



## **Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften**

**Studienarbeit zur Erlangung des akademischen Grades  
- Master of Science -**

**Thema:**

Einfluss von Niacin auf die Granulozytenfunktion bei Milchkühen  
- Untersuchung zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

**vorgelegt von:** Wendy Liermann

**Studiengang:** Agrarwirtschaft

**URN:** urn:nbn:de:gbv:519-thesis 2013-0070-3

- 1. Prüfer:** Professorin Dr. sc. agr. Heidrun Schniedewind
- 2. Prüfer:** Professor Dr. Dr. Sven Dänicke

## Inhalt

Inhalt .....	II
Abbildungsverzeichnis .....	IV
Formelverzeichnis .....	VII
Tabellenverzeichnis .....	VIII
Abkürzungsverzeichnis .....	1
1 Einleitung .....	1
1.1 Problemstellung .....	1
1.2 Zielsetzung .....	1
2 Stand der Forschung und theoretische Grundlagen .....	2
2.1 Granulozyten .....	2
2.1.1 Reaktive Sauerstoffspezies und Oxidativer Burst .....	3
2.1.2 Zelluläre Abwehrmechanismen zum Schutz gegen ROS/ Antioxidative Mechanismen .....	5
2.1.3 Oxidativer Stress .....	6
2.2 Niacin .....	8
2.2.1 Niacin in der Milchviehfütterung .....	9
2.2.2 Niacin und oxidativer Stress .....	10
3 Material und Methoden .....	12
3.1 Tierbestand .....	12
3.2 Fütterung .....	12
3.3 Blutentnahme und Probenaufbereitung .....	13
3.4 Materialien .....	15
3.5 Methoden .....	17
3.5.1 Herstellung der Niacinlösungen .....	17
3.5.2 pH-Messung .....	17
3.5.3 DHR-Assay .....	18
3.5.4 Apoptose .....	22

---

---

3.5.5	Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC's) aus dem Vollblut ...	23
3.5.6	Stoffwechselaktivität der PBMC's (AlamarBlue®-Assay).....	23
3.5.7	Proliferationstest .....	25
3.5.8	Griess-Assay.....	26
3.5.9	Statistische Auswertung .....	26
4	Ergebnisse .....	27
4.1	ROS-Produktion neutrophiler Granulozyten im zeitlichen Abstand zur Kalbung .....	27
4.2	Einfluss von Niacin auf Immunzellparameter .....	31
4.2.1	pH-Wert Messung der Niacinlösungen .....	31
4.2.2	ROS-Bildung neutrophiler Granulozyten.....	32
4.2.3	Apoptoseverhalten von Lymphozyten.....	40
4.2.4	Stoffwechselaktivität von PBMC's .....	43
4.2.5	Zellproliferation von PBMC's.....	44
4.2.6	Trypanblaufärbung/ Lebend-Tod-Färbung von PBMC's .....	47
4.2.7	Stickoxidproduktion von PBMC's .....	49
5	Diskussion.....	50
6	Schlussfolgerung.....	59
7	Zusammenfassung.....	60
8	Summary.....	62
9	Literaturverzeichnis .....	64
	Anhang.....	75
	Danksagung .....	79
	Eidesstattliche Erklärung .....	80

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Blutausstrich Rind; Neutrophiler Granulozyt zwischen mehreren Erythrozyten (Pappenheimfärbung; 1000-fache Vergrößerung) .....	2
<b>Abbildung 2:</b> Übersicht zu Blutentnahmetagen und Untersuchungsmethoden .....	14
<b>Abbildung 3 (links):</b> Repräsentative Darstellung des Anteils ROS-bildender Granulozyten mittels dot blot nach durchflusszytometrischer Messung (Bsp. Kontrollprobe/ Negativkontrolle/ Substanzkontrolle) .....	20
<b>Abbildung 4 (rechts):</b> Repräsentative Darstellung des Anteils ROS-bildender Granulozyten mittels dot blot nach durchflusszytometrischer Messung (Bsp. Positivkontrolle) .....	20
<b>Abbildung 5 A-C:</b> Repräsentative Darstellung von Histogrammen zur durchflusszytometrischen Messung der mittleren Fluoreszenzintensität ROS-bildender Granulozyten (Histogramm A: Kontrollprobe; B: Positivkontrolle; C: Substanzkontrolle).....	21
<b>Abbildung 6:</b> Plattenlayout AlamarBlue®-Assay .....	25
<b>Abbildung 7:</b> Mittlerer prozentualer Anteil R123 positiv gefärbter Granulozyten in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zur Kalbung auf basalem Level (N=3, n=9; MW ± SD) .....	28
<b>Abbildung 8:</b> Durchschnittliche mittlere Fluoreszenzintensität der R123 positiv gefärbten Granulozyten in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zur Kalbung auf basalem Level (N = 3, n = 9; MW ± SD).....	29
<b>Abbildung 9:</b> Mittlerer prozentualer Anteil R123 positiv gefärbter Granulozyten nach TPA-Stimulation in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zur Kalbung (N = 3, n = 9; MW ± SD) ..	30
<b>Abbildung 10:</b> Durchschnittliche mittlere Fluoreszenzintensität R123 positiv gefärbter Granulozyten nach TPA-Stimulation in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zur Kalbung (N = 3, n = 9; MW ± SD).....	31
<b>Abbildung 11:</b> Prozentualer Anteil R123 positiv gefärbter Granulozyten in Abhängigkeit von der Konzentration des Niacinzusatzes nach 30 Minuten Inkubationszeit auf basalem Level (N = 3, n = 9; LSMeans ± SE) .....	33
<b>Abbildung 12:</b> Prozentualer Anteil R123 positiv gefärbter Granulozyten in Abhängigkeit von der Konzentration des Niacinzusatzes nach 180 Minuten Inkubationszeit auf basalem Level (N = 3, n = 9; LSMeans ± SE).....	33
<b>Abbildung 13:</b> Mittlere Fluoreszenz R123 positiv gefärbter Granulozyten in Abhängigkeit von der Konzentration des Niacinzusatzes nach 30 Minuten Inkubationszeit auf basalem Level (N = 3, n = 9; LSMeans ± SE); a-c: p < 0,05 zwischen unterschiedlichen NA-Konzentrationen; A-D: p < 0,05 zwischen unterschiedlichen NAM-Konzentrationen.....	34

<b>Abbildung 14:</b> Mittlere Fluoreszenz R123 positiv gefärbter Granulozyten in Abhängigkeit von der Konzentration des Niacinzusatzes nach 180 Minuten Inkubationszeit auf basalem Level (N = 3, n = 9; LSMMeans ± SE); a-c: p < 0,05 zwischen unterschiedlichen NA-Konzentrationen; A-C: p < 0,05 zwischen unterschiedlichen NAM-Konzentrationen.....	35
<b>Abbildung 15:</b> Anteil R123 positiv gefärbter Granulozyten nach TPA-Stimulation in Abhängigkeit von der Konzentration des Niacinzusatzes nach 30 Minuten Inkubationszeit (N = 3, n = 9; LSMMeans ± SE) .....	37
<b>Abbildung 16:</b> Anteil R123 positiv gefärbter Granulozyten nach TPA-Stimulation in Abhängigkeit von der Konzentration des Niacinzusatzes nach 180 Minuten Inkubationszeit (N = 3, n = 9; LSMMeans ± SE).....	37
<b>Abbildung 17:</b> Mittlere Fluoreszenz R123 positiv gefärbter Granulozyten nach TPA-Stimulation in Abhängigkeit von der Konzentration des Niacinzusatzes nach 30 Minuten Inkubationszeit (N = 3, n = 9; LSMMeans ± SE) .....	38
<b>Abbildung 18:</b> Mittlere Fluoreszenz R123 positiv gefärbter Granulozyten nach TPA-Stimulation in Abhängigkeit von der Konzentration des Niacinzusatzes nach 180 Minuten Inkubationszeit (N = 3, n = 9; LSMMeans ± SE).....	39
<b>Abbildung 19:</b> Anteil Annexin-, PI-, Annexin+PI-positiv gefärbter Lymphozyten in Abhängigkeit von der Konzentration des Zusatzes an NA nach 30 Minuten Inkubationszeit (N = 2, n = 4; LSMMeans ± SE) .....	40
<b>Abbildung 20:</b> Anteil Annexin-, PI-, Annexin+PI-positiv gefärbter Lymphozyten in Abhängigkeit von der Konzentration des Zusatzes an NAM nach 30 Minuten Inkubationszeit (N = 2, n = 4; LSMMeans ± SE).....	41
<b>Abbildung 21:</b> Anteil Annexin-, PI-, Annexin+PI-positiv gefärbter Lymphozyten in Abhängigkeit von der Konzentration des Zusatzes an NA nach 180 Minuten Inkubationszeit (N = 2, n = 4, LSMMeans ± SE).....	42
<b>Abbildung 22:</b> Anteil Annexin-, PI-, Annexin+PI-positiv gefärbter Lymphozyten in Abhängigkeit von der Konzentration des Zusatzes an NAM nach 180 Minuten Inkubationszeit (N = 2, n = 4; LSMMeans ± SE).....	42
<b>Abbildung 23:</b> Stimulierbarkeit der Stoffwechselaktivität von PBMC's in Abhängig von der Niacinkonzentration (N = 3, n = 15; LSMMeans ± SE).....	44
<b>Abbildung 24 (links):</b> Entwicklung der Zellpopulationsgröße im Verhältnis zur Ausgangspopulation in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit verschieden konzentrierten Zusätzen von NA (N = 1, n = 2; MW).....	46
<b>Abbildung 25 (rechts):</b> Entwicklung der Zellpopulationsgröße im Verhältnis zur Ausgangspopulation in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit verschieden konzentrierten Zusätzen von NAM (N =1, n = 2; MW).....	46

**Abbildung 26:** Verhältnis lebender und toter Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit verschiedenen konzentrierten Zusätzen an NA (N = 1, n = 2; MW); — : lebende Zellen; - -: tote Zellen .....48

**Abbildung 27:** Verhältnis lebender und toter Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit verschiedenen konzentrierten Zusätzen an NAM (N = 1, n = 2; MW); — : lebende Zellen; - - - : tote Zellen .....48

## Formelverzeichnis

<b>Formel 1:</b> Reaktion von NADPH zu NADPH <sup>+</sup> und Bildung des Superoxidanions .....	4
<b>Formel 2:</b> Reaktion von Superoxidionen zu Wasserstoffperoxid .....	4

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Zusammensetzung des Versuchskrafftutters (% der TM).....	13
<b>Tabelle 2:</b> Übersicht der für Analysen verwendeten Materialien.....	15
<b>Tabelle 3:</b> Übersicht zur Konzentration verwendeter Niacinlösungen.....	17
<b>Tabelle 4:</b> Übersicht zu Ansätzen des DHR-Assays .....	19
<b>Tabelle 5:</b> pH-Werte nach Verdünnungen von NA und NAM mit NaCl, Blut und Medium in Abhängigkeit von der Niacinkonzentration.....	32
<b>Tabelle 6:</b> Konzentration von Stickoxiden nach ConA-Stimulation in Abhängigkeit von der Niacinkonzentration (N=2; n=2; K: N=1, n=1; LSMeans ± SE).....	49



## Abkürzungsverzeichnis

a.p.	ante partum (vor der Kal- bug)	H <sub>2</sub> O	Wasser
Bsp.	Beispiel	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
c	Konzentration	K	Kontrollprobe
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid	l	Liter
ConA	Concanavalin A	LSMeans	least square means
d	Tag	MFI	Mittlere Fluoreszenzin- tensität
dest.	destilliert	µl	Mikroliter
d.h.	das heißt	µm	Mikrometer
DHR	Dihydrorodamin 123	µM	Mikromol
DMSO	Dimethylsulfoxid	mg	Milligramm
DNA	Deoxyribonucleic acid	min	Minute
DPI	Diphenyliodonium	ml	Milliliter
∅	Durchmesser	mm	Millimeter
EDTA	Ethylene diamine tetra- acetic acid	mM	Millimol
et al.	et alii (und andere)	MW	Mittelwert
FBS	fötales bovines Serum	n	Anzahl der Wiederho- lungen
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat	N	Anzahl der Tiere
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Bundesforschungs- institut für Tiergesundheit	NA	Nicotinsäure
FWS	forward scatter	NaCl	Natriumchlorid
g	Gramm	NAD(H)	Nicotin-Adenin- Dinukleotid
°C	Grad Celsius	NADP(H)	Nicotin-Adenin- Dinukleotid-Phosphat
GSH-PX	Glutathionperoxidase	NAM	Nicotinamid
h	Stunde	NaNO <sub>2</sub>	Natriumnitrit
H <sup>+</sup>	Wasserstoff	NED	N-1-Naphtyl- ethylenediamindichlorid
HBS	HEPES-buffered saline		

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NOX	NADPH-Oxidase
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> •	Superoxidanion
OH•	
p	Irrtumswahrscheinlichkeit eines Ereignisses
PBMC	peripheral blood mononu- clear cells
PBS	phosphate buffered saline
PI	Propidium Iodid
p.p.	post partum (nach der Kal- bung)
%	Prozent
®	Eingetragenes Warenzei- chen
R123	Rhodamin 123
ROS	reactive oxygen species
RPM	round per minute
SD	Standard Derivation
SE	Standard Error
SI	Stimulationsindex
SOD	Superoxid-Dismutase
SSC	side scatter
TM	Trockenmasse
TMR	Totale Mischratio
TPA	Tetradecanoyl-12,13- phorbolacetat

# 1 Einleitung

## 1.1 Problemstellung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind zum einen ein Nebenprodukt zahlreicher Stoffwechselfvorgänge der Zelle, zum anderen ist ihre Bildung durch die Granulozyten ein essentieller Bestandteil der zellulären Immunabwehr. Als Gegenpart zum oxidativen System stehen dem Organismus einige antioxidative Schutzmechanismen zur Verfügung. Ungleichgewichte zwischen dem oxidativen und antioxidativen System führen zu oxidativem Stress. In früheren Studien wurde berichtet, dass Milchkühe während der Transitperiode, d.h. drei Wochen vor der Kalbung bis drei Wochen nach der Kalbung, in besonders hohem Maße oxidativem Stress ausgesetzt sind. Dieser ruft vor allem durch Peroxidation von Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten, DNA und anderen Makromolekülen zelluläre Schäden hervor. Weiterführend können die Folgen eines Ungleichgewichtes beider Systeme die Anfälligkeit gegenüber Krankheiten erhöhen. Die negativen Konsequenzen können Leistungseinbußen und Fruchtbarkeitsstörungen sein.

Als Vorläufer der wasserstoffübertragenden Pyridin-Koenzyme NAD(H) und NADP(H) rückt ein mögliches, antioxidatives Potential von Niacin immer mehr in den Vordergrund der Forschung zur Vermeidung von oxidativem Stress und dessen Folgeschäden. Während die Erkenntnisse in der Humanmedizin immer weiter fortschreiten, sind die Wirkmechanismen von Niacin auf die zellulären Abwehrmechanismen des Immunsystems von Milchkühen noch weitgehend unbekannt.

## 1.2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, anhand der ROS-Bildung der Granulozyten von Milchkühen einen Einblick in die Wirkungsweisen von Niacin auf die zellulären Abwehrmechanismen des Immunsystems zu erlangen. Im Vordergrund der Untersuchungen stehen insbesondere Fragestellungen zu dosisabhängigen und zeitlichen Wirkungen des Niacins sowie zum Einfluss der Niacinform. Zuvor werden jedoch Analysen zur ROS-Bildung der Granulozyten von Milchkühen während der Transitperiode vorgenommen, um grundlegende Erkenntnisse über diese Funktionen zu vertiefen.

## 2 Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

### 2.1 Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind ein Bestandteil der unspezifischen (angeborenen), zellulären Immunabwehr und bilden meist die erste Vorhut im Inflammationsbereich (EDER, 1987; PAAPE ET AL., 2003; AMSELGRUBER, 2004; TIZARD, 2004). Sie gehören zur Gruppe der Leukozyten. Der Anteil neutrophiler Granulozyten im Blut beläuft sich bei Rindern auf durchschnittlich 30 % der Gesamtleukozyten (EDER, 1987; GÖBEL, T. U. B. KASPERS, 2005). Sie werden im Knochenmark gebildet und zeigen eine geringe Lebensdauer.

Neutrophile Granulozyten (siehe Abbildung 1) besitzen einen polymorph segmentierten Nucleus, zahlreiche Granula im Zytoplasma, deren Bestandteile zur Abwehr von Mikroorganismen dienen und ein erhebliches Speichervermögen an Glykogen zur Bereitstellung des Energieträgers Glucose. Durch die mehrfach gewundene Oberfläche und die Fähigkeit intrazelluläre Vakuolen zu formen, sind sie in der Lage Mikroorganismen zu phagozytieren. Aus diesem Grund werden sie auch als Mikrophagen bezeichnet (EDER, 1987; PAAPE ET AL., 2003; AMSELGRUBER, 2004; TIZARD, 2004).



Abbildung 1: Blutausstrich Rind; Neutrophiler Granulozyt zwischen mehreren Erythrozyten (Pappenheimfärbung; 1000-fache Vergrößerung)

Quelle: Eigene Darstellung

Auf der Zelloberfläche von Granulozyten befinden sich zahlreiche Rezeptoren. Diese reagieren auf spezifische Lockstoffe, die am Infektionsherd ausgeschüttet werden. Adhäsionsrezeptoren bedingen die Vorwärtsbewegung im Blutstrom sowie den Eintritt in die Gewebe bis hin zum Inflammationsbereich. Einige Gruppen von Rezeptoren sind befähigt Immunglobuline und Komponenten des Komplementsystems zu binden und somit die Phagozytose einzuleiten. Andere fördern nach dem Kontakt mit mikrobiellen Toxinen oder Zytokinen die Signalkette zur Expression weiterer Zelloberflächenrezeptoren, die wichtige Funktionen in der Immunabwehr besitzen (PAAPE ET AL., 2003)

Neben der Phagozytose gehört der „**oxidative Burst**“, d.h. die Bildung der ROS, zu den wichtigsten mikrobiziden und zytotoxischen Funktionen der neutrophilen Granulozyten.

### 2.1.1 Reaktive Sauerstoffspezies und Oxidativer Burst

Der Begriff ROS ist eine allgemeine Bezeichnung für die Radikale des Sauerstoffs ( $O_2^-$ ,  $\bullet$ ,  $OH\bullet$ ), nichtradikalische Sauerstoffverbindungen (Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Perchlorsäure, hyperchlorige Säure), Ozon sowie Hydroxyl-, Hydroperoxyl-, Tocopheryl- und Ascorbyl-Radikale. Des Weiteren fallen Singulett-Sauerstoff und Ferryl-Verbindungen unter diese Gruppenbezeichnung (FÜRLL, 2005). Die chemischen Spezies der ROS weisen aufgrund ihrer ungepaarten Elektronen eine hohe chemische Reaktivität auf. Sie kommen als natürliches Nebenprodukt der Atmungskette im tierischen Organismus vor. Ihre wichtigste Funktion liegt vor allem in der antimikrobiellen Wirkungsweise. Daher sind sie aktiv an der Immunabwehr beteiligt. Sie dienen zudem der Detoxifikation von Xenobiotika (MILLER ET AL., 1993; YU, 1994; DEVASAGAYAM ET AL., 2004; FÜRLL, 2005; BRIVIBA ET AL., 2008; SARMA ET AL., 2010) und sind außerdem als Signalmoleküle im tierischen Organismus von großer Bedeutung (DEVASAGAYAM ET AL., 2004; LUN U. ROESLER, 2007; SAMAR ET AL., 2010).

Unter dem Begriff „**oxidativer Burst**“ wird in der Regel die massive Bildung von ROS durch die Granulozyten im Rahmen des Phagozytoseprozesses verstanden.

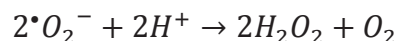
Bei der Phagozytose von Bakterien, Pilzen oder Viren durch neutrophile Granulozyten lagern sich verschiedene zytosolische Untereinheiten der Zellmembran aneinander und bilden den Multienzymkomplex NADPH-Oxidase (NOX). Durch pathogen assoziierte Erkennungsmuster, wie beispielsweise Lipopolysaccharide, Lipoproteine oder Zytokine erfolgt die Aktivierung der NOX. Diese oxidiert NADPH zu  $\text{NADP}^+$ . Das bei dieser Reaktion freigegebene Elektron wird vom molekularen Sauerstoff aufgenommen und es entsteht das reaktive Superoxid anion ( $\text{O}_2^- \bullet$ ).

**Formel 1: Reaktion von NADPH zu  $\text{NADP}^+$  und Bildung des Superoxidanions**



Mit Hilfe der Superoxide-Dismutase (SOD) werden die zwei entstandenen Superoxidanionen spontan zu Wasserstoffperoxid umgewandelt.

**Formel 2: Reaktion von Superoxidionen zu Wasserstoffperoxid**



Des Weiteren können Hydroxyl-Radikale und Singulett-Sauerstoff während dieser Reaktion entstehen. Die Granula der Zellen enthalten zudem große Mengen an Myeloperoxidase. Dieses Enzym kann die Reaktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit Halogen-Ionen von Chlor, Brom, Iod oder Thiocynaten katalysieren. Durch die starke antimikrobielle Wirkung der daraus resultierenden Oxidationsmittel, wie Hypochlorid, werden viele Mikroorganismen abgetötet (YU, 1994; PAAPE ET AL., 2003; TIZARD, 2004; LUN U. ROESLER, 2007).

Es wird in mehreren Studien berichtet, dass ROS Apoptose, d.h. den programmierten Zelltod induzieren können (BUTTKE U. SANDSTROM, 1994; PAAPE ET AL., 2003; TAKAHASHI ET AL.; 2004).

Apoptose gilt als eine Schlüsselfunktion zur Auflösung von Inflammationen (PAAPE ET AL., 2003). Der programmierte Zelltod durch Apoptose dient zum einen der Selektion autoreaktiver T-Lymphozyten, die sich gegen körpereigene Eiweiße richten und Krankheiten im Organismus oder eine Autoimmunantwort hervorrufen können. Andererseits werden antigenspezifische Lymphozyten nach Ausübung ihrer Funktion bei Antigenkontakt eliminiert. Nur einige

dieser Zellen entwickeln sich zu Gedächtniszellen weiter. Durch den programmierten Zelltod wird schließlich die Immunantwort beendet oder gehemmt. Apoptose gilt als die häufigste Form des Zelltods im Organismus. Tod durch Nekrose wird vorwiegend durch Schädigungen und Verletzungen von Gewebe induziert, wobei die Zellen regelrecht zerplatzen und aufgrund ihrer toxischen Inhaltsstoffe Inflammationen hervorrufen. Die Apoptose hingegen ruft keine Entzündungsreaktion hervor. Sie beginnt mit starken Bewegungen der Zellen, die auch als so genanntes „Kochen“ bezeichnet werden. Darauf folgend kommt es in der Phase der Zeiose zum Abschnüren kleiner Bläschen, bis schließlich das Innere des Zellkerns verklumpt. Im Gewebeverband werden die toten Zellen anschließend von Nachbarzellen oder Fresszellen aufgenommen. Die DNA sterbender Zellen wird zuvor schon durch verdauende Enzyme in kleine Bruchstücke zerlegt (KRAMMER, 1996).

Nicht allein wegen der apoptoseinduzierenden Wirkung, rückt die Annahme immer mehr in den Vordergrund, dass ROS, insbesondere  $O_2^- \bullet$  und  $H_2O_2$ , in kleinen Mengen als „Second Messenger“ fungieren und somit zur Modulation von Zellfunktionen und Signalwegen beitragen (DEVASGAYAM ET AL., 2004; LUN U. ROESLER, 2007; SAMAR ET AL., 2010).

### 2.1.2 Zelluläre Abwehrmechanismen zum Schutz gegen ROS/ Antioxidative Mechanismen

Den Gegenpart der ROS bildet das antioxidative Abwehrsystem. Dazu gehören im Allgemeinen Substanzen, die bei niedriger Konzentration in der Lage sind die Oxidation von Substraten zu hemmen und ROS zu neutralisieren (YU, 1994; DEVASAGAYAM ET AL., 2004). Dabei können diese endogener oder exogener Herkunft sein. Als endogene Wirksubstanzen können Enzyme, funktionelle Proteine, Peptide oder niedermolekulare Verbindungen fungieren. Beispiele für endogene Antioxidantien sind Glutathion (GSH), Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase oder Glutathion-Peroxidase (GSH-PX). Exogene Substanzen werden mit der Nahrung aufgenommen, wie beispielsweise Vitamin C und E oder  $\beta$ -Carotin und können im Organismus direkt oder indirekt ihre antioxidative Wirkung entfalten (BRIVIBA ET AL., 2008).

Akteure des antioxidativen Systems können je nach Wirkungsweise in primäre und sekundäre Abwehrstoffe eingeteilt werden. Dabei agieren erstere, indem sie der Bildung von  $O_2^- \bullet$  vorbeugen oder ROS direkt nach ihrer Bildung neutralisieren. Zu den primären Abwehrmechanismen gehören sowohl Antioxidantien wie Vitamin E,  $\beta$ -Carotin und Vitamin C sowie GSH, Harnsäure und Bilirubin, als auch antioxidative Enzyme wie beispielsweise SOD, Katalase und GSH-PX. Sekundäre Abwehrmechanismen schützen vor durch Dismutation von  $O_2^- \bullet$  entstandenen ROS und sind insbesondere am DNA-Repair beteiligt. Diese Gruppierung

beinhalten lipolytische Enzyme, wie Phospholipasen und proteolytische Enzyme, wie beispielsweise Proteasen und Peptidasen (MILLER ET AL., 1993; YU, 1994; DEVASAGAYAM ET AL., 2004; SORDILLO U. AITKEN, 2009).

Weiterführend unterstützen Mineralstoffe indirekt das antioxidative System. Kupfer, Zink und Mangan erweisen sich als essentiell für die SOD-Aktivität, Selen für die Aktivität der GSH-PX und Eisen für die Aktivität von Katalase (BENDICH, 1993; MILLER ET AL., 1993; YU, 1994).

Die positive Wirkung der Antioxidantien kann jedoch aufgehoben werden, da einige dieser Substanzen unter gewissen Umständen potentielle Prooxidantien darstellen. So tragen überhöhte Mengen an Vitamin C in Verbindung mit erhöhten Konzentrationen an Eisen oder Kupfer zur Steigerung der ROS-Bildung bei. Auch  $\beta$ -Carotin weist unter erhöhtem partialem Sauerstoffdruck prooxidative Eigenschaften auf, wobei die antioxidative Wirkung verloren geht (YU, 1994; DEVASAGAYAM ET AL., 2004; BRIVIBA ET AL., 2008).

### 2.1.3 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress ist die Folge eines Ungleichgewichtes zwischen oxidativem und antioxidativem System. In diesem Fall können die freigesetzten ROS nur noch unzureichend neutralisiert werden (DEVASAGAYAM, 2004; BRIVIBA ET AL., 2008; SORDILLO U. AITKEN, 2009; SAMAR ET AL., 2010). Zu einem Ungleichgewicht kann es vor allem bei Entzündungen und Infektionen sowie erhöhtem, umweltbedingtem Stress, aber auch durch unausgewogene Fütterung, Xenobiotika und Mykotoxinen im Futter kommen (MILLER ET AL., 1993). Im Fall des plötzlichen Eintretens von beispielsweise umweltbedingtem Stress reagiert das oxidative Abwehrsystem mit einer massiven Bildung von ROS. Neben den Funktionen zur Immunabwehr, dienen diese zunächst als Signalmoleküle zur Stimulation des antioxidativen Systems. In diesem pathophysiologischen Zustand befindet sich dieses jedoch noch auf niedrigem Niveau. Folglich sind die Zellen bis zur vollen Aktivität des antioxidativen Systems oxidativem Stress ausgesetzt (DEVASAGAYAM ET AL., 2004). In der Konsequenz kann es zu direkten und indirekten Beeinträchtigungen des Gesundheitszustandes des tierischen Organismus kommen (BRIVIBA ET AL., 2008, SAMAR ET AL., 2010).

Die Ursache zellulärer Folgeschäden des oxidativen Stresses besteht in der Peroxidation von Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten, DNA und anderen Makromolekülen, hervorgerufen durch oxidative Kettenreaktionen (MILLER ET AL., 1993; YU, 1994; DEVASAGAYAM ET AL., 2004; SARMA ET AL., 2010). Die resultierenden Gewebeschädigungen können negative Auswirkungen auf die Membranpermeabilität, Enzymfunktionen und den Muskeltonus haben. Es gibt



Hinweise, dass ein Defizit an Antioxidantien, wie Vitamin E und Selen, die uterine Kontraktionsfähigkeit bei Kühen vermindert. In der Folge kommt es zu einer Verringerung des Spermientransportes im weiblichen Genitale und schließlich zu einer Verminderung der Fruchtbarkeitsleistung. Weitere Störungen der Fruchtbarkeit entstehen durch peroxidative Inaktivierung steroidogener Enzyme und der daraus resultierenden Hemmung der Synthese von Steroidhormonen, wie beispielsweise Androgenen und Östrogenen (MILLER ET AL., 1993). Weiterhin geben MILLER ET AL. (1993) einen Hinweis darauf, dass es auf Grund der Änderungen der Steroidgenese durch oxidativen Stress zu vermehrten Natrium und Wassereinlagerungen kommen kann. Dies fördert die Bildung von Euterödemen. SMITH ET AL. (1984) konnte mittels Supplementation von Selen und Vitamin E verminderte Anzeichen auf Nachgeburtverhaltungen und Mastitis bei Kühen nachweisen. Daher werden auch diese Krankheitsgeschehen mit erhöhtem oxidativem Stress in Verbindung gebracht. Ähnliches konnten BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA ET AL. (1994) feststellen. Weiterhin lassen sich nach MILLER ET AL. (1993) auch Leistungseinbußen auf das Ungleichgewicht zwischen ROS und Antioxidantien zurückführen. Ein Überschuss an ROS mindert die Verfügbarkeit, des in vielen physiologischen Prozessen involvierten NADPH, indem die  $\text{NADPH}_2$  Konzentration gesenkt und die NADP Konzentration gesteigert wird. Es kommt zu einer erhöhten Aktivität des Pentose-Phosphat-Weges. Die benötigte Glucose wird nun vermehrt von anderen Stoffwechselwegen des tierischen Organismus mobilisiert werden. Besonders bei Hochleistungskühen birgt dieser Aspekt eine erhöhte Gefahr für Leistungseinbußen.

