

Aus der Klinik für Klautiere
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin
und der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Charité, Universitätsmedizin Berlin

**Nichtinvasive Bestimmung der antioxidativen Karotinoide in der Haut des Rindes
mittels LED-Technologie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Julian Gabriel Klein
Tierarzt aus Duisburg

Berlin 2013

Journal-Nr.: 3667

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Kerstin E. Müller
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. rer. nat. Jürgen Lademann
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Klaus Männer

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

cattle, antioxidants, carotenoids, spectroscopy, skin, diseases

Tag der Promotion: 16.04.2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-502-2

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2014

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	5
1.1. Nichtinvasive reflektionspektroskopische Messungen der Karotinoide in der Rindereuterhaut	8
1.2. Einfluss von Krankheitszuständen auf die Karotinoidkonzentration am Beispiel der Labmagenverlagerung des Rindes	10
1.3. Analyse der Korrelation zwischen der Karotinoidkonzentration in der Haut und im Blut beim weiblichen Rind mittels optischer Methoden	11
2. RESEARCH PAPERS	12
2.1. Noninvasive measurements of carotenoids in bovine udder by reflection spectroscopy	12
2.2. Serial non-invasive measurements of dermal carotenoid concentrations in dairy cows following recovery from abomasal displacement	20
2.3. Analyses of the correlation between dermal and blood carotenoids in female cattle by optical methods	28
3. DISKUSSION	36
4. ZUSAMMENFASSUNG	40
Julian Klein: Nichtinvasive Bestimmung der antioxidativen Karotinoide in der Haut des Rindes mittels LED-Technologie	40
5. SUMMARY	43
6. LITERATURVERZEICHNIS	46
7. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	51

8. DANKSAGUNG	52
9. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	53

1. Einleitung

Im Rahmen der Integrierten Tierärztlichen Bestandsbetreuung (ITB) und für die Realisierung hoher Milchleistungen ist die Früherkennung von Krankheiten bei Milchkühen von entscheidender Bedeutung. Ohne gezielte Tierbeobachtung und sich daran anschließende Einzeltieruntersuchung ist dies nur schwer erreichbar. Moderne Mess- und Sensortechnologien erobern nach dem Ackerbau zurzeit auch die landwirtschaftliche Nutztierhaltung. Ein sensorgestütztes Gesundheitsmonitoring könnte dazu beitragen, Erkrankungen bei Milchrindern frühzeitig zu erkennen. Dies wäre dann als integrativer Bestandteil des Precision Dairy Farming zu sehen, welches eine nachhaltige Erzeugung von Milch mit gesicherter Qualität sowie einen hohen Grad an Verbraucher- und Tierschutz zur Zielsetzung hat (Spilke et al. 03).

Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass das antioxidative Potential (AOP) der Haut den oxidativen Stress eines Individuums sowie den Stress insgesamt widerspiegelt. Stress kann als ein biologischer Prozess definiert werden, der im Körper Veränderungen hervorruft, um die durch verschiedene Einflüsse erhöhten Ansprüche zu bewältigen (Schwarz 2009).

Das alleinige Vorhandensein von reaktiven Spezies (reaktive Sauerstoffspezies (ROS), reaktive Chlorspezies (RCS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS)) stellt im physiologischen aeroben steady-state keine Gefahr für den Organismus dar (Sies, Stahl 1995). Ursächlich für das Entstehen von oxidativem Stress kann ein Mangel an antioxidativen Substanzen oder eine übermäßige Produktion von reaktiven Spezies sein, so dass die Menge der Prooxidantien die Kapazität der Antioxidantien zur Neutralisation dieser überschreitet (Miller et al. 1993). Das System der Antioxidantien umfasst verschiedene enzymatische und nicht-enzymatische Mechanismen (Nitschke 2005). Alle Antioxidantien wirken synergistisch in Form einer Schutzkette und schützen sich so gegenseitig vor der Zerstörung durch freie Radikale und andere reaktive Spezies. Somit funktionieren Antioxidantien nur in Kombination mit anderen Typen von Antioxidantien effektiv (Darvin et al. 2006).

Das AOP der Haut dient als Parameter, der die Fähigkeit beschreibt, vor oxidativen Prozessen zu schützen.

Darvin et al. (2008) konnten in einer einjährigen Studie am Menschen zeigen, dass Faktoren wie Krankheit, Erschöpfung, psychischer Stress, Alkoholkonsum und Rauchen das AOP reduzieren, während eine karotinoide Ernährung sowie die Abwesenheit von eben angeführten Faktoren das AOP erhöhen. Die Bestimmung des AOP's geschieht über die Messung von Markersubstanzen, unter anderem der Karotinoide, in unterschiedlichen Matrices (Blut, Haut, Organmaterial). Karotinoide müssen mit der Nahrung aufgenommen werden und führen dann zu einer Anreicherung im Gewebe und speziell auch in der Haut (Meyer 2002; Lademann et al. 2011). Die ausgedehnten π -Systeme der Karotinoide

bedingen ihre kinetische Reaktivität. Karotinoiden ist es so auf verschiedenen Wegen möglich mit freien Radikalen zu reagieren und auf diese Weise als Antioxidanz wirksam zu werden (Britton 1995).

Verschiedene innovative optische Messverfahren erlauben inzwischen die nichtinvasive Bestimmung der Karotinoidkonzentration in der Haut des Menschen in real-time (Lademann et al. 2011).

Bei Rindern kann durch Supplementation von bedarfsgerechten Gehalten an Mikronährstoffen mit antioxidativem Potential die Milchleistung bis zu einem gewissen Grad optimiert werden. Peripartal mit β -Karotin supplementierte Kühe haben einen niedrigeren Gehalt an somatischen Zellen (SCC) in der Milch und weisen eine niedrigere Inzidenz von intramammären Infektionen auf, verglichen mit nicht supplementierten Tieren (Chew 1995). Weiterhin wird durch Zufütterung von β -Karotin die Zeit von der Abkalbung bis zum ersten Östrus verkürzt (Rakes et al. 1985). Neben dem Einfluss der Karotinoide auf die Gesundheit und Produktivität von Milchrindern ist deren Auswirkung auf die Qualität der Milchprodukte von Bedeutung. Im Rahmen der Herdenbestandsbetreuung wird die β -Karotinkonzentration im Blut heutzutage regelmäßig bestimmt.

Derzeit sind beim Rind ausschließlich invasive *in vitro*-Methoden zur Bestimmung der Karotinoide etabliert. Die Ermittlung der Karotinoidkonzentration über die Plasmafärbung ist die kostengünstigste Methode, wobei deren Aussagegenauigkeit sehr umstritten ist (Schweigert, Immig 2007). Die HPLC (High-Pressure Liquid Chromatography) ist bis heute im Rahmen der Analyse und quantitativen Bestimmung von Karotinoiden in der Medizin (Plasma- und Gewebeprobe) weit verbreitet. Je nach Fragestellung sowie den zu untersuchenden Substanzen wird die HPLC-Methode modifiziert (Hesterberg 2006). Neben dem Nachteil der Invasivität stellt die HPLC eine sehr zeitaufwendige, kostenintensive und ausschließlich *in vitro*-Messmethode dar (Talwar et al. 1998). Untersuchungen zur Effektivität und Kinetik der Aufnahme von Antioxidantien mit der Nahrung und ihrer Anreicherung in der Haut konnten in der Vergangenheit daher nur schwer realisiert werden (Darwin et al. 2006). Auch bei der neu entwickelten photometrischen Schnelltestmethode, iCheck, handelt es sich um eine invasive *in vitro*-Methode, mit bereits genannten Nachteilen (Schweigert, Immig 2007).

