

Aus dem Institut für Tierernährung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Effekte der Fütterung von Natriumselenit und Selenhefe an Milchkühe auf
immunologische Parameter in der Milch und Verfügbarkeit des Selens bei Verfütterung
an Absetzferkel

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

vorgelegt von Daniela Dinse
Tierärztin aus Hilden

Berlin 2010

Journal Nr.: 3471

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Rudolf Staufenbiel
Dritter Gutachter: PD Dr. Helmut Schafft

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
blood, cows, immune system, milk, piglets, selenium

Tag der Promotion: 23.08.2011

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: 978-3-86387-065-2

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011

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 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Tabellen	IV
Abbildungen	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
2 Literatur	2
2.1 Selen	2
2.2 Selen in der Tierernährung	2
2.2.1 Auswirkungen von Selen auf das Immunsystem von verschiedenen Tierarten	3
2.2.2 Auswirkungen von Selen auf immunologische Parameter bei Rindern	3
2.2.3 Auswirkungen von Selen auf die Selenkonzentration und weitere Parameter im Blut von Schweinen	5
2.2.4 Auswirkungen von Selen auf das Immunsystem bei Schweinen	6
2.2.5 Verfügbarkeit von Selen aus der Kuhmilch bei Schweinen und anderen Tierarten	6
2.3 Prinzipieller Aufbau des Immunsystems.....	7
2.4 Differenzierungsantigene der Lymphozyten beim Rind	8
2.5 Differenzierungsantigene der Lymphozyten beim Schwein	9
2.6 Abwehrmechanismen der Milchdrüse beim Rind	11
2.7 Somatische Zellzahl (SCC).....	11
2.8 Die Auswirkungen der unterschiedlichen Laktationsphasen auf die Immunzellen im peripheren Blut von Milchkühen	12
2.9 Die Besonderheiten der Entwicklung des Immunsystems bei jungen Ferkeln	13
2.10 Fragen, die durch die Studie beantwortet werden sollen.....	14
3 Material und Methoden	15
3.1 Versuchstiere.....	15
3.2 Haltung	15
3.3 Versuchsfutter und Fütterung.....	16
3.4 Versuchsdurchführung.....	20
3.5 Probengewinnung und Sektionsgang.....	20
3.6 Futtermitteluntersuchung	21
3.6.1 Rohnährstoffe (Weender Analyse)	21
3.7 Analyse der Milch	22
3.8 Immunologische Parameter	23

3.8.1	Differenzialblutbild.....	23
3.8.2	Zelldifferenzialbild in der Milch	23
3.8.3	Durchflusszytometrie (FACS) zur Untersuchung der immunologischen Parameter	23
3.8.3.1	Isolierung der Immunzellen aus dem peripheren Blut, der Kuhmilch und der Schweinemilz	26
3.8.3.2	Phänotypisierung der peripheren mononukleären Zellen, der mononukleären Zellen aus der Milch und der Milz	27
3.8.3.3	Proliferation der peripheren mononukleären Zellen (V1)	31
3.8.3.4	Lymphozytenproliferation mit anschließender Phänotypisierung	34
3.8.3.5	Phagozytoseaktivität von Monozyten und Granulozyten im peripheren Blut und in der Milch.....	35
3.9	Zusatzuntersuchungen der Blut- und Milchproben	37
3.9.1	Untersuchungen des Serums der Kühe und Kälber auf den Selenstatus und der antioxidativen Kapazität	37
3.9.2	Untersuchungen der Kuhmilch auf den Selenstatus und deren antioxidativen Kapazität	37
3.10	Atom-Absorptions-Spektrometrie zur Bestimmung von Se.....	38
3.10.1	Messung der Selenkonzentrationen in der Kuhmilch, die als Futter für die Ferkel diente, und im Plasma der Ferkel	38
3.11	Statistische Auswertung.....	38