Aus einer unzureichenden Versorgung mit wichtigen Gegenspielern des oxidativen Systems, wie beispielsweise Vitamin A, C und E sowie Kupfer, Eisen und Zink resultiert eine verminderte Immunabwehr. Demzufolge wird angenommen, dass oxidativer Stress mit einer gehemmten Immunabwehr einhergeht (MILLER ET AL., 1993).

Laut SORDILLO ET AL. (2009) besteht vor allem während der Transitphase von Milchkühen ein vermehrtes Risiko für oxidativen Stress, da es zu diesem Zeitpunkt zu drastischen physiologischen Veränderungen und einem Verlust des antioxidativen Potentials kommen kann. Anhand einiger früherer Versuche bei Milchkühen kann diese Annahme bestätigt werden. Mehrere Autoren berichten von Folgeschäden und vermehrtem Vorkommen von Nebenprodukten des oxidativen Stresses in dieser Phase (BERNABUCCI ET AL. 2002; BERNABUCCI ET AL., 2005; SORDILLO ET AL., 2007; BOUWSTRA ET AL., 2008). Einige Autoren beobachten zudem, dass es vor und nach der Kalbung zu einem dramatischen Absinken antioxidativer Substanzen im Blut kommt (BRZINSKA-SLEBODZINSKA ET AL, 1994; BERNABUCCI ET AL., 2002; BERNABUCCI ET AL., 2005; BOUWSTRA ET AL., 2008; GRAUGNARD ET AL., 2012).

Die genauen Ursachen für diese Resultate konnten jedoch noch nicht aufgeklärt werden.

## 2.2 Niacin

Unter dem Begriff Niacin werden die vitaminwirksamen Verbindungen Nicotinsäure (NA) und Nicotinamid beziehungsweise Nicotinsäureamid (NAM) zusammengefasst. Diese zählen zur Stoffgruppe der B-Vitamine. Da NA und NAM als Wirkformen der wasserstoffübertragenden Pyridin-Koenzyme NAD(H) und NADP(H) gelten, finden sie besondere Bedeutung im Energiestoffwechsel der Zellen (GROPP, 1987; ROSSOW ET AL., 1994; SEEHAWER U. SCHLIFFKA, 2006; COMBS, 2012). NA und NAM sind unter physiologischen Gesichtspunkten als gleichwertige Niacinquelle anzusehen.

Der Transport von Niacin im Blutplasma erfolgt sowohl in Form von NA als auch in Form von NAM, wobei letzteres als die Haupttransportform gilt. NA wird meist in NAD(H) und schließlich zu NAM umgewandelt (COLLINS U. CHAYING, 1971; HENDERSON, 1983). Niacin gelangt in der Regel durch passive Diffusion in die Zellen. Zellen, wie beispielsweise Erythrozyten besitzen jedoch auch spezifische Transportmechanismen für NA oder NAM. Nach Umwandlung von Niacin in NAD(H) und NADP(H), kann dieses in Geweben gespeichert werden (COMBS, 2012).

Ein Niacinmangel kann im Allgemeinen Störungen des zentralen Nervensystems hervorrufen. Weiterhin kommt es in Folge eines Mangels zu Hautveränderungen, die auch als Pellagra bekannt sind. Bei Schweinen lösen Defizite des Vitamins eine verringerte Futteraufnahme, Wachstumsverzögerungen, Dermatitis, Durchfall und Anämien, bis hin zu nekrotischen Veränderungen des Caecum sowie Kolon aus. Geflügelarten zeigen bei Niacinmangel Störungen der Federentwicklung und verminderte Legeleistungen beziehungsweise Brutfähigkeit. Auch hier treten Entzündungen des Verdauungstraktes auf. Dermatitis an den Gliedmaßen und Perosis sind weitere Mangelsymptome beim Geflügel. Bei Kleintieren können Defizite durch Appetitlosigkeit, Durchfall und in Folge dessen Abmagerungen hervorrufen. Die Tiere neigen zu Blutungen, die zu Anämien führen. Insbesondere bei Hunden ist die Schwarzzungenkrankheit („black tongue“) eine pathognomonische Erscheinung eines Mangels an Niacin. Starke Defizite können bis zum Tod führen (GROPP, 1987; ROSSOW ET AL., 1994; SEEHAWER U. SCHLIFFKA, 2006; COMBS, 2012).

Im Allgemeinen erweisen sich höhere Niacindosen von geringer Toxizität. Der Toleranzbereich für Monogastrier liegt über dem 10- bis 20-fachen des Normalbedarfs. NAM besitzt jedoch im Vergleich zu NA höhere toxische Eigenschaften (COMBS, 2012).

### 2.2.1 Niacin in der Milchviehfütterung

Niacin kann bei Wiederkäuern durch Pansenmikroben aus der Aminosäure Tryptophan beziehungsweise dessen Metaboliten Chinolinsäure synthetisiert werden (FLACHOWSKY, 1991). Nach Angaben der GfE (2001) wird der Bedarf einer Milchkuh bei wiederkäuergerechter Fütterung und mittlerer Leistung in der Regel durch die mikrobielle Niacinsynthese gedeckt. Im Fall negativer Energiebilanzen wird Tryptophan vermehrt zur Milchproteinsynthese genutzt. Daher kann unter diesen Umständen mit einem höheren Bedarf gerechnet werden.

In der Fütterung von Milchkühen ist Niacin insbesondere auf Grund seiner stoffwechselstabilisierenden Effekte, durch dessen positive Eigenschaften auf die Pansenfermentation und Pansenmikroben sowie seiner antilipolytischen und antiketogenen Wirkungsmechanismen Gegenstand der Forschung (FLACHOWSKY, 1993). So berichten einige Autoren von einer Vergrößerung der Protozoenpopulation im Pansen und einer gesteigerten mikrobiellen Proteinsynthese durch Niacin (RIDDEL ET AL., 1981; SHIELDS ET AL., 1983; NIEHOFF ET AL., 2009A; ASCHEMANN ET AL., 2012B). Ein Zeichen verbesserter mikrobieller Proteinsynthese ist zudem eine verringerte Harnstoffkonzentration im Blutplasma, die häufig bei Milchkühen mit Niacinzulagen festzustellen ist (BAUMGARTNER U. BLUM, 1993; BELIBASAKIS U. TSIRGOGIANNI, 1996; NIEHOFF ET AL., 2009A; ASCHEMANN ET AL. 2012A)

Nach Niacinsupplementationen wird oftmals von einer Erhöhung und Stabilisierung der Glukosekonzentration im Blut berichtet (FRONK U. SCHULTZ, 1979; DUFVA ET AL., 1983; BRENT U. BARTLEY, 1984; HORNER ET AL., 1986; FÜRLI U. SCHÄFER, 1991; ZIMMERMAN ET AL., 1992; BAUMGARTNER U. BLUM, 1993; EL-BARODY ET AL., 2001; GHORBANI ET AL., 2008). Die antilipolytischen und antiketogenen Effekte basieren insbesondere auf der Senkung der NEFA- und  $\beta$ -OH-Buttersäurekonzentrationen im Blut unter Niacineinfluss (FRONK U. SCHULTZ, 1979; DUFVA ET AL., 1983; BRENT U. BARTLEY, 1984; RUEGSEGGER U. SCHULTZ, 1986; ZIMMERMAN ET AL., 1992; BAUMGARTNER U. BLUM, 1993; PIRES U. GRUMMER, 2007; GHORBANI ET AL., 2008; NIEHOFF ET AL., 2009B; MOREY ET AL., 2011; YUAN ET AL., 2012). Dabei sind die genauen Wirkmechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt.

In mehreren Untersuchungen wird der positive Einfluss auf die Milchleistung geschildert (FRONK U. SCHULTZ, 1979; KUNG ET AL., 1980; RIDDEL ET AL., 1981; DUFVA ET AL., 1983; BRENT U. BARTLEY, 1984; MÜLLER ET AL., 1986; BAUMGARTNER U. BLUM, 1993; BELIBASAKIS U. TSIRGOGIANNI, 1996). Als Grund wird häufig die Reduktion von subklinischer und klinischer Keto-se genannt (FRONK U. SCHULTZ, 1979; KUNG ET AL., 1980; RIDDEL ET AL., 1981; FLACHOWSKY, 1991). Die positiven Effekte des Niacins zeigen sich am deutlichsten bei Kühen in ange-

spannter Stoffwechsellage. In der Milchzusammensetzung zeigen sich vermehrt erhöhte Milchfettgehalte (MÜLLER ET AL., 1986; BAUMGARTNER U. BLUM, 1993; WAGNER ET AL., 1995; BELIBASAKIS U. TSIRGOGIANNA, 1996; NIEHOFF ET AL., 2009A; YUAN ET AL., 2012). Teilweise können höhere Milchproteingehalte oder Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung der Milch festgestellt werden (HORNER ET AL., 1986; BAUMGARTNER U. BLUM, 1993; MADISON-ANDERSON ET AL., 1997; NIEHOFF ET AL., 2009A; ASCHEMANN ET AL., 2012A).

YUAN ET AL. (2012) zeigt zudem eine Reduzierung der somatischen Zellzahl bei Milchkühen mit Niacinsupplementation auf.

Es gibt Hinweise, dass Niacin eine größere Hitzetoleranz der Tiere fördert (MÜLLER ET AL., 1986; BAUMGARTNER U. BLUM, 1993; ZIMBELMAN, 2010).

Nach FLACHOWSKY (1991) kann Niacin die Fruchtbarkeitsleistung von Milchkühen positiv beeinflussen, indem Zwischentragezeiten und die Anzahl der Besamungen je Trächtigkeit verringert werden. Auch EL-BARODY ET AL. (2001) berichten von ähnlichen Beobachtungen. Weiterhin geben Untersuchungen von EL-BARODY ET AL. (2001) Hinweise zur Förderung der Uterusinvolution durch Niacin. Im Plasma konnten geringere Natrium- und Cholesterolkonzentrationen festgestellt werden.

### 2.2.2 Niacin und oxidativer Stress

Seit einiger Zeit rückt immer mehr die Vermutung in den Vordergrund, dass Niacin als Vorläufer von NAD(H) und NADP(H), die selbst als Antioxidantien agieren, antioxidatives Potential besitzt (KAMANNA ET AL., 2007). NADP(H) ist zudem in der Lage GSH zu reduzieren. Dieses wirkt in reduzierter Form ebenfalls als Antioxidans und bedingt weiter die Regeneration von Vitamin E (ARUN ET AL., 1999). YUAN ET AL. (2012) teilen nach Untersuchungen mit Milchkühen diese Annahme, da Niacin die Fähigkeit zur Hemmung der Lipolyse und zur Reduktion von Fettsäuresubstraten, die die Lipidperoxidation fördern, aufweist. In der Humanmedizin wurden des Öfteren Verminderungen der Folgeschäden des oxidativen Stresses, wie Lipidperoxidation, Proteinperoxidation oder DNA-Einzelstrang-Brüche beobachtet (LEDOUX ET AL., 1988; WEITBERG, 1989; KLAIDMAN ET AL., 1996; ARUN ET AL., 1999; GHAZIKHANSARI ET AL., 2005; VARELLA ET AL., 2006).

TANG ET AL. (2008) stellte bei Defiziten in der Niacinversorgung in Versuchen mit Ratten mehr Anzeichen auf Zellschäden durch oxidativen Stress fest. Ähnliche Angaben machten BENAVENTE U. JACOBSON (2008).

CROWLY ET AL. (2000) ermittelte nach der Behandlung von Jurkat-Zelllinien mit Niacin zwar eine Senkung der Proteine NF- $\kappa$ B und GRP78, die als Indikatoren von oxidativem Stress gelten fest, jedoch auch eine steigende Bildung an ROS. Im Gegensatz dazu fanden TONG ET AL. (2012) nach der Behandlung von menschlichen Herzmuskelzellen eine geminderte ROS-Bildung vor.

Die genauen Wirkmechanismen des Niacins bleiben nach den bisherigen Studien noch weitestgehend ungeklärt. In der Humanmedizin schreitet die Erforschung dieser, insbesondere auf immunologischem Niveau, weiter voran. Bei Milchkühen sind derzeit keine konkreten Untersuchungen zu diesem Gebiet bekannt.

Problematisch ist die Vergleichbarkeit der genannten Studien aufgrund verschiedener verwendeter Zelllinien. Weiterhin besteht eine unterschiedliche Definition für den Begriff „oxidativer Stress“. Oftmals wird alleine das Vorkommen von ROS als oxidativer Stress bezeichnet, ohne die Betrachtung des antioxidativen Systems mit einzubeziehen. Auch der Aspekt, dass in vielen Fällen nur die Folgen und Nebenprodukte des oxidativen Stresses geprüft werden, macht es schwierig, genaue Mechanismen für die Wirkung von Niacin zu identifizieren.

### 3 Material und Methoden

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit gliedern sich in einen Fütterungsversuch des Instituts für Tierernährung des Friedrich-Loeffler-Institutes (FLI), Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit ein. Der gesamte Versuchszeitraum umfasste die Monate August bis März der Jahre 2012 und 2013.

#### 3.1 Tierbestand

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit standen drei Kühe der Rasse Deutsche Holstein, die aus der Gesamtversuchsherde von 64 Tieren ausgewählt wurden, zur Verfügung. Als Hauptkriterium stand ein unauffälliger gesundheitlicher Zustand der Tiere im Vordergrund. Ein weiteres Auswahlkriterium war die Anzahl der Laktationen. Bei den untersuchten Tieren handelte es sich um Tiere, die im Laufe des Versuchszeitraums in die zweite Laktation eintraten.

Die Tiere wurden in zwei nicht klimatisierten Boxenlaufställen, deren Laufgänge mit Spaltenböden ausgestattet waren, gehalten. Die Liegeflächen waren mit Gummimatten ausgelegt und wurden zusätzlich mit Häckselstroh beziehungsweise Spänen eingestreut. Die Fütterung erfolgte einerseits über Futterwiegetröge (Totale Mischration (TMR)/ Grassilage) und andererseits über einen Kraffutterautomaten. Transponder an den Ohren der Tiere dienten dabei zur automatisierten Futterzuteilung des Kraffutters sowie zur Erfassung der täglichen Futtermehraufnahme.

#### 3.2 Fütterung

Die Energie- und Nährstoffversorgung der Tiere wurde nach den Empfehlungen der GfE (2001) ausgerichtet.

Das frei zur Verfügung stehende Grundfutter der Versuchsperiode umfasste einen Anteil von 50 % Trockenmasse (TM) an Maissilage und 50 % TM an Grassilage.

Der 42. Tag vor der Abkalbung galt als Beginn der Versuchsfütterung. Die Ration der Vorversuchsfütterung setzte sich aus Grassilage zusammen. Ab dem 42. Tag a.p. bis zur Kalbung beinhaltete die Tagesration einen Anteil von 60 % Kraffutter. Nach der Kalbung wurde

der Krafftutteranteil bis zum 14. Tag p.p. von anfänglich 30 % auf 50 % gesteigert. Für die Nachversuchsfütterung wurde eine für laktierende Milchkühe angepasste Futtermischung gewählt.

Das Versuchskrafftutter setzte sich, wie in Tabelle 1 aufgeführt, aus Anteilen an Sojaextraktionsschrot, Weizen, Mais, Sojaöl, Mineralfutter für trockenstehende beziehungsweise laktierende Tiere und Futterkalk zusammen.

**Tabelle 1: Zusammensetzung des Versuchskrafftutters (% der TM)**

	<b>Trockenstehperiode</b>	<b>Laktation</b>
Sojaextraktionsschrot	26,8	26,8
Weizen	50,6	50,6
Mais	21,6	21,6
Sojaöl	1	1
Mineralfutter für Trockensteher	2	-
Mineralfutter für laktierende Tiere	-	1,2
Futterkalk	-	1,2

### 3.3 Blutentnahme und Probenaufbereitung

Zur Blutprobenentnahme wurden die Tiere in einen abgetrennten Stallbereich getrieben und dort im Fressfanggitter fixiert.

Die Blutentnahme erfolgte an den Tagen 42, 21, 14, 7, 3 und 1 vor dem errechneten Kalbettermin sowie an den Tagen 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 63, 82 und 100 nach der Kalbung. Für die Erhebung von Parametern auf der *in vitro*-Ebene wurden zusätzlich am Tag 82 ± 5 p.p. Blutproben genommen (siehe Abbildung 2).

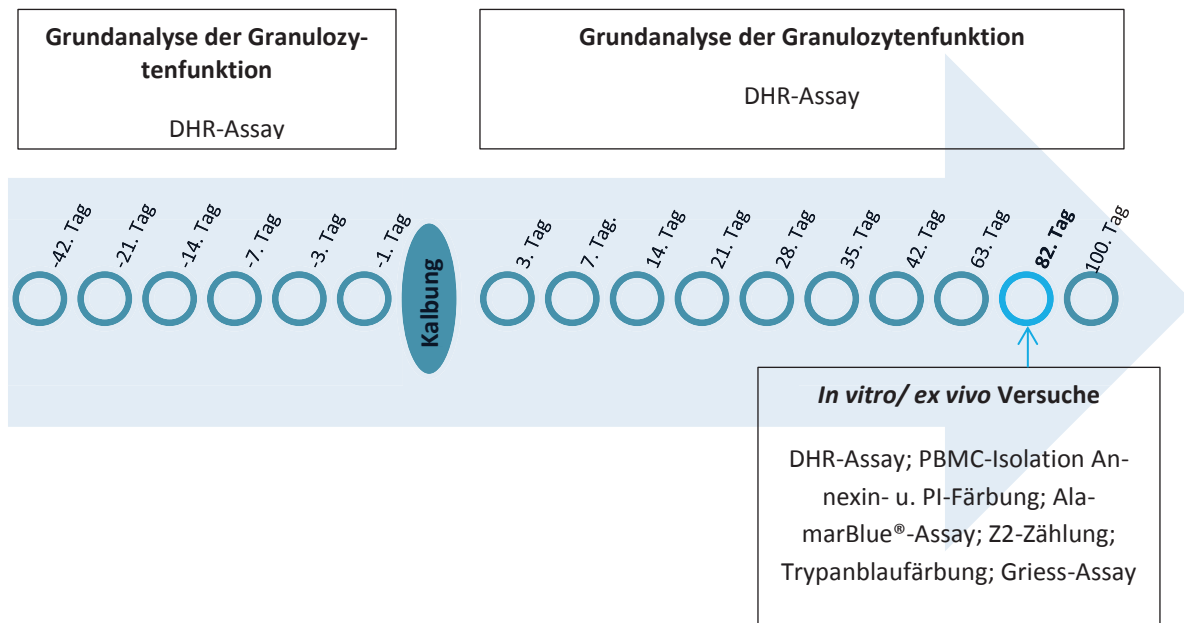


Abbildung 2: Übersicht zu Blutentnahmetagen und Untersuchungsmethoden

Die Blutentnahme erfolgte mittels Punktion einer Drosselvene (Vena jugularis externa) durch eine sterile Einmalkanüle (STRAUSS-Kanüle Ø 18,00 mm, DISPOMED®, Geilenhausen, Deutschland). Als Auffanggefäß dienten sowohl EDTA-Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von 10 ml (SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland; 1,6 mg EDTA/ ml Blut) als auch Vacutainer und dazugehörige VACUETTE®-Röhrchen mit Lithium Heparin Zusatz (9 ml; GRAINER BIO-ONE, Kremsmünster, Österreich).



### 3.4 Materialien

In der nachfolgenden Tabelle sind sämtliche für die Analysen verwendeten Großgeräte, Chemikalien und Reagenzien sowie Puffer und Lösungen aufgelistet.

Tabelle 2: Übersicht der für Analysen verwendeten Materialien

Material	Bezeichnung	Herstellerfirma
Geräte	BD FACS Canto II™ Flow Cytometer	BD Bioscience (San Jose, USA)
	Celltac α MEK-6450	Qinlab Diagnostik (Martinried, Deutschland)
	Inkubator/ Begasungsschrank	IBS (Höhr-Grenzhausen, Deutschland)
	Mikroskop	Nikon Eclipse E200 (Düsseldorf, Deutschland)
	inoLab pH Level 2 mit SenTix®Mic Elektrode	WTW (Weilheim, Deutschland)
	Tecan infinitie 200	Tecan Austria (Grödig, Österreich)
	Varifuge 3.0R Heraeus	THERMO ELECTRIC (Oberhausen, Deutschland)
	Z2-Coulter®	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Chemikalien/ Reagenzien	AlamarBlue®	AbD Serotec (Oxford, UK)
	FITC Annexin V Apoptosis Detection (Kit II)	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
	β-Mercapto-Ethanol	Sigma-Aldrich® (Steinheim, Deutschland)
	Concanavalin A	Sigma-Aldrich® (Steinheim, Deutschland)
	Dihydrorhodamin123	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
	FBS Superior	Biochrom (Berlin, Deutschland)
	L-Glutamin	Biochrom (Berlin, Deutschland)
	Natriumnitrit	Merck (Darmstadt, Deutschland)
	N-1-Naphthyl-ethylenediamindichlorid	Sigma-Aldrich® (Steinheim, Deutschland)
	Nicotinamid	Sigma-Aldrich® (Steinheim, Deutschland)
	Nicotinsäure	Sigma-Aldrich® (Steinheim, Deutschland)
	PBS Dulbecco	Biochrom (Berlin, Deutschland)
	Penicillin/ Streptomycin	Biochrom (Berlin, Deutschland)
	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate	Sigma-Aldrich® (Steinheim, Deutschland)
Sulfanilamin	Sigma-Aldrich® (Steinheim, Deutschland)	
Puffer/ Lösungen	BD FACS Lysin Solution	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
	Biocoll Separating Solution	Biochrom (Berlin, Deutschland)
	DMSO	Sigma-Aldrich® (Steinheim, Deutschland)
	Hepes Buffer (1M)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
	RPMI 1640 Medium	Biochrom (Berlin, Deutschland)
	Trypan Blue Solution	Biochrom (Berlin, Deutschland)

## Medien und Pufferzusammensetzungen

- HBS-Puffer
  - 14 mM HEPES in 0,9 % NaCl+
- 50 mM Natriumnitrit ( $\text{NaNO}_2$ )
  - Stocklösung: 34,5 mg  $\text{NaNO}_2$  in 10 ml Medium RPMI 1640+
  - 500  $\mu\text{M}$  Lösung (1:100 Verdünnung): 25  $\mu\text{l}$  der 50 mM  $\text{NaNO}_2$ -Stocklösung + 2475  $\mu\text{l}$  Medium RPMI 1640+
- 0,1 % N-1-Naphtylethylenediamindichlorid (NED)
  - 0,1 g NED in 100 ml dest.  $\text{H}_2\text{O}$
- PBMC-Medium
  - 91 % RPMI 1640
  - 5 % Fötale Bovines Serum (FBS)
  - 1 % HEPES-Buffer
  - 1 % L-Glutamin
  - 1 % Penicillin/ Streptomycin
  - 1 % verdünntes  $\beta$ -Mecapto-Ethanol (10  $\mu\text{l}$  in 28 ml Aqua bidest.)
- 5 % Phosphorsäure
  - 294  $\mu\text{l}$  von 85 %iger ortho-Phosphorsäure + 4706  $\mu\text{l}$  dest.  $\text{H}_2\text{O}$
- 1 % Sulanilamin
  - 1g in 100 ml 5 %iger Phosphorsäure

## 3.5 Methoden

### 3.5.1 Herstellung der Niacinlösungen

NA und NAM wurden jeweils in destilliertem Wasser gelöst. Die 0,4 molare Stammlösung wurde später mit 0,9 %igem NaCl beziehungsweise Medium weiter verdünnt. Es wurden für jede Niacinform jeweils sechs Lösungen hergestellt, deren Endkonzentrationen in Tabelle 3 aufgelistet sind. Die Konzentrationen wurden so ausgewählt, dass sie einerseits aus Vorversuchen bekannte Niacinkonzentrationen einschlossen und andererseits nicht zu starken Abweichungen vom physiologischen pH-Wert führen sollten.

Tabelle 3: Übersicht zur Konzentration verwendeter Niacinlösungen

Niacinform	Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Konzentration [ $\mu\text{M/l}$ ]
NA	0,25	2,03
	0,40	3,25
	1,00	8,12
	2,00	16,25
	3,00	24,37
	4,00	32,49
NAM	0,25	2,05
	0,40	3,28
	1,00	8,19
	2,00	16,38
	3,00	24,57
	4,00	32,75

### 3.5.2 pH-Messung

Nach der Herstellung der Niacinlösungen, wurden die pH-Werte sowohl der Stammlösungen, als auch der durch NaCl, Blut beziehungsweise Medium verdünnten Lösungen mittels pH-Meter ermittelt.

### 3.5.3 DHR-Assay

Das DHR-Assay dient zur Analyse der Funktion von Granulozyten, im Speziellen zum Nachweis freier Sauerstoffradikale und zur Untersuchung des oxidativen Bursts.

Dihydrorhodamin 123 (DHR) ist ein membrangängiger, nichtfluoreszierender Farbstoff, der durch ROS zum grünfluoreszierenden Metaboliten Rhodamin 123 (R123) oxidiert werden kann. Die Umwandlung ist dabei abhängig von  $H_2O_2$ . R123 ist nach Bindung an die Zellmembran mittels Durchflusszytometer quantitativ messbar und dient als Maß für die ROS-Bildung. Dabei steigt die Fluoreszenz proportional mit der Aktivität der NOX. Bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm ist Rhodamin in einem Fluoreszenzbereich von 515-545 nm nachweisbar (KINSEY ET AL., 1987; EMMENDÖRFFER ET AL., 1990; HENDERSON U. CHAPPELL, 1993; SMITH U. WEIDEMANN, 1993; PELT ET AL., 1996; SMITS ET AL., 1997; WALRAND ET AL., 2003; LUN U. ROESLER, 2007).

Tetradecanoyl-12,13-phorbolacetat (TPA) aktiviert die NOX in der Zelle, indem es die Proteinkinase C verstärkt. Folglich fungiert es als besonders empfindlicher Stimulus zur Bildung von ROS durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten (EMMENDÖRFFER ET AL., 1990; HENDERSON U. CHAPPELL, 1993; SMITH U. WEIDEMANN, 1993; WALRAND ET AL., 2003) und wird in dieser Arbeit zur Positivkontrolle genutzt.

Diphenyleniodonium (DPI) ist bekannt als wirksamer NOX-Inhibitor. Es ist nachgewiesen, dass es die NOX hemmt, so die Bildung von Superoxiden erheblich vermindert und die aktivierende Wirkung von TPA aufhebt. Daher fungierte dieses in der vorliegenden Arbeit als Zusatz der Negativkontrollen (LI U. TRUSH, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde die DHR-Methode zunächst genutzt, um die Funktion der Granulozyten im Verhältnis zum zeitlichen Abstand zur Kalbung zu analysieren und somit einen Hinweis über die normale Aktivität der Granulozyten zu erhalten. Im Weiteren wurden Blutproben des 82. Tages p.p. mit dieser Methode dahingehend untersucht, welchen Einfluss die Zugabe verschieden konzentrierter Lösungen von NA und NAM *ex vivo* auf die Aktivität des oxidativen Bursts der Granulozyten besitzt. Der Probennahmeterrin wurde aus der Erwartung einer normalen Funktionsfähigkeit der Granulozyten ohne Einflüsse von parallelen Versuchsgeschehen oder besonderen Belastungen des Stoffwechsels und des Immunsystems während der Transitphase gewählt.

Während die Blutproben zur Grundanalyse der Granulozytenfunktion (siehe Abbildung 2, Seite 14) direkt weiterverarbeitet wurden, wurden die Proben zur Analyse des Einflusses von Niacin zunächst für 30 Minuten beziehungsweise 180 Minuten mit verschiedenen konzentrierten Niacinlösungen (siehe Tabelle 3, Seite 17;  $c = 0,25 \mu\text{g/ml}$ ;  $0,40 \mu\text{g/ml}$ ;  $1,00 \mu\text{g/ml}$ ;  $4,00 \mu\text{g/ml}$ ), bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert und schließlich nach der im Folgenden beschriebenen DHR-Methode weiterverarbeitet und analysiert.

Zunächst wurde das Vollblut ( $50 \mu\text{l}$ ) in Eppendorfgefäße zu einer HBS-Lösung ( $100 \mu\text{l}$ ) mit verschiedenen Zusätzen gegeben. Während die Kontrollprobe nur mit DHR versetzt wurde ( $c = 40 \mu\text{M}$ ), wurde in einem weiteren Ansatz TPA als Positivkontrolle hinzugefügt ( $c = 200 \text{ ng/ml}$ ). Bei den Substanzkontrollen wurden die Proben neben DHR und TPA mit DPI ( $c = 25 \mu\text{M}$ ) versetzt sowie eine Negativkontrolle nur mit DPI ( $c = 25 \mu\text{M}$ ). Alle Proben wurden in einer Zweifachbestimmung beziehungsweise in einer Dreifachbestimmung nach dem in Tabelle 4 aufgezeigten Schema inkubiert und analysiert.