In dieser Arbeit wurde erstmalig eine auf Reflektionsspektroskopie basierende, nichtinvasive *in vivo*-Methode zur Bestimmung der antioxidativen Karotinoide beim Rind eingesetzt. Die Messungen wurden mit einem neu entwickelten LED-basierten miniaturisierten Hautscanner WK1 (Opsolution GmbH, Kassel, Deutschland) aus der Humanmedizin an der Euterhaut durchgeführt. Der Scanner besteht aus einem System von zwei Laser-Dioden, wobei die eine im Absorptionsmaximum der Karotinoide und die andere außerhalb der Karotinoidabsorption Licht ausstrahlt. Maß für die Karotinoidkonzentration in der Haut ist die

Differenz in der Signalintensität des rückgestreuten Lichts der beiden Wellenlängen. Die Karotinoidkonzentration wurde auf einer Skala von 0-2 gemessen, wobei der Wert 2 einer Konzentration von 2 nmol/g Haut entspricht.

Im Rahmen der Studie sollten die folgenden Fragen geklärt werden:

1. Bestehen bei Rindern, die unter denselben Umgebungsbedingungen aufgestellt sind und die das gleiche Futter erhalten, Unterschiede in den Messwerten?

J Biomed Opt. 2012 Oct;17(10):101514. doi: 10.1117/1.JBO.17.10.101514.

2. Wie verhalten sich die Messwerte bei wiederholten Messungen bis zu einem Zeitraum von einem Monat, wenn die Tiere unter gleichen Umgebungsbedingungen gehalten werden und das gleiche Futter erhalten?

PLoS One. 2012;7(10):e47706. doi: 10.1371/journal.pone.0047706. Epub 2012 Oct 31.

3. Wie verhalten sich die Messwerte bei kranken Tieren (Milchkühe mit einer Dislocatio abomasi) in der Rekonvaleszenzperiode?

PLoS One. 2012;7(10):e47706. doi: 10.1371/journal.pone.0047706. Epub 2012 Oct 31.

4. Inwiefern korrelieren die Bestimmungen von β -Karotin im Blut mit denen mittels LED-Technologie generierten Messwerten in der Haut?

J Biomed Opt. 2013 Jun;18(6):061219. doi: 10.1117/1.JBO.18.6.061219.

Die Ergebnisse der Studien sind in den drei genannten Veröffentlichungen zusammengefasst, die die Grundlage für die vorliegende kumulative Dissertation darstellen.

1.1. Nichtinvasive reflektionsspektroskopische Messungen der Karotinoide in der Rindereuterhaut

Oxidativer Stress ist derzeit ein aktives Forschungsgebiet im Bereich der Veterinärmedizin. Aus der Humanmedizin liegt zu diesem Thema bereits ein umfangreiches Wissen vor, während sich die Untersuchungen über die Bedeutung des oxidativen Status beim Rind noch im Anfangsstadium befinden (Celi 2010). Aktuell erfolgt die Bestimmung des antioxidativen Status beim Rind invasiv in der Regel mittels Untersuchungen von Blutproben (Hayajneh 2007). Die kostengünstigste Methode zur Ermittlung der Karotinoidkonzentration im Blut ist die Beurteilung der Intensität der Gelbfärbung des Plasmas im Vergleich zu vorgegebenen Standards. Die Validität der Methodik ist jedoch sehr umstritten (Noziere et al. 2006). Bis heute ist die High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC) im Rahmen der Analyse und quantitativen Bestimmung von Karotinoiden in der Veterinärmedizin weit verbreitet (Rodriguez-Amaya 2003). Hierzu ist die Entnahme von Biopsiematerial oder Blut erforderlich. Neben dem Nachteil der Invasivität stellt die HPLC eine sehr zeitaufwendige, kostenintensive und ausschließliche *in vitro*-Messmethode dar (Talwar et al. 1998). Für fortlaufende Untersuchungen ist diese Messmethodik deshalb ungeeignet.

Reflektionsspektroskopische β -Karotinmessungen der Haut am isoliert perfundierten Rindereuter wurden durch Niedorf (2001) in aufwendigen Studien validiert. Die Messergebnisse ergaben eine signifikante Korrelation zu Vergleichsmessungen in Gewebeproben mittels dem Golden Standard, der HPLC ($R=0.711$).

Spektroskopische Messungen ermöglichen wiederholte Untersuchungen *in vivo* bei einer größeren Zahl von Individuen und erlauben insofern die Erforschung der Wirksamkeit und Kinetik von über das Futter supplementierten Karotinoiden, die in der Haut akkumulieren (Blume-Peytavi et al. 2009; Darvin et al. 2007; Darvin et al. 2008; Haag et al. 2010; Lima, Kimball 2011; Mayne et al. 2010; Meinke et al. 2010; Rerksuppaphol, Rerksuppaphol 2006). In den hier beschriebenen Studien kam der Hautscanner (HS) WK1 (Opsolution GmbH, Kassel, Deutschland) zum Einsatz. Er besteht aus einem System von zwei Laser-Dioden, wobei die eine im Absorptionsmaximum der Karotinoide und die andere außerhalb der Karotinoidabsorption Licht ausstrahlt. Die Differenz in der Signalintensität des rückgestreuten Lichts der beiden Wellenlängen dient als Maß für die Karotinoidkonzentration in der Haut.

Ziel der vorliegenden Studie war die Durchführung nichtinvasiver *in vivo*-Messungen der Karotinoidkonzentration in der Rinderhaut mittels des HS.

Messungen an 25 gesunden Rindern (Milchrinder, Zweinutzungsrinder) unterschiedlicher Rassen ergaben hochsignifikante interindividuelle Unterschiede ($p < 0.001$) der Karotinoidkonzentration obwohl die Tiere die gleiche Fütterung erhielten und den gleichen Umgebungsbedingungen ausgesetzt waren. Einen Hinweis, weshalb zwischen den Tieren

Unterschiede bestehen, ergibt sich aus der Anwendung eines für das Rind beschriebenen Wesens- oder Temperamenttests (Grandin 1993). Dieser ermöglichte die Zuordnung der Tiere zu einer Gruppe sensibler und einer Gruppe robuster Rinder. Die Karotinoidkonzentrationen „sensibler“ und „robuster“ Rinder variierten in einer weiteren Messreihe dieser Studie signifikant ($p < 0.05$), wobei im Falle der „robusten“ Rinder höhere Konzentrationen gemessen wurden.

Die Ergebnisse dieser Studie wurden im Journal of Biomedical Optics veröffentlicht:

J. Klein, M.E. Darvin, K. E. Müller, J. Lademann. 2012.

Noninvasive measurements of carotenoids in bovine udder by reflection spectroscopy.

