and liver samples were taken from cows at 8 days, 28 days and 50 days after calving.

Cows with GTE supplementation showed a lower milk fat content, a lower energy-corrected milk performance and a slight reduction in energy balance. After examining hepatic genes responsible for lipid metabolism, it was seen that GTE only had minor influence on lipid metabolism during the peripartal period. With respect to oxidative stress in the plasma and the hepatic gene expression of nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2) target genes, no differences in the early lactation between the two groups were seen. Overall, GTE supplementation had no influence on the expression of hepatic genes involved in inflammation or the acute phase reaction. The concentrations of the acute phase proteins in the plasma did not differ between the two groups. Further, GTE feeding did have a minor effect on the expression of hepatic genes targeted by the unfolded protein response (UPR) during lactation. Some genes in this signalling pathway were downregulated in the first week of lactation, in the treatment group.

Overall, the hypothesis of an improvement in oxidative stress and inflammation using GTE could not be confirmed in the present study. Nonetheless, the results suggest a reduction in ER stress in the first week of lactation, as well as an improvement in energy efficiency due to the reduction in the milk fat content.

7 Literaturverzeichnis

- Abarghuei M.J., Rouzbehan Y., Salem A.Z.M., Zamiri M.J. (2014): Nitrogen balance, blood metabolites and milk fatty acid composition of dairy cows fed pomegranate-peel extract. *Livestock Science*. 164, 72-80.
- Abd Eldaim M.A., Kamikawa A., Soliman M.M., Ahmed M.M., Okamatsu-Ogura Y., Terao A., Miyamoto T., Kimura K. (2010): Retinol binding protein 4 in dairy cows: its presence in colostrums and alteration in plasma during fasting, inflammation, and the peripartum period. *Journal of Dairy Research*. 77, 27-32.
- Abe K., Ijiri M., Suzuki T., Taguchi K., Koyama Y., Isemura M. (2005): Green tea with a high catechin content suppresses inflammatory cytokine expression in the galactosamine-injured rat liver. *Biomed Res*. 26, 187-192.
- Abuajamieh M., Kvidera S.K., Sanz Fernandez M.V., Nayeri A., Upah N.C., Nolan E.A., Lei S.M., DeFrain J.M., Green H.B., Schoenberg K.M., Trout W.E., Baumgard L.H. (2016): Inflammatory biomarkers are associated with ketosis in periparturient holstein cows. *Research in Veterinary Science*. 109, 81-85.
- ADR (Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter e.V.) - Richtlinie 1.1 für das Verfahren der Durchführung der Milchleistungs- und Qualitätsprüfung (MLP) bei Rindern. Stand 28.05.2001, Bonn.
- Akbar H., Batistel F., Drackley J.K., Looor J.J. (2015): Alterations in hepatic FGF21, co-regulated genes, and upstream metabolic genes in response to nutrition, ketosis and inflammation in periparturient holstein cows. *PLoS ONE*. 10(10).
- Allen M.S. (2000): Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. Symposium: Dry matter intake of lactating dairy cattle, *J Dairy Sci*. 83, 1598-1624.
- Amm I., Sommer T., Wolf D.H. (2014): Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1843, 182-196.

-
- Anesini C., Ferraro G.E., Filip R. (2008): Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. *J Agric Food Chem.* 56, 9225-9229.
- Attaix D., Rémond D., Savary-Auzeloux I.C. (2005): Protein metabolism and turnover. in: Dijkstra J., Forbes J.M., France J.: Quantitation aspects of ruminant digestion and metabolism. *CAB International. 2nd edition*, 373-397.
- Auldist M.J., Coats S., Rogers G.L., McDowell G.H. (1995): Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. *Australian Journal of Experimental Agriculture.* 35427-35436.
- Badman M.K., Pissios P., Kennedy A.R., Koukos G., Flier J.S., Maratos-Flier E. (2007): Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPAR alpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* 5, 426-437.
- Baeuerle P.A. und Henkel T. (1994): Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev.* 12, 141-179.
- Bagga A., Randhawa S.S., Sharma S., Bansal B.K. (2016): Acute phase response in lame crossbred dairy cattle. *Veterinary World.* 9(11), 1204-1208.
- Baird G.D. (1981): Lactation, pregnancy and metabolic disorder in the ruminant. *Proc Nutr Soc.* 40, 115-120.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006): Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry.* 99, 191-203.
- Balz, M.K.; Schulte, E., Thier, H.P. (1993): Simultaneous determination of α -tocopherol acetate, tocopherols and tocotrenols by HPLC with fluorescence detection in foods. *European Journal of Lipid Science and Technology.* 95, 215-220.

-
- Basiricó L., Morera P., Dipasquale D., Bernini R., Santi L., Romani A., Lacetera N., Bernabucci U. (2019): (-)-Epigallocatechin-3-gallate and hydroxytyrosol improved antioxidative and anti-inflammatory responses in bovine mammary epithelial cells. *Animal*. 1-10.
- Batistel F., Arroyo J.M., Garces C.I.M., Trevisi E., Parys C., Ballou, M.A., Cardoso F.C., Looor J.J. (2018): Ethyl-cellulose rumen-protected methionine alleviates inflammation and oxidative stress and improves neutrophil function during the periparturient period and early lactation in holstein dairy cows. *J Dairy Sci*. 101, 480-490.
- Bauchart D. (1993): Lipid absorption and transport in ruminants. *J Dairy Sci*. 76, 3864-3881.
- Bauchart D., Gruffat D., Durand D. (1996): Lipid absorption and hepatic metabolism in ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*. 55, 39-47.
- Bauman D.E. und Griinari J.M. (2003): Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu Rev Nutr*. 23, 203-227.
- Bell A.W. (1995): Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci*. 73, 2804-2819.
- Benchaar C., McAllister T.A., Chouinard P.Y. (2008): Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or yucca schidigera saponin extracts. *J Dairy Sci*. 91, 4765-4777.
- Bergman E.N. (1990): Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*. 70(2), 567-590.
- Bernabucci U., Ronchi B., Lecetera N., Nardone A. (2005): Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci*. 88, 2017-2026.