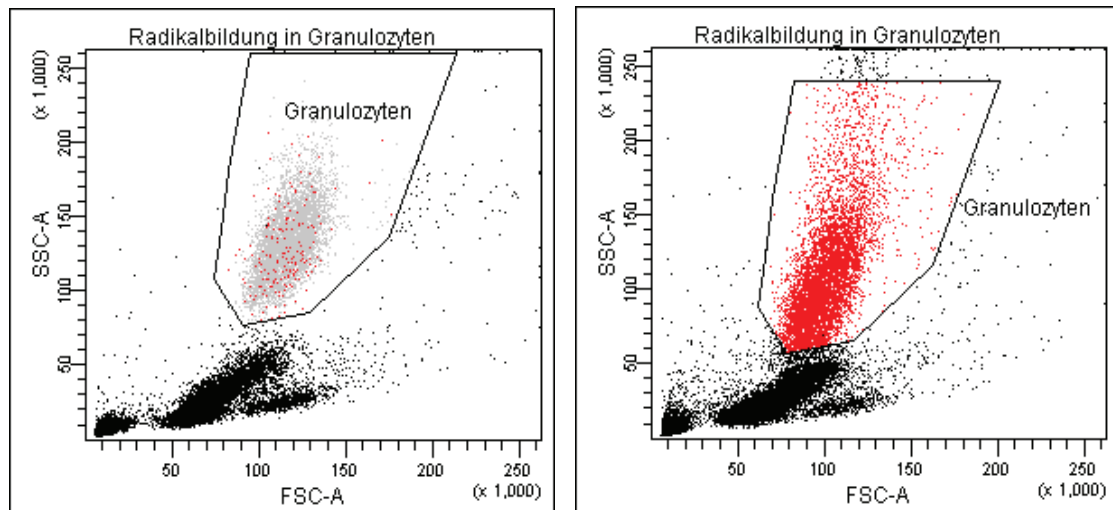
Tabelle 4: Übersicht zu Ansätzen des DHR-Assays

Zusätze	Grundanalyse der Granulozytenfunktion (42. Tag a.p. – 100. Tag p.p.)			Einfluss von Niacin auf die Granulozytenfunktion
	Grundanalyse	Tag 14 a.p.	Tag 14 p.p.	Tag 82 p.p.
DHR (Kontrollprobe)	2 x	2 x	2 x	3 x
DHR + TPA (Positivkontrolle)	2 x	2 x	2 x	3 x
DHR + DPI (Negativkontrolle)	-	-	2 x	3 x
DHR + TPA + DPI (Substanzkontrolle)	-	2 x	-	1 x (nur bei Proben ohne Niacinzusatz)

Nach einer Inkubationsphase von 15 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  im Wasserbad wurden die Proben mit  $1000 \mu\text{l}$  BD FACS Lysing Solution (1fach konzentriert) behandelt, um die Erythrozyten zu lysieren und gleichzeitig die Leukozyten zu fixieren und permeabilisieren. Es folgte eine erneute Inkubationszeit für 10 min auf dem Schüttler sowie eine 5 minütige Zentrifugation bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $250 \times g$ . Nachdem der Überstand verworfen wurde, konnte das erhaltene Pellet mit  $600 \mu\text{l}$  HBS-Lösung resuspendiert und je  $200 \mu\text{l}$  Suspension auf einer 96-well-Mikrotiterplatte aufgetragen werden.

Anschließend wurden die Proben am BD FACSCanto II™ Flow Cytometer unter Verwendung eines „high throughput systems“ gemessen, wobei eine Analyse von 10000 Granulozyten pro Probe angestrebt wurde. Die Definition der Zellen erfolgte aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften wie Größe und Granularität und damit ihrer Darstellung im forward (FSC)- beziehungsweise side scatter (SSC).

Die folgenden dot blots (Abbildung 3 und Abbildung 4) zeigen eine repräsentative Darstellung einer lysierten EDTA-Vollblutprobe, wobei die linke Abbildung ein Beispiel einer Kontroll-, Negativ- oder Substanzkontrolle widerspiegelt und die rechte Abbildung die Messung einer Positivkontrolle. Die eingerahmte Fläche beinhaltet die definierte Granulozytenpopulation. Grau markierte Zellen verdeutlichen den Anteil inaktiver Zellen und rot markierte Zellen den Anteil ROS-produzierender Granulozyten.



**Abbildung 3 (links):** Repräsentative Darstellung des Anteils ROS-bildender Granulozyten mittels dot blot nach durchflusszytometrischer Messung (Bsp. Kontrollprobe/ Negativkontrolle/ Sustanzkontrolle)

**Abbildung 4 (rechts):** Repräsentative Darstellung des Anteils ROS-bildender Granulozyten mittels dot blot nach durchflusszytometrischer Messung (Bsp. Positivkontrolle)

Die Abbildung 5 A-C zeigen anhand repräsentativer Histogramme lysierter EDTA-Vollblutproben, die Kurvenverläufe nach durchflusszytometrischer Messung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) ROS-bildender Granulozyten einer Kontrollprobe (A), Positivkontrolle (B) und einer Substanzkontrolle (C).

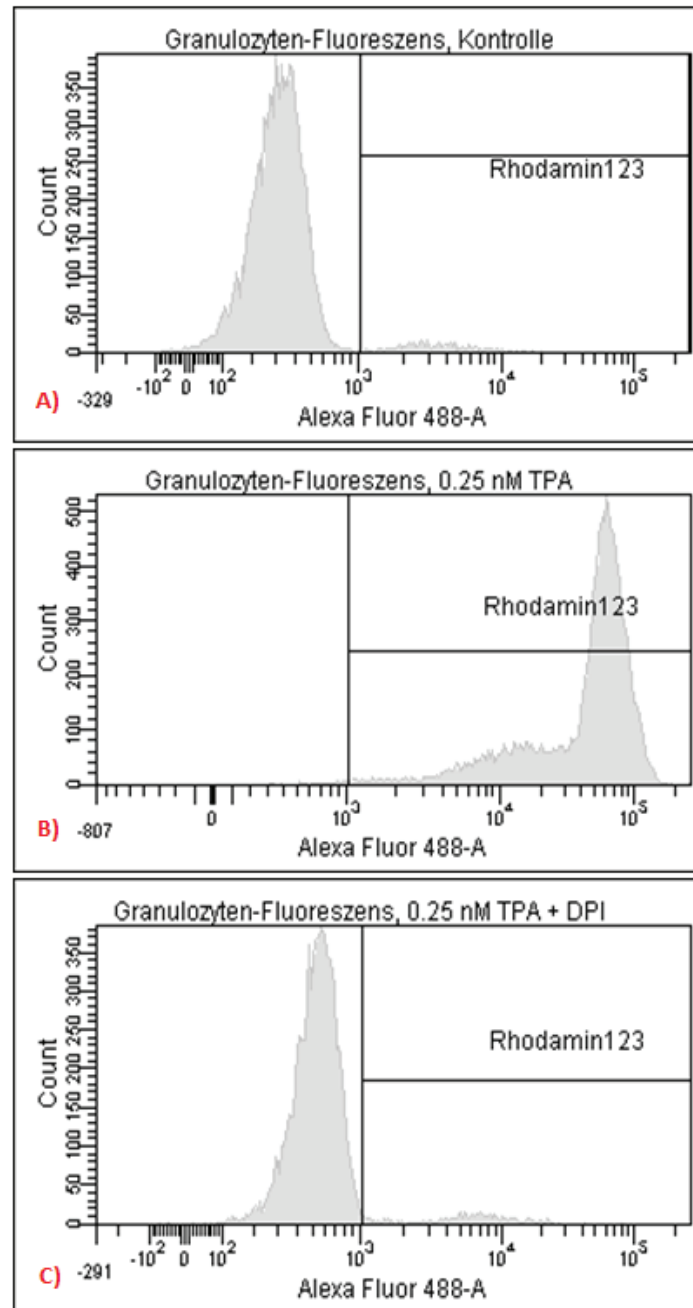


Abbildung 5 A-C: Repräsentative Darstellung von Histogrammen zur durchflusszytometrischen Messung der mittleren Fluoreszenzintensität ROS-bildender Granulozyten (Histogramm A: Kontrollprobe; B: Positivkontrolle; C: Substanzkontrolle)

### 3.5.4 Apoptose

Die Bestimmung der Apoptoserate von in Vollblut enthaltenen Lymphozyten erfolgte mittels Annexin- und Propidium-Iodid-Färbung.

Annexin V ist ein Protein, das abhängig von Calcium, spezifisch an Phosphatidylserin bindet (KOOPMAN ET AL., 1994; VERMES ET AL., 1995). Dieses Phospholipid wird von Zellen während der frühen Phase der Apoptose vom zytosolischen Teil der Zellmembran an die äußere Oberfläche exponiert (FADOK ET AL., 1992). Annexin V ist nicht in der Lage an nicht apoptotischen Zellen zu binden, da es die Doppelschicht der Membran vitaler Zellen nicht durchdringen kann. Daher ist die Annexinfärbung eine präzise Methode zur Identifikation und Quantifizierung frühapoptotischer Zellen (KOOPMAN ET AL., 1994; VERMES ET AL., 1995). Bei apoptotischen Zellen, geht die Integrität der Zellmembran verloren und Annexin V kann auch an Phosphatidylserin der inneren Membranen binden. Zur Identifikation und Selektion nekrotischer Zellen wird deshalb der rotfluoreszierende DNA-Farbstoff Propidium Iodid (PI) hinzugezogen. Dieser dringt bei Verlorengang der Integrität der Membran in die Zelle, bindet stöchiometrisch an der Nukleinsäure und färbt schließlich die entstehenden DNA-Fragmente. Die gemessene Fluoreszenz verhält sich proportional zur in der Zelle enthaltenen DNA (DEL BINO ET AL., 1991; POLLACK U. CIANCIO, 1991; VAN ENGLAND ET AL., 1998).

Zellen mit positiver Annexin V-Färbung und negativer PI-Färbung sind daher als frühapoptotische Zellen zu identifizieren, während PI-positive jedoch Annexin V-negative Zellen nekrotische Zellen darstellen. Bei doppelt positiver Färbung handelt es sich bereits um nicht lebensfähige, spätapoptotische Zellen und bei doppelt negativer Färbung um lebensfähige, nicht apoptotische Zellen (VERMES ET AL., 1995)

Bevor eine Inkubation mit Annexin V beziehungsweise PI erfolgt, müssen die Erythrozyten aus den Blutproben entfernt werden. Dazu wurden 100 µl EDTA-Vollblut mit 1000 µl destilliertem H<sub>2</sub>O 15 Sekunden resuspendiert und anschließend mit 108 µl einer 8,8 %igen NaCl-Lösung neutralisiert. Die Proben wurden fünf Minuten bei 250 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 1000 ml PBS gewaschen und wiederum zentrifugiert. Im Folgenden wurde ein kommerziell erhältlicher Assay der Firma BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) verwendet. Das Zellpellet wurde mit 600 µl Binding-Buffer resuspendiert. 100 µl der Suspension wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 3 µl FITC Annexin V sowie 5 µl PI versetzt. Es folgte eine 15-minütige Inkubationszeit, bei Raumtemperatur und Dunkelheit. Nach Zugabe des Binding-Buffers (400 µl) wurden jeweils 200 µl der ungefärbten und zwei Aliquots der Annexin/PI-Probe auf einer 96-well-Mikrotiterplatte



aufgetragen und innerhalb einer Stunde am BD FACSCanto II™ Flow Cytometer gemessen. Ausgezählt wurden dabei mindestens 10000 Lymphozyten.

### 3.5.5 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC's) aus dem Vollblut

Für die *In-vitro*-Analysen wurden primäre Kulturen von peripheren, mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten) verwendet.

Zur Gewinnung von PBMC's wurde heparinisiertes Vollblut 1:1 mit sterilem PBS in einem Zentrifugenröhrchen (50 ml) verdünnt. 25 ml des gewonnenen Blutgemisches wurden auf 20 ml Biocoll Lösung geschichtet. Diese Polysaccharidlösung fungiert als Dichtegradient, da sie eine höhere Dichte als die PBMC's besitzt. Die Proben wurden 30 min, bei 1200 x g ohne Bremse, bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die entstandene PBMC-Fraktion sammelt sich entsprechend ihrer Dichte in der Interphase zwischen Blutplasma und dem Biocoll. Sie wurde daraufhin abpipettiert und in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml PBS gegeben. Anschließend wurden die Röhrchen mit PBS auf 30 ml aufgefüllt und acht Minuten, bei 1200 x g ohne Bremse zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 1 ml destilliertem Wasser für 15 Sekunden gewaschen und 108 µl von einer 8,8 %igen NaCl-Lösung hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde wiederum zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das erhaltene Pellet wurde mit 15 ml RPMI-Medium resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugationsphase. Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgte die Bestimmung der Zellzahl beziehungsweise des Lebend-Tod-Verhältnisses. Die Zellen wurden so entsprechend der folgenden *In-vitro*-Versuche in Zellkulturgefäße gebracht und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert.

### 3.5.6 Stoffwechselaktivität der PBMC's (AlamarBlue®-Assay)

AlamarBlue®, auch bekannt als Resazurin, gilt als wichtiger Redoxindikator, der zur Einschätzung der metabolischen Funktion von Zellen verwendet wird. Es ist ein blauer nicht-fluoreszierender Farbstoff, der nicht toxisch auf Zellen wirkt und frei permeabel durch die Membranen ist. Durch die Stoffwechselaktivität der Zellen und in Abhängigkeit mitochondrialer Koenzyme, wie beispielsweise NADPH und NADH, wird Resazurin nach dem Eindringen in die Zelle in den pink-fluoreszierenden Farbstoff Resofurin umgewandelt. Gesunde Zellen sind kontinuierlich in der Lage Resazurin zu Resofurin zu reduzieren. Die messbare Fluoreszenz des Farbstoffs verhält sich proportional zur Anzahl an lebenden Zellen und korres-

pondiert mit der metabolischen Aktivität derer. Geschädigte oder nicht lebensfähige Zellen weisen eine geringere metabolische Aktivität auf. Folglich ergibt sich eine geringere messbare Fluoreszenz, als es bei gesunden Zellen der Fall ist (O'BRIAN ET AL., 2000; RAMPERSAD, 2012). Aus diesem Grund wurde das AlamarBlue<sup>®</sup>-Assay in der vorliegenden Arbeit als Methode zur Prüfung des Vitalitätsstatus und der metabolische Aktivität der Zellen sowie die Zytotoxizität auf die Zellen herangezogen.

Die isolierten PBMC's wurden auf einer Mikrotiterplatte ausgesät ( $100 \mu\text{l} \pm 1 \cdot 10^6$  Zellen/well). Weiterhin wurden  $50 \mu\text{l}$  Niacinlösung mit den in Abbildung 6 (Seite 25) aufgezeigten Konzentrationen aufgetragen sowie, bei der Hälfte der Proben,  $50 \mu\text{l}$  des Proliferationsstimulators Concanavalin A (ConA) ( $c = 10 \mu\text{g/ml}$ ;  $0,25 \mu\text{g/well}$ ). Anschließend wurden die Vertiefung mit RPMI-Medium auf  $200 \mu\text{l}$  Gesamtvolumen aufgefüllt. Als Blank wurden die äußersten Vertiefungen nur mit  $200 \mu\text{g}$  RPMI-Medium gefüllt. Nachdem die Mikrotiterplatte mit Hilfe eines Mikroskops auf Bakterien überprüft wurde, folgte eine Inkubationszeit von 69 h und 30 min im Brutschrank, bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $5 \%$   $\text{CO}_2$ . Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen erneut auf Fremdwachstum untersucht, da mikrobielle Kontaminationen ebenfalls zu einer Umwandlung des Farbstoffs führen und dieses zu falsch positiven Ergebnissen führen könnte. Daraufhin wurde die Mikrotiterplatte für fünf Minuten, bei  $200 \text{ g}$  zentrifugiert.  $100 \mu\text{l}$  des Überstandes wurden für die Bestimmung von Stickoxiden abgenommen. Schließlich wurde in jedes well, in einem 1:10 Verdünnungsverhältnis, AlamarBlue<sup>®</sup> gegeben. Es wurde eine Inkubationszeit von  $2 \frac{1}{2} \text{ h}$ , bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  eingeräumt. Mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Multimode Lesegerätes (TECAN infinite 200) konnte bei einer Anregung von 530-560 nm die Fluoreszenz der Proben ermittelt werden.

In der nachfolgenden Abbildung (Abbildung 1) wird ein Plattenlayout zum Test der Stoffwechselaktivität der PBMC's mittels AlamarBlue<sup>®</sup>-Assay dargestellt. Die blau gekennzeichneten Felder spiegeln die Blanks, d.h. Medium gefüllte wells wieder. Alle rot umrandeten Felder zeigen Proben, die mit den jeweiligen Niacinlösungen versetzt wurden und nicht mit ConA versetzt wurden. Die rot umrandeten Felder weisen auf Proben mit ConA-Zusatz hin.

Kuhnr.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Blank	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	ConA	ConA	ConA	ConA	ConA	Blank
<b>A</b>	Kontrolle												
<b>B</b>	c = 0,25 µg/ml												
<b>C</b>	c = 0,40 µg/ml												
<b>D</b>	c = 1,00 µg/ml												
<b>E</b>	c = 2,00 µg/ml												
<b>F</b>	c = 3,00 µg/ml												
<b>G</b>	c = 4,00 µg/ml												
<b>H</b>	Kontrolle												

Abbildung 6: Plattenlayout AlamarBlue®-Assay

### 3.5.7 Proliferationstest

Auf einer 24-well-Mikrotiterplatte wurden 500 µl PBMC-Zellsuspension/well mit  $1 \times 10^6$  Zellen/ml ausgesät (500000 Zellen/well). Zur Analyse der Auswirkung von Niacin auf die Zellproliferation wurden die Zellen bei einer Endkonzentrationen von 0,25; 0,40; 1,0; 2,0; 3,0 und 4,0 µg/ml von NA beziehungsweise NAM inkubiert. Weiterhin wurde eine Kontrollprobe ohne Zusätze mit und ohne ConA-Zusatz getestet. Nach Inkubationszeiten von 24, 48 und 72 h wurden manuelle Lebend/Tod-Bestimmungen mittels Trypanblaufärbung und eine Zellzählung mit Hilfe des Z2-Zählers durchgeführt. Zellfreie Proben des Überstandes wurden für die Stickoxidanalyse zuvor abgenommen.

Bei der **Trypanblaufärbung** wurden zunächst 40 µl Trypan Blue Solution und 40 µl Zellsuspension vermischt. Dabei werden alle nicht lebensfähigen beziehungsweise toten Zellen blau angefärbt. Die Proben wurden anschließend in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und ausgezählt.

Mit Hilfe des **Z2-Coulter®** (Beckmann Coulter; Krefeld, Deutschland) wurde für jeden Zeitpunkt zusätzlich die Gesamtanzahl der Lymphozyten bestimmt und eine Aussage zum durchschnittlichen Volumen der Lymphozyten getroffen. Dazu wurden 200 µl PBMC-Zellsuspension 1:46 mit 9 ml NaCl verdünnt. Schließlich wurden sämtliche Zellen, die einen Durchmesser von mehr als 5,5 µm aufwiesen und somit als Lymphozyten definiert wurden, gezählt.

### 3.5.8 Griess-Assay

Der Griess-Assay ist eine einfache und sensitive Methode zur indirekten Bestimmung von Stickoxiden in biologischen Systemen über das im Vergleich zu den Stickoxiden wesentlich stabilere Nitrit. Die Grundlage der Analyse ist die Behandlung von Nitrit mit einem diazotierten Reagenz, wie beispielsweise Sulfanilamiden. In Folge der Behandlung kommt es in sauren Medien zur Bildung von flüchtigen Diazoniumsalzen, die eine Verbindung mit dem Koppelungsreagenz NED eingehen und dadurch eine stabile Azoverbindung bilden. Es kommt zu einer roten Färbung, dessen Intensität proportional zur Konzentration von Stickoxiden in einer Probe steigt. Dabei ist die Absorptionsfähigkeit der entstandenen Verbindung bei einer Wellenlänge von 540 nm linear proportional zur Konzentration der Stickoxide in der Probe (SUN ET AL., 2003).

Zunächst wurden die Zellüberstände des AlamarBlue<sup>®</sup>-Assays beziehungsweise der Zellproliferation auf eine 96-well-Mikrotiterplatte aufgetragen (100 µl/well). Nachdem 1 %iges Sulfanilamin und 0,1 %iges NED 1:1 vermischt wurden, wurden 100 µl des Griess-Reagenz in die wells gegeben. Zudem wurde auf jeder Platte eine Standardlösung mit aufsteigenden Konzentrationen von 0 µg/ml bis 50 µg/ml an Natriumnitrit aufgetragen, um die Quantifizierung von Nitrit zu ermöglichen. Im Plattenphotometer wurden die Proben für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei einer Absorption von 540 nm mittels Mikrotiterplatten-Multimode Lesegerät (TECAN infinitie 200) gemessen.

### 3.5.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Erstellung grafischer Darstellungen der gewonnenen Daten erfolgte mittels Microsoft Excel 2010 und SAS<sup>®</sup>Enterprise Guide Version 4.3 (SAS Institute Inc., Cary NC, USA). Zur Verarbeitung der Daten des DHR-Assays; der Apoptose; des AlamarBlue<sup>®</sup>-Assays und des Griess-Assays wurde die PROC MIXED Prozedur verwendet. Dabei wurde, außer bei der Apoptose, das Tier als Wiederholungsfaktor einbezogen. Statistisch signifikante Unterschiede ließen sich mittels Tukey's multiplen Rang-Test ermitteln, wobei Differenzen mit  $p \leq 0,05$  als statistisch signifikant beziehungsweise  $p \leq 0,001$  als höchst signifikant galten und  $p$ -Werte  $> 0,05$  und  $\leq 0,1$  als Tendenz beurteilt wurden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 ROS-Produktion neutrophiler Granulozyten im zeitlichen Abstand zur Kalbung

Mittels DHR-Assay wurde zum einen der Anteil R123 positiv gefärbter Granulozyten ermittelt und zum anderen die MFI der R123 positiv gefärbten Granulozyten. Der Anteil der positiv gefärbten Granulozyten ist dabei dem Anteil ROS-bildender Granulozyten im Verhältnis zur Gesamtgranulozytenpopulation gleichzusetzen. Die MFI ist ein Maß für die Intensität der ROS-Bildung in den positiv gefärbten Zellen. Es wurde einerseits das basale Level der Granulozyten betrachtet und andererseits die Stimulierbarkeit des oxidativen Bursts nach TPA-Stimulation. Eine Substanzkontrolle und eine Negativkontrolle dienten zur Prüfung der Methodik.

Bei Betrachtung der positiv gefärbten Granulozyten über einen Zeitraum vom 42. Tag a.p. bis zum 100. Tag p.p. zeigt sich auf basalem Level ein markanter Verlauf während der Transitperiode (siehe Abbildung 7), wobei zum Tag 1 a.p. aus versuchstechnischen Gründen nur die Analyse eines Versuchstieres vorliegt.

Zu Versuchsbeginn liegt der Anteil ROS-bildender Granulozyten im Mittel bei 9,40 % und am 21. Tag a.p. bei 13,4 %. Zwei Wochen vor bis drei Wochen nach der Kalbung bewegt sich dieser Anteil auf sehr niedrigem Niveau. Drei Tage vor und nach der Kalbung sinkt der Anteil im Mittel auf bis zu 2,30 beziehungsweise 2,40 % ab. Am 28. Tag p.p. ist ein deutlicher Anstieg der ROS-bildenden Zellen auf durchschnittlich 21,00 % zu erkennen. Ab dem 42. Tag nach der Kalbung bewegen sich die Anteile um die 8,00 %. Auffällig ist im Vergleich zu den restlichen Versuchstagen die niedrige Standardabweichung der Werte drei Wochen vor bis vier Wochen nach der Kalbung.

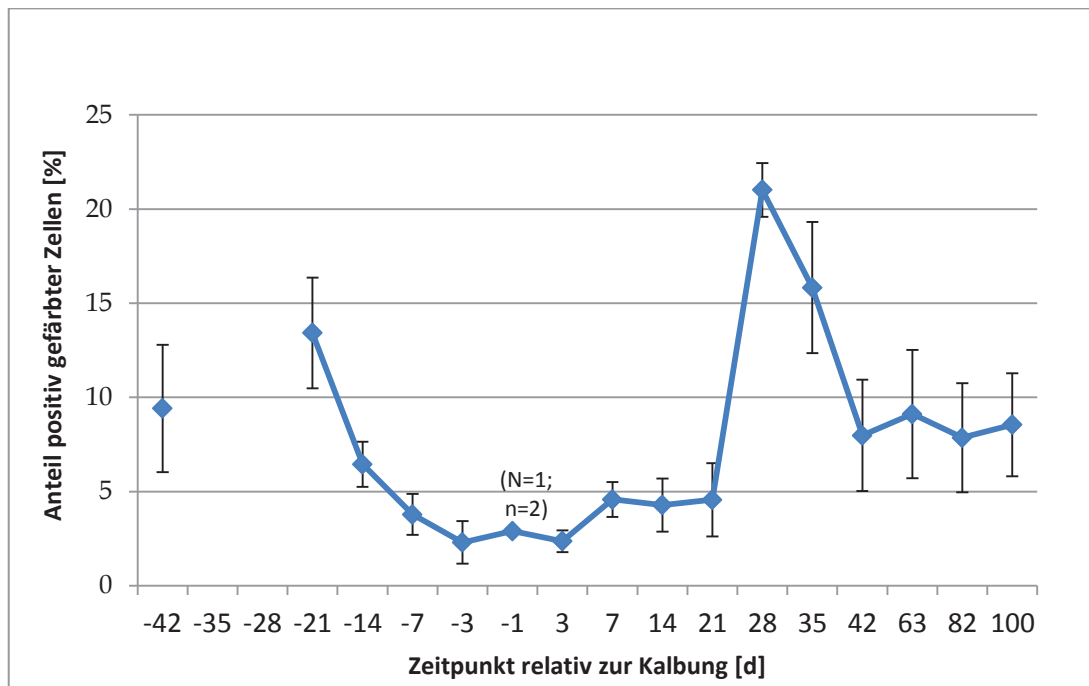


Abbildung 7: Mittlerer prozentualer Anteil R123 positiv gefärbter Granulozyten in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zur Kalbung auf basalem Level (N=3, n=9; MW  $\pm$  SD)

Ein anderer Verlauf im Vergleich zum Anteil der ROS-bildenden Zellen zeigt sich bei Betrachtung der Intensität der ROS-Bildung, jedoch auch hier mit einer deutlichen Abnahme bis zur Kalbung (siehe Abbildung 8).

Zu Versuchsbeginn kann bei Betrachtung der R123 positiv gefärbten Granulozyten auf basalem Niveau eine durchschnittliche MFI von 1556,20 verzeichnet werden. Bis zur Kalbung ist ein kontinuierliches Absinken der durchschnittlichen MFI zu beobachten. Drei Tage a.p. liegt diese bei 787,30 und einen Tag a.p. lediglich bei 517,00, wobei bei letzterem Zeitpunkt nur die Probenanalyse eines Tieres vorliegt. Kurz nach der Kalbung steigt die MFI der R123 positiv gefärbten Granulozyten bis zum Tag 28 p.p. deutlich an, wobei an Tag 14 und 21 p.p. ein leichter Abfall zu erkennen ist. Nach dem 28. Tag p.p. sinkt die MFI und damit die Intensität der ROS-Bildung der Granulozyten. Allerdings zeigt sich in diesem Zeitraum auch eine höhere Standardabweichung. In der folgenden Abbildung (Abbildung 8) wird noch einmal die beschriebene Entwicklung der Intensität der ROS-Bildung der Granulozyten anhand der durchschnittlichen MFI veranschaulicht.

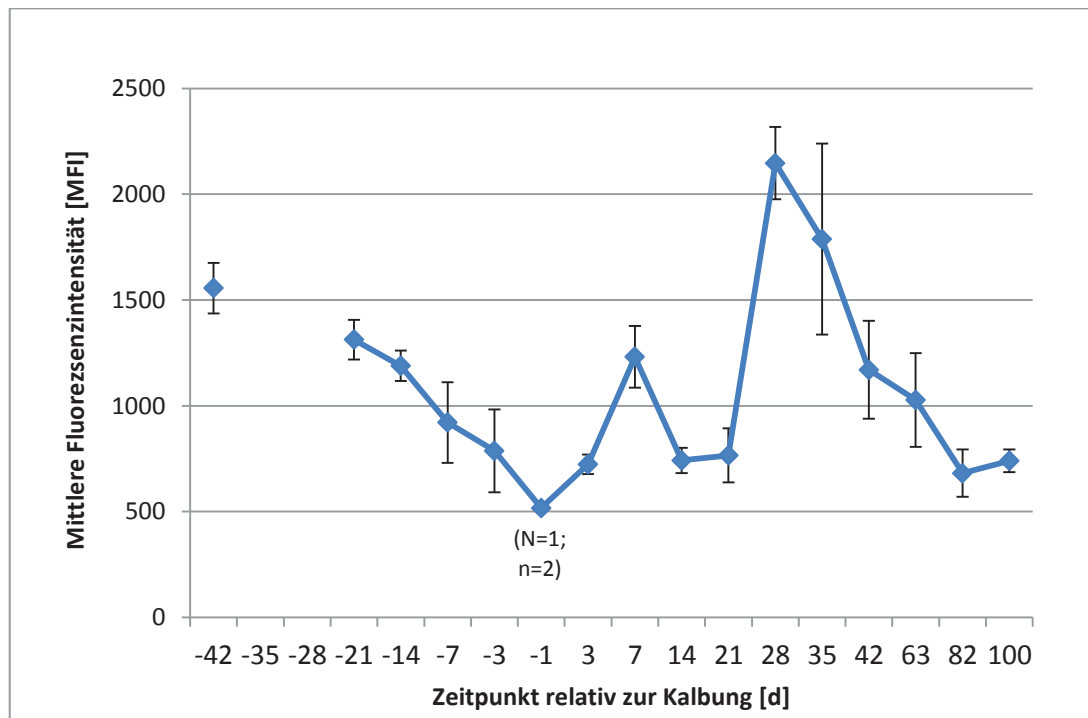


Abbildung 8: Durchschnittliche mittlere Fluoreszenzintensität der R123 positiv gefärbten Granulozyten in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zur Kalbung auf basalem Level (N = 3, n = 9; MW  $\pm$  SD)

Zur maximalen Induktion des oxidativen Bursts und um somit die Leistungsfähigkeit der Granulozyten im zeitlichen Verlauf der Transitperiode zu prüfen, wurden die Zellen mit dem NOX-Aktivator TPA behandelt.

Im Ergebnis kann mit Hilfe der TPA-Stimulation zu allen Beprobungszeitpunkten eine Aktivierung der ROS-Bildung bei durchschnittlich über 98,00 % der Gesamtgranulozytenpopulation erzielt werden. Ausnahme bilden die Zeitpunkte 3 und 7 p.p.. Zu diesen Zeitpunkten können im Mittel nur 96,60 % beziehungsweise 97,50 % der Granulozyten aktiviert werden. Während die prozentualen Anteile der ROS-bildenden Zellen vor der Kalbung und bis zu einer Woche nach der Kalbung leichten Schwankungen unterliegen, die von einer großen Standardabweichung zwischen den Werten begleitet sind, ist eine deutlich homogenere Struktur ab dem 14. Tag p.p. zu beobachten.

In Abbildung 9 kann der Verlauf der durchschnittlichen prozentualen Anteile der R123 positiv gefärbten Granulozyten vom 42. Tag a.p. bis 100. Tag p.p. nach der Stimulation mittels TPA nachvollzogen werden. Dabei beträgt die Stichprobengröße  $N = 3$  beziehungsweise aus versuchstechnischen Gründen an Tag 1 a.p.  $N = 1$ .