J Biomed Opt. 2012 Oct;17(10):101514. doi: 10.1117/1.JBO.17.10.101514.

1.2. Einfluss von Krankheitszuständen auf die Karotinoidkonzentration am Beispiel der Labmagenverlagerung des Rindes

Beim Menschen konnten Darvin et al. (2006; 2008) nichtinvasiv und in real-time zeigen, dass Stress, inbegriffen Krankheit, die Konzentration der Antioxidantien in der Haut reduziert.

Ergebnisse von Blutuntersuchungen beim Rind deuten ebenfalls auf einen Verbrauch von Antioxidantien und somit reduzierten antioxidativen Status während Krankheits- und Stresszuständen hin, aber auch Weidegang im Sommer und Stallhaltung mit Fütterung konservierter Futtermittel beeinflussen den oxidativen Status. Sattler et al. (2001) konnten nachweisen, dass der antioxidative Status von Kühen mit Labmagenverlagerung, gemessen anhand der Aktivitäten von Superoxid-Dismutase und Glutathion-Peroxidase, durch oxidativen Stress belastet wird. Auch die Trolox Equivalent Antioxidative Capacity-Konzentrationen sind bei kranken Kühen (Klauenerkrankungen, Mastitiden, Metritiden, Labmagenverlagerung etc.) niedriger als die der Kontrollgruppe, wobei der zeitliche Abstand zum Partus vergleichend miteinbezogen wurde (Dinges 2004). Etliche weitere Studien belegen, dass die Karotinoidkonzentration im Blut, sowie der Antioxidantienstatus insgesamt, beim Rind im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen sowie peripartal erniedrigt ist (Heinrichs et al. 2009; Kankofer 2001; Ranjan et al. 2005).

Im Rahmen einer zweiten Studie sollte nichtinvasiv und in real-time zum einen die Stabilität des individuellen AOP's unter standardisierten Bedingungen bei gesunden Rindern über einen längeren Zeitraum untersucht werden, zum anderen sollte geklärt werden, ob sich bei kranken Rindern in der Rekonvaleszenz im Zeitverlauf Unterschiede im AOP ergeben.

Wiederholte Messungen an sechs nicht laktierenden Rindern im Wochenrhythmus über einen Zeitraum von einem Monat ergaben Schwankungen für dasselbe Tier von bis zu 18 %, diese waren jedoch nicht signifikant.

Im Folgenden wurden 23 Rinder mit chirurgisch versorgter Labmagenverlagerung innerhalb von 12 Stunden post operationem sowie in der Rekonvaleszenz und nach Genesung bzw. bis zu deren Tod gemessen. In der Rekonvaleszenzperiode kam es zu einem Anstieg der Karotinoidkonzentration um 53 ± 44 % bei den 20 genesenen Rindern. Ausgangspunkt dieser Berechnung war der innerhalb von 12 Stunden p. op. gemessene Wert. Der Anstieg war hochsignifikant ($p < 0.001$). Bei den drei verstorbenen Rindern kam es zu einem Abfall der Karotinoidkonzentration von 31 ± 27 %.

Die Ergebnisse dieser Studie wurden in PLOS ONE veröffentlicht:

J. Klein, M. E. Darvin, K. E. Müller, J. Lademann. 2012.

Serial non-invasive measurements of dermal carotenoid concentrations in dairy cows following recovery from abomasal displacement.

PLoS One. 2012;7(10):e47706. doi: 10.1371/journal.pone.0047706. Epub 2012 Oct 31.

1.3. Analyse der Korrelation zwischen der Karotinoidkonzentration in der Haut und im Blut beim weiblichen Rind mittels optischer Methoden

Untersuchungen am Menschen ergaben, dass die Ergebnisse von Messungen der Haut- und Blutkarotinoidkonzentration nicht oder nur mäßig korrelieren (Meinke et al. 2010; Stahl et al. 1998). Es zeigte sich, dass die Zeit, die notwendig ist, bis die Antioxidantien nach oraler Aufnahme die Haut als Zielstruktur erreichen, probandenspezifisch unterschiedlich ist und zwischen ein und drei Tagen in Anspruch nimmt (Darwin et al. 2006; Darwin et al. 2008). Es besteht somit eine Zeitverzögerung, mit der die Konzentration der Karotinoide nach Anflutung über das Blut auch in der Haut steigt. Einen Abfall der Hautkarotinoidkonzentration konnten Darwin et al. (2008; 2010) bereits einen Tag nach Stressexposition feststellen.

In den eigenen Untersuchungen war es Ziel festzustellen, ob die spektroskopisch ermittelten Hautkarotinoidkonzentrationen mit den β -Karotin-Konzentrationen im Blut korrelieren. Die Korrelation wurde unter Einbeziehung des Ernährungszustandes der Rinder berechnet, da sich die lipophilen Karotinoide im Fettgewebe akkumulieren (Krinsky et al. 2009).

Ab einem Body-Condition-Score von 2.5 (mäßiger Ernährungszustand) lag eine signifikante Korrelation vor ($R = 0.86$). Unter gleich bleibenden Bedingungen (Fütterung, Haltung, mäßiger bis guter Ernährungszustand) besteht eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Haut- und Blutkarotinoidkonzentrationen d.h. die Messwerte sind im vorgegebenen Rahmen (Ernährungszustand) mit denen der Blutuntersuchungen vergleichbar.

Die Ergebnisse dieser Studie wurden im Journal of Biomedical Optics veröffentlicht:

J. Klein, M. E. Darwin, M. C. Meinke, F. J. Schweigert, K. E. Müller, J. Lademann. 2012.

Analyses of the correlation between dermal and blood carotenoids in female cattle by optical methods.

J Biomed Opt. 2013 Jun;18(6):061219. doi: 10.1117/1.JBO.18.6.061219.

2. Research Papers

2.1. Noninvasive measurements of carotenoids in bovine udder by reflection spectroscopy

J. Klein, M.E. Darvin, K. E. Müller, J. Lademann. 2012.
J Biomed Opt. 2012 Oct;17(10):101514.

You have to buy this part.

<http://dx.doi.org/10.1117/1.JBO.17.10.101514>

2.2. Serial non-invasive measurements of dermal carotenoid concentrations in dairy cows following recovery from abomasal displacement

J. Klein, M. E. Darvin, K. E. Müller, J. Lademann. 2012.

PLoS One. 2012;7(10):e47706.

You have to buy this part.

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0047706>

2.3. Analyses of the correlation between dermal and blood carotenoids in female cattle by optical methods

J. Klein, M. E. Darvin, M. C. Meinke, F. J. Schweigert, K. E. Müller, J. Lademann. 2012.
J Biomed Opt. 2013 Jun;18(6):061219.

You have to buy this part.

<http://dx.doi.org/10.1117/1.JBO.18.6.061219>

3. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der Einsatz des Hautscanners WK1 (Opsolution GmbH, Kassel, Deutschland) beim Rind möglich ist und ob mittels Messung der antioxidativen Karotinoide in der Euterhaut des Rindes Krankheitszustände nichtinvasiv und in real-time diagnostiziert werden können. Ebenso sollte geklärt werden, inwieweit Korrelationen zwischen der Bestimmung der β -Karotinkonzentration im Blut und den Messungen in der Haut bestehen.