-
- Berry C.L. (2005): Untersuchung von Blutparametern bei Jungrindern der Rassen Deutsche Holstein und Deutsches Braunvieh. *Aus dem Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung und der Klinik für Rinder der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Dissertation.*
- Bertoni G., Trevisi E., Han X., Bionaz M. (2008): Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *J Dairy Sci.* 91, 3300-3310.
- Bionaz M., Trevisi E., Calamari L., Librandi F., Ferrari A., Bertoni G. (2007): Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. *J Dairy Sci.* 90, 1740-1750.
- Bobe G., Young J.W., Beitz D.C. (2004): Invited review: Pathology, etiology, prevention and treatment of fatty liver in dairy cows. *J Dairy Sci.* 87, 3105-3124.
- Bossaert P., Trevisi E., Opsomer G., Bertoni G., De Vliegher S., Leroy J.L.M.R. (2012): The association between indicators of inflammation and liver variables during the transition period in high-yielding dairy cows: An observational study. *The Veterinary Journal.* 192, 222-225.
- Bradford B.J., Mamedova L.K., Minton J.E., Drouillard J.S., Johnson B.J. (2009): Daily injection of tumor necrosis factor- α increases hepatic triglycerides and alters transcript abundance of metabolic genes in lactating dairy cattle. *J Nutr.* 139, 1451-1456.
- Bradford B.J., Yuan K., Farney J.K., Mamedova L.K., Carpenter A.J. (2015): Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. *J Dairy Sci.* 98, 6631-6650.
- Bravo L. (1998): Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews.* 56(1), 317-333.

-
- Bravo R., Parra V., Gatica D., Rodriguez A.E., Torrealba N., Paredes F., Wang Z.V., Zorzano A., Hill J.A., Jaimovich E., Quest A.F.G., Lavandero S. (2013): Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: Dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol.* 301, 215- 290.
- Buchberger A., Bukau B., Sommer T. (2010): Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: Brothers in arms. *Molecular Cell.* 40, October 22, 238-252.
- Bühler S., Frahm J., Tienken R., Kersten S., Meyer U., Huber K., Dänicke S. (2018): Effects of energy supply and nicotinic acid supplementation on serum anti-oxidative capacity and on expression of oxidative stress-related genes in blood leucocytes of periparturient primi-and pluriparous dairy cows. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 102, e87-e98.
- Burfeind K.G., Michaelis K.A., Marks D.L. (2016): The central role of hypothalamic inflammation in the acute illness response and cachexia. *Semin Cell Dev Biol.* 54, 42-52.
- Bursill C., Roach P.D., Bottema C.D.K., Pal S. (2001): Green tea upregulates the low-density lipoprotein receptor through the sterol-regulated element binding protein in HepG2 liver cells. *J Agric Food Chem.* 49, 5639-5645.
- Bursill C., Roach P.D. (2006): Modulation of cholesterol metabolism by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate in cultured human liver (HepG2) cells. *J Agric Food Chem.* 54, 1621-1626.
- Caamaño J. und Hunter C.A. (2002): NF- κ B family of transcription factors: Central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clinical Microbiology reviews.* 414-429.
- Caixeta L.S., Giesy S.L., Krumm C.S., Perfield II J.W., Butterfield A., Boisclair Y.R. (2019): Fibroblast growth factor-21 (FGF21) administration to early-lactating dairy cows. II. Pharmacokinetics, whole-animal performance, and lipid metabolism. *J Dairy Sci.* 102(12).

-
- Cao G., Sofic E., Prior R.L. (1996): Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J Agric Food Chem.* 44, 3426-3431.
- Cao X. (2016): Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease. *Nature reviews immunology.* 16, 35-50.
- Ceciliani F., Ceron J.J., Eckersall P.D., Sauerwein H. (2012): Acute phase proteins in ruminants. *J Proteomics.* 75, 4207-4231.
- Chedea V.S., Pelmus R.S., Lazar C., Pistol G.C., Calin L.G., Toma S.M., Dragomir C., Taranu I. (2017): Effects of a diet containing dried grape pomace on blood metabolites and milk composition of dairy cows. *J Sci Food Agric.* 97, 2516-2523.
- Chen C., Yu R., Owuor E.D., Kong A.-N. (2000): Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Arch Pharm Res.* 23(6), 605-612.
- Cnop M., Foufelle F., Velloso L.A. (2012): Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends in Molecular Medicine.* January, 18(1), 59-68.
- De Hoff J.L., Davidson J.H., Kritchevsky V. (1978): An enzymatic assay for determining free and total cholesterol in tissues. *Clin Chem.* 24, 433-435.
- De Nardi R., Marchesini G., Plaizier J.C., Li S., Khafipour E., Ricci R., Andrighetto I., Segato S. (2014): Use of dicarboxylic acids and polyphenols to attenuate reticular pH drop and acute phase response in dairy heifers fed a high grain diet. *BMC Veterinary Research.* 10(277).
- Dębski B., Nowicki T., Zalewski W., Ochota M., Mrowiec J., Twardoń J. (2016): Evaluation of acute phase proteins in clinically healthy dairy cows in perinatal period and during lactation. *Polish Journal of Veterinary Sciences.* 19(3), 519-523.
- Delves P.J. und Roitt I.M. (2000): Advances in immunology - The immune system, first of two parts. *N Engl J Med.* 343, 37-49.