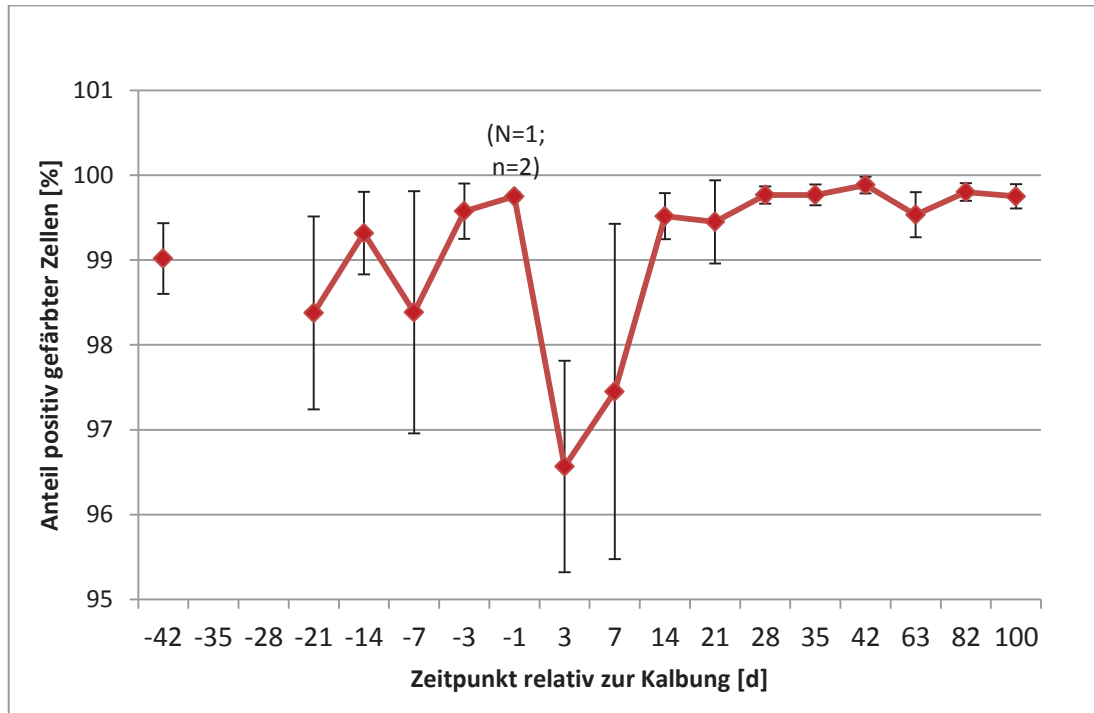


Abbildung 9: Mittlerer prozentualer Anteil R123 positiv gefärbter Granulozyten nach TPA-Stimulation in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zur Kalbung ( $N = 3$ ,  $n = 9$ ;  $MW \pm SD$ )

Die MFI der R123 positiv gefärbten Granulozyten liegt im Allgemeinen im Vergleich zum basalen Niveau nach der Behandlung mit TPA deutlich höher. Bis zur Kalbung unterliegen die Werte der MFI deutlichen Schwankungen. Am Tag 14 a.p. ist im Vergleich zu allen anderen Versuchszeitpunkten die durchschnittlich höchste MFI zu verzeichnen (66325,30). Am Tag 7 a.p. ist ein deutlich niedrigeres Niveau zu erkennen. Bis zum Tag 1 a.p. zeigt sich ein Anstieg der MFI auf 63613,50. Danach fällt die Intensität kontinuierlich bis zum 21. Tag p.p. auf durchschnittlich 52649,50 ab. Bis zum 42. Tag p.p. ist ein Ansteigen der MFI aller R123 positiv gefärbten Granulozyten zu beobachten. Danach verbleiben die Werte auf einem Niveau von durchschnittlich 60411,00 bis 62347,50.

Die Entwicklung der MFI der R123 positiv gefärbten Granulozyten in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zur Kalbung wird in der folgenden Abbildung (Abbildung 10) noch einmal veranschaulicht.



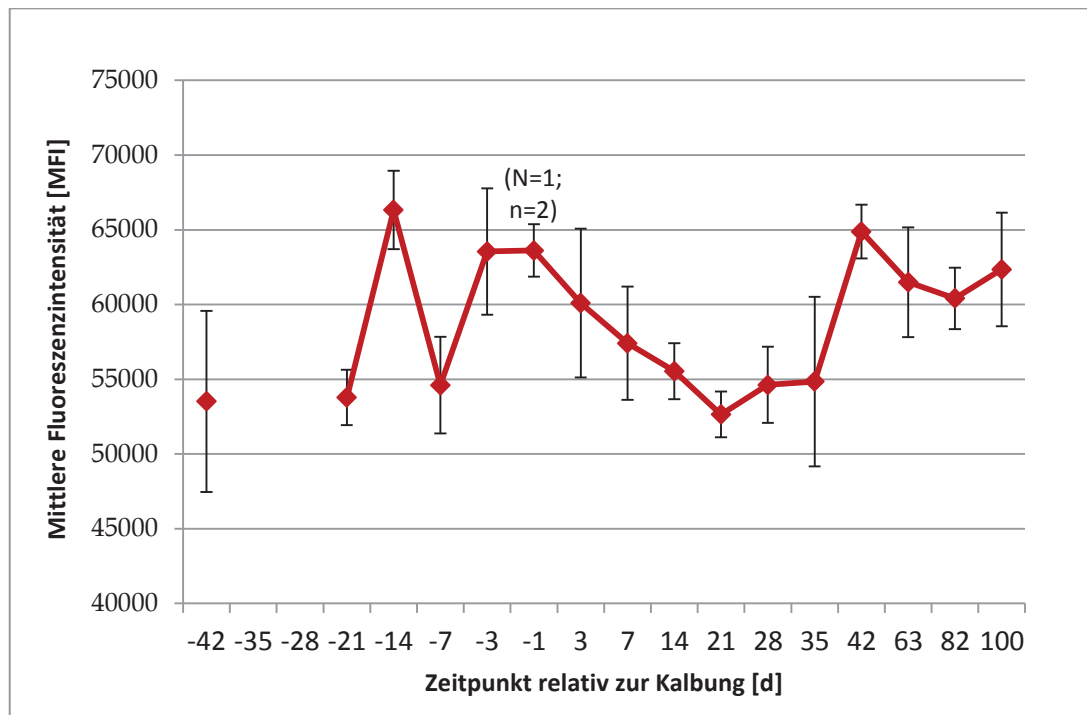


Abbildung 10: Durchschnittliche mittlere Fluoreszenzintensität R123 positiv gefärbter Granulozyten nach TPA-Stimulation in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zur Kalbung (N = 3, n = 9; MW ± SD)

Nach Zugabe von DPI mit und ohne TPA-Zusatz ergeben sich bei allen Proben Werte ähnlich dem basalen Niveau.

## 4.2 Einfluss von Niacin auf Immunzellparameter

### 4.2.1 pH-Wert Messung der Niacinlösungen

Vor der Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an NA und NAM wurde eine Bestimmung des pH-Wertes der Niacinlösungen durchgeführt, da der Säurecharakter beider Niacinformen die Zellreaktion beeinflussen könnten. Im Ergebnis ergeben sich für die Konzentrationen von NA pH-Werte von 5,42 bei der niedrigsten Konzentration des Zusatzes und 4,60 bei der höchsten Konzentration nach der Verdünnung des Niacins mit NaCl. Bei Zugabe des Zusatzes zum Blut können jedoch pH-Werte von 7,63 (0,25 µg/ml) bis 7,67 (1,00 µg/ml) festgestellt werden. Nach der 1:4 Verdünnung mit Medium ergeben sich Werte zwischen 7,45 (2,00 µg/ml) und 7,54 (0,25 µg/ml und 4,00 µg/ml). Bei NAM zeigen sich Werte bei Verdünnung mit NaCl zwischen 5,43 bei der zweithöchsten Konzentration des Zusatzes und 5,65 bei der niedrigsten Konzentration. Im Blut beläuft sich der pH-Wert nach Zugabe von NAM zwischen 7,66 (0,40 µg/ml) und 7,68 (0,25 µg/ml; 1,00 µg/ml; 4,00 µg/ml) und bei

einer 1:4 Verdünnung mit Medium zwischen 7,46 (0,25 µg/ml; 1,00 µg/ml) bis maximal 7,56 (1,00 µg/ml). Die Ergebnisse der Messungen sind in der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 5) aufgeführt. Dabei werden zunächst die pH-Werte nach einer Verdünnung mit NaCl aufgeführt und anschließend die pH-Werte bei den Endkonzentrationen an NA und NAM im Blut und Medium.

**Tabelle 5: pH-Werte nach Verdünnungen von NA und NAM mit NaCl, Blut und Medium in Abhängigkeit von der Niacinkonzentration**

Konzentration [µg/ml]	NA	NAM
Verdünnung mit NaCl		
8,00	4,60	5,45
2,00	5,05	5,43
0,80	5,29	5,52
0,50	5,42	5,65
Verdünnung mit Blut		
4,00	7,64	7,68
1,00	7,67	7,68
0,40	7,63	7,66
0,25	7,63	7,68
Verdünnung mit Medium		
4,00	7,54	7,47
3,00	7,53	7,51
2,00	7,45	7,46
1,00	7,48	7,56
0,40	7,53	7,47
0,25	7,54	7,46

#### 4.2.2 ROS-Bildung neutrophiler Granulozyten

Zur Analyse der Wirkmechanismen von Niacin wurden die in Vollblut enthaltenen Granulozyten mit NA oder NAM versetzt und anschließend nach der DHR-Methode weiter behandelt.

Auf basalem Level kann, bei Betrachtung der LSMeans, bei den Proben verschiedener Konzentrationen an NA nach 30-minütiger Inkubationszeit in der Regel ein Anteil von  $10,30 \pm 3,02$  % (0,25 µg/ml) -  $11,00 \pm 3,02$  % (1,00 µg/ml) ROS-bildender Granulozyten nachgewiesen werden. Bei NAM liegt dieser Anteil bei gleicher Inkubationsdauer im Bereich von  $9,51 \pm 4,08$  % (0,25 µg/ml) –  $10,00 \pm 4,08$  % (K). Nach einer Inkubationszeit von 180 Minuten bewegen sich die Anteile bei NA im Bereich von  $9,89 \pm 4,73$  (4,00 µg/ml) bis  $12,08 \pm 4,73$  % (K) und bei NAM auf  $8,99 \pm 4,04$  % (K) bis  $9,53 \pm 4,04$  % (1,00 µg/ml).

In den Abbildung 11 und Abbildung 12 werden die Anteile R123 positiv gefärbter Granulozyten aus der Gesamtgranulozytenpopulation der Kontrollproben und mit unterschiedlichen Konzentrationen an NA und NAM versetzten Proben nach einer Inkubationszeit von 30 min beziehungsweise 180 min vergleichend gegenübergestellt (LSMeans  $\pm$  SE). Die Angaben beziehen sich auf das basale Level der ROS-bildenden Zellen.

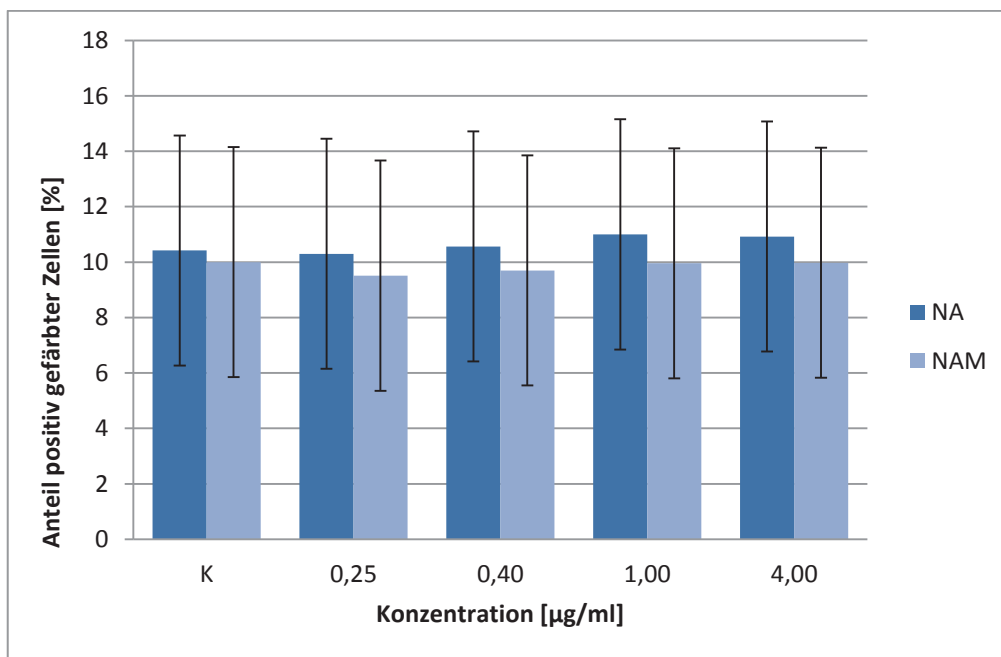


Abbildung 11: Prozentualer Anteil R123 positiv gefärbter Granulozyten in Abhängigkeit von der Konzentration des Nicotinzusatzes nach 30 Minuten Inkubationszeit auf basalem Level (N = 3, n = 9; LSMeans  $\pm$  SE)

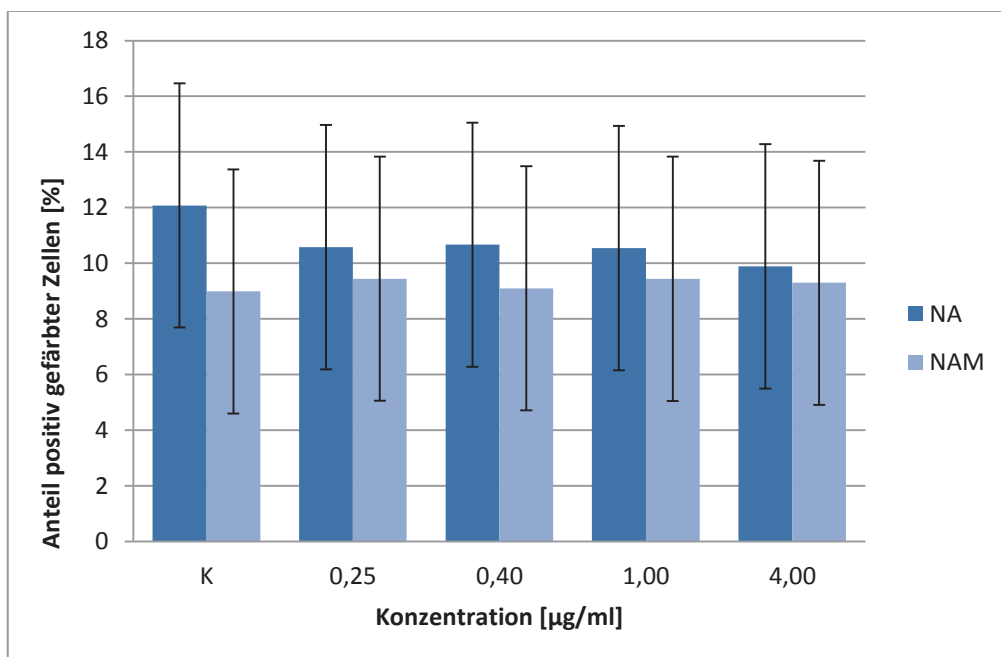


Abbildung 12: Prozentualer Anteil R123 positiv gefärbter Granulozyten in Abhängigkeit von der Konzentration des Nicotinzusatzes nach 180 Minuten Inkubationszeit auf basalem Level (N = 3, n = 9; LSMeans  $\pm$  SE)

Bei beiden Inkubationszeitpunkten kann in Bezug auf den Anteil ROS-bildender Granulozyten weder bei NA noch bei NAM ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollproben und den Proben mit Niacinzusatz ermittelt werden. Auch die Proben mit verschieden konzentriertem Niacinzusatz unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Auftretende Differenzen der Anteile der ROS-bildenden Granulozyten zwischen NA und NAM erweisen sich bei gleichen Konzentrationen des Niacinzusatzes als sehr gering und nicht von statistischer Relevanz.

Bei Betrachtung der MFI zeigt sich auf basalem Level sowohl bei NA als auch bei NAM ein dosisabhängiger Effekt nach beiden Inkubationszeitpunkten.

In den Abbildung 13 und Abbildung 14 werden die MFI der R123 positiv gefärbten Granulozyten auf basalem Level beider Inkubationszeitpunkte in Abhängigkeit von der Konzentration des Niacinzusatzes anhand der LSMeans  $\pm$  SE vergleichend gegenübergestellt. Signifikanzen zwischen den verschiedenen konzentrierten Zusätzen werden bei NA mit kleinen Buchstaben gekennzeichnet und bei NAM mit Großbuchstaben, wobei unterschiedliche Buchstaben signifikante Unterschiede kennzeichnen.

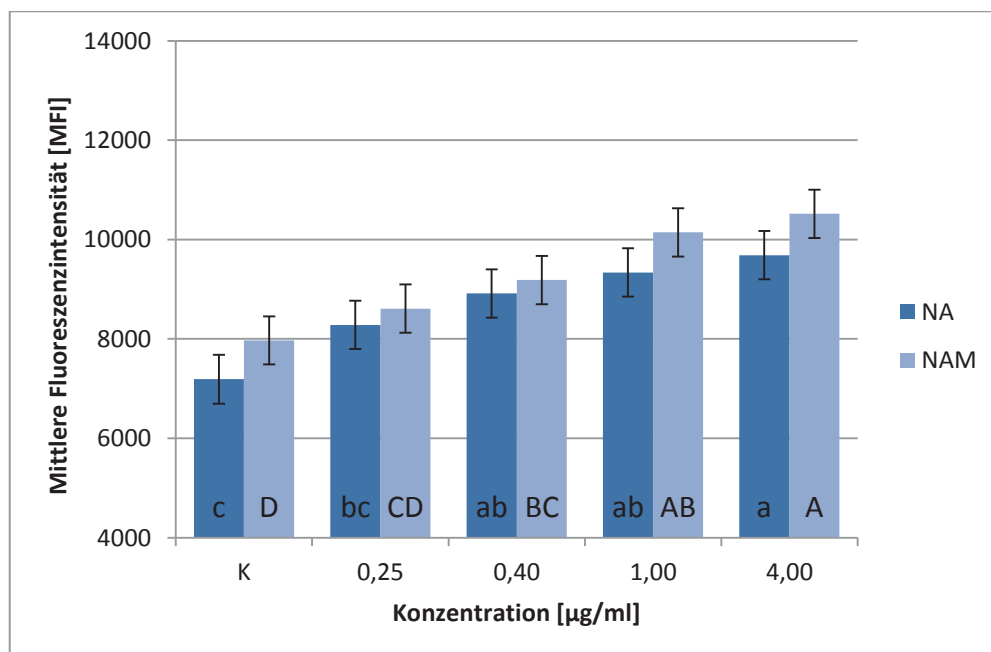


Abbildung 13: Mittlere Fluoreszenz R123 positiv gefärbter Granulozyten in Abhängigkeit von der Konzentration des Niacinzusatzes nach 30 Minuten Inkubationszeit auf basalem Level (N = 3, n = 9; LSMeans  $\pm$  SE); a-c: p < 0,05 zwischen unterschiedlichen NA-Konzentrationen; A-D: p < 0,05 zwischen unterschiedlichen NAM-Konzentrationen

Wie in Abbildung 13 ersichtlich, erweisen sich die Unterschiede der MFI-Werte von Proben mit einer Konzentration von 0,40 µg/ml, 1,00 µg/ml sowie 4,00 µg/ml NA zum Kontrollniveau, bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten als höchst signifikant ( $p < 0,001$ ). Zudem bewegen sich die MFI der Proben mit einer Konzentration von 4,00 µg/ml NA auf signifikant höherem Niveau im Vergleich zu Proben mit einer Konzentration von 0,25 µg/ml NA ( $p = 0,0104$ ).

Auch bei NAM können ab einer Konzentration von 0,40 µg/ml gegenüber den Proben ohne Zusatz, signifikant höhere MFI bei einer 30-minütigen Inkubation ermittelt werden ( $p < 0,05$ ) (siehe Abbildung 13). Dabei sind die Differenzen zu den Konzentrationen von 1,00 µg/ml und 4,00 µg/ml des NAM-Zusatzes als höchst signifikant einzustufen ( $p < 0,001$ ). Signifikante Unterschiede der MFI sind ebenfalls zwischen Proben mit einem Zusatz von 0,25 µg/ml und Proben der beiden höchsten Konzentrationen an NAM festzustellen ( $p < 0,01$ ). Zudem ergibt sich bei dieser Inkubationsdauer eine Signifikanz beim statistischen Vergleich der Proben mit Konzentrationen von 0,40 µg/ml und 4,00 µg/ml ( $p = 0,0186$ ).

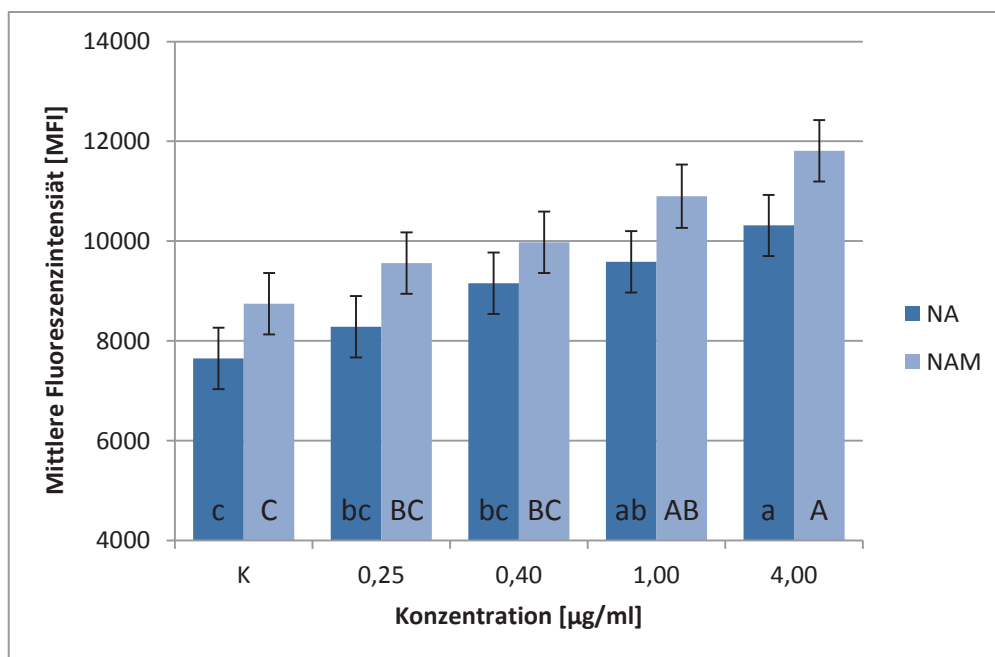


Abbildung 14: Mittlere Fluoreszenz R123 positiv gefärbter Granulozyten in Abhängigkeit von der Konzentration des Niacinzusatzes nach 180 Minuten Inkubationszeit auf basalem Level ( $N = 3$ ,  $n = 9$ ;  $LSMeans \pm SE$ ); a-c:  $p < 0,05$  zwischen unterschiedlichen NA-Konzentrationen; A-C:  $p < 0,05$  zwischen unterschiedlichen NAM-Konzentrationen

Nach einer Inkubationszeit von 180 Minuten können gegenüber der kürzeren Inkubationsdauer fast bei jeder Konzentration geringfügig höhere Werte zur MFI der ROS-bildenden Granulozyten ermittelt werden. Allerdings erweisen sich die Differenzen nicht als statistisch signifikant.

Es treten jedoch sowohl bei NA als auch bei NAM signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollproben beziehungsweise einer Konzentration von 0,25 µg/ml und den Proben ab einer Konzentration von 1,00 µg/ml auf ( $p < 0,05$ ). Der Unterschied zwischen dem Kontrollniveau und Proben mit dem höchst konzentrierten Zusatz ist bei beiden Niacinformen als höchst signifikant einzustufen ( $p < 0,001$ ) (siehe Abbildung 14).

Unterschiede in Bezug auf die Werte der MFI auf basalem Niveau bei Gegenüberstellung der beiden Niacinformen können zu beiden Inkubationszeitpunkten nicht als statistisch relevant nachgewiesen werden.

Die Stimulation mittels TPA bewirkt, sowohl bei den Kontrollproben als auch bei Proben mit Niacinzusatz, bei einer Inkubationsdauer von 30 Minuten, eine Aktivierung zur Produktion von ROS bei über 98,00 % aller Granulozyten. Nach 180-minütiger Inkubationsdauer mit Niacin können über 97,50 % aller Granulozyten zum oxidativen Burst stimuliert werden.

Die Anteile R123 positiv gefärbter Granulozyten nach der Stimulation durch TPA werden in Abhängigkeit von der Konzentration des Niacinzusatzes in Abbildung 15 (30-minütige Inkubationszeit) und Abbildung 16 (180-minütige Inkubationszeit) dargestellt. Eine Signifikanz zwischen den Werten der beiden Niacinformen werden durch (\*) gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

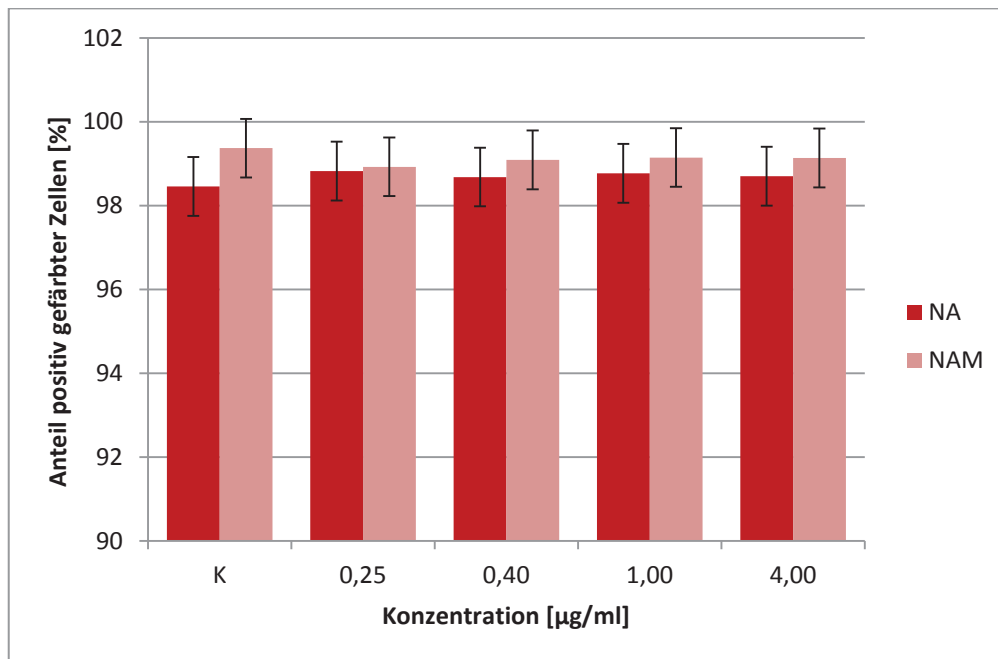
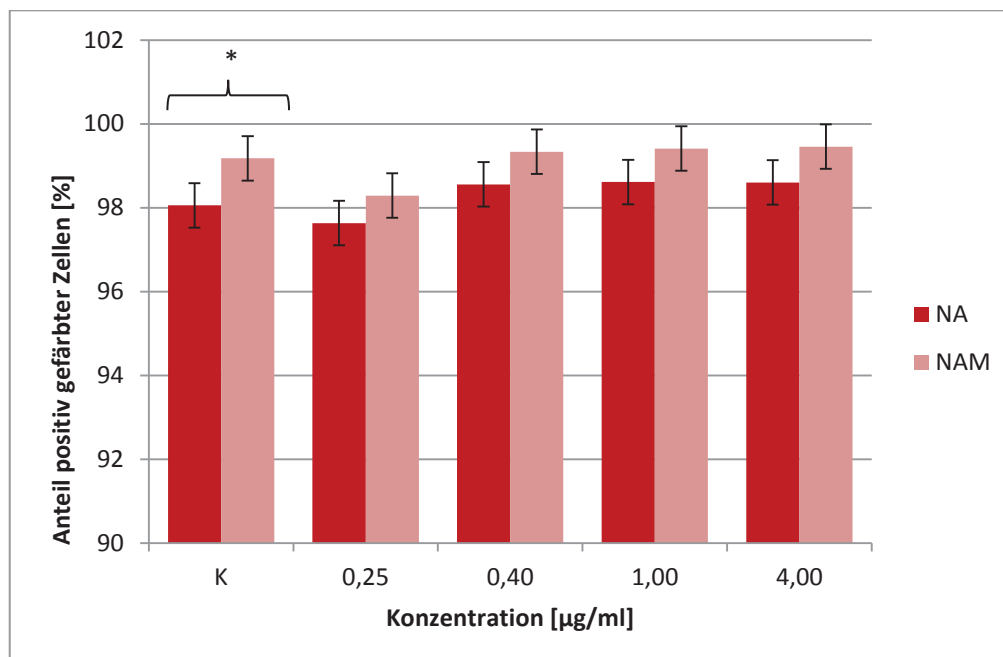


Abbildung 15: Anteil R123 positiv gefärbter Granulozyten nach TPA-Stimulation in Abhängigkeit von der Konzentration des Niacinzusatzes nach 30 Minuten Inkubationszeit (N = 3, n = 9; LSMMeans ± SE)



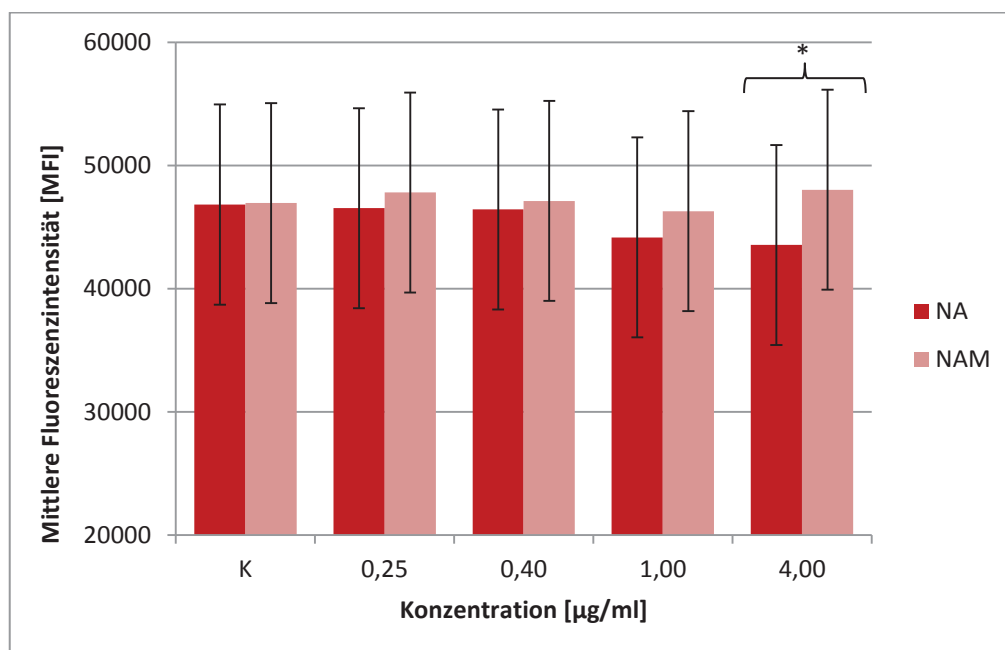
\*signifikant ( $p < 0,05$ )

Abbildung 16: Anteil R123 positiv gefärbter Granulozyten nach TPA-Stimulation in Abhängigkeit von der Konzentration des Niacinzusatzes nach 180 Minuten Inkubationszeit (N = 3, n = 9; LSMMeans ± SE)

Weder beim Vergleich der mit Niacin versetzten Proben mit den Kontrollproben, noch dosisabhängig ist eine veränderte Stimulierbarkeit der Granulozyten festzustellen. Mit Ausnahme der Kontrollproben nach einer Inkubationszeit von 180 Minuten, kann bei beiden Inkubationszeitpunkten kein signifikanter Unterschied zwischen den Niacinformen in Bezug auf den Anteil ROS-bildender Zellen nach der TPA-Stimulation nachgewiesen werden.