Der HS besteht aus einem System von zwei Laser-Dioden, wobei die eine im Absorptionsmaximum der Karotinoide und die andere außerhalb der Karotinoidabsorption Licht ausstrahlt. Die Differenz in der Signalintensität des rückgestreuten Lichts der beiden Wellenlängen dient als Maß für die Karotinoidkonzentration in der Haut.

Die Ergebnisse der ersten Publikation zeigten, dass mit dem HS reproduzierbare Karotinoidmessungen an der Euterhaut von Rindern durchgeführt werden können. Hiermit eröffnen sich neue Perspektiven um die Ursachen und die Bedeutung von oxidativem Stress im Zusammenhang mit hohen Milchleistungen, Krankheit oder umgebungsbedingten Stressoren, zu untersuchen.

Im ersten Telexperiment der ersten Publikation variierten die Karotinoidkonzentrationen gleicher Hautareale bei den Rindern interindividuell hochsignifikant. U. a. Lotthammer et al. (1977) und Noziere et al. (2006) stellten ebenso eine große interindividuelle Variabilität der β -Karotinkonzentration im Blutplasma fest. Lotthammer et al. (1977) sieht als ursächlich dafür ein individuell bedingtes, unterschiedliches Resorptions- und/oder Mobilisierungsvermögen der Karotinoide und weist zusätzlich auf die Bedeutung der Schilddrüsenfunktion für die Resorption des β -Karotins hin. Auch bei den von Niedorf (2001) durchgeführten reflektionspektroskopischen Messungen am isoliert perfundierten Rindereuter zeigten sich bei allen Versuchen starke Schwankungen der dermalen β -Karotinkonzentration zwischen den Eutern verschiedener Tiere. Untersuchungen der menschlichen Haut ergaben ebenfalls starke Unterschiede der β -Karotin- und Lykopinkonzentration gleicher Hautareale bei verschiedenen Probanden (Darvin et al. 2005b; Darvin et al. 2009). In der menschlichen Haut hängt die Verteilung und Konzentration der Karotinoide stark vom Gesundheitszustand, der Ernährung, der Lebensführung, der Körperregion und dem Einfluss von Stressfaktoren ab (Darvin et al. 2005a; Darvin et al. 2008; Mayne et al. 2010).

Ob und inwieweit die enormen interindividuellen Differenzen in dieser Publikation auf die unterschiedlichen Laktationsstadien, Rassen sowie das variierende Alter zurückzuführen sind, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Im zweiten Telexperiment der ersten Publikation ergaben Wiederholungsmessungen der Hautkarotinoidkonzentration bei zehn gesunden Rindern keine signifikanten Änderungen der Messwerte über einen Zeitraum von vier Tagen. Kurzfristig scheint folglich bei Einhaltung konstanter Umgebungsbedingungen und Abwesenheit von Krankheit die Karotinoidkonzentration in der Euterhaut konstant zu bleiben, eine Beobachtung die für Messungen am Menschen ebenfalls bestätigt werden konnte (Darvin et al. 2008).

Bei mit Hilfe eines standardisierten Temperamenttests selektierten Rindern lag die Hautkarotinoidkonzentration der „robusten“ Rinder signifikant über dem Niveau der „sensiblen“. Dieses Ergebnis könnte als Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen dem Wesen eines Tieres und seinem oxidativen Status angesehen werden, müsste aber an einer größeren Tierzahl verifiziert werden. Da für das Rind ein Zusammenhang zwischen Temperament und Produktivität nachgewiesen ist (Voisinet et al. 1997a; Voisinet et al. 1997b), ist dies für die Tierproduktion von besonderem Interesse. Bei ruhigeren Rindern zeigten sich höhere Mastleistungen und eine bessere Fleischqualität des Schlachtkörpers.

In der zweiten Publikation konnte nachgewiesen werden, dass sich das AOP, gemessen anhand der Karotinoidkonzentration der Haut, im Falle einer positiven Entwicklung in der Rekonvaleszenzphase nach operativer Behebung einer Labmagenverlagerung bei der Milchkuh stabilisiert.

Im ersten Telexperiment der zweiten Publikation wurden über mehrere Wochen unter standardisierten Bedingungen Messungen an Rindern durchgeführt. Wie auch in der ersten Publikation zeigte sich unter konstanten Bedingungen ein stabiles AOP. Die im zweiten Telexperiment der zweiten Publikation erfolgten Messungen an Rindern nach Labmagenoperationen ergaben im genesenen Zustand eine statistisch hoch signifikante Differenz der Karotinoidkonzentration im Vergleich zum Operationszeitpunkt. Der durchschnittliche Anstieg der Karotinoidkonzentration der 20 genesenen Rinder lag bei 53 ± 44 % verglichen mit dem Ausgangswert. Der Anstieg war hoch signifikant ($p < 0.001$). Bei den drei im Verlauf der Studie gestorbenen bzw. euthanasierten Rindern kam es zu einem Abfall der Karotinoidkonzentration um 31 ± 27 %.

Das stabile AOP unter konstanten Bedingungen einerseits und der hoch signifikante Anstieg der Karotinoidkonzentration nach einer Rekonvaleszenzphase andererseits verdeutlichen sehr gut die zukünftigen Möglichkeiten, die der HS bietet.

Krankheit und extremer Stress resultierten auch bei nichtinvasiven Untersuchungen am Menschen in einer reduzierten Konzentration der Antioxidantien in der Haut (Darvin et al.

2006; Darvin et al. 2008). Es ist anzunehmen dass die reduzierte Futtermittelaufnahme der Rinder und der mit dem Krankheitsgeschehen einhergehende Stress hauptsächlich für die erniedrigten Karotinoidkonzentrationen sind. Zusätzlich zu bedenken ist die enorme Stoffwechsellistung der Kuh um dem, wenn auch während Krankheitszuständen herabgesetzten, angezüchteten sehr großen Milchleistungspotenzial gerecht zu werden. Weitere Studien müssen zeigen ob der HS geeignet ist, zeitaufwendige andere Methoden zur Frühdiagnostik von Krankheiten durch tägliche Melkstandmessungen zu ersetzen.

In der dritten Publikation zeigten sich, wie auch in den ersten beiden Publikationen, signifikante interindividuelle Unterschiede der dermalen Karotinoidkonzentration. Auch die absolute β -Karotinkonzentration im Blut variierte interindividuell enorm. Über die Ursachen der großen interindividuellen Differenzen unter denselben Umgebungsbedingungen und unter gleicher Fütterung stehend gibt es bisher nur Vermutungen, wie bereits an anderer Stelle erläutert (Lotthammer et al. 1977; Noziere et al. 2006).

Eine signifikante Korrelation ($R = 0.86$) zwischen Haut- und Blutwerten lag erst ab einem mäßigen Ernährungszustand der Rinder vor. Dennoch korrelierte die Hautkarotinoidkonzentration bei diesen Tieren nicht exakt mit der Blutkonzentration von β -Karotin, was Meinke et al. (2010) und Stahl et al. (1998) ebenso für den Menschen feststellen konnten. Es handelt sich bei dem Blut und der Haut um zwei Kompartimente, die verschiedenen Gesetzmäßigkeiten gehorchen.