-
- DHV (Deutsch Holstein Verband): Deutsch Holsteins – 21.168 kg Milch! *Milchrind*. 1/2012. Internet: <https://www.elite-magazin.de/news/nachrichten/21168-kg-milch-11164.html> (04.11.19)
- Drackley J.K., Overton T.R., Douglas G.N. (2001): Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J Dairy Sci.* 84, E100-E112.
- Drackley J.K., Dann H.M., Doouglas N., Guretzky N.A.J., Litherland N.B., Underwood J.P., Loor J.J. (2005): Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital J Anim Sci.* (4), 323-344.
- Du X., Chen L., Huang D., Peng Z., Zhao C., Zhang Y., Zhu Y., Wang Z., Li X., Liu G. (2017): Elevated apoptosis in the liver of dairy cows with ketosis. *Cell Physiol Biochem.* 43, 568-578.
- Durmic Z., Blache D. (2012): Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Animal Feed Science and Technology.* 176, 150-162.
- Ebermann R. und Elmadfa I. (2011): Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung. Phenolische Verbindungen als Bestandteile von Lebensmitteln. *Springer WienNewYork*. Deutschland, 2. Auflage, 191-213.
- Eder K. und Kirchgeßner M. (1994): Dietary fat influences the effect of zinc deficiency on liver lipids and fatty acids in rats force-fed equal quantities of diet. *Biochemical and Molecular Roles of Nutrients. American Institute of Nutrition.* 1917-1926.
- Ellgaard L., Helenius A. (2003): Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Review. Molecular cell biology.* 4, 181-191.
- Eng Q.Y., Thanikachalam P.V., Ramamurthy S. (2018): Molecular understanding of epigallocatechin gallate (EGCG) in cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Ethnopharmacology.* 210, 296-310.

-
- Ferguson L.R. (2001): Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*. 475, 89-111.
- Fleck A. (1989): Clinical and nutritional aspects of changes in acute-phase proteins during inflammation. *Proceedings of the Nutrition Society*. 48, 347-354.
- Gessner D.K., Fiesel A., Most E., Dinges J., Wen G., Ringseis R., Eder K. (2013a): Supplementation of a grape seed and grape marc meal extract decreases activities of the oxidative stress-responsive transcription factors NF- κ B and Nrf2 in the duodenal mucosa of pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 55(18).
- Gessner D.K., Schlegel G., Keller J., Schwarz F.J., Ringseis R., Eder K. (2013b): Expression of target genes of nuclear factor E2-related factor 2 in the liver of dairy cows in the transition period and at different stages of lactation. *J Dairy Sci*. 96, 1038-1043.
- Gessner D.K., Schlegel G., Ringseis R., Schwarz F.J., Eder K. (2014): Up-regulation of endoplasmic reticulum stress induced genes of the unfolded protein response in the liver of periparturient dairy cows. *BMC Veterinary Research*. 10, 46.
- Gessner D.K., Koch C., Romberg F.-J., Winkler A., Dusel G., Herzog E., Most E., Eder K. (2015): The effect of grape seed and grape marc meal extract on milk performance and the expression of genes of endoplasmic reticulum stress and inflammation in the liver of dairy cows in early lactation. *J Dairy Sci*. 98, 1-13.
- Gessner D.K., Ringseis R., Eder K. (2016): Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*.
- Gessner D.K., Winkler A., Koch C., Dusel G., Liebisch G., Ringseis R., Eder K. (2017): Analysis of hepatic transcript profile and plasma lipid profile in early lactating dairy cows fed grape seed and grape marc meal extract. *BMC Genomics*. 18, 253.

-
- GfE (Deutsche Gesellschaft für Ernährung, 2001): Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Milchkühe und Aufzuchttrinder. *DLG-Verlag*. Frankfurt am Main, Deutschland.
- Ghani M.A., Barril C., Bedgood Jr. D.R., Prenzler P.D. (2017): Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chemistry*. 230, 195-207.
- Gimeno R.E., Cao J. (2008): Mammalian glycerol-3-phosphate acyltransferases: New genes for an old activity. *J Lipid Res*. 49, 2079-2088.
- Gladine C., Rock E., Morand C., Bauchart D., Durand D. (2007): Bioavailability and antioxidant capacity of plant extracts rich in polyphenols, given as a single acute dose, in sheep made highly susceptible to lipoperoxidation. *British Journal of Nutrition*. 98, 691-701.
- Gonzalez-Baro M.R., Lewin T.M., Coleman R.A. (2007): Regulation of triglyceride metabolism II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 292(5).
- Gozho G.N., Plaizier J.C., Krause D.O., Kennedy A.D., Wittenberg K.M. (2005): Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *J Dairy Sci*. 88, 1399-1403.
- Graham H.N. (1991): Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*. 21, 334-350.
- Gross J.J., Schwarz F.J., Eder K., van Dorland H.A., Bruckmaier R.M. (2013): Liver fat content and lipid metabolism in dairy cows during early lactation and during a mid-lactation feed restriction. *J Dairy Sci*. 96, 5008-5017.
- Gruffat D., Durand D., Graulet B., Bauchart D. (1996): Regulation of VLDL synthesis and secretion in the liver. *Reprod Nutr Dev*. 36, 375-389.
- Gruffat D., Durand D., Chilliard Y., Williams P., Bauchart D. (1997): Hepatic gene expression of apolipoprotein B100 during early lactation in underfed, high producing dairy cows. *J Dairy Sci*. 80, 657-666.