Begleitend zu den höheren Anteilen an ROS-bildenden Granulozyten, kann nach TPA-Stimulation eine deutlich höhere MFI gegenüber dem basalem Niveau nachgewiesen werden.

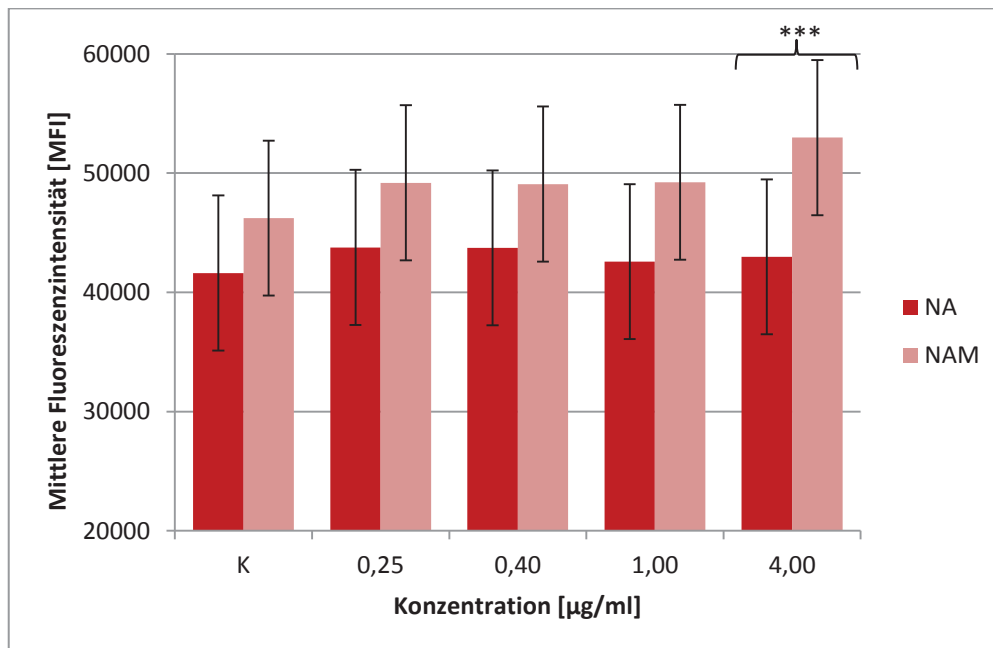
In Abbildung 17 und Abbildung 18 werden die Werte zur MFI nach 30-minütiger und nach 180-minütiger Inkubation mit verschieden konzentrierten Zusätzen an NA beziehungsweise NAM dargestellt.



\*signifikant ( $p < 0,05$ )

Abbildung 17: Mittlere Fluoreszenz R123 positiv gefärbter Granulozyten nach TPA-Stimulation in Abhängigkeit von der Konzentration des Niacinzusatzes nach 30 Minuten Inkubationszeit (N = 3, n = 9; LSMean ± SE)





\*\*\* höchst signifikant ( $p < 0,001$ )

Abbildung 18: Mittlere Fluoreszenz R123 positiv gefärbter Granulozyten nach TPA-Stimulation in Abhängigkeit von der Konzentration des Niacinzusatzes nach 180 Minuten Inkubationszeit (N = 3, n = 9; LSMMeans ± SE)

Nach 30-minütiger Inkubationsdauer mit NA zeigen sich mit steigender Konzentration des Zusatzes geringere MFI-Werte. Hingegen konnten bei NAM die höchsten MFI bei einer Konzentration von 4,00 µg/ml ermittelt werden. Dies führt zu signifikanten Unterschieden zwischen den Werten der MFI der beiden Niacinformen bei dem am höchsten konzentrierten Zusatz ( $p = 0,0454$ ). Dieser Effekt ist auch nach längerer Inkubation noch nachzuweisen. Bei einer Konzentration von 1,00 µg/ml lassen sich bei NAM, gegenüber der NA, tendenziell höhere Werte der MFI erkennen ( $p = 0,0624$ ).

Auch hier zeigen sich nach Behandlung der Proben mit DPI mit und ohne Zusatz von TPA Ergebnisse auf dem Niveau des basalen Levels.

### 4.2.3 Apoptoseverhalten von Lymphozyten

Mit Hilfe der Annexin-Färbung beziehungsweise PI-Färbung wurden die Anteile apoptotischer und nekrotischer Lymphozyten im Vollblut nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen konzentrierten Zusätzen von NA und NAM ermittelt.

Im Ergebnis ist mit steigender Konzentration des NA-Zusatzes, nach 30-minütiger Inkubationszeit, ein größer werdender Anteil an Annexin-positiv gefärbten Lymphozyten, d.h. apoptotischer Zellen, nachzuweisen

Abbildung 19 und Abbildung 20). Ein ähnlicher Verlauf zeigt sich bei Betrachtung der PI-positiv beziehungsweise der doppelt-positiv (Annexin + PI) gefärbten Lymphozyten (nekrotische Zellen). Auch bei NAM nimmt der Anteil apoptotischer Zellen mit steigender Konzentration zu. Hingegen fallen die Anteile nekrotischer Zellen bei einer Konzentration von 0,25 µg/ml und 4,00 µg/ml NAM am höchsten aus. Der Anteil frühapoptotischer und nekrotischer Zellen liegt beim Vergleich der beiden Niacinformen bei NAM geringfügig höher. Sowohl bei NA als auch bei NAM erweist sich der Anteil apoptotischer Zellen, wie in den

Abbildung 19 und Abbildung 20 ersichtlich, als weitaus größer als der der nekrotischen Zellen.

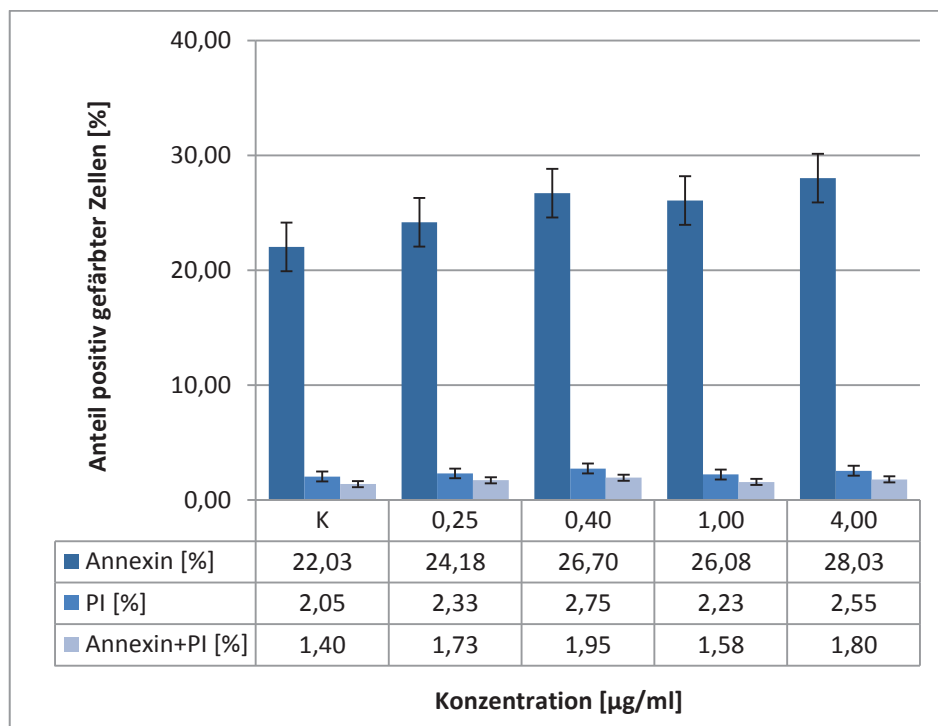


Abbildung 19: Anteil Annexin-, PI-, Annexin+PI-positiv gefärbter Lymphozyten in Abhängigkeit von der Konzentration des Zusatzes an NA nach 30 Minuten Inkubationszeit (N = 2, n = 4; LSM means ± SE)

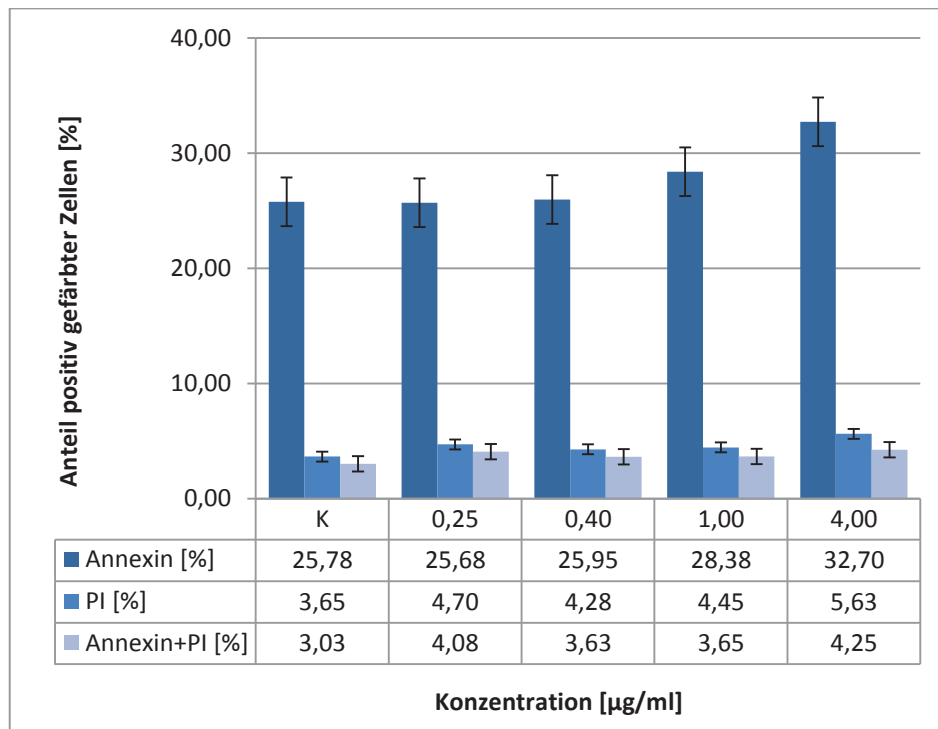


Abbildung 20: Anteil Annexin-, PI-, Annexin+PI-positiv gefärbter Lymphozyten in Abhängigkeit von der Konzentration des Zusatzes an NAM nach 30 Minuten Inkubationszeit (N = 2, n = 4; LSMMeans ± SE)

Nach 180 min Inkubationsdauer steigert sich der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen geringfügig, wobei der dosisabhängige Effekt bei NA weiterhin besteht. Umso höher der NA-Zusatz konzentriert ist, desto größer wird der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen. Bei einer Inkubationszeit von 180 min mit NAM wird dieser Effekt weniger deutlich. Die Werte nekrotischer Zellen liegen bei NAM leicht über den Werten von NA. Die Anteile apoptotischer Lymphozyten erweist sich aber auch hier als weitaus größer gegenüber den Anteilen nekrotischer Zellen.

In den folgenden zwei Abbildungen werden die Anteile Annexin-, PI- und Annexin+PI-positiv gefärbter Lymphozyten in Abhängigkeit von der Konzentration des Niacinzusatzes und einer Inkubationszeit von 180 Minuten zusammengefasst. Abbildung 21 stellt die Werte von NA und Abbildung 22 die Werte von NAM dar.

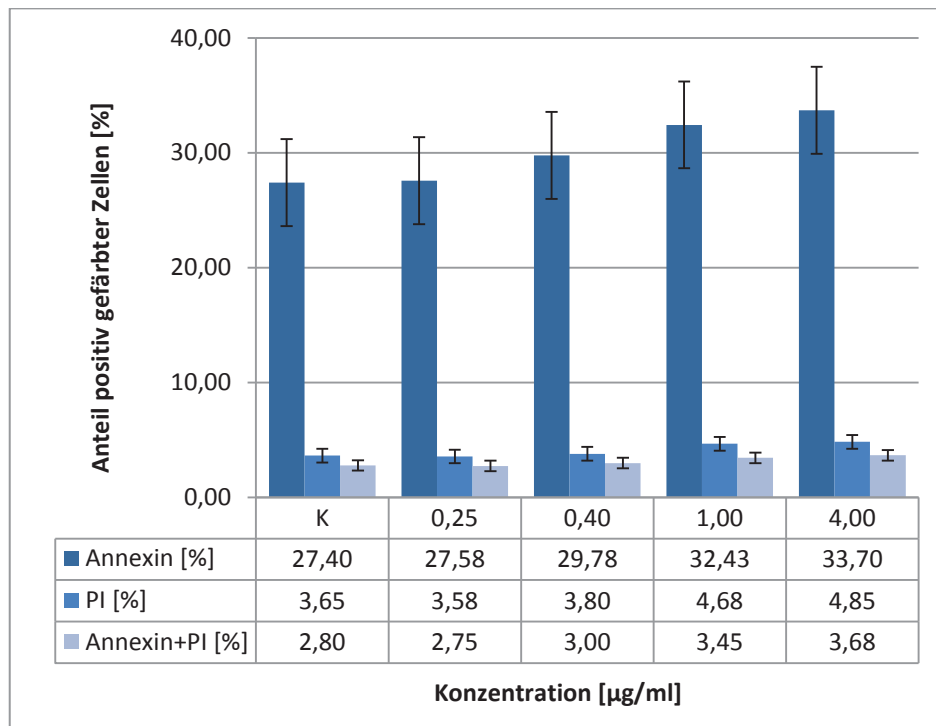


Abbildung 21: Anteil Annexin-, PI-, Annexin+PI-positiv gefärbter Lymphozyten in Abhängigkeit von der Konzentration des Zusatzes an NA nach 180 Minuten Inkubationszeit (N = 2, n = 4, LSMMeans ± SE)

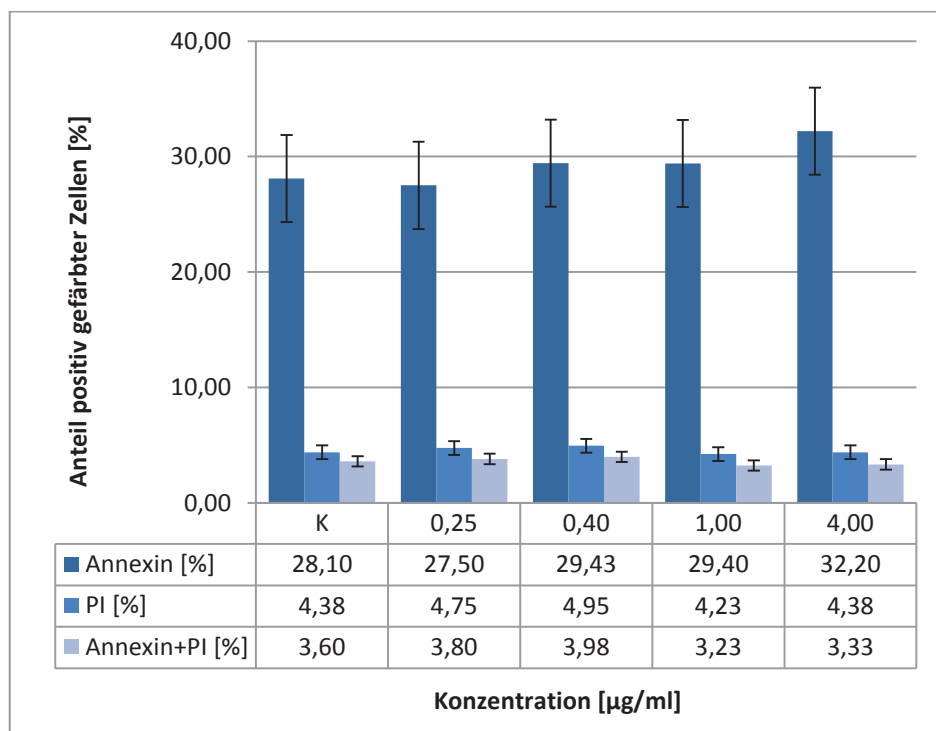


Abbildung 22: Anteil Annexin-, PI-, Annexin+PI-positiv gefärbter Lymphozyten in Abhängigkeit von der Konzentration des Zusatzes an NAM nach 180 Minuten Inkubationszeit (N = 2, n = 4; LSMMeans ± SE)

Die aufgezeigten Differenzen der Anteile apoptotischer und nekrotischer Zellen zwischen den Proben mit unterschiedlicher NA- oder NAM-Konzentration lassen sich weder bei kurzer noch nach längerer Inkubationsdauer statistisch belegen. Gleiches gilt für die Unterschiede zwischen den Niacinformen bei gleicher Konzentration.

#### 4.2.4 Stoffwechselaktivität von PBMC's

Der Stimulationsindex (SI) lässt sich aus dem Quotienten der gemessenen Fluoreszenz der mittels ConA-stimulierten Proben und der gemessenen Fluoreszenz der unstimulierten Proben berechnen und dient als Maß zur Stimulierbarkeit der Stoffwechselaktivität der isolierten PBMC's.

Bei NA kann bei Berücksichtigung aller analysierten Proben eine Spannweite der SI von 4,08-4,87 ermittelt werden. Dabei gibt es geringfügige, aber keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen dem SI der Kontrollproben und dem SI der mit NA versetzten Proben, wobei hier dosisabhängig eine geringfügige Erhöhung der SI zu erkennen ist.

Die Werte des SI bewegen sich in Hinblick auf alle analysierten Proben des NAM in einer Spanne von 3,11 bis 6,31. Bei Betrachtung der mit NAM versetzten Proben ist von der niedrigsten Konzentration bis zu einer Konzentration von 3,00 µg/ml ein leichter dosisabhängiger Anstieg des SI zu erkennen, bevor dieser bei einer Konzentration von 4,00 µg/ml wieder leicht abfällt.

Abbildung 23 spiegelt die SI-Werte in Abhängigkeit von der Konzentration des Niacinzusatzes der mittels AlamarBlue®-Assay analysierten Proben von NA und NAM wieder.

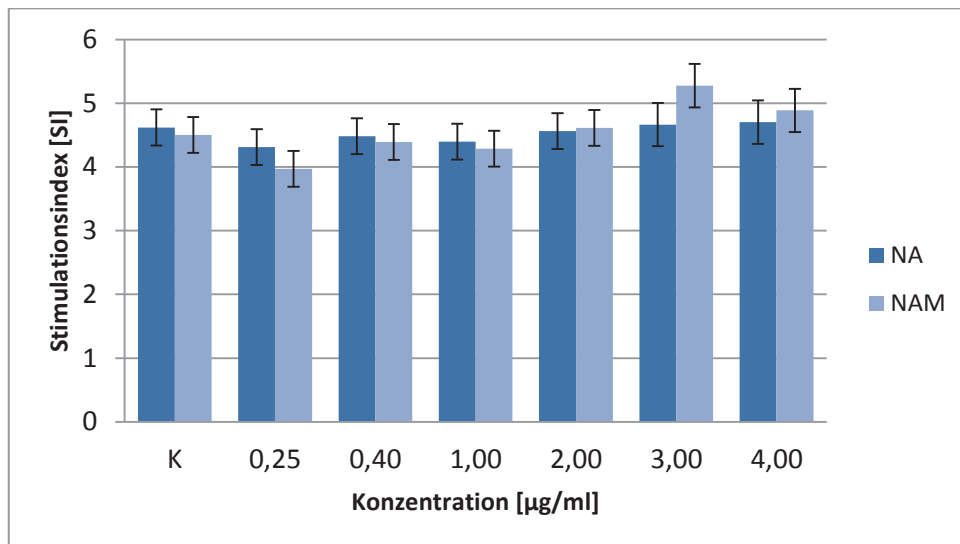


Abbildung 23: Stimulierbarkeit der Stoffwechselaktivität von PBMC's in Abhängigkeit von der Niacinkonzentration (N = 3, n = 15; LSMean  $\pm$  SE)

Trotz leichter dosisabhängiger Effekte, lassen sich keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen Proben mit verschiedenen Niacinkonzentrationen nachweisen. Die Differenzen zwischen den Niacinformen sind ebenfalls nicht signifikant.

#### 4.2.5 Zellproliferation von PBMC's

Die Zellproliferation der isolierten PBMC's eines Tieres wurde beispielhaft über 72 h beobachtet. Als Basis wurden 500000 Zellen ausgesät.

Während bei unstimulierten PBMC's keine Änderung in der Proliferationsfähigkeit zu erkennen ist, kann nach einer Behandlung der Proben mit ConA ein Anstieg der Populationsgröße bis auf das doppelte der Ausgangspopulation festgestellt werden (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25). Dabei führt ConA nach einer kurzen Inkubationszeit von 24 h zunächst zu einer deutlichen Senkung der Populationsgröße. Erst nach 48 h wird die Zellproliferation deutlich gesteigert.

Proben mit einem Zusatz an NA und NAM zeigen einen dem Kontrollniveau ähnlichen Wachstumsverlauf der Zellpopulation. Es ist kein inhibierender oder steigernder Einfluss auf die Zellproliferation der PBMC's durch Niacin erkennbar. Allerdings verringert sich die Populationsgröße im Vergleich zur Ausgangspopulation sowohl bei Zusätzen von NA als auch NAM bei einer Konzentration von 2,00  $\mu\text{g/ml}$  nach 24-stündiger Inkubationszeit deutlich. Im Fall von NA ist ein Rückgang von 32,62 % und bei NAM von 36,85 % zu verzeichnen (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25). Im weiteren Inkubationsverlauf ist jedoch eine dem Kon-

trollniveau ähnliche Zellproliferation zu beobachten. Die stärkste Verringerung der Populationsgröße ist bei dem höchstkonzentrierten Zusatz an NAM festzustellen. Hier zeigt sich nach einer Inkubationszeit von 24 h ein Rückgang von 43,83 % im Vergleich zur Ausgangspopulation. Auch bei dieser Konzentration an NAM ist im weiteren Zeitverlauf keine weitere Beeinträchtigung der Zellproliferation zu beobachten.

In den folgenden Abbildungen werden die Werte der Z2-Zählung zur Entwicklung der Größe der Zellpopulation, nach Zusatz verschieden konzentrierter NA- und NAM-Lösungen sowie nach Zusatz von ConA, in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dargestellt. Die Werte beziehen sich dabei auf das Verhältnis der Zellzahlen zur Ausgangspopulation mit 50000 Zellen. Die Ausgangspopulation ist als 100 %-Marke rot gekennzeichnet.

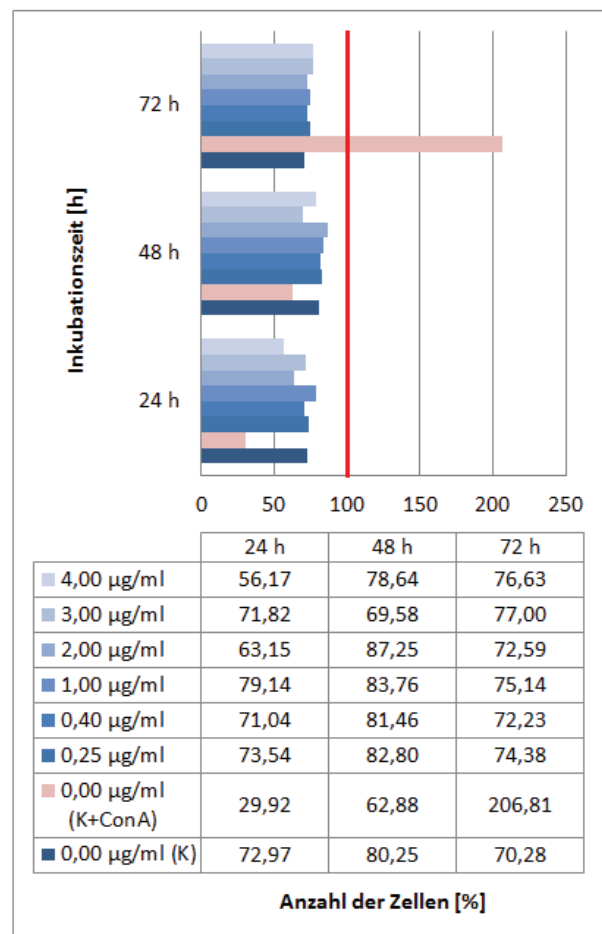
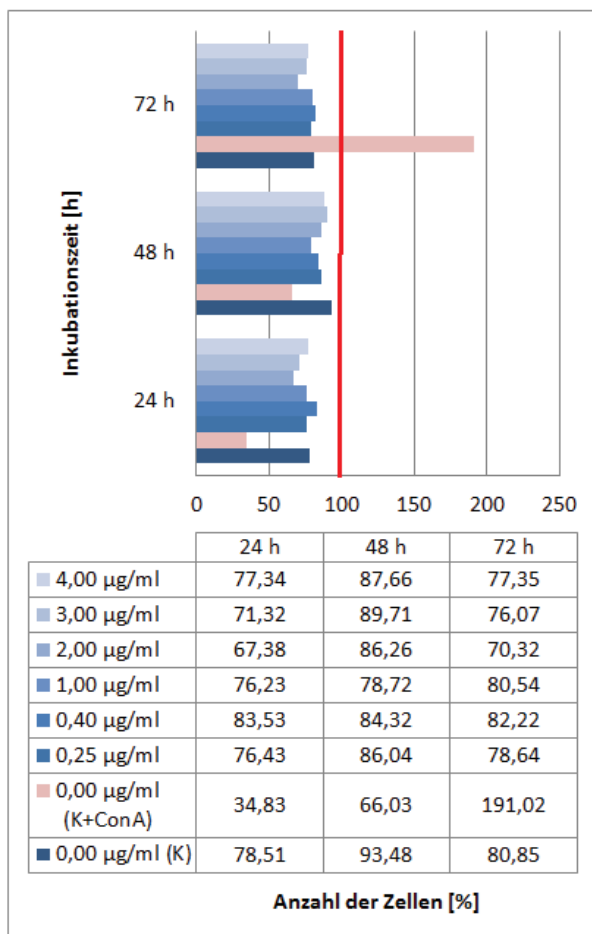


Abbildung 24 (links): Entwicklung der Zellpopulationsgröße im Verhältnis zur Ausgangspopulation in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit verschiedenen konzentrierten Zusätzen von NA (N = 1, n = 2; MW)

Abbildung 25 (rechts): Entwicklung der Zellpopulationsgröße im Verhältnis zur Ausgangspopulation in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit verschiedenen konzentrierten Zusätzen von NAM (N = 1, n = 2; MW)

Signifikanzen ergeben sich aufgrund der geringen Stichprobengröße nicht.



#### 4.2.6 Trypanblaufärbung/ Lebend-Tod-Färbung von PBMC's

Anhand der Trypanblaufärbung kann das Verhältnis der lebenden und toten Zellen nach Behandlung von isolierten PBMC's mit Niacin in Bezug auf die Ausgangspopulation ermittelt werden.

Bei den Kontrollproben können im Mittel zu Beginn der Beobachtungen 86,24 % (Kontrolle NA) beziehungsweise 85,53 % (Kontrolle NAM) der Gesamtpopulation als lebende Zellen sowie 13,76 % (Kontrolle NA) beziehungsweise 14,47 % (Kontrolle NAM) als tote Zellen identifiziert werden. Während die Zahl der lebenden Zellen kontinuierlich im weiteren Zeitverlauf absinkt, steigt die Zahl der toten Zellen proportional an. Zum Ende der Beobachtungen nehmen die lebenden Zellen nur noch einen Anteil von 65,38 % beziehungsweise 70,99 % und die toten Zellen einen Anteil von 34,61 % bis 29,01 % ein. Hingegen hat der Zusatz von ConA eine entgegengesetzte Entwicklung zur Folge. Nach einer Inkubationszeit von 24 h liegt der Anteil an lebenden Zellen im Mittel bei 83,87 % beziehungsweise bei 72,60 %. Der Anteil an toten Zellen beläuft sich auf 16,12 beziehungsweise 27,40 %. Nach 72 Stunden Inkubationsdauer können 92,08 % beziehungsweise 90,12 % der Gesamtpopulation als lebende Zellen eingestuft werden. Nur 7,92 % beziehungsweise 9,88 % der Zellen sind blau gefärbt und somit nicht lebensfähig.