Ein kachektischer oder schlechter Ernährungszustand, wie bei den acht Rindern dieser Studie, ist unerwünscht und kann auf pathologische Zustände hinweisen.

Unter stabilen Bedingungen korrelieren Haut- und Blutwerte miteinander, so dass der HS gut geeignet ist, um die Karotinoidkonzentration beim Rind zu messen.

Weitere Untersuchungen mit Rindern die eine hohe Karotinoidkonzentration in Haut oder Blut aufweisen sollten jedoch folgen, um die erhaltene Korrelation zu präzisieren.

Alle drei Publikationen zeigen, dass der auf reflektionsspektroskopischen Messungen basierende HS ein nichtinvasives Monitoring des AOP's ermöglicht. Das AOP stabilisiert sich in der Rekonvaleszenzphase, ein Hinweis darauf, dass Krankheit zu einem Verlust an AOP führt, jedoch kann ebenso eine defizitäre Versorgung mit Karotinoiden (Winter, schlechte Silagen) zu einer Verminderung des AOP führen.

Es gibt keinen Karotinoid-Grenzwert der gesunde von gestressten (erkrankten) Tieren unterscheidet, da die individuellen Messwerte von der Sensibilität der Tiere abhängen. Somit kann ein jedes Tier nur als eigene Kontrolle fungieren und der Verlauf der Messwerte Hinweise auf äußere Einflüsse geben. Die Erkennung von "Krankheit", die das System zur Auslösung eines „Alarms“ veranlassen würde, erfordert die Entwicklung von Algorithmen

basierend auf weiteren Beobachtungen. Dies erfordert eine enge Kooperation von Informatikern und Experten, die z.B. laktationsbedingte Schwankungen und routinemäßige Stresszustände (Herdenklauenschnitt) einbeziehen.

Eine relativ einfache Möglichkeit der Umsetzung eines solchen Systems wäre der Einbau eines Hautscanners als miniaturisiertes System in die Melkanlage. Ausgehend von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurden die ersten Entwicklungsarbeiten von der Herstellerfirma des HS zur Integration des Messsystems in Melkanlagen begonnen.

4. Zusammenfassung

Julian Klein: Nichtinvasive Bestimmung der antioxidativen Karotinoide in der Haut des Rindes mittels LED-Technologie

Die veränderten Bedingungen im Gesundheitsmanagement von Milchrindern mit Fokussierung auf Krankheitsprävention und Bestandsbetreuung lassen der Früherkennung von Krankheiten eine große Bedeutung zukommen. Die Entwicklungen auf dem Gebiet des Precision Dairy Farming gehen in diese Richtung.

Ziel der Arbeit war es daher zu untersuchen, ob die Diagnostik von Krankheitszuständen anhand von Langzeitmessungen der Karotinoidkonzentration in der Rindereuterhaut mit Hilfe des neu entwickelten Hautscanners WK1 (Opsolution GmbH, Kassel, Deutschland) realisiert werden kann.

In der ersten Publikation erfolgten im ersten Telexperiment Messungen an 25 klinisch gesunden Rindern, die in einem Stall unter gleichen Bedingungen und mit gleicher Fütterung gehalten wurden. Die Tiere unterschieden sich hinsichtlich des Laktationsstadiums, Alters und der Rasse. Bei allen untersuchten Tieren konnte eine Karotinoidkonzentration reproduzierbar in der Euterhaut nachgewiesen werden. Für den HS ergab sich bei Wiederholungsmessungen eine Abweichung von 12 %. Die mittlere Variation der Karotinoidwerte an drei benachbarten Messpunkten auf der Euterhaut betrug 17 %. Die Karotinoidkonzentrationen gleicher Hautareale variierten interindividuell hochsignifikant ($p < 0.001$). Der Median lag bei 0.88 ± 0.25 a.u. (arbitrary units = relative Einheiten). Die Variationsbreite lag bei 1.06 a.u., somit war der höchste Wert fast viermal so groß wie der niedrigste Messwert. Die mittlere Standardabweichung betrug 0.05 a.u. Zwischen täglicher Milchleistung und Hautkarotinoidkonzentration bestand nur eine sehr schwache Korrelation ($R^2 < 0.2$).

Im zweiten Telexperiment der ersten Publikation ergaben Messungen an zehn institutseigenen klinisch gesunden Rindern über vier Tage unter standardisierten Bedingungen keine signifikanten Unterschiede der Karotinoidkonzentration zwischen den einzelnen Messzeitpunkten. Die mittlere Abweichung der Karotinoidkonzentration über den gemessenen Zeitraum lag bei 10 %.

Um die Auswertungsobjektivität im Rahmen des Temperamenttests zu überprüfen, erfolgte die Einstufung der 25 Rinder aus dem ersten Telexperiment der ersten Publikation parallel von zwei unabhängigen Personen. Die Ergebnisse ergaben keine signifikanten Unterschiede. Mit Hilfe dieses Temperamenttests wurden aus einer Gruppe von 12 Tieren sechs als „sensibel“ und sechs als „robust“ klassifiziert. Die Mediane der beiden Gruppen unterschieden sich signifikant ($p < 0.05$). Das allgemeine Niveau (Median für $n = 6$) der

robusten Rinder lag bei 1.11 ± 0.24 a.u. Bei den sensiblen Rindern lag das allgemeine Niveau der Karotinoide bei 0.72 ± 0.10 a.u.

Die zweite Publikation erbrachte bei Messungen über vier Wochen an sechs institutseigenen Rindern erneut den Nachweis, dass gesunde Rinder unter konstanten Haltungsbedingungen ein konstantes AOP aufweisen. Die Abweichungen betragen im Zeitverlauf ≤ 18 %.

Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgten Messungen an 23 Rindern die an linksseitiger Labmagenverlagerung erkrankt waren innerhalb von 12 Stunden p. op. sowie in der Rekonvaleszenz und nach Genesung. Die operative Behebung der Verlagerung wurde mittels Methode nach Janowitz (n=6) bzw. Methode nach Dirksen (n=17) durchgeführt. 18 der 20 genesenen Rinder zeigten einen Anstieg der Hautkarotinoidkonzentration verglichen mit den Ausgangswerten. Es kam bei diesen Tieren 20 Tage p. op. zu einem durchschnittlichen Anstieg der Karotinoidkonzentration um 53 ± 44 % im Vergleich zum Ausgangswert. Die Differenz war statistisch hoch signifikant ($p < 0.001$).

Bei den drei im Verlauf der Studie gestorbenen bzw. euthanasierten Tieren fiel die Karotinoidkonzentration bis zur letzten Messung vor dem Tod um 31 ± 27 % ab, der Abfall war nicht signifikant.

In der dritten Publikation variierten die dermalen Karotinoidkonzentrationen der 20 gesunden Rinder von 0.39 a.u. bis zu 1.53 a.u., die interindividuellen Unterschiede waren hochsignifikant ($p < 0.001$). Der Median (n=20) der Hautkarotinoidkonzentration lag bei 0.80 ± 0.32 a.u., die β -Karotinkonzentration im Plasma lag zwischen 0.92 mg/L und 5.22 mg/L.