-
- Grummer R.R. (1993): Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci.* 76, 3882-3896.
- Grummer R.R. (2008): Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *The Veterinary Journal.* 176, 10-20.
- Han J. und Kaufman R.J. (2016): The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. *J Lipid Res.* 57, 1329-1338.
- Hanhineva K., Törrönen R., Bondia-Pons I., Pekkinen J., Kolehmainen M., Mykkänen H., Poutanen K. (2010): Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci.* 11, 1365-1402.
- Hara A., Radin N. S. (1978): Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem.* 90, 420-426.
- Harding H.P., Zhang Y., Ron D. (1999): Protein translation and folding are coupled by an endoplasmicreticulum-resident kinase. *Nature.* 397, 271-274.
- Harvatine K.J., Boisclair Y.R., Bauman D.E. (2009): Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal.* 3(1), 40-54.
- Hashemzadeh-Cigari F., Ghorbani G.R., Khorvash M., Riasi A., Taghizadeh A., Zebeli Q. (2015): Supplementation of herbal plants differently modulated metabolic profile, insulin sensitivity, and oxidative stress in transition dairy cows fed various extruded oil seeds. *Preventive Veterinary Medicine.* 118, 45-55.
- Hayakawa S., Saito K., Miyoshi N., Ohishi T., Oishi Y., Miyoshi M., Nakamura Y. (2016): Anti-cancer effects of green tea by either anti- or pro- oxidative mechanisms. *Asian Pac J Cancer Prev.* 17(4), 1649-1654.
- Hayirli A. (2006): The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Veterinary Research Communications.* 30, 749-774.
- Hocquette J.-F., Bauchart D. (1999): Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals. *Reprod Nutr Dev.* 39, 27-48.

-
- Hoffmann A. und Baltimore D. (2006): Circuitry of nuclear factor κ B signaling. *Immunological Reviews*. 210, 171-186.
- Höhler D., Frohlich A.A., Marquardt R.R., Stelsovsky H. (1998): Extraction of α -tocopherol from serum prior to reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 973-978.
- Hollman, P.C.H. (2001): Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81, 842-852.
- Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S. (2002): SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *Clin Invest*. 109, 1125-1131.
- Huang Z., Xu A., Cheung B.M.Y. (2017): The potential role of fibroblast growth factor 21 in lipid metabolism and hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 19(28).
- Ishida K., Kishi Y., Oishi K., Hirooka H., Kumagai H. (2015): Effects of feeding polyphenol-rich winery wastes on digestibility, nitrogen utilization, ruminal fermentation, antioxidant status and oxidative stress in wethers. *Animal Science Journal*. 86, 260-269.
- Jentsch A.M., Bachmann H., Fürst P., Biesalski H.K. (1996): Improved analysis human of malondialdehyd in body fluids. *Free Radical Biology & Medicine*. 20(2), 251-256.
- Jiang S., Yan C., Fang Q., Shao M., Zhang Y., Liu Y., Deng Y., Shan B., Liu J., Li H., Yang L., Zhou J., Dai Z., Liu Y., Jia W. (2014): Fibroblast growth factor 21 is regulated by the IRE1 α -XBP1 branch of the unfolded protein response and counteracts endoplasmic reticulum stress-induced hepatic steatosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 289(43), 29751-29765.
- Jung K.-A., Kwak M.-K. (2010): The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules*. 15, 7266-7291.
- Kand'ár R.; Novotná P.; Drábková P. (2013): Determination of retinol, α -tocopherol, lycopene and β -carotene in human plasma using HPLC with UV-Vis detection. Application to a clinical study. *Journal of Chemistry*. 1-7.

-
- Karamać M. (2009): Chelation of Cu(II), Zn(II), and Fe(II) by tannin constituents of selected edible nuts. *Int J Mol Sci.* 10, 5485-5497.
- Katoh N. (2002): Relevanz of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows. *J Vet Med Sci.* 64(4), 293-307.
- Kaufman R.J. (1999): Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes & Development.* 13, 1211-1233.
- Kaya S., Merhan O., Kacar C., Colak A., Bozulkuhan K. (2016a): Determination of ceruloplasmin, some other acute phase proteins, and biochemical parameters in cows with Endometritis. *Veterinary World.* 9(10), 1056-1062.
- Kaya S., Kacar C., Ögün M., Kuru M., Özen H., Demir M.C., Sahin L., Zonturlu A.K. (2016b): Evaluation of serum C-reactive protein and natural antibodies in cows with endometritis. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 22(5), 709-715.
- Khan J.M., Jacometo C.B., Graungard D.E., Corrêa M.N., Schmitt E., Cardoso F., Looor J.J. (2014): Overfeeding dairy cattle during late-pregnancy alters hepatic PPAR α -regulated pathways including hepatokines: Impact on metabolism and peripheral insulin sensitivity. *Gene Regulation and Systems Biology.* 8, 97-111.
- Kharitonov A., Shiyanova T.L., Koester A., Ford A.M., Micanovic R., Galbreath E.J., Sandusky G.E., Hammond L.J., Moyers J.S., Owens R.A., Gromada J., Brozinick J.T., Hawkins E.D., Wroblewski V.J., Li D.-S., Mehrbod F., Jaskunas S.R., Shanafelt A.B. (2005): FGF21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest.* 115(6), 1627-1635.
- Khokhar S. und Magnusdottir S.G.M. (2002): Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50, 565-570.
- Kirchgeßner M. (2004): Tierernährung. *DLG Verlag.* Frankfurt, 11. Auflage.