Sämtliche Proben mit einem NA- oder NAM-Zusatz zeigen den Kontrollproben ähnliche Entwicklungen des Verhältnisses zwischen lebenden und toten Zellen. Dabei ist der Anteil an lebenden Zellen zum Ende der Beobachtungen, außer bei einer Konzentration von 0,25 µg/ml NAM, bei allen anderen Zusätzen kleiner als bei den Kontrollproben. Bei NAM können bei der erwähnten Konzentration nach 72 h, 72,37 % als lebende Zellen und 27,63 % als tote Zellen definiert werden. Der niedrigste Anteil lebender Zellen (57,69 %) tritt bei gleichem Inkubationszeitpunkt bei einer Konzentration von 1,00 µg/ml NAM auf. Im Verhältnis zum Kontrollniveau lassen sich bei dieser Konzentration 23,65 % weniger lebende Zellen nachweisen. Bei NA ist dies mit einem Anteil von 41,73 % lebender Zellen bei einer Konzentration von 4,00 µg/ml der Fall. Dieser Anteil liegt 13,30 % unter dem des Kontrollniveaus.

In Abbildung 26 und Abbildung 27 kann die Entwicklung des Verhältnisses lebender und toter Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit einem Zusatz an ConA sowie verschieden konzentrierten Zusätzen an NA und NAM nachvollzogen werden. Die lebenden Zellen werden mit Hilfe einer durchgezogenen Linie gekennzeichnet. Tote Zellen heben sich bei gleicher Konzentration durch eine gestrichelte Linie ab.

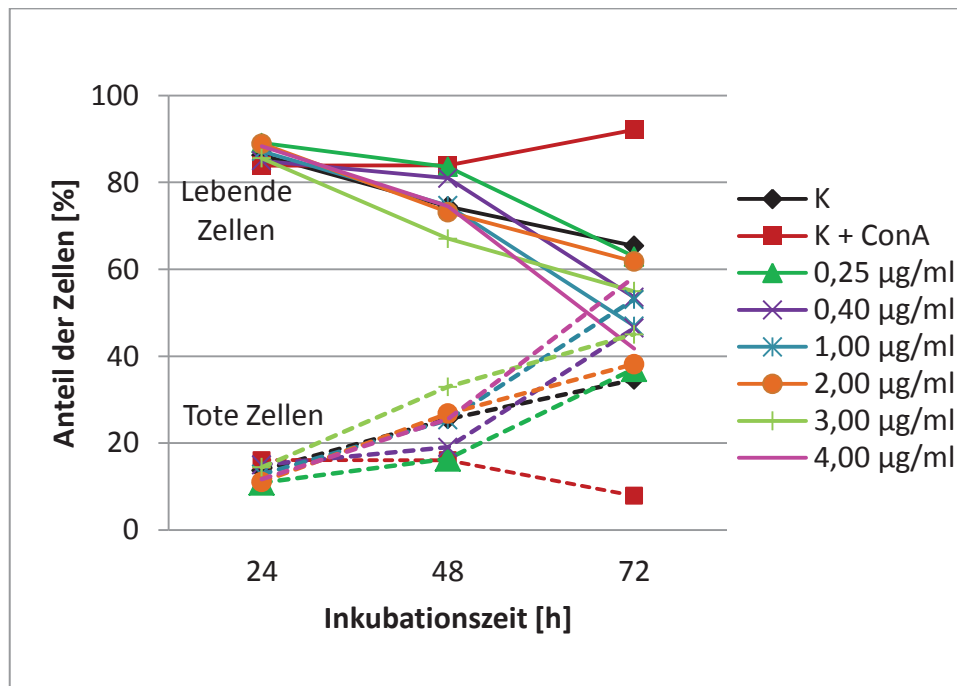


Abbildung 26: Verhältnis lebender und toter Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit verschiedenen konzentrierten Zusätzen an NA (N = 1, n = 2; MW); — : lebende Zellen; - - - : tote Zellen

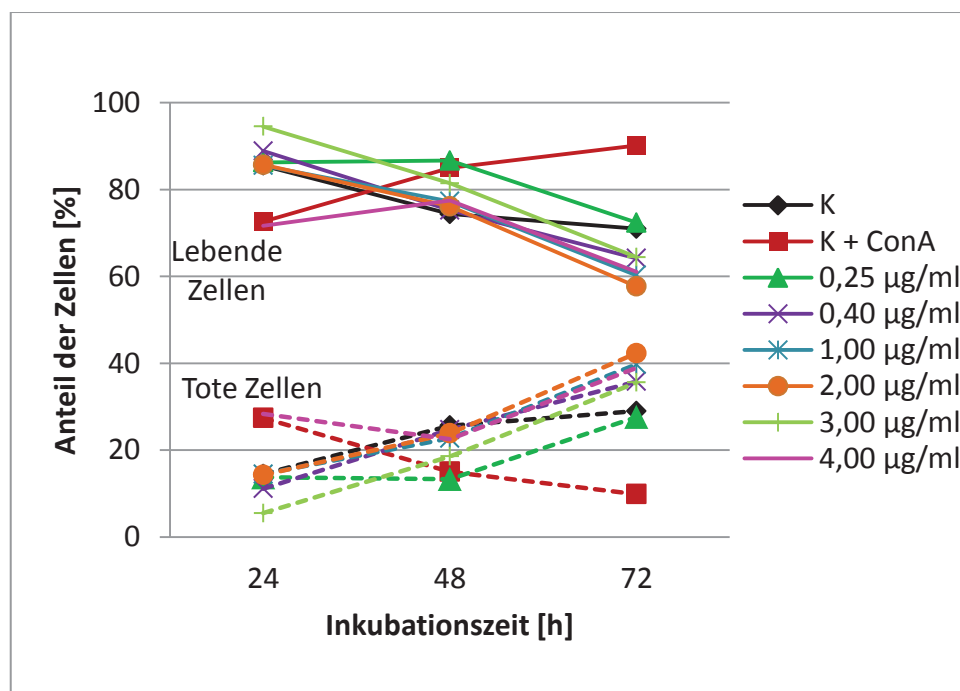


Abbildung 27: Verhältnis lebender und toter Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit verschiedenen konzentrierten Zusätzen an NAM (N = 1, n = 2; MW); — : lebende Zellen; - - - : tote Zellen

Auch hier können aufgrund der niedrigen Stichprobengröße keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

#### 4.2.7 Stickoxidproduktion von PBMC's

Lediglich in ConA stimulierten Proben liegen die Konzentrationen an Stickoxiden oberhalb der Nachweisgrenze. Daher werden nur diese weiter beschrieben.

Im Vergleich zu Proben ohne Niacinzusatz können bei Proben mit NA höhere Konzentrationen an Stickoxiden ermittelt werden (siehe Tabelle 6). Die höchste Konzentration an Stickoxiden ist bei einer NA-Konzentration von 0,25 µg/ml nachweisbar ( $c = 2,47 \mu\text{M} \pm 0,31$ ;  $\text{LSMeans} \pm \text{SE}$ ). Danach ist mit steigender Konzentration eine geringfügige Senkung der Konzentration an Stickoxiden zu vermerken. Proben mit einem Zusatz an NAM weisen Stickoxidkonzentrationen unter denen des Kontrollniveaus auf. Die niedrigste Konzentration an Stickoxiden ( $2,94 \mu\text{M} \pm 0,31$ ) lässt sich bei einer Konzentration von 2,00 µg/ml herausfiltern. Am höchsten fallen die Stickoxidkonzentrationen bei Proben mit NAM-Zusatz von 1,00 µg/ml aus ( $3,36 \mu\text{M} \pm 0,31$ ).

**Tabelle 6: Konzentration von Stickoxiden nach ConA-Stimulation in Abhängigkeit von der Niacinkonzentration (N=2; n=2; K: N=1, n=1;  $\text{LSMeans} \pm \text{SE}$ )**

Konzentration [µg/ml]	Konzentration an Stickoxiden [µM]	
	NA	NAM
0,00 (K)	$2,31 \pm 0,29$	$3,53 \pm 0,29$
0,25	$2,74 \pm 0,31$	$3,28 \pm 0,31$
0,40	$2,59 \pm 0,31$	$3,33 \pm 0,31$
1,00	$2,53 \pm 0,31$	$3,36 \pm 0,31$
2,00	$2,54 \pm 0,31$	$2,94 \pm 0,31$
3,00	$2,48 \pm 0,31$	$3,01 \pm 0,31$
4,00	$2,49 \pm 0,31$	$3,06 \pm 0,31$

Die Differenzen zwischen den Proben mit verschiedenen konzentrierten Zusätzen beider Niacinformen und von diesen zum Kontrollniveau sind nicht von statistischer Relevanz. Ein statistischer Vergleich der Werte beider Niacinformen bei gleicher Konzentration ergibt ebenfalls keine Signifikanzen.

## 5 Diskussion

Mehrere Untersuchungen weisen auf eine Suppression spezifischer Funktionen zellulärer Immunabwehrmechanismen während der Transitperiode von Milchkühen hin (KEHRLI ET AL., 1989A; NONNECKE ET AL., 2003). Insbesondere berichten KEHRLI ET AL. (1989B), DETILLEUX ET AL. (1995) und MEHRZAD ET AL. (2002) von einem erheblichen Verlust der Immunfunktion neutrophiler Granulozyten zur Bildung von ROS kurz vor der Kalbung beziehungsweise zum Zeitpunkt der Kalbung. GILBERT ET AL. (1992) konnten eine Woche a.p. und am Tag der Kalbung im Vergleich zur 3. und 6. Woche p.p. eine geringere Bildung an  $O_2^- \bullet$  nachweisen. CAI ET AL. (1994) beobachteten zudem eine verminderte Aktivität der Myeloperoxidase nach der Kalbung. Allerdings konnte in Studien von KEHRLI ET AL. (1989B) und CAI ET AL. (1994) eine Aufrechterhaltung der Phagozytoseaktivität festgestellt werden.

Die eigenen Untersuchungen weisen eine deutliche Reduzierung der Anzahl ROS-bildender Granulozyten in einem Zeitraum von drei Wochen a.p. bis drei Wochen p.p. auf. Weiterhin zeigt sich anhand der verringerten MFI in diesem Zeitraum eine deutlich geminderte Intensität der ROS-Bildung dieser Granulozyten, mit einem leichten Anstieg der ROS-Bildung nach der Kalbung. Zum Tag 21 p.p. liegen die Werte der MFI deutlich über den Werten zu Versuchsbeginn. Der leichte Anstieg der MFI an den Tagen 3 und 7 p.p., bei reduzierter Anzahl der ROS-bildenden Granulozyten, ist möglicherweise damit zu begründen, dass aufgrund der eingeschränkten Anzahl an ROS-bildenden Granulozyten, die Intensität der ROS-Produktion der aktiven Zellen erhöht werden muss, um dem möglichen Infektionsdruck entgegen zu wirken. Der aufgezeigte Verlauf der Werte der MFI ähnelt stark den Befunden von BERNABUCCI ET AL. (2005), bei denen die Menge von  $H_2O_2$  im Plasma in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zur Kalbung ermittelt wurde. Dessen Ergebnisse wiesen ebenfalls einen dramatischen Abfall der ROS kurz vor der Kalbung und einen Anstieg unmittelbar nach der Kalbung auf.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben einen Hinweis auf eine verminderte Funktionsfähigkeit der Granulozyten von Milchkühen während der Transitperiode. Zusätzlich scheint die Stimulierbarkeit dieser zum oxidativen Burst drei Tage p.p. und eine Woche p.p. eingeschränkt zu sein, da sowohl der Anteil ROS-bildender Zellen und in geringerem Umfang die Intensität der ROS-Produktion derer trotz der Behandlung mit dem NOX-Aktivator TPA im Vergleich zu anderen Versuchstagen vermindert ist. Dieser Unterschied zeigt sich bei Betrachtung der prozentualen Anteile von geringer Ausprägung, scheint jedoch in Hinblick auf die Homogenität der Werte nach diesem Zeitraum von Bedeutung. Die MFI weist deutliche Schwankungen in diesem Zeitraum auf. Die Stimulationsfähigkeit der Intensität der ROS-Bildung bleibt jedoch zunächst erhalten. Auch RINALDI ET AL. (2008) bestätigt eine Inhi-

---

bierung der Stimulierbarkeit der Granulozyten von Milchkühen durch TPA kurz nach der Kalbung im Vergleich zu Tieren in der mittleren Laktation. In diesen Untersuchungen wurde jedoch die extrazelluläre ROS-Bildung erfasst, während die eigens verwendete Methode nur die intrazelluläre ROS-Bildung berücksichtigt. DOSOGNE ET AL. (1999) wiesen unmittelbar vor der Kalbung eine sinkende Stimulierbarkeit zur ROS-Bildung neutrophiler Granulozyten durch TPA anhand von Messungen der luminol-gestützten Chemiluminescence nach. Wobei dieses Verfahren sowohl die intra- als auch extrazelluläre ROS-Bildung in die Messungen einbezieht.

SALGAR ET AL. (1991) wiesen in ihren Untersuchungen auf die große Variation der ROS-Bildung von Granulozyten zwischen verschiedenen Kühen hin. Dies ist auf basalem Niveau auch im vorliegenden Versuch festzustellen. Allerdings fällt auf, dass die Varianzen während der Transitphase deutlich schwächer ausgeprägt sind. Daher ist davon auszugehen, dass die Verringerung der Funktionsfähigkeit der Granulozyten in diesem Zeitraum ein generelles Problem der Milchkühe ist.

Nach HEYNEMAN ET AL. (1990) gibt es tierindividuelle Unterschiede in der Stimulierbarkeit von Granulozyten durch TPA. Dieser Aspekt zeigt sich in Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vor allem in der MFI ROS-bildender Zellen. Der Anteil ROS-bildender Granulozyten unterliegt drei Wochen vor der Kalbung bis zu einer Woche nach der Kalbung ebenfalls tierindividuellen Schwankungen. Davor und danach fallen die Varianzen jedoch deutlich kleiner aus.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es während der Transitperiode zu einer markanten, physiologischen Suppression der ROS-Bildung von Granulozyten kommt. Zudem wird die Stimulierbarkeit der Granulozyten zum oxidativen Burst in gewissem Umfang gehemmt, wobei diese Inhibierung der Stimulierbarkeit tierindividuell schwankt. Als eine mögliche Ursache der Immunsuppression während der Transitperiode geben KEHRLI U. GOFF (1989) die hormonelle Situation der Milchkuh in dieser Phase an, da zur gleichen Zeit die Steigerung des Östrogenspiegels erfolgt. Allerdings wird betont, dass nicht ein einzelnes Hormon zu einer solchen Veränderung führen kann, sondern es zu einem Zusammenspiel vieler Mechanismen in Abhängigkeit der Funktionen des Organsystems der Milchkuh kommt. Daher ist es schwer eine spezifische Ursache dieser Suppression herauszufiltern. So unterliegen die Konzentrationen von Progesteron und Prostaglandinen ebenfalls starken Veränderungen in dieser Zeit (GOFF U. HORST, 1997). Dabei scheint laut GOFF U. HORST (1997) insbesondere Progesteron einen wesentlichen Beitrag zur Immunsuppression zu leisten. Bei erhöhtem Krankheitsgeschehen tritt zudem die immunsuppressive Wirkung von Kortisol weiter in den Vordergrund. Auch diese Autoren weisen auf die unzureichenden Kenntnisse über die genauen Einflussfaktoren hin. Hingegen konnten Fütterungsgeschehen und Hypocalcemia, wie oft vermutet, in einigen Untersuchungen nicht als maßgeblicher Faktor identifiziert werden

(KEHRLI U. GOFF, 1989; GRAUGNARD ET AL., 2007; MOYA ET AL., 2008). NONNECKE ET AL. (2003) führen eine allgemeine Immunsuppression auf das Einsetzen der Laktation zurück, da in ihren Versuchen die immunologische Funktionalität von PBMC's aus dem Blut von Milchkühen nach Durchführung einer Mastektomie auch während der Transitperiode erhalten blieb.

In Hinblick auf die Wirkungsweise der ROS als „Second Messenger“ könnte die beschriebene Inhibierung der Funktionsfähigkeit von Granulozyten mit weitreichenden Folgen verbunden sein. BERNABUCCI ET AL. (2002 und 2005) zeigen neben dem deutlichen Abfall an ROS im Blutplasma einen gleichzeitigen Abfall der antioxidativ wirkenden GSH-PX kurz vor der Kalbung. Nach der Kalbung konnte zudem ein dramatisches Absinken der SOD-Aktivität beobachtet werden, obwohl kurz vor der Kalbung die höchste Expression verzeichnet werden konnte. BOUWSTRA ET AL. (2008) wiesen kurz vor der Kalbung geringere Konzentrationen an Vitamin E im Blut von Milchkühen nach. Auch BRZINSKA-SLEBODZINSKA ET AL. (1994) konnten bis zu sechs Wochen p.p. eine sehr geringe Freisetzung antioxidativer Substanzen im Blut feststellen. GRAUGNARD ET AL. (2012) wiesen sieben Tage p.p. im Vergleich zu 14 Tagen a.p. einen geringeren Anteil der Antioxidantien Vitamin A und E sowie  $\beta$ -Carotin im Blut, bei gleichzeitigem Anstieg des Anteils an  $H_2O_2$ , nach. Kenntnisse über die Aktivität des antioxidativen Systems liegen den eigenen Untersuchungen nicht zugrunde, jedoch könnte nach Einbeziehung der Ergebnisse von BERNABUCCI ET AL. (2005) und GRAUGNARD ET AL. (2012) vermutet werden, dass in Folge der fehlenden Signalwirkung der ROS, die Aktivität des antioxidativen Systems deutlich eingeschränkt ist.

Alles in allem wird in den beschriebenen Untersuchungen ein Ungleichgewicht zwischen oxidativem und antioxidativem System, insbesondere nach der Kalbung, deutlich. Dieser Aspekt kann zu erhöhtem oxidativen Stress führen und zellulären Folgeschäden, die sich bis hin zu Leistungsminderungen sowie weiterem Krankheitsgeschehen auswirken. In Studien von BERNABUCCI ET AL. (2002 und 2005), SORDILLO ET AL. (2007) und BOUWSTRA ET AL. (2008) konnten insbesondere zum Zeitpunkt der Kalbung als auch danach vermehrt Anzeichen für oxidativen Stress nachgewiesen werden.

Aufgrund der großen Bedeutung der ROS bei der unspezifischen Immunabwehr und der potentiellen Funktionsweise als „Second Messenger“, könnte ein Stimulus, der die ROS-Bildung der Granulozyten anregt, speziell in der Transitperiode der Milchkühe, von enormer Bedeutung sein. Unter Umständen gibt Niacin als möglicher Stimulus eine Antwort zum Schutz gegen oxidativen Stress und deren Folgeschäden.

Als Wirkungsform von NAD(H) und NADP(H) tritt Niacin immer mehr in den Vordergrund der Forschung zur Vorbeugung gegen oxidativen Stress und deren weitreichende Konsequenzen. In Anbetracht dessen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Einflüsse von Niacin auf die Funktion neutrophiler Granulozyten untersucht. Hierbei wurde vorwiegend die Bildung der ROS betrachtet. Sowohl NA als auch NAM wurden in die Untersuchungen einbezogen. Um eine Aussage über die direkten Wirkmechanismen des Niacins treffen zu können, wurden die Blutentnahmen möglichst zeitentfernt von der Transitperiode gewählt. Weiterhin wurde der pH-Wert der zu verwendenden Zusätze geprüft. Beide Niacinformen ergeben nach Verdünnung durch NaCl leicht saure pH-Werte. Nach Verdünnungen mit Blut oder Medium ist kein Einfluss steigender Niacinkonzentrationen auf den pH-Wert mehr nachweisbar.

Mit Zugabe von NA und NAM zu den Vollblutproben zeigen sich im Vergleich zu unbehandelten Proben keine Unterschiede zwischen den Anteilen ROS-bildender Granulozyten auf basalem Niveau sowie nach TPA-Stimulation. Auch die MFI TPA-stimulierter, ROS-bildender Zellen unterscheidet sich nicht nach Behandlung dieser mit Niacin. Es wird zudem keine dosis- oder inkubationszeitabhängige Wirkungsweise festgestellt. Hingegen beeinflussen beide Niacinformen dosisabhängig die Intensität der ROS-Bildung aktiver Zellen auf basalem Niveau. Dabei geht eine Erhöhung der Konzentration mit teils signifikanten Steigerungen der Intensität der ROS-Bildung der einzelnen Granulozyten nach 30-minütiger Inkubation einher. Dieser Effekt verdeutlicht sich nach Betrachtung der Ergebnisse einer längeren Inkubationszeit von bis zu 3 Stunden. Geringfügige, aber nicht signifikante Unterschiede ergeben sich zwischen NA und NAM bei Betrachtung gleicher Konzentrationen.

Es wurde des Öfteren berichtet, dass Niacin die Anzeichen von oxidativem Stress mindert (ARUN ET AL., 1999; GHAZI-KHANSARI ET AL., 2005; VARELLA ET AL., 2006). Die Wirkmechanismen dafür sind jedoch weitgehend unbekannt. Zusätzlich sind Defizite an Niacin mit erhöhten oxidativen Schäden in Verbindung zu bringen (TANG ET AL., 2008). In früheren Studien wurden oftmals nur Endprodukte des oxidativen Stresses analysiert und anhand der Reduktion von Folgeschäden oder Nebenprodukten auf die potentielle antioxidative Wirkung des Niacins geschlossen. Laut LEDOUX ET AL. (1988) ist die Reduktion von DNA-Einzelstrangbrüchen nach NAM-Behandlungen von Zellen mit der Fähigkeit ROS abzufangen zu erklären. ARUN ET AL. (1999) vermutet das die Mechanismen für die antioxidative Wirkung in der Fähigkeit roter Blutzellen NADH aus zugesetztem NA zu synthetisieren, liegt. NADH ist in der Lage, GSH zu reduzieren. Diese reduzierte Form ist ein wichtiges Antioxidans und an der Regeneration von Vitamin E beteiligt. Auch KLAIMAN ET AL. (1996) bringen die Förderung der Zellgesundheit mit einer Steigerung der  $\text{NAD}^+$ -Konzentration in Verbin-

dung. Bei Betrachtung der eigens gewonnenen Ergebnisse zur ROS-Bildung von Granulozyten kann ein weiterer möglicher Mechanismus diskutiert werden.

In der vorliegenden Arbeit führt Niacin ab einer Dosierung von 0,40 µg/ml (30 min Inkubationszeit) beziehungsweise 1,00 µg/ml (180 min Inkubationsdauer) zu einer Steigerung der Intensität der ROS-Bildung von Granulozyten aus basalem Niveau. Die ROS könnten als Signalmoleküle für das antioxidative System fungieren. Vermutlich könnte daher das Induzieren der ROS-Bildung durch Niacin im frühen Stadium der Inflammation der Anregung des anti-oxidativen Systems dienen, um bei stärkerer Stimulation der Immunabwehr vor oxidativen Stress zu schützen. Diese Hypothese stellten auch schon CROWLY ET AL. (2000) auf, da trotz höheren ROS-Werten bei Jurkat-Zelllinien eine Verminderung von, durch oxidativen Stress stimulierten Proteinen nachgewiesen wurde.

WEITBERG (1989) stellte bei Patienten, nach achtwöchiger Niacin-Supplementation und einer darauffolgenden Behandlung der isolierten Lymphozyten mit ROS, deutlich weniger DNA-Einzelstrangbrüche fest. MUKHERJEE ET AL. (1997) konnten bei Zellen von Mäusen, denen einen Tag vor den Zellanalysen NAM injiziert wurde, eine bessere Neutralisation von ROS aufzeigen und daraus resultierend geringere DNA-Einzelstrangbrüche. Diese Studien könnten die Annahme einer protektiven Wirkung des Niacins gegen oxidativen Stress unterstützen. BENAVENTE U. JACOBSON (2008) wies bei Defiziten an NAM eine erhöhte ROS-Bildung bei Analysen von Keratinozyten (hornbildenden Zellen) und in der Konsequenz mehr DNA-Schädigungen nach. Eine Erklärung könnte in diesem Fall die fehlende Signalwirkung sein und daraus resultierend eine ungenügende Stimulation des antioxidativen Systems, die zu oxidativem Stress und in der Konsequenz zu DNA-Schäden führt.

TONG ET AL. (2012) ermittelte unter Behandlung von humanen Herzmuskelzellen mit NAM entgegen den vorliegenden Untersuchungen ein Absinken von ROS, wobei die Vergleichbarkeit zum eigenen Versuch aufgrund unterschiedlicher Zellpopulationen stark eingeschränkt ist. Allerdings kommen auch er und seine Kollegen zu dem Schluss, dass Niacin zur Anregung des antioxidativen Systems führt. Die gegensätzlichen Ergebnisse zu den eigenen Daten könnten vor allem, neben den unterschiedlichen Zellpopulationen und teilweise höheren Konzentrationen, an der deutlich längeren Inkubationsdauer liegen. Möglicherweise hätte eine längere Inkubation der Zellen mit Niacin im vorliegenden Versuch ähnliche Ergebnisse hervorgebracht. Auch dies könnte ein Indiz dafür sein, dass Niacin durch die Steigerung der Intensität der ROS-Bildung zu einer Aktivierung des antioxidativen Systems führt und zu späteren Zeitpunkten eine protektive Wirkung gegen oxidativen Stress hervorruft. Bei der Wahl einer längeren Inkubationsdauer könnte es jedoch zu vermehrtem Zellsterben und einer Abschwächung der Granulozytenfunktion kommen.



---

Sowohl NA als auch NAM scheinen gleichwertige Stimulationsfähigkeiten auf die ROS-Bildung zu besitzen. Besonders positiv könnte sich dieser Aspekt auf die Transitperiode von Milchkühen auswirken. Eine Steigerung der Anteile von ROS-bildenden Granulozyten konnte zwar nicht durch Niacin bewirkt werden, jedoch kann die Intensität der ROS-Produktion aktiver Granulozyten durch diese Vitaminverbindung gesteigert werden. Da eine Stimulierbarkeit von mehr Granulozyten zum oxidativen Burst kurz nach der Kalbung eingeschränkt zu sein scheint, bietet die Anregung der Intensität aktiver Zellen unter Umständen eine günstigere Voraussetzung zur Verbesserung des Immunstatus der Milchkühe.

In mehreren Studien wurden durch die Fütterung von Milchkühen mit Niacin Hinweise auf eine stoffwechselstabilisierende und teilweise leistungssteigernde Wirkung dieses Vitamins gefunden (FRONK U. SCHULTZ, 1979; KUNG ET AL., 1980; RIDDEL ET AL., 1981; DUFVA ET AL., 1983; BRENT U. BARTLEY, 1984; HORNER ET AL., 1986; MÜLLER ET AL., 1986; RUEGSEGGER U. SCHULTZ, 1986; FÜRLL U. SCHÄFER, 1991; ZIMMERMAN ET AL., 1992; BAUMGARTNER U. BLUM, 1993; BELIBASAKIS U. TSIRGOGIANNI, 1996; EL-BARODY ET AL., 2001; PIRES U. GRUMMER, 2007; GHORBANI ET AL., 2008; NIEHOFF ET AL., 2009B; MOREY ET AL., 2011; YUAN ET AL., 2012). Möglicherweise sind diese darauf zurückzuführen, dass Niacin aufgrund der Anregung des antioxidativen Systems den Folgeschäden von oxidativem Stress, die wie beschrieben bis hin zu Änderungen im Stoffwechselgeschehen und Leistungseinbußen reichen, vorbeugt. FLACHOWSKY (1991) und EL-BARODY ET AL. (2001) konnten mittels Niacinsupplementation die Fruchtbarkeitsleistung von Milchkühen steigern. Auch dieser positive Effekt könnte auf die protektive Wirkung des Niacins vor oxidativem Stress zurückzuführen sein. Zur Absicherung dieser Ergebnisse müssen jedoch weitere Untersuchungen folgen, die insbesondere neben dem oxidativen, auch das antioxidative System näher betrachten.

Die Inhibierung der NOX durch DPI führt in den Substanzkontrollen zur Aufhebung der TPA-Wirkung. Da die Ergebnisse der Negativkontrollen dem basalem Niveau der DPI und TPA unbehandelten Proben entsprechen, ist davon auszugehen, dass es sich bei den basal nachgewiesenen ROS um NOX unabhängige oxidative Spezies handelt.

Die vorliegende Studie untersucht zudem die Wirkung des Niacins auf die Apoptose von Lymphozyten. Die Ergebnisse zeigen nach beiden Inkubationszeitpunkten und bei beiden Niacinformen eine dosisabhängige Steigerung der Apoptose, die jedoch nicht statistisch abzusichern ist. Die höheren Anteile apoptotischer Zellen zum zweiten Inkubationszeitpunkt sind wahrscheinlich auf das natürliche Apoptoseverhalten der Zellen aufgrund der Versuchsbedingungen zurückzuführen.

In früheren Studien wurde eine dosisabhängige Apoptoseinduktion durch Niacin an anderen Zelllinien bereits nachgewiesen (AUDRITO ET AL., 2011; FERNANDES ET AL., 2011). Auch OGATA ET AL. (2000) konnten unter Verwendung verschiedener Niacinverbindungen eine apoptoseinduzierende Wirkung dieser bei Tumorzellen ermitteln. In normalen Lymphozyten war dies jedoch nicht der Fall. Gründe dafür können hier nicht genannt werden. Die Vergleichbarkeit zum vorliegenden Versuch ist nur begrenzt gegeben, da andere Niacinverbindungen genutzt wurden. Weiterhin ist erwiesen, dass ROS in der Lage sind, Apoptose in Zellen zu induzieren (WHITE ET AL., 1993; BUTTKE U. SANDSTROM, 1994; TAKAHASHI ET AL., 2004). VAN OOSTVELDT (1999) beschreibt in seinen Studien, dass eine Steigerung der Apoptose durch Anregung des oxidativen Bursts von bovinen, neutrophilen Granulozyten mittels Natriumarsenit, hervorgerufen wird.

Als Ursache für die in den eigenen Untersuchungen nachgewiesene dosisabhängige Steigerung der Anteile apoptotischer Zellen durch Niacin könnte ebenfalls die intensivierete ROS-Bildung der Granulozyten angenommen werden. Die Apoptoserate wurde zwar an Lymphozyten untersucht, da diese jedoch im Vollblut während der Inkubation nicht von den Granulozyten isoliert waren, ist die steigende Intensität der ROS-Bildung als Einflussfaktor denkbar. Auch OGATA ET AL. (2000) nehmen an, dass Niacinverbindungen unter Aktivierung der ROS-Bildung Apoptose induzieren. FERNANDES ET AL. (2011) stellten die Hypothese auf, dass eine NAM-abhängig gesteigerte Apoptoserate eine schnellere Auflösung des Inflammationsgeschehens fördert. Diese Vermutung wird nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gestützt, da der Apoptose eine Schlüsselfunktion bei der Abschaltung und Hemmung der Immunantwort zukommt. YUAN ET AL. (2012) konnte mittels Niacinsupplementation bei Milchkühen eine Senkung der somatischen Zellzahl feststellen. Dieser Aspekt könnte eine Bestätigung der anti-inflammatorischen Wirkung dieser Vitaminverbindung sein.