Der Vergleich der Haut- und Plasmawerte wurde unter Einbeziehung der Rückenfettdicke der Tiere durchgeführt. Ein Vergleich der Werte aller 20 Rinder ergab nur eine schwache Korrelation ($R = 0.23$). Der Korrelationskoeffizient der acht Tiere mit sehr schlechtem bis schlechtem Ernährungszustand lag bei $R = -0.23$. Der Korrelationskoeffizient der 12 Rinder mit mäßigem bis adipösem Ernährungszustand lag bei $R = 0.86$, die Korrelation war signifikant ($p < 0.05$).

Sowohl die erste als auch die zweite Publikation konnten zeigen, dass sich die individuellen Karotinoidwerte der Rinder über einen längeren Zeitraum unter sich nicht verändernden äußeren Bedingungen nicht signifikant ändern. Die während der Rekonvaleszenz untersuchten Rinder der zweiten Publikation dagegen wiesen einen hoch signifikanten Anstieg der Karotinoidkonzentration auf.

Zusammenfassend kann daher aufgrund der Ergebnisse aller drei Publikationen die Messung mittels HS als geeignet eingestuft werden, um die Karotinoidkonzentration beim

Rind zu messen und mithilfe von Wiederholungsmessungen Rückschlüsse auf Krankheitszustände zu ziehen.

Aufgrund der individuellen Messwerte der Einzeltiere, muss jedes der Tiere als seine eigene Kontrolle dienen. Besonders für die Betreuung großer Bestände könnte die Integration des HS in die Melkanlage zukünftig die Früherkennung von erkrankten, klinisch noch unauffälligen, Tieren ermöglichen.

5. Summary

Julian Klein: Non-invasive determination of antioxidative carotenoids in the skin of dairy cows by means of LED-Technology

The modified requirements in the health management of dairy cows with a focus on the prevention of disease and medical care of the herd, allowing the early recognition of disease, have become extremely important. The progress, which has been made in the field of Precision Dairy Farming, shows a tendency in this direction.

Therefore, the aim of the study was to examine, whether the diagnosis of medical conditions by means of long-term measurements of the carotenoid concentration in bovine udder skin, with the help of the newly-developed skin scanner WK1 (Opsolution GmbH, Kassel, Germany) could be realized.

The first publication was concerned primarily with partial experimental measurements on 25 clinically healthy cows, which were kept in a barn under the same conditions and with the same feed. The animals differed in regard to the stage of lactation, age and breed. In all the animals examined, a carotenoid concentration, reproducible in the udder skin, could be detected. In the case of the skin scanner, a follow-up measurement showed a deviation of 12 %. The mean variation of the carotenoid values on three adjacent measuring points on the udder amounted to 17 %. The carotenoid concentrations on the same skin areas varied inter-individually, highly significant ($p < 0.001$). The median was 0.88 ± 0.25 a.u. (arbitrary units = relative units). The variation range was 1.06 a.u., whereby the highest value was nearly four times as high as the lowest value. The mean standard deviation was 0.05 a.u. Comparing the daily milk output and the carotenoid concentration of the skin, only an extremely low correlation was evident ($R^2 < 0.2$).

The second partial experiment of the first publication dealt with measurements acquired on ten clinically healthy cows, owned by the institute. The measurements were undertaken for a period of four days under standardized conditions, whereby no significant differences in the carotenoid concentration between the individual measuring times could be established. The mean deviation of the carotenoid concentration during the duration of the measurements was 10 %.

In order to prove the objectivity of the analysis in the frame of a temperament test, the 25 cows examined in the first partial experiment of the first publication were classified parallel by two independent persons. The results showed no significant differences. With the help of the temperament test, out of a group of 12 animals, 6 were classified as “sensitive” and 6 as “robust”. The median of both groups differed significantly ($p < 0.05$). The common level

(median of $n = 6$) of the robust cattle was 1.11 ± 0.24 a.u. In the case of the sensitive cattle, the common level of carotenoids was 0.72 ± 0.10 a.u.

The second publication, taking into account the measurements over a period of four weeks on the six cows owned by the institute, again supplied the confirmation that healthy cows under constant husbandry conditions exhibited a constant antioxidant potential. During the time elapsed, the deviations were shown to be $\leq 18\%$.

Based on the aforementioned results, measurements were undertaken on 23 cows, suffering from a left displaced abomasum, within 12 hours p. op. as well as during convalescence and following recovery. The operative adjustment of the displaced abomasum was performed by means of the Janowitz method ($n=6$), or the Dirksen method ($n=17$), respectively. 18 of the 20 recuperated cows showed an increased skin carotenoid concentration as compared to the initial values. In the case of these animals, 20 days p. op. an average increase in carotenoid concentration occurred in the region of $53 \pm 44\%$, as compared to initial values. The difference was statistically highly significant ($p < 0.001$).

Referring to the three dead or euthanized animals, which died during the course of the study, the last carotenoid concentration measurement before death had decreased to $31 \pm 27\%$, which was insignificant.

When considering the third publication, the dermal carotenoid concentrations of the 20 healthy cattle was 0.39 a.u. up to 1.53 a.u., the inter-individual differences were highly significant ($p < 0.001$). The median ($n = 20$) of the skin carotenoid concentration was in the range of 0.80 ± 0.32 a.u., whereby the β -carotenoid concentration in the plasma showed values of 0.92 mg/L and 5.22 mg/L.

The comparison of the skin and plasma parameters was performed under the inclusion of the backfat thickness of the animals. A comparison of the parameters of all 20 cows showed only a weak correlation ($R = 0.23$). The correlation coefficient of the eight animals, which were in a very poor or poor nutritional condition showed a value of $R = -0.23$. The correlation coefficient of the 12 animals with a moderate to obese nutritional condition was at $R = 0.86$, the correlation was significant ($p < 0.05$).

The first, as well as the second publication were able to show that the individual carotenoid values of the cows over a longer period, on account of the unchanged external conditions, had not significantly altered. However, the cattle that were examined during convalescence had on the other hand a highly significant increase in carotenoid concentration, as reported in the second publication.

In summarizing, taking into account the results cited in all three publications, wherein the measurements performed by means of the skin scanner were classified as suitable, in order to measure the carotenoid concentration supported by repeated measurements, and therefore to establish conclusions regarding the state of disease.

On account of the individual values of each animal, every single animal has to serve as its own control. In particular in the care of a high number of cattle, the integration of the skin scanner in the milking plant, would in the future also enable the early diagnosis of clinically inconspicuous animals.

6. Literaturverzeichnis

Blume-Peytavi, Ulrike; Rolland, Anne; Darvin, Maxim E.; Constable, Anne; Pineau, Isabelle; Voit, Christiane et al. (2009): Cutaneous lycopene and beta-carotene levels measured by resonance Raman spectroscopy: high reliability and sensitivity to oral lactycopene deprivation and supplementation. In: *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e*, Jg. 73, H. 1, S. 187–194. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.ejpb.2009.04.017.

Britton, G. (1995): Structure and properties of carotenoids in relation to function. In: *FASEB J.*, Jg. 9, H. 15, S. 1551–1558. Online verfügbar unter <http://www.fasebj.org/cgi/content/abstract/9/15/1551>.