-
- Kizil O., Akar Y., Saat N., Kizil M., Yuksel M. (2007): The plasma lipid peroxidation intensity (MDA) and chain-breaking antioxidant concentrations in the cows with clinic or subclinic mastitis. *Revue Méd Vét.* 158(11), 529-533.
- Kolling G.J., Stivanien S.C.B., Gabbi A.M., Machado F.S., Ferreira A.L., Campos M.M., Tommich T.R., Cunha C.S., Dill S.W., Peireira L.G.R., Fischer V. (2018): Performance and methane emissions in dairy cows fed oregano and green tea extracts as feed additives. *J Dairy Sci.* 101, 4221-4234.
- Kono N. und Arai H. (2015): Intracellular transport of fat-soluble vitamins A and E. *Traffic* 16, 19-34.
- Konvicná J., Vargová M., Paulíková I., Kovác G., Kostecká Z. (2015): Oxidative stress and antioxidant status in dairy cows during prepartal and postpartal periods. *Acta Vet Brno.* 84, 133-140.
- Kronberg S.L. und Schauer C.S. (2013): Cattle and sheep develop preference for drinking water containing grape seed tannin. *Animal.* 7(10), 1714-1720.
- Krumm C.S., Giesy S.L., Caixeta L.S., Perfield 2nd J.W., Sauerwein H., Moore B.L., Boisclair Y.R. (2019): Fibroblast growth factor-21 (FGF21) administration to early-lactating dairy cows. I. Effects on signaling and indices of insulin action. *J Dairy Sci.* 102(12).
- Kushibiki S., Hodate K., Shingu H., Obara Y., Touno E., Shinoda M., Yokomizo Y. (2003): Metabolic and lactational responses during recombinant bovine tumor necrosis factor- α treatment in lactating cows. *J Dairy Sci.* 86, 819-827.
- Lewandowska U., Szewczyk K., Hrabec E., Janecka A., Gorlach S. (2013): Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols. *J Agric Food Chem.* 61, 12183-12199
- Li F., Yang Y., Yang L., Wang K., Zhang X., Zong Y., Ding Y., Wang C., Zhang L., Ji G. (2017): Resveratrol alleviates FFA and CCl₄ induced apoptosis in HepG2 cells via restoring endoplasmic reticulum stress. *Oncotarget.* 8(27), 43799-43809.

-
- Li Y., Ding H.Y., Wang X.C., Feng S.B., Li X.B., Wang Z., Liu G.W., Li X.W. (2016): An association between the level of oxidative stress and the concentrations of NEFA and BHBA in the plasma of ketotic dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 100, 844-851.
- Lin C.-L., Huang H.-C., Lin J.-K. (2007): Theaflavins attenuate hepatic lipid accumulation through activating AMPK in human HepG2 cells. *J Lipid Res*. 48, 2334-2343.
- Liu C., Ma J., Sun J., Cheng C., Feng Z., Jiang H., Yang W. (2017): Flavonoid-rich extract of paulownia fortunei flowers attenuates diet-induced hyperlipidemia, hepatic steatosis and insulin resistance in obesity mice by AMPK pathway. *Nutrients*. 9, 959.
- Liu H.W., Zhou D.W., Li K. (2013): Effects of chestnut tannins on performance and antioxidative status of transition dairy cows. *J Dairy Sci*. 96, 5901-5907.
- Loeffler K. und Gäbel G. (2018): Anatomie und Physiologie der Haustiere. *Verlag Eugen Ulmer Stuttgart*. 15. Auflage.
- Lomax M.A. und Baird G.D. (1983): Blood flow and nutrient exchange across the liver and gut of the dairy cow. *Br J Nutr*. 49, 481-496.
- Ma Q. (2013): Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 53, 401-426.
- Maciej J., Schäff C.T., Kanitz E., Tuchscherer A., Bruckmaier R.M., Wolfram S., Hammon H.M. (2016): Short communication: Effects of oral flavonoid supplementation on the metabolic and antioxidative status of newborn dairy calves. *J Dairy Sci*. 99, 805-811.
- Magata F., Morino I., Teramura M., Tsunoda E., Kawashima C., Haneda S., Miyamoto A., Kida K., Shimizu T. (2017): Impact of metritis on the generation of reactive oxygen species by circulating phagocytes and plasma lipopolysaccharide concentration in peripartum dairy cows. *Animal Science Journal*. 88, 248-253.

-
- Mahgoub O., Kadim I.T., Tageldin M.H., Al-Marzooqi W.S., Khalaf S., Ali A.A., Al-Amri I. (2008): Pathological features in sheep fed rations constaining phenolsand condensed tannins. *J Anim Vet Adv.* 7(9), 1105-1109.
- Makkar H.P.S., Blümmel M., Becker K. (1995): In vitro effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *J Sci Food Agric.* 69, 481-493.
- Makkar H.P.S (2003a): Quantification of tannins in tree and shrub foliage - A laboratory manual. *Kluwer Academic Publishers.* Holland.
- Makkar H.P.S. (2003b): Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. Review. *Small Ruminant Research.* 49, 241-256.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004): Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79, 727-747.
- Maratos-Flier E. (2017): Fatty liver and FGF21 physiology. *Experimental Cell Research.* 360, 2-5.
- Marín L., Miguélez E.M., Villar C.J., Lombó F. (2015): Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Antimicrobial properties. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International.* 2015, 1-18
- Martin Bauer Group (o.J.): Plantextrakt – Tea for industries; refreshing tea ideas for the food and beverage sector.
- Maruyama R., Shimizu M., Hashidume T., Inoue J., Itoh N., Sato R. (2018): FGF21 alleviates hepatic endoplasmatic reticulum stress under physiological conditions. *J Nutr Sci Vitaminol.* 64, 200-208.
- Maunsell F.P., Morin D.E., Constable P.D., Hurley W.L., McCoy G.C., Kakoma I., Isaacson R.E. (1998): Effects of mastitis on the volume and composition of colostrum produced by Holstein cows. *J Dairy Sci.* 81, 1291-1299.
- Miller J.K., Brzezinska-Slebodzinska E. (1993): Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J Dairy Sci.* 76, 2812-2823.