Nach NAM-Restriktion wiesen BENAVENTE U. JACOBSON (2008) höhere Zahlen apoptotischer Zellen (humane Keratinozyten) nach. Auch dies könnte auf die fehlende Stimulation des antioxidativen Systems und mangelnde Schutzmechanismen der Zelle vor ROS zurückzuführen sein. Die gleiche Erklärung könnte für die Ergebnisse von MUKHERJEE ET AL. (1997) zutreffen. In dessen Untersuchungen zeigten sich bei Mäusen, die 13 Stunden vor der Analyse mit Niacin behandelt wurden, im Gegensatz zu unbehandelten Tieren keine apoptotischen Nervenzellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen keine signifikanten Einflüsse von Niacin auf die Anzahl nekrotischer Zellen. Dabei weist NAM gegenüber NA geringfügig höhere Anteile nekrotischer Zellen auf. Die geringen Anteile nekrotischer Zellen nach Zugabe von NA und NAM sprechen für eine nicht toxische Wirkungsweise beider Niacinformen in den gewählten Konzentrationen. Nach KRAMMER (1996) fördern zu hohe Dosen an ROS eine vermehrte

---

Induktion von Nekrose bei Zellen (KRAMMER, 1996). Daher ist die Steigerung der Intensität der ROS durch die Granulozyten aufgrund der nicht letalen Wirkungsweise deutlich positiv zu beurteilen und unterstützt die Vermutung des Signalcharakters. Auch CROWLY ET AL. (2000) geben an, dass die Steigerung der ROS-Bildung subletale Folgen für die Zellen hat, die diese durch Anpassungsreaktionen gut tolerieren.

TONG ET AL. (2012) stellten im Gegensatz zu den in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnissen eine sinkende Anzahl apoptotischer und nekrotischer, humaner Herzmuskelzellen nach einer Behandlung mit NAM fest. Die Ursache könnte in der deutlich längeren Inkubationsdauer von 6 beziehungsweise 16 h liegen. TONG ET AL. (2012) vermuten hinter dem positiven Effekt auf die Überlebensrate der Zellen die Steigerung antioxidativer Enzyme durch NAM. Ähnliches stellten HOORENS U. PIPELEERS (1999) an Beta-Zellen von Menschen und Ratten nach einer Inkubationsdauer von mehreren Tagen fest. Sie geben sogar eine protektive Wirkung gegen durch ROS-induzierte Nekrose an. CROWLY ET AL. (2000) zeigten ebenfalls reduzierte Apoptoseraten bei Jurkat-Zellen unter Behandlung mit NA und NAM. Inkubationszeiten sind hier jedoch unbekannt. In weiterführenden Untersuchungen sollte eine längere Inkubationsdauer getestet werden. Sollten sich dann die Ergebnisse mit denen von TONG ET AL (2012) decken, könnte dies eine weitere Bestätigung für die Hypothese bedeuten, dass die Steigerung der Intensität der ROS-Bildung eine Aktivierung des antioxidativen Systems bewirkt.

Zur Untersuchung möglicher zellschädigender Einflüsse von Niacin wurde, neben der Analyse apoptotischer und nekrotischer Lymphozyten, die Stoffwechselaktivität, Zellproliferation und Bildung von Stickoxiden nach Behandlung von PBMC's mit NA und NAM untersucht.

In Hinblick auf die Stoffwechselaktivität belaufen sich die SI aller Proben auf etwa ähnlichem Niveau. Eine Inhibierung oder deutliche Steigerung der Stoffwechselaktivität kann mit Zusatz von Niacin nicht erzielt werden. Frühere Untersuchungen zu diesem Aspekt sind nicht bekannt.

Die Zellproliferation erfolgte sowohl durch Analysen mittels Trypanblaufärbung als auch durch Auszählungen mittels Z2-Zähler. Beim Vergleich beider Methoden ergeben sich in den Aussagen zu den gezählten Zellen kleine Unterschiede. Dies liegt vor allem in der Zählmethode. Erstere unterscheidet klar die lebenden von den toten Zellen, so dass eindeutig die Entwicklung der Zellpopulation aufgezeigt werden kann. Die manuelle Auszählung der Zellen birgt jedoch erhöhtes Fehlerpotential und eine geringere Vergleichbarkeit. Der Z2-Zähler kann hingegen nur den Anteil der zuvor nach Volumen definierten Zellen in einer Suspension angeben. Die lebenden und toten Zellen können nicht klar differenziert werden. Analysen des Z2-Zählers basieren auf den Unterschieden in der Größe der lebenden Zellen im Ver-

gleich zu den toten Zellen. Das System ist eine sichere Methode der Auszählung, gibt jedoch nur eine quantitative Auskunft über Wachstum oder Rückgang einer Zellpopulation an. Daher ist es sinnvoll beide Methoden zu verwenden, um gezielte quantitative und qualitative Aussagen über die Zellproliferation treffen zu können. Im Ergebnis ergeben sich nach Behandlung der PBMC's mit NA und NAM keine signifikanten Veränderungen der Proliferationsfähigkeit im Vergleich zu unbehandelten Populationen anhand beider Analysemethoden. Es kommt lediglich zu einer geringfügigen Abnahme der Gesamtzellzahl. Es ist jedoch anzumerken, dass dieses Ergebnis auf die geringe Stichprobenanzahl zurückzuführen ist. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen CROWLY ET AL. (2000), wobei die Vergleichbarkeit dieser aufgrund der verschiedenen verwendeten Zelllinien eingeschränkt ist. AUDRITO ET AL. (2011) konnten lediglich eine Inhibierung der Proliferationsfähigkeit von menschlichen Leukämiezellen ermitteln. In einfachen B-Lymphozyten ergab sich ähnlich den eigens gewonnenen Ergebnissen nur eine leichte Schwächung der Proliferationsfähigkeit. Bei Untersuchungen von BENAVENTE U. JACOBSON (2008) traten deutliche Verminderungen des Wachstums von Keratinozyten nach NAM-Restriktion auf. Nach Zusatz von NAM konnten wieder Proliferationsraten auf Kontrollniveau verzeichnet werden. Eine Erklärung könnte ebenfalls, wie zuvor schon diskutiert, oxidativer Stress aufgrund der fehlenden Aktivität des antioxidativen Systems und den als Konsequenz folgenden DNA-Schäden, sein.

Eine vermehrte Stimulierung oder Inhibierung der Produktion von Stickoxiden durch die Monozyten beziehungsweise Makrophagen, die auf immunologischer und zentralnervöser Ebene von deutlichem Signalcharakter zeugen, wurde ebenfalls nicht beobachtet. Zudem können lediglich nach ConA-Zusatz Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze gemessen werden. ConA gilt als Stressor für die Zellen und kann daher die Stickoxidproduktion der Monozyten und Makrophagen anregen. Die deutlichen Unterschiede der Kontrollproben von NA und NAM sind darauf zurückzuführen, dass aus versuchsbedingten Gründen nur die Messung eines Tieres bei diesen Proben vorliegt. Aufgrund der geringen Stichprobengröße ist in diesem Fall keine statistische Relevanz zu verzeichnen.

Im Gesamtergebnis zeigen sich sowohl bei NA als auch bei NAM keine Hinweise auf markante Einflüsse der Vitaminverbindungen auf die Stoffwechselaktivität, Proliferationsfähigkeit oder Stickoxidproduktion von PBMC's.

## 6 Schlussfolgerung

Niacin steigert die Intensität der ROS-Bildung in Granulozyten. Es wird vermutet, dass ROS als „Second Messenger“ zur Aktivierung des antioxidativen Systems beitragen. In einem frühen Stadium der Inflammation kann dies als prophylaktischer Schutz vor oxidativem Stress und deren Folgeschäden bei erhöhter Reaktion der Immunabwehr wirken. Die Steigerung der Apoptoserate ist möglicherweise auf die erhöhte Intensität der ROS-Bildung der Granulozyten zurückzuführen. Sie dient vermutlich der schnelleren Auflösung einer Inflammation. Andererseits kann durch die Steigerung der ROS-Bildung und der daraus folgenden Stimulation des antioxidativen Systems zu späteren Zeitpunkten, durch den Schutz vor Folgeschäden des oxidativen Stresses, die Überlebensrate der Zellen gesteigert werden.

Die beschriebenen Wirkungen des Niacins könnten sich besonders positiv auf die Transitphase von Milchkühen auswirken. Die Ergebnisse belegen einen deutlichen Verlust der ROS-Bildung von Granulozyten in diesem Zeitraum, wobei die Stimulierbarkeit dieser weitestgehend erhalten bleibt. Die Alteration der ROS-Bildung in Granulozyten in dieser Phase könnte im Zusammenhang mit der erhöhten Anfälligkeit der Tiere für oxidativen Stress und dessen weitreichende Folgeschäden stehen. Die in der Literatur häufig aufgedeckten stoffwechselstabilisierenden und teilweise leistungssteigernden Effekte des Niacins sind möglicherweise auf die protektive Wirkung gegen oxidativen Stress dieses Vitamins zurückzuführen. Dabei scheinen sowohl NA als auch NAM gleichwertige stimulierende Funktionen auf die Granulozyten auszuüben. Es können in den gewählten Konzentrationen keine toxischen Eigenschaften der beiden Niacinformen nachgewiesen werden, so dass die Reaktion der Zellen nicht durch diesen Aspekt beeinflusst scheint.

Es mangelt derzeit an vergleichbaren Studien zur Untersuchung von Niacin auf die immunologischen Parameter von Milchkühen. Lediglich auf dem Gebiet der Humanmedizin wurde die Wirkung dieser Vitaminverbindung an verschiedenen Zelllinien diskutiert. Die vorliegende Arbeit gibt einige Hinweise auf die möglichen Effekte von Niacin auf die Funktionalität von bovinen Granulozyten. Aufgrund noch vieler unbekannter Parameter können jedoch nur hypothetische Aussagen über die Folgen für den Immunstatus von Milchkühen getätigt werden. Um die Vermutungen zu konkretisieren bedarf es weiteren Untersuchungen, die insbesondere neben dem oxidativen System auch das antioxidative System erforschen. Die Relevanz der *In-vitro*-Befunde für eine mögliche Stabilisierung der Milchkuh während der Transitperiode durch Niacinsupplementationen ist dann in entsprechenden Fütterungsversuchen weiter zu prüfen.

## 7 Zusammenfassung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind ein Nebenprodukt zahlreicher Stoffwechselfvorgänge des tierischen Organismus. Aufgrund ihrer antimikrobiellen Wirkung gelten sie als ein essentielles Instrument der unspezifischen Immunabwehr. Das antioxidative System bildet den direkten Gegenpart der ROS und dient der Regulierung ihrer Produktion. Ein Ungleichgewicht zwischen oxidativem und antioxidativem System führt aufgrund der hohen Reaktivität der ROS zu Kettenreaktionen ihrer Bildung. Die Folge ist oxidativer Stress, der die Zellen durch Peroxidation von Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten, DNA und anderen Makromolekülen massiv schädigt. Für den Organismus hat dies erhebliche Konsequenzen, die neben erhöhtem Krankheitsgeschehen mit Leistungseinbußen und Fruchtbarkeitsstörungen einhergehen.

Es ist erwiesen, dass insbesondere die Transitperiode von Milchkühen ein erhöhtes Risiko für oxidativen Stress birgt. Einige Studien belegen eine eingeschränkte Funktionsfähigkeit des antioxidativen Systems in dieser Phase. Die Ursache dafür ist weitgehend unbekannt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die Aktivität des oxidativen Systems anhand der Funktionsfähigkeit von Granulozyten durch die durchflusszytometrische Messung der Bildung von ROS boviner Granulozyten in Augenschein genommen. Nach Auswertung der Daten zeigt sich am dramatischen Abfall der Anzahl ROS-bildender Granulozyten sowie der Intensität der ROS-Produktion aktiver Granulozyten, drei Wochen a.p. und drei Wochen p.p., eine deutliche Schwächung der Funktionsfähigkeit dieser Zellen. Wobei jedoch die Stimulierbarkeit weitgehend erhalten bleibt. In Hinblick auf die oft angedeutete stimulierende Wirkung der ROS auf das antioxidative System, ist anzunehmen, dass die fehlende Signalfunktion derer in der Transitperiode, zu einer verminderten Aktivität des antioxidativen System beiträgt und in der Konsequenz zum vermehrten Auftreten von oxidativem Stress. In Anbetracht dessen, könnte ein möglicher Stimulus, der eine höhere Aktivität der ROS-Bildung fördert, oxidativem Stress entgegenwirken.

Vielfach wurde das antioxidative Potential von Niacin diskutiert und oft auch anhand der Fähigkeit zur Minderung zellulärer Folgeschäden von oxidativem Stress bestätigt. Die grundlegenden Wirkmechanismen konnten bislang nicht aufgedeckt werden. Anhand von *in-vitro*-Versuchen wurde daher versucht einige Hinweise darauf zu finden.

Im Ergebnis zeigt sich die Fähigkeit des Niacins die Intensität der ROS-Bildung von Granulozyten teils signifikant dosisabhängig zu steigern. Dabei können Nicotinsäure und Nicotinamid als gleichwertige Stimulatoren angesehen werden. Weiterhin zeigt sich eine leichte dosisabhängige Steigerung der Apoptoserate von Lymphozyten nach Behandlung mit Niacin,

die wahrscheinlich mit der intensivierten ROS-Bildung in Verbindung zu bringen ist. Die intensivierte ROS-Bildung bleibt ohne letale Folgen für die Zellen. Die Stoffwechselaktivität, Proliferation und Stickoxidbildung nach Inkubation von PBMC's mit Nicotinsäure und Nicotinamid wird bis zu einer Konzentration von 4,00 µg/ml nicht merklich beeinflusst.

Die gesteigerte Intensität der ROS-Bildung durch Niacin könnte durch Stimulation des antioxidativen Systems eine protektive Wirkung gegen oxidativen Stress hervorrufen. Stoffwechselstabilisierende und teilweise leistungssteigernde Effekte, die in der Literatur oftmals nach Niacinsupplementationen bei Milchkühen beschrieben werden, sind unter Umständen auf diesen Wirkmechanismus zurückzuführen. Weiterhin begünstigt Niacin womöglich durch die ROS-induzierte, gesteigerte Apoptoserate eine schnellere Auflösung des Inflammationsgeschehens.

Zusammenfassend ist zu vermuten, dass eine Niacinsupplementierung bei Milchkühen einen prophylaktischen Schutz vor oxidativem Stress und deren weitreichende Konsequenzen bieten kann. Zudem ist eine anti-inflammatorische Wirkung dieser Vitaminverbindung denkbar. Fehlende, vergleichbare Studien zur Wirkung von Niacin auf den Immunstatus von Milchkühen lassen jedoch nur hypothetische Aussagen zu. Diese Studie gilt als Vorversuch zur Gewinnung grundlegender Kenntnisse über die Wirkmechanismen von Niacin auf die zellulären Immunabwehrmechanismen von Milchkühen. Zur Konkretisierung bedarf es weiterer *in-vitro* und *in-vivo* Versuche.

## 8 Summary

Reactive oxygen species (ROS) are byproducts of numerous metabolic processes of animal organism. In course of their antimicrobial effect they are considered as essential instruments of the unspecific immune defense. The antioxidant system functions as the counterpart of ROS and regulates their production. An imbalance between oxidative and antioxidant system leads to chain reaction of ROS formation because of their high reactivity. This disparity results in oxidative stress, which damages cells by peroxidation of proteins, lipids, carbohydrates, DNA and other macromolecules. Consequences for the animal organism extend to an increased susceptibility to infectious and metabolic diseases, it is associated with a drop in performance and fertility disorders.

It has been proven that dairy cows are affected by oxidative stress especially during transition period. Restrictions of the antioxidant system in this stage are evidenced by previous studies with the reason being unknown so far. Therefore, the activity of the oxidative system was focused by flow cytometric methods to characterize the ability of bovine granulocytes ability to form ROS. Data show dramatic drops in counts of granulocytes which form ROS and in intensity of the ROS production of these active cells over a span of three weeks a.p. and three weeks p.p.. This indicates an obvious suppression of functionality of these cells. While the stimulation capability remains. Often it is suggested, that ROS stimulate the antioxidant system. Therefore it is likely, that the loss of ROS-signal contributes to reduced activity of the antioxidant system and in consequence to excessive oxidative stress. In view of this, a potential stimulus which promotes a higher activity of ROS-production could counteract to oxidative stress.

The possible antioxidant function of niacin was discussed many times and could be confirmed by its ability to reduce cellular damage in response to oxidative stress. However, the fundamental mechanisms behind these effects are still largely unknown. Therefore in-vitro dose-response studies were performed for better understanding of the mode of action of niacin.

The results prove the ability of niacin to enhance the intensity of ROS-production by granulocytes in a partial significant dose-dependent manner. Regarding to the niacin form both nicotinic acid and nicotinamide can be regarded as similarly effective. Additionally data reveal a slight dose-dependent increase in the number of apoptotic cells after treatment of lymphocytes with niacin. This increase was possibly associated with the enhanced intensity of ROS-production. The elevated release of ROS remains without lethal consequences for cells. PBMC's, which were treated with nicotinic acid or nicotinamide, showed no remarkable al-



terations in metabolic activity, proliferation and nitric oxide production, up to a concentration of 4,00 µg/ml.

The elevated intensity of ROS-production by niacin could evoke a protective effect against oxidative stress because of stimulation of the antioxidant system. Perhaps the associated stabilization of the metabolism might improve performance, which was detected in previous studies after niacin supplementation of dairy cattle rations. Furthermore, niacin could promote the resolution of inflammation by ROS induced apoptosis.

In conclusion it can be assumed, that niacinsupplementation of dairy cattle can be offer a prophylactic protection against oxidative stress and its consequences. Furthermore an anti-inflammatory effect of this vitamin compound is also conceivable. A lack of comparable studies, about the influence of niacin on immunological status of dairy cows allows only hypothetical statements presently. This study has to be regarded as a preliminary experiment about the functional mechanism of niacin in immunological cellular defense. Further studies are needed to substantiate the current findings and hypotheses.

## 9 Literaturverzeichnis

AMSELGRUBER, W. M. (2004): Infektionsabwehrsysteme, Immunität und Immunisierung. In: BUSCH, W.; METHLING, W. U. W. M. AMSELGRUBER (Hrsg.); Tiergesundheitslehre- und Tierkrankheitslehre; 1. Auflage; Parey Verlag; Stuttgart; S. 66-75

ARUN, P.; PADMAKUMARAN NAIR, K.G.; MANOJKUMAR, V.; DEEPADEVI, K.V.; LAKSHMI, L.R. U. P.A. KURUP (1999): Decreased hemolysis and lipid peroxidation in blood during storage in the presence of nicotinic acid. In: Vox Sanguinis 76, S. 220-225

ASCHEMANN, M.; LEBZIEN, P.; HÜTHER, L.; DÖLL, S.; SÜDEKUM, K.-H. U. S. DÄNICKE (2012A): Effect of niacin supplementantion on digestibility, nitrogen utilisation and milk an blood variables in lactating dairy cows fed a diet with a negative rumen nitrogen balance. In: Archiv of Animal Nutrition, 6:3, 200-214

ASCHEMANN, M.; LEBZIEN, P.; HÜTHER, L.; SÜDEKUM, H. U. S. DÄNICKE (2012B): Effects of niacin supplementation on rumen fermentation characteristics an nutrient flow at the duodenum in lactating dairy cows fed a diet with a negative rumen nitrogen balance. In: Archieves of Animal Nutrition 66; S. 303-318

AUDRITO, V.; VAISITTI, T.; ROSSI, D.; GOTTARDI, D.; D'ARENA, G.; LAURENTI, L.; GAIDANO, G.; MALAVASI, F. U. S. DEAGLIO (2011): Nicotinamide blocks proliferation and induces apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells through activation of the p53/miR-34a/SIRT1 tumor suppressor network. In: Cancer Research 71; S. 4473-4483

AUSSCHUSS FÜR BEDARFSNORMEN DER GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNGSPHYSIOLOGIE (GFE) (2001): Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Milchkühe und Aufzuchtrinder, DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt am Main; S. 124-125

BAUMGARTNER, M. U. R. BLUM (1993): Nicotinsäure in der Tierernährung. In: Schubert, R.; Flachowsky, G. u. R. Bitsch (Hrsg.): Vitamine und weitere Zusatzstoffe bei Mensch und Tier, 4. Symposium, Wissenschaftlicher Fachverlag, Niederkleen; S. 190-193

BELIBASAKIS, N.G. U. D. TSIRGOGIANNA (1996): Effects of niacin on milk yield, milk composition, and blood components of dairy cows in hot weather. In: Animal Feed Science Technology 64, S. 53-59

BENAVENTE, C.A. U. E.L. JACOBSON (2008): Niacin restriction upregulates NADPH oxidase and reactive oxygen species (ROS) in human keratinocytes. In: Free Radical Biology & Medicine 44; S. 527-537

BENDICH, A. (1993): Physiological role of antioxidants in the immune system. In: Journal of Dairy Science 76; S. 2789-2794

BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; LACETERA, N. U. A. NARDONE (2002): Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. In: Journal of Dairy Science 85; S. 2173-2179

BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; LACETERA, N. U. A. NARDONE (2005): Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. In: Journal of Dairy Science 88; S. 2017-2026

DEL BINO, G.; LASSOTA, P. U. Z. DARZYNKIEWICZ (1991): The S-phase cytotoxicity of camptothecin. Experimental Cell Research 193; S. 27-35

BOUWSTRA, R.; GOSELINK, R.M.A.; DOBBELAAR, P. NIELEN, M. NEWBOLD, J.R. U. T. VAN WERVEN (2008): The relationship between oxidative damage and vitamin E concentration in blood, milk, and liver tissue from vitamin E supplemented and nonsupplemented periparturient heifers. In: Journal of Dairy Science 91; S. 977-987

BRENT, B.E. U. E.E. BARTLEY (1984): Thiamin and niacin in the rumen. In: Journal of Animal Science 59; S. 813-822

BRIVIBA, K.; HEINZOW B. U. M. SCHWENK (2008): Oxidativer Stress und Möglichkeiten seiner Messung aus umweltmedizinischer Sicht. In: Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 51; S. 1464-1482

BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; MILLER, J.K.; QUIGLEY, J.D., MOORE R.R. U. F. C. MADSEN (1994): Antioxidant status of dairy cows supplemented prepartum with vitamin E and selenium. In: Journal of Dairy Science 77; S. 3087-3095

BUTTKE, T.M. U. P.A. SANDSTROM (1994): Oxidative stress as a mediator of apoptosis. In: Immunology Today 15; S. 7-10

CAI, T.-Q.; WESTON, P.G.; LUND, L.A.; BRODIE, B.; MCKENNA, D.J. U. W.C. WAGNER (1994): Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. In: American Journal of Veterinary Research 55; S. 934-943

COLLINS, P.B. U. S. CHAYKIN (1972): The management of nicotinamid and nicotinic acid in the mouse. In: Journal of Biological Chemistry 247; 778-783

COMBS, G.F. (2012): The Vitamins. 4. Auflage, Academic Press, London; S. 291-307

CROWLY, C.L.; PAYNE, C.M.; BERNSTEIN, C. U. D. ROE (2000): The NAD<sup>+</sup> precursors, nicotinic acid and nicotinamide protect cells against apoptosis induced by a multiple stress inducer, deoxycholate. In: Cell Death and Differentiation 7; S. 314-326

DETILLEUX, J.C.; KEHRLI, M.E.; STABEL, J.R.; FREEMAN, A.E. U. D.H. KELLEY (1995): Study of immunological dysfunction in periparturient holstein cattle selected for high and average milk production. Veterinary Immunology and Immunopathology 44; S. 251-267

DEVASAGAYAM, T.P.A.; TILAK, J.C.; BOLOOR, K.K.; SANE, K.S.; GHASKADBI, S.S. U. R.D. LELE (2004): Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. In: Journal of Association of Physicians of India 52; S. 794-804

DOSOGNE, H. BURVENICH, C. FREEMAN, A.E.; KEHRLI, M.R.; DETILLEUX, J.C.; SULON, J.; BECKERS, J.-F. U. D. HOEBEN (1999): Pregnancy-associated glycoprotein and decreased polymorphonuclear leucocyte function in early-partum dairy cows. In: Veterinary Immunology and Immunopathology 67; S. 47-54

DUFVA, G.S.; BARTLEY, E.E.; DAYTON, A.D. U. D.O. RIDDEL (1983): Effect of niacin supplementation on milk production and ketosis of dairy cattle. In: Journal of Dairy Science 66, S. 2329-2336

EDER, H. (1987): Blut und Lymphe. In: WITTKER, G. (Hrsg.): Lehrbuch der Veterinär-Physiologie, 7. Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin Hamburg; S. 160-205

EL-BARODY, M.A.A.; DAGASH, H.A. U. Z.B.H. RABIE (2001): Some physiological responses of pregnant Egyptian buffalo to niacin supplementation. In: Livestock Production Science 69, S. 291-296

EMMENDÖRFFER, A.; HECHT, M.; LOHMANN-MATTHES, M.-L. U. J. ROESLER (1990): A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. In: Journal of Immunological Methods 131; S. 269-275

VAN ENGLAND, M.; NIELAND, L.J.W.; RAMAEKERS, F.C.S.; SCHUTTE, B. U. C.P.M. REUTELINGSPERGER (1998): Annexin V-Affinity Assay: A review on an apoptosis detection system based on Phosphatidylserine exposure. In: Cytometry 31; S.1-9

FADOK, V.A.; VOELKER, D.R.; CAMPBELL, P.A.; COHEN, J.J.; BRATTON, D.L. U. P.M. HENSON (1992): Exposure of Phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. In: *Journal of Immunology* 148; S. 2207-2216

FERNANDES, C.A.; FIEVEZ, L.; UCAKER, B.; NEYRINCK, A.M.; FILLEE, C.; HUAUX, F.; DELZENNE, N.M.; BUREAU, F. U. R. VANBEVER (2011): Nicotinamide enhances apoptosis of G(M)-CSF-treated neutrophils and attenuates endotoxin-induced airway inflammation in mice. In: *American Journal of Physiology Lung Cell and Molecular Physiology* 300; S. L354-L361

FLACHOWSKY, G. (1991): B-Vitamine in der Wiederkäuerfütterung. In: FLACHOWSKY, G.; SCHÖNE, F. U. A. HENNIG (Hrsg.): *Vitamine und weitere Zusatzstoffe bei Mensch und Tier 3. Symp.*, Wissenschaftlicher Verlag, Niederkleen, S.204-211

FLACHOWSKY, G. (1993): Niacin in dairy and beef cattle nutrition. In: *Archive of Animal Nutrition* 43; S. 195-213

FRONK, T.J U. L.H. SCHULTZ (1979): Oral nicotinic acid as a treatment for ketosis. In: *Journal of Dairy Science* 62, 1804-1807

FÜRL, M. (2005): Stoffwechsel- und Mangelkrankheiten. In: HOFFMANN, W. (Hrsg.): *Rinderkrankheiten*, 2. Auflage, Eugen Ulmer KG, Stuttgart (Hohenheim)

FÜRL, M. U. M. SCHÄFER (1991): Niacinwirkung bei Milchkühen während Futterentzug. In: FLACHOWSKY, G.; SCHÖNE, F. U. A. HENNIG (Hrsg.): *Vitamine und weitere Zusatzstoffe bei Mensch und Tier 3. Symp.*, Wissenschaftlicher Verlag, Niederkleen; S. 238-243

GHAZI-KHANSARI, M.; NASIRI, G. U. M. HONARJOO (2005): Decreasing the oxidant stress from paraquat in isolated perfused rat lung using captopril and niacin. In: *Archives of Toxicology* 79, S. 341-345

GHOORBANI, B.; VAHDANI, N. U. S. ZEREHDARAN (2008): Effects of niacin on milk production and blood parameters in early lactation of dairy cows. In: *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11, S. 1582-1587

GILBERT, R.O.; GRÖHN, Y.T.; MILLER, P.M. U. D.J. HOFFMANN (1993): Effect of parity on periparturient neutrophil function in dairy cows. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 36; S. 75-82

GÖBEL, T. U. B. KASPERS (2005): Immunabwehr und Blutgruppen. In: VON ENGELHARDT, W. U. G. BREVES (Hrsg.): Physiologie der Haustiere; 2. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart; S. 213-227

GOFF, J.P. U. R.L. HORST (1997): Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of Dairy Science* 80; S. 1260-1268

GRAUGNARD, D.E.; BIONAZ, M.; TREVISI, E.; MOYES, K.M.; SLAKES-JOHNSON, J.L.; WALLACE, R.L.; DRACKLY, J.K.; BERTONI, G. U. J.J. LOOR (2012): Blood immunometabolic indices and polymorphonuclear neutrophil function in peripartum dairy cows are altered by level of dietary energy prepartum. In: *Journal of Dairy Science* 95; S. 1749-1758

GROPP, J. (1987): Vitamine. In: SCHEUNERT, A. U. A. TRAUTMANN (Hrsg.): Lehrbuch der Veterinär-Physiologie, 7. Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin Hamburg; S. 86-87

HENDERSON, L.M. (1983): Niacin. In: *Annual Review of Nutrition* 3; S. 289-307

HENDERSON, L.M. U. J.B. CHAPPELL (1993): Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? In: *European Journal of Biochemistry* 217, S. 973-980

HEYNEMAN, R.; BURVENICH, C. U. R. VERCAUTERN (1990): Interaction between the respiratory burst activity of neutrophil leukocytes and experimentally induced *escherichia coli* mastitis in cows. In: *Journal of Dairy Science* 73; S. 985-994

HOORENS, A. U. D. PIPELEERS (1999): Nicotinamide protects human beta cells against chemically-induced necrosis, but not against cytokine-induced apoptosis. In: *Diabetologia* 42; S. 55-59

HORNER, J.L.; COPPOCK, C.E.; SCHELLING, G.T.; LABORE, J.M. U. D.H. NAVE (1986): Influence of niacin and whole cottonseed on intake, milk yield and composition and systemic responses of dairy cows. In: *Journal of Dairy Science* 69; S. 3087-3093

KAMANNA, V.S. U. M.L. KASHYAP (2007): Nicotinic acid (niacin) receptor agonists: Will they be useful therapeutic agents? In: *American Journal of Cardiology* 100, S.53N-61N