Celi, P. (2010): Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. In: *Immunopharmacology and immunotoxicology*. Online verfügbar unter doi:10.3109/08923973.2010.514917.

Chew, B. P. (1995): Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. In: *The Journal of nutrition*, Jg. 125, H. 6 Suppl, S. 1804S-1808S.

Darvin, M.; Gersonde, I.; Meinke, M.; Sterry, W.; Lademann, J. (2005a): Non-invasive in vivo determination of the carotenoids beta-carotene and lycopene concentrations in the human skin using the Raman spectroscopic method. In: *Journal of Physics*, H. 38, S. 2696–2700. Online verfügbar unter <http://www3.interscience.wiley.com/journal/112650938/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>.

Darvin, M. E.; Gersonde, I.; Albrecht, H.; Gonchukov, S. A.; Sterry, W.; Lademann, J. (2005b): Determination of Beta Carotene and Lycopene Concentrations in Human Skin Using Resonance Raman Spectroscopy. In: *Laser Physics*, Jg. 15, H. 2, S. 295–299.

Darvin, M.; Zastrow, L.; Sterry, W.; Lademann, J. (2006): Effect of supplemented and topically applied antioxidant substances on human tissue. In: *Skin pharmacology and physiology*, Jg. 19, H. 5, S. 238–247. Online verfügbar unter doi:10.1159/000093979.

Darvin, M. E.; Gersonde, I.; Albrecht, H.; Sterry, W.; Lademann, J. (2007): Resonance Raman spectroscopy for the detection of carotenoids in foodstuffs. Influence of the nutrition on the antioxidative potential of the skin. In: *Laser Phys. Lett.*, Jg. 4, H. 6, S. 452–456. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1002/lapl.200710004>.

Darvin, Maxim E.; Fluhr, J. W.; Caspers, P.; van der Pool, A.; Richter, H.; Patzelt, Alexa et al. (2009): In vivo distribution of carotenoids in different anatomical locations of human skin:

comparative assessment with two different Raman spectroscopy methods. In: *Experimental dermatology*. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1600-0625.2009.00946.x.

Darvin, Maxim E.; Patzelt, Alexa; Knorr, Fanny; Blume-Peytavi, Ulrike; Sterry, Wolfram; Lademann, Juergen (2008): One-year study on the variation of carotenoid antioxidant substances in living human skin: influence of dietary supplementation and stress factors. In: *Journal of biomedical optics*, Jg. 13, H. 4, S. 44028. Online verfügbar unter doi:10.1117/1.2952076.

Darwin, M.; Schanzer, S.; Teichmann, A.; Blume-Peytavi, U.; Sterry, W.; Lademann, J. (2006): [Functional food and bioavailability in the target organ skin]. In: *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, Jg. 57, H. 4, S. 286, 288-90. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00105-006-1093-z.

Dinges, G. (2004): Untersuchungen zum antioxidativen Status bei verschiedenen Formen der Dislocatio abomasi des Rindes im Blut der V. jugularis und der V. epigastrica. Dissertation. Betreut von M. Füll. Leipzig. Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, Medizinische Tierklinik.

Grandin, T. (1993): Behavioral agitation during handling of cattle is persistent over time. In: *Applied Animal Behaviour Science*, Jg. 36, H. 1, S. 1–9. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T48-49NRS09-12W/2/a57df2a98db7c13793a155e0191aed9d>.

Haag, S. F.; Bechtel, A.; Darwin, M. E.; Klein, F.; Groth, N.; Schafer-Korting, M. et al. (2010): Comparative study of carotenoids, catalase and radical formation in human and animal skin. In: *Skin pharmacology and physiology*, Jg. 23, H. 6, S. 306–312. Online verfügbar unter doi:10.1159/000313539.

Hayajneh, Firas Mahmoud Faleh (2007): Untersuchung zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität des Blutes von Milchkühen. Dissertation. Betreut von R. Staufenbiel. Berlin. Freie Universität Berlin, Klinik für Klautiere.

Heinrichs, A. J.; Costello, S. S.; Jones, C. M. (2009): Control of heifer mastitis by nutrition. Special Issue: Heifer and CNS Mastitis. In: *Veterinary Microbiology*, Jg. 134, H. 1-2, S. 172–176. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TD6-4TF2J2V-9/2/01b457c8a25830b7a2543b8b99814260>.

Hesterberg, K. (2006): Raman- spektroskopische Untersuchungen zu den Veränderungen des Gehalts an Carotinoiden im Produktlebenszyklus von Eiern von der landwirtschaftlichen Produktion bis zum Verzehr. Dissertation. Betreut von A. Hartwig, Knorr D. und J. Lademann. Berlin. Technische Universität Berlin, Fakultät III- Prozesswissenschaften.

- Kankofer, M. (2001): Non-enzymatic antioxidative defence mechanisms against reactive oxygen species in bovine-retained and not-retained placenta: vitamin C and glutathione. In: *Reproduction in domestic animals*, Jg. 36, H. 3-4, S. 203–206.
- Krinsky, N. I.; Mayne, Susan T.; Sies, H. (2009): *Carotenoids in Health and Disease*: Taylor & Francis.
- Lademann, Juergen; Meinke, Martina C.; Sterry, Wolfram; Darvin, Maxim E. (2011): Carotenoids in human skin. In: *Experimental Dermatology*, Jg. 20, H. 5, S. 377–382. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01189.x>.
- Lima, X. T.; Kimball, A. B. (2011): Skin carotenoid levels in adult patients with psoriasis. In: *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, Jg. 25, H. 8, S. 945–949. Online verfügbar unter [doi:10.1111/j.1468-3083.2010.03888.x](https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2010.03888.x).
- Lotthammer, K. H.; Ahlswede, L.; Meyer H. (1977): Untersuchungen über eine spezifische, Vitamin A-unabhängige Wirkung des β -Carotins auf die Fertilität des Rindes. 3. Mitteilung: Blutuntersuchungen. In: *Dtsch. Tierärztl. Wochenschrift*, Jg. 84, H. 6, S. 220–226.
- Mayne, Susan T.; Cartmel, Brenda; Scarmo, Stephanie; Lin, Haiqun; Leffell, David J.; Welch, Erin et al. (2010): Noninvasive assessment of dermal carotenoids as a biomarker of fruit and vegetable intake. In: *The American Journal of Clinical Nutrition*, Jg. 92, H. 4, S. 794–800. Online verfügbar unter <http://www.ajcn.org/content/92/4/794.abstract>.
- Meinke, Martina C.; Darvin, Maxim E.; Vollert, Henning; Lademann, Jürgen (2010): Bioavailability of natural carotenoids in human skin compared to blood. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Jg. 76, H. 2, S. 269–274. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T6C-509W74C-1/2/a803e709cc5cbd4c5d0c4f09c0d352f4>.
- Meyer, Karl (2002): Carotinoide - Bedeutung und technische Synthesen: Farbenfrohe Antioxidantien. In: *Chemie in unserer Zeit*, Jg. 36, H. 3, S. 178–192. Online verfügbar unter <http://www3.interscience.wiley.com/journal/94517606/abstract>.
- Miller, J. K.; Brzezinska-Slebodzinska, E.; Madsen, F. C. (1993): Oxidative Stress, Antioxidants, and Animal Function. In: *J. Dairy Sci.*, Jg. 76, H. 9, S. 2812–2823. Online verfügbar unter <http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/76/9/2812>.
- Niedorf, Frank (2001): Entwicklung eines Verfahrens zur quantitativen Auswertung nicht-invasiver reflexionsspektroskopischer Messungen von Beta-Carotin in der Haut. Dissertation. Betreut von M. Kietzmann. Hannover. Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie.