-
- Miyoshi N., Pervin M., Suzuki T., Unno K., Isemaru M., Nakamura Y. (2015): Green tea catechins for well-being and therapy: prospects and opportunities. *Botanics, Targets and Therapy*. 5, 85-96.
- Moate P.J., Williams S.R.O., Torok V.A., Hannah M.C., Ribaux B.E., Tavendale M.H., Eckhard R.J., Jacobs J.L., Auldism M.J., Wales W.J. (2014): Grape marc reduces methane emissions when fed to dairy cows. *J Dairy Sci*. 97, 5073-5087.
- Nacera H., Gregory T., Sihem B., Salah A., Souhila A.-B. (2017): Green tea beverage and epigallocatechin gallate attenuate nicotine cardiocytotoxicity in rat. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 74(1), 277-287.
- Ng-Kwai-Hang K.F., Hayes J.F., Moxley J.E., Monardes H.G. (1982): Environmental influences on protein content and composition of bovine milk. *J Dairy Sci*. 65, 1993-1998.
- Nishida T., Eruden B., Hosoda K., Matsuyama H., Nakagawa K., Miyazawa T., Shioya S. (2006): Effects of green tea (*camellia sinensis*) waste silage and polyethylene glycol on ruminal fermentation and blood components in cattle. *Asian-Aust J Anim Sci*. 19(12), 1728-1736.
- Oh J., Wall E.H., Bravo D.M., Hristov A.N. (2017): Host-mediated effects of phytonutrients in ruminants: A review. *J Dairy Sci*. 100, 5974-5983.
- Ohishi T., Goto S., Monira P., Isemaru M., Nakamura Y. (2016): Anti-inflammatory action of green tea. *Anti-inflammatory & anti-allergy agents in Medicinal Chemistry*. 15, 74-90.
- Oliveira R.A., Narciso C.D., Bisinotto R.S., Perdomo M.C., Ballou M.A., Dreher M. (2010): Effects of feeding polyphenols from pomegranate extract on health, growth, nutrient digestion, and immunocompetence of calves. *J Dairy Sci*. 93, 4280-4291.

-
- Ordovas L., Zaragoza P., Altarriba J., Rodellar C. (2008): Identification of 14 new single nucleotide polymorphisms in the bovine SLC27A1 gene and evaluation of their association with milk fat content. *Journal of Dairy Research*. 75, 129-134.
- Pan Q.-R., Ren Y.-L., Liu W.-X., Hu Y.-J., Zheng J.-S., Xu Y., Wang G. (2015): Resveratrol prevents hepatic steatosis and endoplasmic reticulum stress and regulates the expression of genes involved in lipid metabolism, insulin resistance, and inflammation in rats. *Nutrition Research*. 35, 576-584.
- Raboisson D., Mounié M., Maigné E. (2014): Diseases, reproductive performance, and changes in milk production associated with subclinical ketosis in dairy cows: a meta-analysis and review. *J Dairy Sci*. 97, 7547-7563.
- Rafiei H., Omidian K., Bandy B. (2018): Protection by different classes of dietary polyphenols against palmitic acid-induced steatosis, nitro-oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in HepG2 hepatocytes. *Journal of Functional Foods*. 44, 173-182.
- Ramadori G., Moriconi F., Malik K., Dudas J. (2008): Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *Journal of physiology and pharmacology*. 59(1), 107-117.
- R Core Team (2017): A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Available:<http://www.R-project.org/>.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical action decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 26(9/10), 1231-1237.
- Rezamand P., Hoagland T.A., Moyes K.M., Silbart L.K., Andrew S.M. (2007): Energy status, lipid-soluble vitamins, and acute phase proteins in periparturient Holstein and Jersey dairy cows with or without subclinical mastitis. *J Dairy Sci*. 90, 5097-5107.

-
- Rezamand P., Watts J.S., Hunt K.M., Bradford B.J., Mamedova L.K., Morey S.D. (2012): Bovine hepatic and adipose retinol-binding protein gene expression and relationship with tumor necrosis factor- α . *J Dairy Sci.* 95, 7097-7104.
- Ringseis R., Gessner D.K., Eder K. (2014): Molecular insights into the mechanisms of liver-associated diseases in early-lactating dairy cows: hypothetical role of endoplasmic reticulum stress. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.*
- Rira M., Morgavi D.P., Archimède H., Marie-Magdeleine C., Popova M., Bousseboua H., Doreau M. (2015): Potential of tannin-rich plants for modulating ruminal microbes and ruminal fermentation in sheep. *J Anim Sci.* 93, 334-347.
- Rodriguez J., Gilson H., Jamart C., Naslain D., Pierre N., Deldicque L., Francaux M. (2015): Pomegranate and green tea extracts protect against ER stress induced by a high-fat diet in skeletal muscle of mice. *Eur J Nutr.* 54, 377-389.
- Ron D. und Walter P. (2007): Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews, Molecular cell biology.* 8, 519-529.
- Saminathan M., Sieo C.C., Abdullah N., Vui LingWong C.M., Wan Ho Y. (2015): Effects of condensed tannin fractions of different molecular weights from a *Leucaena leucocephala* hybrid on in vitro methane production and rumen fermentation. *J Sci Food Agric.* 95, 2742-2749.
- Sánchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F. (1999): Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic compounds. *Food Research International.* 32, 407-412.
- Scalbert A. und Williamson G. (2000): Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition.* 130, 2073S-2085S.
- Schaap G.F., Kremer A.E., Lamers W.H., Jansen P.L.M., Gaemers I.C. (2013): Fibroblast growth factor 21 is induced by endoplasmic reticulum stress. *Biochimie.* 95, 692-699.

-
- Schirardin H. und Ney J. (1972): Eine vereinfachte Mikromethode zur Bestimmung von Serumalbumin mit Hilfe von Bromkresolgrün. *Z Klin Chem Klin Biochem.* 10, 338-344
- Schlegel G., Ringseis R., Keller J., Schwarz F.J., Eder K. (2012a): Changes in the expression of hepatic genes involved in cholesterol homeostasis in dairy cows in the transition period and at different stages of lactation. *J Dairy Sci.* 95, 3826-3836.
- Schlegel G., Keller J., Hirche F., Geißler S., Schwarz F.J., Ringseis R., Stangl G., Eder K. (2012b): Expression of genes involved in hepatic carnitine synthesis and uptake in dairy cows in the transition period and at different stages of lactation. *BMC Veterinary Research.* (8)28.
- Schlegel G., Ringseis R., Keller J., Schwarz F.J., Windisch W., Eder K. (2013): Expression of fibroblast growth factor 21 in the liver of dairy cows in the transition period and during lactation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 97, 820-829.
- Schoenberg K.M., Giesy S.L., Harvatine K.J., Waldron M.R., Cheng C., Kharitonov A., Boisclair Y.R. (2011): Plasma FGF21 is elevated by the intense lipid mobilization of lactation. *Endocrinology.* 152, 4652-4661.
- Schröder M. und Kaufman R.J. (2005): The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem.* 74, 739-89.
- Shi J., Yu J., Pohorly J.E., Kakuda Y. (2003): Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. Review. *J Med Food* 6(4), 291-299.
- Sidwell C.G., Salwin H., Benca M., Mitchell J.H. (1954): The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. *J Am Oil Chem Soc.* 31, 603-606.
- Singleton V.L. und Rossi J.A. Jr. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture.* 16, 144-158.