KEHRLI, M.E. U. J.P. GOFF (1989): Periparturient hypocalcemia in cows: Effects on peripheral blood neutrophil and lymphocyte function. In: *Journal of Dairy Science* 72; S. 1188-1196

KEHRLI, M.E.; NONNECKE, B.J. U. J.A. ROTH (1989A): Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. In: American Journal of Veterinary Research 50; S. 215-220

KEHRLI, M.E.; NONNECKE, B.J. U. J.A. ROTH (1989B): Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. In: American Journal of Veterinary Research 50; S. 207-214

KINSEY, B.M.; KASSIS, A.I.; FAYAD, F.; LAYNE, W.W. U. S.J. ADELSTEIN (1987): Synthesis and biological studies of iodinated ( $^{127/125}\text{I}$ ) derivatives of rhodamine 123. In: Journal of Medicinal Chemistry 30; S. 1757-1761

KLAIDMAN, L.K.; MUKHERJEE, S.K.; HUTCHIN, T.P. U. J.D. ADAMS (1996): Nicotinamid as a precursor for  $\text{NAD}^+$  prevents apoptosis in the mouse brain induced by tertiary-butylhydroperoxide. In: Neuroscience Letters 206; S. 5-8

KOOPMAN, G.; REUTLINGSPERGER, C.P.; KUIJTEN, G.A.; KEEHNEN, R.M.; PALS, S.T. U. M.H. VAN OERS (1994): Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. In: Blood 84; S. 1415-1420

KRAMMER, P.H. (1996): Apoptose im Immunssystem: Mord oder Selbstmord. In: Pharmazie in unserer Zeit 6; S. 306-310

KUNG, L.; GUBERT, K. U. J.T. HUBER (1980): Supplemental niacin for lactating cows fed diets of natural protein or nonprotein nitrogen. In: Journal of Dairy Science 63; S. 2020-2025

LEDOUX, S.P.; HALL, C.R.; FORBES, P.M.; PATTON, N.J. U. G.L. WILSON (1988): Mechanisms of nicotinamide and thymidine protection from alloxan and streptozocin toxicity. Diabetes 37; S. 1015-1019

LI, Y. U. M.A. TRUSH (1998): Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H Oxidase Inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. In: Biochemical and Biophysical Research Communications 253; S. 295-299

LUN, A. U. J. ROESLER (2007): Oxidativer Burst, Phagozytose und Expression der Adhäsionsmoleküle. In: SACK, U.; TÁRNOK, A. U. G. ROTHE (Hrsg.): Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie, 1. Auflage, S. Karger Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH; S. 519-557

MADISON-ANDERSON, R.J.; SCHINGOETHE, D.J.; BROUK, M.J.; BAER, R.J. U. M. LENTSCH (1997): Response of lactating cows to supplemental unsaturated fat and niacin. In: Journal of Dairy Science 80; S. 1329-1338

MEHRZAD, J.; DUCHATEAU, L.; PYÖRÄLÄ, S. U. C. BURVENICH (2002): Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation. *Journal of Dairy Science* 85, S. 3268-3276

MOREY, S.D.; MAMEDOVA, L.K.; ANDERSON, D.E.; ARMENDARIZ, C.K.; TITGEMEYER, E.C. U. B.J. BRADFORD (2011): Effects of encapsulated niacin on metabolism and production of periparturient dairy cows. In: *Journal of Dairy Science* 94; S. 5090-5104

MOYA, S.L.; GÓMEZ, M.A.; BOYLE, L.A.; MEE, J.F.; O'BRIEN, B. U. S. ARKINS (2008): Effects of milking frequency on phagocytosis and oxidative burst activity of phagocytes from primiparous and multiparous dairy cows during early lactation. In: *Journal of Dairy Science* 91; S. 587-595

MILLER, J.K.; BRZINSKA-SLEBODINSKA, E. U. F.C. MADSEN (1993): Oxidative Stress, antioxidants and animal function. In *Journal of Dairy Science* 76; S. 2812-2823

MUKHERJEE, S.K.; KLAIDMAN, L.K.; YASHAREL, R. U. J.D. ADAMS (1997): Increased brain NAD prevents neuronal apoptosis in vivo. In: *European Journal of Pharmacology* 330; S. 27-34

MÜLLER, L.D.; HEINRICHS, A.J.; COOPER, J.B. U. Y.H. ATKIN (1986): Supplemental niacin for lactating cows during summer feeding. In: *Journal of Dairy Science* 69; S. 1416-1420

NIEHOFF, I.-D.; HÜTHER, L. U. P. LEBZIEN (2009A): Niacin for dairy cattle: a review. In: *British Journal of Nutrition* 101; S. 5-19

NIEHOFF, I.-D.; HÜTHER, L.; LEBZIEN, P.; BIGALKE, W.; DÄNICKE, S. U. G. FLACHOWSKY (2009B): Investigations on the effect of a niacin supplementation to three diets differing in forage-to-concentrate ratio on several blood and milk variables of dairy cows. In: *Archives of Animal Nutrition*, 63; S. 203-218

NONNECKE, B.J.; KIMURA, K.; GOFF, J.P. U. M.E. KEHRLI (2003): Effects of the mammary gland on functional capacities of blood mononuclear leukocyte populations from periparturient cows. In: *Journal of Dairy Science* 86; S. 2359-2368

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T. U. F. POGNAN (2000): Investigation of alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. In: *European Journal of Biochemistry* 267; S. 5421-5426



OGATA, S.; TAKEUCHI, M.; FUJITA, H.; SHIBATA, K.; OKUMURA, K. U. H. TAGUCHI (2000): Apoptosis induced by niacin-related compounds in K562 cells but not in normal human lymphocytes. In: *Bioscience Biotechnology Biochemie* 64; S. 1142-1146

VAN OOSTVELDT, K.; DOSOGNE, H.; BURVENICH, C.; PAAPE, M.J.; BROCHEZ, V. U. E. VAN DEN EECKHOUT (1999): Flow cytometric procedure to detect apoptosis of bovine polymorphonuclear leukocytes in blood. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 70; S. 125-133

PAAPE, M.J.; BANNERMANN, D.D.; ZHAO, X. U. J.-W. LEE (2003): The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. In: *Veterinary Research* 34; S. 597-627

PELT, L.J.; ZWIETEN, R.; WEENING, R.S.; ROOS, D.; VERHOEVEN, A.J. U. B.G.J.M. BOLSCHER (1996): Limitations on the use of dihydrorhodamine 123 for flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst. In: *Journal of Immunological Methods* 191, S. 187-196

PIRES, J.A.A. U. R.R. GRUMMER (2007): The use of nicotinic acid to induce sustained low plasma nonesterified fatty acids in feed-restricted holstein cows. In: *Journal of Dairy Science* 90; S. 3725-3732

POLLACK, A. U. G. CIANCIO (1991): Cell cycle phase-specific analysis of cell viability using Hoechst 33342 and propidium iodide after ethanol preservation. In: DARZYNKIEVIC, Z. U. H.A. CHRISMAN (Hrsg.): *Flow Cytometry*, Academic Press, San Diego; S. 19-24

RAMPERSAD, S.N. (2012): Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassay. In: *Sensors* 2012 12; S. 12347-12360

RIDDEL, D.O.; BARTLEY, E.E. U. A.D. DAYTON (1981): Effect of nicotinic acid on microbial protein synthesis *in vitro* and on dairy cattle growth and milk production. In: *Journal of Dairy Science* 64; S. 782-791

RINALDI, M.; MORONI, P.; PAAPE, M.J. U. D.D. BANNERMANN (2008): Differential alterations in the ability of bovine neutrophils to generate extracellular and intracellular reactive oxygen species during the periparturient period. In: *The Veterinary Journal* 178; S. 208-213

ROSSOW, W.; BOLDUAN, G. U. R. STAUFENBIEL (1994): *Stoffwechselstörungen bei Haustieren*, 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena Stuttgart; S. 155-156

RUEGSEGGER, G.J. U. L.H. SCHULTZ (1986): Use of a combination of pyrolene glycol and niacin for subclinical ketosis. In: *Journal of Dairy Science* 69; S. 1411-1415

SALGAR, S.K.; PAAPE, M.J.; ALSTON-MILLS, B. U. R.H. MILLER (1991): Flow cytometric study of oxidative burst activity in bovine neutrophils. In: American Journal of Veterinary Research 52; S. 1201-1207

SARMA, A. D.; MALLICK, A.R. U. A.K. GHOSH (2010): Free radicals and their role in different clinical conditions: An overview. In: International Journal of Pharma Sciences and Research 1(3); S. 185-192

SEEHAWER, J. U. W. SCHIFFKA (2006): Vitamine. In: PAPE, H.-C. (Hrsg.): Futtermittelzusatzstoffe-Technologie und Anwendung, Agrimedia GmbH, Bergen/ Dumme; S. 187-203

SHIELDS, D.R.; SCHAEFER, D.M. U. T.W. PERRY (1983): Influence of niacin supplementation and nitrogen source on rumen microbial fermentation. In: Journal of Animal Science 57; S. 1576-1583

SMITH, J.A. U. M.J. WEIDEMANN (1993): Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. In: Journal of Immunological Methods 162, S. 261-268

SMITH, K.L.; HARRISON, J.H.; HANCOCK, D.D.; TODHUNTER, D.A. U. H.R. CONRAD (1984): Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. In: Journal of Dairy Science 67; S. 1293-1300

SMITS, E. C. BURVENICH U. R. HEYNEMAN (1997): Simultaneous flow cytometric measurements of phagocytotic and oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes in whole bovine blood. In: Veterinary Immunology and Immunopathology 56; S. 259-269

SORDILLO, L.M. U. S.L. AITKEN (2009): Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. In: Veterinary Immunology and Immunopathology 128; S. 104-109

SORDILLO, L.M.; O'BOYLE, N.; GANDY, C.; CORL, C.M. U. E. HAMILTON (2007): Shifts in thioredoxin reductase activity and oxidant status in mononuclear cells obtained from transition dairy cattle. In: Journal of Dairy Science 90; S. 1186-1192

SUN, J.; ZHANG, X.; BRODERICK, M. U. H. FEIN (2003): Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess Reaction Assay. In: Sensors 3, S. 276-284

TAKAHASHI, A.; MASUDA, A.; SUN, M.; CENTONZE, V.E. u. B. HERMAN (2004): Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pH<sub>m</sub>). In: Brain Research Bulletin 62; S. 497-504

TANG, K.; SHAM, H.; HUI, E. u. J.B. KIRKLAND (2007): Niacin deficiency causes oxidative stress in rat bone marrow cells but not through decreased NADPH or glutathione status. In: Journal of Nutritional Biochemistry 19, S. 746-753

TIZARD, I.R. (2004): Neutrophils and Their Products. In: Veterinary Immunology. 7. Auflage, Elsevier, Philadelphia (USA); S. 24-34

TONG, D.-L.; ZHANG, D.-X.; XIANG, F.; TENG, M.; JIANG, X.-P.; HOU, J.-M.; ZHANG, Q. u. Y.-S. HUANG (2012): Nicotinamide pretreatment protects cardiomyocytes against hypoxia-induced cell death by improving mitochondrial stress. In: Pharmacology 90; S. 11-18

VARELLA, M.J-F.; ERNESTO T.L.; GARCIA, C.P.; DO ROSARIO DEL LAMA UNAMUNO, M.; AFONSO, J.A. u. H. VANNUCCHI (2006): Intestinal permeability and oxidative stress in patients with alcoholic pellagra. In: Clinical Nutrition 25, S. 977-983#

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H. u. C. REUTELINGSPERGER (1995): A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. In: Journal of Immunological Methods 184; S. 39-51

WAGNER, K.; MÖCKEL, P.; LEBZIEN U. G. FLACHOWSKY (1995): Einfluss Postruminal applizierten Niacins auf das Fettsäuremuster von Kuhmilch. In: SCHUBERT, R.; FLACHOWSKY, G. u. R. BITSCH (Hrsg.): Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier, 5. Symposium, Buch und Kunstdruckerei Keßler GmbH, Weimar; S. 324-327

WALRAND, S.; VALEIX, S.; RODRIGUEZ, C.; LIGOT, P.; CHASSAGNE, J. u. M.-P. VASSON (2003): Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison three fluorescent probes. In: Clinica Chimica Acta 331; S. 103-110

WEITBERG, A.B. (1989): Effect of nicotinic acid supplementation in vivo on oxygen radical-induced genetic damage in human lymphocytes. In: Mutation Research 216; S. 197-201

WHITE, M.K.B.; MEAGHER, L.C.; MACDERMOT, J. u. C. HASLETT (1993): Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. In: Journal of Immunology 150; S. 5124-5134

YU, B.P. (1994): Cellular defense against damage from reactive oxygen Species. In: Physiological Reviews 74, S. 139-162

YUAN, K.; SHAVER, R.D.; BERTICS, S.J.; ESPINEIRA, M. U. R.R. GRUMMER (2012): Effect of rumen-protected niacin on lipid metabolism, oxidative stress and performance of transition dairy cows. In: Journal of Dairy Science 95, S. 2673-2679

ZIMBELMANN, R.B.; BAUMGARD, L.H. U. R.J. COLLIER (2010): Effects of encapsulated niacin on evaporative heat loss and body temperature in moderately heat-stressed lactating Holstein cows. In: Journal of Dairy Science 93; S. 2387-2394

ZIMMERMAN, C.A.; RAKES, A.H.; DANIEL, T.E. U. B.A. HOPKINS (1992): Influence of dietary protein and supplemental niacin on lactational performance of cows fed normal and low fiber diets. In: Journal of Dairy Science 75; S. 1965-1978

## Anhang

Tabelle I: pH-Wert-Messungen von Blut, Medium, NaCl-Lösung und Stammlösungen von Niacin

Probe	pH-Wert
Blut	7,57
RPMI-Medium	7,28
0,9 % NaCl-Lösung	5,47
0,9 % NaCl-Lösung + Blut	7,62
Stammlösungen	
Nicotinsäure (40 mg/ml)	3,82
Nicotinamid (40 mg/ml)	6,09

Tabelle II: Anteil R123 positiv gefärbter Granulozyten und MFI der R123-pos. gefärbten Granulozyten in Abhängigkeit vom Tag relativ zur Kalbung (N = 3, n = 9; MW ± SD)

Tag relativ zur Kalbung	Anteil positiv gefärbter Granulozyten [%]		MFI positiv gefärbter Granulozyten	
	basales Level	nach TPA-Stimulation	basales Level	nach TPA-Stimulation
-42	9,42 ± 3,40	99,02 ± 0,40	1556,17 ± 119,40	53520,67 ± 6064,90
-35	-	-	-	-
-28	-	-	-	-
-21	13,43 ± 2,90	98,38 ± 1,10	1312,50 ± 93,50	53777,25 ± 1848,80
-14	6,45 ± 1,20	99,32 ± 0,50	1189,17 ± 72,10	66325,33 ± 2623,70
-7	3,78 ± 1,10	98,38 ± 1,40	920,83 ± 190,40	54608,00 ± 3234,40
-3	2,30 ± 1,10	99,58 ± 0,30	787,25 ± 195,90	63547,25 ± 4233,10
-1	2,90 ± 0,00	99,75 ± 0,00	517,00 ± 13,00	63613,50 ± 1752,50
3	2,37 ± 0,60	96,57 ± 1,20	723,67 ± 46,10	60093,17 ± 4973,50
7	4,58 ± 0,90	97,45 ± 2,00	1231,33 ± 145,80	57406,17 ± 3790,50
14	4,28 ± 1,40	99,52 ± 0,30	742,00 ± 60,10	55548,67 ± 1871,00
21	4,57 ± 1,90	99,45 ± 0,50	765,67 ± 127,20	52649,50 ± 1531,90
28	21,02 ± 1,40	99,77 ± 0,10	2146,50 ± 170,80	54627,33 ± 2551,70
35	15,83 ± 3,50	99,77 ± 0,10	1787,83 ± 451,00	54848,33 ± 5672,60
42	7,98 ± 3,00	99,88 ± 0,10	1170,17 ± 230,70	64878,00 ± 1798,80
63	9,12 ± 3,40	99,53 ± 0,30	1027,83 ± 221,80	61491,33 ± 3667,30
82	7,87 ± 2,90	99,80 ± 0,10	681,83 ± 111,60	60411,00 ± 2047,60
100	8,55 ± 2,70	99,75 ± 0,10	739,83 ± 53,30	62347,50 ± 3805,00

Tabelle II: Anteil R123 positiv gefärbter Granulozyten und MFI positiv gefärbter Granulozyten in Abhängigkeit von der Konzentration an Niacin (N = 3, n = 9; LSM means ± SE)

Inkubationszeit [min]	Konzentration [µg/ml]	NA						NAM									
		Anteil positiv gefärbter Granulozyten [%]		MFI der positiv gefärbten Granulozyten		Anteil positiv gefärbter Granulozyten [%]		MFI der positiv gefärbten Granulozyten		Anteil positiv gefärbter Granulozyten [%]		MFI der positiv gefärbten Granulozyten					
		basales Level	Nach TPA Stimulation	basales Level	nach TPA Stimulation	basales Level	nach TPA Stimulation	basales Level	nach TPA Stimulation	basales Level	nach TPA Stimulation	basales Level	nach TPA Stimulation				
30	0,00 (K)	10,42 ± 4,15	98,46 ± 0,70	7189,82 ± 494,06 <sup>c</sup>	46825,44 ± 8114,51	10,00 ± 4,15	99,37 ± 0,70	7970,44 ± 485,01 <sup>D</sup>	46953,00 ± 8114,51	9,70 ± 4,15	99,09 ± 0,70	9184,67 ± 485,01 <sup>BC</sup>	47119,56 ± 8114,51	9,51 ± 4,15	98,92 ± 0,70	8610,11 ± 485,01 <sup>CD</sup>	47800,56 ± 8114,51
	0,25	10,30 ± 4,15	98,82 ± 0,70	8283,00 ± 485,01 <sup>bc</sup>	46532,11 ± 8114,51	9,70 ± 4,15	99,09 ± 0,70	9184,67 ± 485,01 <sup>BC</sup>	47119,56 ± 8114,51	9,96 ± 4,15	99,14 ± 0,70	10144,44 ± 485,01 <sup>AB</sup>	46284,89 ± 8114,51	9,98 ± 4,15	99,13 ± 0,70	10518,00 ± 485,01 <sup>A</sup>	48025,11 ± 8114,51
	0,40	10,57 ± 4,15	98,68 ± 0,70	8915,33 ± 485,01 <sup>ab</sup>	46426,22 ± 8114,51	9,96 ± 4,15	99,14 ± 0,70	10144,44 ± 485,01 <sup>AB</sup>	46284,89 ± 8114,51	8,99 ± 4,39	99,18 ± 0,53	8744,56 ± 615,33 <sup>C</sup>	46225,56 ± 6498,99	9,44 ± 4,39	98,29 ± 0,53	9558,78 ± 615,33 <sup>BC</sup>	49186,00 ± 6498,99
	1,00	11,00 ± 4,15	98,77 ± 0,70	9338,00 ± 485,01 <sup>ab</sup>	44153,67 ± 8114,51	9,96 ± 4,15	99,14 ± 0,70	10144,44 ± 485,01 <sup>AB</sup>	46284,89 ± 8114,51	9,10 ± 4,39	99,33 ± 0,53	9974,67 ± 615,33 <sup>BC</sup>	49076,00 ± 6498,99	9,44 ± 4,39	99,41 ± 0,53	10899,27 ± 632,43 <sup>AB</sup>	49220,78 ± 6498,99
	4,00	10,92 ± 4,15	98,70 ± 0,70	9685,78 ± 485,01 <sup>a</sup>	43550,33 ± 8114,51	9,98 ± 4,15	99,13 ± 0,70	10518,00 ± 485,01 <sup>A</sup>	48025,11 ± 8114,51	9,30 ± 4,39	99,46 ± 0,53	11811,22 ± 615,33 <sup>A</sup>	52973,11 ± 6498,99	9,30 ± 4,39	99,46 ± 0,53	11811,22 ± 615,33 <sup>A</sup>	52973,11 ± 6498,99
180	0,00 (K)	12,08 ± 4,39	98,06 ± 0,53	7650,78 ± 615,33 <sup>c</sup>	41616,00 ± 6498,99	12,08 ± 4,39	98,06 ± 0,53	7650,78 ± 615,33 <sup>c</sup>	41616,00 ± 6498,99	10,30 ± 4,39	98,60 ± 0,53	10313,11 ± 615,33 <sup>a</sup>	42970,22 ± 6498,99	10,54 ± 4,39	98,61 ± 0,53	9583,22 ± 615,33 <sup>ab</sup>	42576,00 ± 6498,99
	0,25	10,58 ± 4,39	97,63 ± 0,53	8283,22 ± 615,33 <sup>bc</sup>	43762,22 ± 6498,99	10,58 ± 4,39	97,63 ± 0,53	8283,22 ± 615,33 <sup>bc</sup>	43762,22 ± 6498,99	10,67 ± 4,39	98,56 ± 0,53	9153,22 ± 615,33 <sup>bc</sup>	43729,89 ± 6498,99	10,54 ± 4,39	98,61 ± 0,53	9583,22 ± 615,33 <sup>ab</sup>	42576,00 ± 6498,99
	0,40	10,67 ± 4,39	98,56 ± 0,53	9153,22 ± 615,33 <sup>bc</sup>	43729,89 ± 6498,99	10,67 ± 4,39	98,56 ± 0,53	9153,22 ± 615,33 <sup>bc</sup>	43729,89 ± 6498,99	9,89 ± 4,39	98,60 ± 0,53	9860 ± 0,53	42970,22 ± 6498,99	9,89 ± 4,39	98,60 ± 0,53	9860 ± 0,53	42970,22 ± 6498,99
	1,00	10,54 ± 4,39	98,61 ± 0,53	9583,22 ± 615,33 <sup>ab</sup>	42576,00 ± 6498,99	10,54 ± 4,39	98,61 ± 0,53	9583,22 ± 615,33 <sup>ab</sup>	42576,00 ± 6498,99	10,30 ± 4,39	98,60 ± 0,53	10313,11 ± 615,33 <sup>a</sup>	42970,22 ± 6498,99	10,54 ± 4,39	98,61 ± 0,53	9583,22 ± 615,33 <sup>ab</sup>	42576,00 ± 6498,99
	4,00	9,89 ± 4,39	98,60 ± 0,53	10313,11 ± 615,33 <sup>a</sup>	42970,22 ± 6498,99	9,89 ± 4,39	98,60 ± 0,53	10313,11 ± 615,33 <sup>a</sup>	42970,22 ± 6498,99	9,89 ± 4,39	98,60 ± 0,53	9860 ± 0,53	42970,22 ± 6498,99	9,89 ± 4,39	98,60 ± 0,53	9860 ± 0,53	42970,22 ± 6498,99

a-c – p &lt; 0,05 zwischen unterschiedlichen NA-Konzentrationen bei gleichem Zeitpunkt

A-D – p < 0,05 zwischen unterschiedlichen NAM-Konzentrationen bei gleichem Zeitpunkt

\* - p < 0,05 zwischen unterschiedlichen Niacinformen bei gleicher Konzentration; Stimulation; gleichem Zeitpunkt

\*\*\*- p < 0,001 zwischen unterschiedlichen Niacinformen bei gleicher Konzentration; Stimulation; gleichem Zeitpunkt

Tabelle III: Anteil Annexin-, PI- und Annexin+PI-positiv gefärbter Lymphozyten in Abhängigkeit von der Konzentration an Niacin (N = 2; n = 4; LSMmeans ± SE)

Inku- ba- tions- zeit [min]	Kon- zentra- tion [µg/ml]	NA			NAM		
		Annexin-positiv gefärbte Lymphozyten [%]	PI-positiv gefärbte Lymphozyten [%]	Annexin+PI-positiv gefärbte Lymphozyten [%]	Annexin-positiv ge- färbte Lymphozyten [%]	PI-positiv gefärbte Lymphozyten [%]	Annexin+PI-positiv gefärbte Lymphozyten [%]
30	0,00 (K)	22,03 ± 2,11	2,05 ± 0,43	1,40 ± 0,26	25,78 ± 2,11	3,65 ± 0,43	3,03 ± 0,66
	0,25	24,18 ± 2,11	2,33 ± 0,43	1,73 ± 0,26	25,68 ± 2,11	4,70 ± 0,43	4,08 ± 0,66
	0,40	26,70 ± 2,11	2,75 ± 0,43	1,95 ± 0,26	25,95 ± 2,11	4,28 ± 0,43	3,63 ± 0,66
	1,00	26,08 ± 2,11	2,23 ± 0,43	1,58 ± 0,26	28,38 ± 2,11	4,45 ± 0,43	3,65 ± 0,66
180	4,00	28,03 ± 2,11	2,55 ± 0,43	1,80 ± 0,26	32,70 ± 2,11	5,63 ± 0,43	4,25 ± 0,66
	0,00 (K)	27,40 ± 3,78	3,65 ± 0,60	2,80 ± 0,45	28,10 ± 3,78	4,38 ± 0,60	3,60 ± 0,45
	0,25	27,58 ± 3,78	3,58 ± 0,60	2,75 ± 0,45	27,50 ± 3,78	4,75 ± 0,60	3,80 ± 0,45
	0,40	29,78 ± 3,78	3,80 ± 0,60	3,00 ± 0,45	29,43 ± 3,78	4,95 ± 0,60	3,98 ± 0,45
	1,00	32,43 ± 3,78	4,68 ± 0,60	3,45 ± 0,45	29,40 ± 3,78	4,23 ± 0,60	3,23 ± 0,45
	4,00	33,70 ± 3,78	4,85 ± 0,60	3,68 ± 0,45	32,20 ± 3,78	4,38 ± 0,60	3,33 ± 0,45

Tabelle IV: Stimulationsindex (SI) AlamarBlue®-Assay in Abhängigkeit von der Niackonzentration (N = 3, n = 15)

Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Stimulationsindex [SI]					
	NA			NAM		
	Min	Max	LSMeans $\pm$ SE	Min	Max	LSMeans $\pm$ SE
0,00 (K)	4,26	4,38	4,62 $\pm$ 0,28	3,30	4,77	4,50 $\pm$ 0,28
0,25	4,20	4,85	4,31 $\pm$ 0,28	3,75	5,12	3,97 $\pm$ 0,28
0,40	4,08	4,64	4,48 $\pm$ 0,28	4,03	4,62	4,39 $\pm$ 0,28
1,00	4,41	4,70	4,40 $\pm$ 0,28	4,40	5,01	4,29 $\pm$ 0,28
2,00	4,58	4,87	4,56 $\pm$ 0,28	4,36	6,31	4,61 $\pm$ 0,28
3,00	4,75	4,78	4,66 $\pm$ 0,34	4,28	5,61	5,28 $\pm$ 0,34
4,00	4,21	4,85	4,70 $\pm$ 0,34	3,11	5,50	4,89 $\pm$ 0,34

Tabelle V: Anteil lebender/ toter Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit verschiedenen konzentrierten Zusätzen an Niacin (N = 1, n = 2; MW)

Inkubationszeit [h]	Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	NA		NAM	
		Anteil lebender Zellen [%]	Anteil toter Zellen [%]	Anteil lebender Zellen [%]	Anteil toter Zellen [%]
24	0,00 (K)	86,24	13,76	85,53	14,47
	0,00 (K+ConA)	83,87	16,13	72,60	27,40
	0,25	89,07	10,93	86,25	13,75
	0,40	84,97	15,03	88,89	11,11
	1,00	87,14	12,86	85,53	14,47
	2,00	88,89	11,11	85,71	14,29
	3,00	85,54	14,46	94,52	5,48
	4,00	88,31	11,69	71,67	28,33
48	0,00 (K)	74,44	25,56	74,36	25,64
	0,00 (K+ConA)	83,93	16,07	84,96	15,04
	0,25	83,56	16,44	86,67	13,33
	0,40	80,95	19,05	75,27	24,73
	1,00	74,65	25,35	77,27	22,73
	2,00	73,17	26,83	76,12	23,88
	3,00	67,05	32,95	81,43	18,57
	4,00	74,47	25,53	77,46	22,54
72	0,00 (K)	65,38	34,62	70,99	29,01
	0,00 (K+ConA)	92,08	7,92	90,12	9,88
	0,25	62,92	37,08	72,37	27,63
	0,40	53,54	46,46	64,18	35,82
	1,00	46,94	53,06	60,26	39,74
	2,00	61,80	38,20	57,69	42,31
	3,00	54,95	45,05	64,41	35,59
	4,00	41,73	58,27	61,04	38,96



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit und während meines Studiums helfend zur Seite standen.

Mein Dank gilt in erster Linie dem **Friedrich-Loeffler-Institut (FLI)**, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, für die Bereitstellung des Forschungsthemas meiner Masterthesis und der Untersuchungsmaterialien sowie den dort ansässigen Mitarbeitern für die freundliche Aufnahme und die vielen helfenden Hände.

Insbesondere bedanke ich mich bei meinen Betreuern **Herrn Prof. Dr. Dr. Sven Dänicke** und **Frau Dr. Jana Frahm**. Weiterhin möchte ich **Frau Nicola Mickenautsch**, **Frau Reka Tienken**, **Frau Kirsten Schulz**, **Frau Ulrike Brezina**, **Frau Marleen Paulick** und **Frau Laura Winter** für die vielen Ratschläge und die tatkräftige Unterstützung danken. Dankende Worte möchte ich hierbei auch an die Versuchsstation des Institutes richten und vor allem an **Herrn Matthias Klein**.

Ein großer Dank gilt auch meiner Professorin **Frau Prof. Dr. Schniedewind** für die Übernahme der Betreuung dieser Masterthesis und die unterstützenden Ratschläge sowie die nötigen motivierenden Worte.

Einen besonderen Dank möchte ich meiner Familie für die finanzielle und seelische Unterstützung aussprechen. Meiner Mutter danke ich zudem für den entscheidenden Anstoß zum Agrarstudium.

Ein sehr großes Dankeschön richte ich an meine Freunde und den Kommilitonen, aus denen im Laufe meines Studiums Freunde wurden. Auch in schweren Zeiten boten sie den nötigen Halt und gaben die Motivation sich immer wieder durchzubeißen.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Wendy Liermann, an Eides statt, dass ich diese Masterthesis selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe erstellt habe. Ich habe lediglich, die in der Arbeit angegebenen Hilfen genutzt. Sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus schon veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Literaturquellen stammten, habe ich deutlich gekennzeichnet. Diese Masterthesis wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und wurde noch nicht veröffentlicht.

*Neubrandenburg, den 29.08.2013*

*Wendy Liermann*