4 Ergebnisse 40

4.1	Ergebnisse aus V.1.....	40
4.1.1	Entwicklung der Lebendmasse der Kühe und der Kälber	40
4.1.2	Erkrankungen der Kühe	40
4.1.3	Ergebnisse der Blutuntersuchungen aus V.1.....	41
4.1.3.1	Differenzialblutbild.....	41
4.1.3.2	Phänotypisierung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) der Kühe	43
4.1.3.3	Phänotypisierung der PBMC der Kälber.....	45
4.1.3.4	Phagozytoseleistung der Granulozyten und Monozyten im Blut	46
4.1.3.5	Lymphozytenproliferation	50
4.1.3.6	Lymphozytenproliferation mit anschließender Phänotypisierung der Lymphozytensubpopulationen.....	53
4.1.4	Ergebnisse der Milchanalysen aus V1.....	55
4.1.4.1	Milchleistung	55
4.1.4.2	Milchausstrich	56
4.1.4.3	Phänotypisierung der mononukleären Milchzellen	58
4.1.4.4	Phagozytoseleistung der phagozytierenden Zellen in der Milch	60
4.2	Ergebnisse aus V2.....	62
4.2.1	Sauenmilch	62
4.2.2	Lebendmasse der Ferkel.....	62
4.2.3	Ergebnisse der Blutuntersuchungen	63
4.2.3.1	Differenzialblutbild.....	63
4.2.3.2	Messung der Selenkonzentrationen im Blutplasma der Ferkel	64
4.2.3.3	Phänotypisierung der PBMC	65
4.2.3.4	Phagozytoseleistung der Granulozyten und Monozyten im Blut	73

4.2.4	Phänotypisierung der mononukleären Zellen der Milz	77
5	Diskussion	78
5.1	Hintergrund und Ziel der Arbeit	78
5.2	Diskussion der Versuchsbedingungen und des Studiendesigns	79
5.3	Diskussion der Ergebnisse.....	80
5.3.1	Effekte von Selen auf die Leistungsparameter der Tiere	80
5.3.2	Effekte von Selen auf immunologische Parameter im peripheren Blut von Kühen und ihren Kälbern.....	80
5.3.2.1	Effekte von Selen auf die Phänotypisierung der Immunzellen im peripheren Blut der Kühe und Kälber	81
5.3.2.2	Effekte von Selen auf die Proliferation der Lymphozyten des peripheren Blutes der Kühe und Kälber und anschließende Phänotypisierung bei den Kühen.....	82
5.3.2.3	Effekte von Selen auf die Phagozytoseaktivität der Granulozyten und Monozyten im peripheren Blut der Kühe und Kälber	83
5.3.3	Effekte von Selen auf immunologische Parameter in der Kuhmilch.....	84
5.3.3.1	Effekte von Selen auf die Phänotypisierung der Immunzellen in der Milch	85
5.3.3.2	Effekte von Selen auf die Phagozytoseaktivität der Immunzellen in der Milch	85
5.3.4	Effekte von natürlich Selen angereicherter Kuhmilch auf die Selenkonzentration im Plasma von Absetzferkeln	86
5.3.5	Effekte von Selen auf immunologische Parameter im peripheren Blut von Ferkeln	86
5.3.5.1	Effekte von Selen auf die Phänotypisierung der Immunzellen im peripheren Blut und in der Milz der Ferkel.....	87
5.3.5.2	Effekte von Selen auf die Phagozytoseaktivität der Granulozyten und Monozyten im peripheren Blut der Ferkel.....	89
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick	89
6	Zusammenfassung	91
7	Summary	92
8	Literaturverzeichnis	93
	Anhang	105
	Publikationsnachweise	108
	Danksagung	109
	Selbstständigkeitserklärung	110