-
- Smith R.E., Tran K., Smith C.C., McDonald M., Shejwalkar P., Hara K. (2016): The role of the Nrf2/ARE antioxidant system in preventing cardiovascular diseases. *Disease*. 4, 34.
- Spears J.W. und Weiss W.P. (2008): Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *The Veterinary Journal*. 176, 70-76.
- Steinegger E. und Hänsel R. (1992): Pharmakognosie. *Springer*. 5. Auflage, S. 404.
- Stoldt A.-K., Derno M., Nürnberg G., Weitzel J.M., Otten W., Starke A., Wolfram S., Metges C.C. (2015): Effects of a 6-wk intraduodenal supplementation with quercetin on energy metabolism and indicators of liver damage in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci*. 98, 4509-4520.
- Stoldt A.-K., Derno M., Das G., Weitzel J.M., Wolfram S., Metges C.C. (2016a): Effects of rutin and buckwheat seeds on energy metabolism and methane production in dairy cows. *J Dairy Sci*. 99, 2161-2168.
- Stoldt A.-K., Mielenz M., Nürnberg G., Sauerwein H., Esatbeyoglu T., Wagner A.E., Rimbach G., Starke A., Wolfram S., Metges C.C. (2016b): Effects of a six-week intraduodenal supplementation with quercetin on liver lipid metabolism and oxidative stress in periparturient dairy cows. *J Anim. Sci*. 94, 1913-1923.
- Suganya N., Bhakkiyalakshmi E., Suriyanarayanan S., Paulmurugan R., Ramkumar K.M. (2014): Quercetin ameliorates tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in endothelial cells. *Cell Prolif*. 47, 231-240.
- Sun F., Cao Y., Cai C., Li S., Yu C., Yao J. (2016): Regulation of nutritional metabolism in transition dairy cows: Energy homeostasis and health in response to post-ruminal choline and methionine. *PLoS ONE*. 11(8).
- Surh Y.-J., Kundu J.K., Na H.-K. (2008): Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med*. 74, 1526-1539.

-
- Suzuki Y., Miyoshi N., Isemura M. (2012): Health-promoting effects of green tea. *Proc Jpn Acad. Ser. B*, 88-101.
- Tager L.R. und Krause K.M. (2011): Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 94, 2455-2464.
- Takeuchi K., Reue K. (2009): Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296(6), E1195-E1209.
- Tang D., Liu L., Ajjakber D., Ye J., Xu J., Xin X., Aisa H.A. (2018): Anti-diabetic effect of punica granatum flower polyphenols extract in type 2 diabetic rats: Activation of Akt/GSK-3 β and inhibition of IRE1 α -XBP1 pathways. *Frontiers in Endocrinology.* 9, Artikel 586.
- Tekippe J.A., Tacoma R., Hristov A.N., Lee C., Oh J., Heyler K.S., Cassidy T.W., Varga G.A., Bravo D. (2013): Effect of essential oils on ruminal fermentation and lactation performance of dairy cows. *J Dairy Sci.* 96, 7892-7903.
- Thornton B. und Basu C. (2011): Laboratory exercise – real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and molecular biology education.* 39(2), 145-154.
- Tothova C., Nagy O., Kovak G. (2014): Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a review. *Veterinari Medicina.* 59(4), 163-180.
- Trevisi E., Amadori M., Cogrossi S., Razzuoli E., Bertoni G. (2012): Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. *Research in Veterinary Science.* 93, 695-704.
- Trevisi E., Bertoni G., Lombardelli R., Minuti A. (2013): Relation of inflammation and liver function with the plasma cortisol response to adrenocorticotropin in early lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 96, 5712-5722.

-
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 3(7), research0034.1–0034.11.
- Vasta V., Daghighi M., Cappucci A., Buccioni A., Serra A., Viti C., Mele M. (2019): Invited review: Plant polyphenols and rumen microbiota responsible for fatty acid biohydrogenation, fiber digestion, and methane emission: Experimental evidence and methodological approaches. *J Dairy Sci*. 102, 3781-3804.
- VDLUFA (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten, 2007): VDLUFA-Methodenbuch. Band III: Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. Ergänzungslieferungen von 1983, 1988, 1992, 1997, 2004, 2006, 2007. VDLUFA. Darmstadt, Deutschland.
- VDLUFA (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten, 2011): VDLUFA-Methodenbuch. Band VII: Umweltanalytik. 4. Auflage. VDLUFA. Darmstadt, Deutschland.
- Vinson J.A., Dabbagh Y.A., Serry M.M., Jang J. (1995): Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J Agric Food Chem*. 43, 2800-2802.
- Viveros A., Chamorro S., Pizarro M., Arija I., Centeno C., Brenes A. (2011): Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. *Poultry Science*. 90, 566-578.
- Walter P. und Ron D. (2011): The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 334(6059), 1081-1086.
- Wan X.-S., Lu X.-H., Xiao H., Xiao Y.-C., Lin Y., Zhu H., Ding T., Yang Y., Huang Y., Zhang Y., Liu Y.-L., Xu Z.-M., Xiao J., Li X.-K. (2014): ATF4- and CHOP-dependent induction of FGF21 through endoplasmic reticulum stress. *BioMed Research International*.