Nitschke, Nicole (2005): Der Einfluss der Carotinoide Lycopin und Lutein auf den antioxidativen Status des Hundes. Dissertation. Betreut von W. A. Rambeck. München. LMU München: Tierärztliche Fakultät, Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung. Online verfügbar unter <http://edoc.ub.uni-muenchen.de/3541/>.

Noziere, P.; Grolier, P.; Durand, D.; Ferlay, A.; Pradel, P.; Martin, B. (2006): Variations in carotenoids, fat-soluble micronutrients, and color in cows' plasma and milk following changes in forage and feeding level. In: *Journal of dairy science*, Jg. 89, H. 7, S. 2634–2648.

Rakes, A. H.; Owens, M. P.; Britt, J. H.; Whitlow, L. W. (1985): Effects of adding beta-carotene to rations of lactating cows consuming different forages. In: *Journal of dairy science*, Jg. 68, H. 7, S. 1732–1737. Online verfügbar unter doi:10.3168/jds.S0022-0302(85)81019-5.

Ranjan, R.; Swarup, D.; Naresh, R.; Patra, R. C. (2005): Enhanced erythrocytic lipid peroxides and reduced plasma ascorbic acid, and alteration in blood trace elements level in dairy cows with mastitis. In: *Veterinary research communications*, Jg. 29, H. 1, S. 27–34.

Reksuppaphol, Sanguansak; Reksuppaphol, Lakkana (2006): Effect of fruit and vegetable intake on skin carotenoid detected by non-invasive Raman spectroscopy. In: *Journal of the Medical Association of Thailand*, Jg. 89, H. 8, S. 1206–1212.

Rodriguez-Amaya, D. B. (2003): Food carotenoids: analysis, composition and alterations during storage and processing of foods. In: *Forum of nutrition*, Jg. 56, S. 35–37.

Sattler, T. (2001): Untersuchungen zum antioxidativen Status von Kühen mit Labmagenverlagerungen. Dissertation. Betreut von M. Füll. Leipzig. Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, Medizinische Tierklinik.

Schwarz, F. (2009): *Stressmanagement*. 1. Auflage: Grin Verlag.

Schweigert, F. J.; Immig, I. (2007): Rapid assessment of β -carotene status. In: *International Dairy Topics*, Jg. 6, H. 4, S. 15–17.

Sies, H.; Stahl, W. (1995): Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. In: *The American journal of clinical nutrition*, Jg. 62, H. 6 Suppl, S. 1315S-1321S.

Spilke, Joachim; Büscher, Wolfgang; Doluschitz, Reiner; Fahr, Rolf-Dieter; Lehner, Wolfgang (03): Precision Dairy Farming - integrativer Ansatz für eine nachhaltige Milcherzeugung. In: *Zeitschrift für Agrarinformatik*, Jg. 2, S. 19–25.

Stahl, Wilhelm; Heinrich, Ulrike; Jungmann, Holger; Laar, Jutta von; Schietzel, Michael; Sies, Helmut; Tronnier, Hagen (1998): Increased Dermal Carotenoid Levels Assessed by

Noninvasive Reflection Spectrophotometry Correlate with Serum Levels in Women Ingesting Betatene. In: *The Journal of Nutrition*, Jg. 128, H. 5, S. 903–907. Online verfügbar unter <http://jn.nutrition.org/content/128/5/903.abstract>.

Talwar, D.; Ha, T. K.; Cooney, J.; Brownlee, C.; O'Reilly, D. S. (1998): A routine method for the simultaneous measurement of retinol, alpha-tocopherol and five carotenoids in human plasma by reverse phase HPLC. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, Jg. 270, H. 2, S. 85–100.

Voisinet, B. D.; Grandin, T.; Tatum, J. D.; O'Connor, S. F.; Struthers, J. J. (1997b): Feedlot cattle with calm temperaments have higher average daily gains than cattle with excitable temperaments. In: *J. Anim Sci.*, Jg. 75, H. 4, S. 892–896. Online verfügbar unter <http://jas.fass.org/cgi/content/abstract/75/4/892>.

Voisinet, B. D.; Grandin, T.; O'Connor, S. F.; Tatum, J. D.; Deesing, M. J. (1997a): Bos indicus-cross feedlot cattle with excitable temperaments have tougher meat and a higher incidence of borderline dark cutters. In: *Meat Science*, Jg. 46, H. 4, S. 367–377. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T9G-3RJR1S6-G/2/c21b5451bf6e356227832a46a7f29653>.

7. Publikationsverzeichnis

J. Klein, M.E. Darvin, K. E. Müller, J. Lademann. 2012:

Noninvasive measurements of carotenoids in bovine udder by reflection spectroscopy.

J Biomed Opt. 2012 Oct;17(10):101514. doi: 10.1117/1.JBO.17.10.101514.

J. Klein, M. E. Darvin, K. E. Müller, J. Lademann. 2012:

Serial non-invasive measurements of dermal carotenoid concentrations in dairy cows following recovery from abomasal displacement.

PLoS One. 2012;7(10):e47706. doi: 10.1371/journal.pone.0047706. Epub 2012 Oct 31.

J. Klein, M. E. Darvin, M. C. Meinke, F. J. Schweigert, K. E. Müller, J. Lademann. 2012:

Analyses of the correlation between dermal and blood carotenoids in female cattle by optical methods.

J Biomed Opt. 2013 Jun;18(6):061219. doi: 10.1117/1.JBO.18.6.061219.

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Ing. Lademann für die Überlassung des Themas und die hervorragende fachliche Hilfestellung sowie ständige Hilfsbereitschaft bei auftretenden Problemen bedanken. Darüber hinaus hervorheben möchte ich die warmherzige und motivierende Arbeitsatmosphäre während der Anfertigung der Dissertation.

Mit großem Respekt spreche ich auch Frau Prof. Dr. Müller meinen Dank für die jederzeit freundliche und hilfreiche Unterstützung und die vielen Anregungen aus.

Mein großer Dank gilt auch Herrn Dr. Dr. Darwin für die menschlich sehr angenehme fachliche Hilfe bei der Einarbeitung in die Messmethodik und auch während der Dauer der gesamten Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Schweigert für die hilfreiche Analyse der Blutproben.

Insgesamt möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Klinik für Klauentiere als auch der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Bereich für Experimentelle und angewandte Physiologie der Haut der Charité sehr herzlich für das ausgesprochen gute Arbeitsklima und ihre allzeit freundliche Hilfestellung bedanken.

Vielen Dank auch an die Mitarbeiter der Milchviehbetriebe für die gute Zusammenarbeit.

Zum Schluss möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie für ihre vielfältige Unterstützung während meiner Studien- und Promotionszeit bedanken.

9. Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 17.08.13

Julian Klein