Tabellen

Tabelle 01	Übersicht über Studien zum Einfluss von Selen auf das Immunsystem von Rindern	04
Tabelle 02	Übersicht über die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle von Immunzellen zur Detektion spezifischer Leukozytenpopulationen des Rindes	09
Tabelle 03	Übersicht über Oberflächenmoleküle von Immunzellen zur Detektion spezifischer Leukozytenpopulationen beim Ferkel	10
Tabelle 04	Zelldifferenzialbild von Milch gesunder Kühe (in % der Gesamtzellzahl)	12
Tabelle 05	Zusammensetzung und Selengehalt der Totalen Mischration (TMR) sowie Nährstoffzusammensetzung und Energiegehalt des Kraftfutters für die Milchkühe	17
Tabelle 06	Zusammensetzung des Mischfutters für die Sauen sowie Nährstoff- und Energiegehalte des Sauenfutters	18
Tabelle 07	Angaben zu den mittleren Nährstoff- und Se-Gehalten in der Kuhmilch in Abhängigkeit von dem Fütterungsregime, die die Ferkel der verschiedenen Gruppen erhielten	19
Tabelle 08	Mittlere Zusammensetzung des für die Ferkel eingesetzten Spurenelement - Ergänzungsfutters	19
Tabelle 09	Für die Futtermitteluntersuchung genutzte Geräte	22
Tabelle 10	Für die Futtermitteluntersuchung genutzten Chemikalien	22
Tabelle 11	Für die durchflusszytometrischen Analysen eingesetzte Geräte und Materialien	25
Tabelle 12	Verwendete primäre Antikörper zur Phänotypisierung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut der Kühe und teilweise der Kälber sowie aus der Milch	28
Tabelle 13	Verwendete primäre Antikörper zur Phänotypisierung der mononukleären Zellen der Ferkel aus dem peripheren Blut und der Milz	29
Tabelle 14	Verwendete sekundäre Antikörper	30
Tabelle 15	Für die Lymphozytenproliferation verwendete Antikörper	33
Tabelle 16	Mittlere Lebendmasse (kg) der Kühe der drei Versuchsgruppen während der Versuchszeit	40
Tabelle 17	Mittlere Lebendmasse (kg) der Kälber der drei Versuchsgruppen	40
Tabelle 18	Anzahl der medikamentellen Behandlungen der Kühe, aufgeteilt nach Erkrankung	41
Tabelle 19	Differenzialblutbild der Kühe zu den verschiedenen Zeitpunkten	42
Tabelle 20	Differenzialblutbild der Kälber aus den drei Versuchsgruppen	43
Tabelle 21	Relativer Anteil der CD4-, CD8-, CD25- und MHCII-Lymphozyten (%) des peripheren Blutes der Kühe in der ersten und 12. Woche <i>post partum</i>	44
Tabelle 22	Relativer Anteil der lymphozytären Subpopulationen (%) des peripheren Blutes der Kälber	45
Tabelle 23	Prozentualer Anteil der phagozytierenden Granulozyten und Monozyten im Blut der Kühe ein und 12 Wochen <i>post partum</i>	47
Tabelle 24	Prozentualer Anteil der phagozytierenden Granulozyten und Monozyten im peripheren Blut der Kälber	48
Tabelle 25	Mittlere Fluoreszenzintensität der phagozytierenden Granulozyten und Monozyten im peripheren Blut der Kühe	49
Tabelle 26	Mittlere Fluoreszenzintensität der phagozytierenden Granulozyten und Monozyten im peripheren Blut der Kälber	50