-
- Wang B., Tu Y., Zhao S.P., Hao Y.H., Liu F.H., Xiong B.H., Jiang L.S. (2017): Effect of tea saponins on milk performance, milk fatty acids, and immune function in dairy cow. *J Dairy Sci.* 100, 8043-8052.
- Wang, L., Zhang B., Huang F., Liu B., Xie Y. (2016): Curcumin inhibits lipolysis via suppression of ER stress in adipose tissue and prevents hepatic insulin resistance. *J Lipid Res.* 57, 1243-1255.
- Wein S., Beyer B., Gohlke A., Blank R., Metges C.C., Wolfram S. (2016): Systemic absorption of catechins after intraruminal or intraduodenal application of a green tea extract in cows. *PLoS ONE.* 11(7).
- Winkler A., Gessner D.K., Koch C., Romberg F.-J., Dusel G., Herzog E., Most E., Eder K. (2015): Effects of a plant product consisting of green tea and curcuma extract on milk production and the expression of hepatic genes involved in endoplasmic stress response and inflammation in dairy cows. *Archives of Animal Nutrition.* 69(6), 425-441.
- Xu C., Xu Q., Chen Y., Yang W., Xia C., Yu H., Zhu K., Shen T., Zhang Z. (2015): The relationship between Fibroblast Growth Factor-21 and characteristic parameters related to energy balance in dairy cows. *BMC Veterinary Research.* 11(271).
- Xu C., Xu Q., Chen Y., Yang W., Xia C., Yu H., Zhu K., Shen T., Zhang Z. (2016): FGF-21: promising biomarker for detecting ketosis in dairy cows. *Vet Res Commun.* 40, 49-54.
- Xu J., Lloyd D.J., Hale C., Stanislaus S., Chen M., Sivitis G., Vonderfecht S., Hecht R., Li Y., Lindberg R.A., Chen J., Jung D.Y., Zhang Z., Ko H., Kim J.K., Véniant M (2009): Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes.* 58.

-
- Yadav B.K., Singh S.K., Nakade U.P., Singh V.K., Sharma A., Srivastava M., Yadav B., Singh Y., Sirohi R., Garg S.K. (2017): Ameliorative potential of prepartal trace mineral and vitamin supplementation on parturition-induced redox balance and myeloperoxidase activity of periparturient sahiwal cows. *Biol Trace Elem Res.* 177, 72-79.
- Yang F., Oz H.S., Barve S., De Villiers W.J.S., McClain C.J., Varilek G.W. (2001a): The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor- κ B activation by inhibiting I κ B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Mol Pharmacol.* 60, 528-533.
- Yang C.S., Landau J.M., Huang M.-T., Newmark H.L. (2001b): Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Reviews in Nutrition.* 21, 381-406.
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. (2012): Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 13, 134.
- Yisehak K., Becker A., Rothman J.M., Dierenfeld E.S., Marescau B., Bosch G., Hendriks W., Janssens G.P.J. (2012): Amino acid profile of salivary proteins and plasmatic trace mineral response to dietary condensed tannins in free-ranging zebu cattle (*Bos indicus*) as a marker of habitat degradation. *Livestock Science.* 144(3), 275-280.
- Youssef M.A., El-Khodery S.A., El-deeb W.M., El-Amaiem W.E.E.A. (2010): Ketosis in buffalo (*Bubalus bubalis*): clinical findings and the associated oxidative stress level. *Trop Anim Health Prod.* 42, 1771 -1777.
- Zhang G., Hailemariam D., Dervishi E., Goldansaz S.A., Deng Q., Dunn S.M., Ametaj B.N. (2016): Dairy cows affected by ketosis show alterations in innate immunity and lipid and carbohydrate metabolism during the dry off period and postpartum. *Research in Veterinary Science.* 107, 246-256.

Zhang X., Yeung D.C.Y., Karpisek M., Stejskal D., Zhou Z.-G., Liu F., Wong R.L.C., Chow W.-S., Tso A.W.K., Lam K.S.L., Xu A. (2008): Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes*. 57, 1246-1253.

Zhang X.Q., Xu C.F., Yu C.H., Chen W.X., Li Y.M. (2014): Role of endoplasmatic reticulum stress in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. February 21, 20(7), 1768-1776.

8 Erklärung

Erklärung gemäß der Promotionsordnung des Fachbereichs 09 vom 07. Juli 2004
§ 17(2)

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

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

Gießen, den 04.09.2020

.....

Corinna Sophie Brock

9 Danksagung

Mein erster Dank geht an Herrn Prof. Dr. Eder für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Ermöglichung der Promotion am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie der JLU Gießen. Er war mir ein lehrreicher und engagierter Doktorvater, der zusammen mit Frau Dr. habil. Denise Geßner mit Denkanstößen, Motivation und konstruktiver Kritik mir stets zur Seite stand.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Christian Koch und der Firma Plantextrakt GmbH & Co. KG für die Zusammenarbeit in diesem Projekt und Herrn Dr. Uwe Wenzel für die Übernahme des Zweitgutachtens. Frau Dr. Erika Most danke ich für die Möglichkeit, zwischendurch abwechslungsreiche Stunden in den Praktika verbringen zu können.

Ein besonderes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Instituts und an meine Laborgenossinnen, die durch Besprechungen und Pausen den Fortschritt dieser Arbeit unterstützt haben. Insbesondere danke ich denen, die mich stets mit Kaffee, Tee und Leckereien versorgt haben.

Abschließend möchte ich noch meiner Familie und meinen Freunden danken, die mir in allem den Rücken frei gehalten haben, immer für mich da waren und mir damit die Möglichkeit gaben, diese Arbeit zu verfassen.

Dankeschön!