Tabelle 27	Relativer Anteil proliferierter Zellen im peripheren Blut der Kühe nach Behandlung mit den Mitogenen PHA-M, CON A und PWM	51
Tabelle 28	Relativer Anteil proliferierter Zellen im peripheren Blut der Kälber nach Behandlung mit den Mitogenen PHA-M, CON A und PWM	52
Tabelle 29	Relativer Anteil der lymphozytären Subpopulationen (%) nach Proliferation ohne Mitogen im peripheren Blut der Kühe 12 Wochen <i>post partum</i>	53
Tabelle 30	Relativer Anteil der lymphozytären Subpopulationen (%) nach Proliferation mit dem Mitogen CON A im peripheren Blut der Kühe 12 Wochen <i>post partum</i>	54
Tabelle 31	Relativer Anteil der lymphozytären Subpopulationen (%) nach Proliferation mit dem Mitogen PHA-M im peripheren Blut der Kühe 12 Wochen <i>post partum</i>	55
Tabelle 32	Durchschnittliche Milchmenge der Kühe sowie Angaben zu den mittleren Mengen der Inhaltsstoffe und der Zellzahl der Milch	56
Tabelle 33	Differenzialbild in den Milchausstrichen	57
Tabelle 34	Relativer Anteil der Subpopulationen (%) der mononukleären Zellen aus der Kuhmilch 9 und 12 Wochen <i>post partum</i>	59
Tabelle 35	Prozentualer Anteil der phagozytierenden Zellen in der Milch	61
Tabelle 36	Mittlere Fluoreszenzintensität der phagozytierenden Zellen in der Milch	61
Tabelle 37	Selengehalt ($\mu\text{g/l}$) der Sauenmilch während der Aufzuchtphase	62
Tabelle 38	Mittlere Lebendmasse (kg) der Ferkel der drei Versuchsgruppen während der 14tägigen Versuchszeit	63
Tabelle 39	Differenzialblutbild der Ferkel aus den drei Versuchsgruppen zum Ende des Versuches	64
Tabelle 40	Mittlere Selenkonzentrationen ($\mu\text{g/l}$) im Blutplasma der Ferkel der drei Versuchsgruppen während der 14tägigen Versuchszeit	64
Tabelle 41	Relativer Anteil der SWC3- und CD21-Leukozyten (%) des peripheren Blutes der Ferkel	65
Tabelle 42	Relativer Anteil der TCR1- und CD8 α -Lymphozyten (%) des peripheren Blutes der Ferkel	66
Tabelle 43	Relativer Anteil der CD4- und CD8 β -, sowie der CD4- und CD25-Lymphozyten (%) des peripheren Blutes der Ferkel	68
Tabelle 44	Relativer Anteil der CD2- und CD5-Lymphozyten (%) des peripheren Blutes der Ferkel	70
Tabelle 45	Relativer Anteil der CD5- und MHCII-Lymphozyten (%) des peripheren Blutes der Ferkel	71
Tabelle 46	Relativer Anteil der 45RC-, CD14- und CD21-Lymphozyten(%) des peripheren Blutes der Ferkel beim Absetzen und am Versuchsende	72
Tabelle 47	Prozentualer Anteil der phagozytierenden Granulozyten und Monozyten im Blut der Ferkel während der 14tägigen Versuchszeit	74
Tabelle 48	Mittlere Fluoreszenzintensität der phagozytierenden Granulozyten und Monozyten im Blut der Ferkel	76
Tabelle 49	Relativer Anteil der CD4- und CD8 β -Lymphozyten (%) der Milz der Ferkel am Ende des Versuches	77
Tabelle 50	Relativer Anteil der CD2- und CD16-Lymphozyten (%) der Milz der Ferkel am Versuchsende	77
Tabelle 51	Relativer Anteil der CD14- und CD21-Lymphozyten (%) der Milz der Ferkel am Ende des Versuches	77

Abbildungen

Abbildung 1	Zweiparameterdarstellung im Density Plot nach Festlegung einer Region um die Lymphozyten am Beispiel von CD4 und CD8 markierten T-Lymphozyten	31
Abbildung 2	Zweiparameterdarstellung im Density Plot der mit CON A stimulierten peripheren mononukleären Blutzellen	34
Abbildung 3	Zweiparameterdarstellung im Histogramm (a) und im Density Plot (b) zur Identifizierung der Granulozyten und Monozyten	36
Abbildung 4	Zweiparameterdarstellung im Histogramm zur Beurteilung der Phagozytoseaktivität der Granulozyten und Monozyten	36

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektrophotometrie
AS	Versuchsgruppe anorganisch gebundenes Selen
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BrdU	Bromdesoxyuridin
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CD	Cluster of Differentiation
Con A	Concanavalin A
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward scatter
g	Gramm
GfE	Gesellschaft für Ernährungsphysiologie
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iPP	Intestinale Peyersche Plaques
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
l	Liter
M.	Musculus
M/T	Milchmenge pro Tag und Tier
mAk	monoklonale Antikörper
MEZ	Milch Epithelzellen
MHC	Major histocompatibility complex
ml	Milliliter
NEL	Netto Energie Laktation
NK	Natürliche Killerzellen
nRp	nutzbares Rohprotein
OS	Versuchsgruppe organisch gebundenes Selen
p.p.	post partum
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-aktivität
RNB	ruminale N-Bilanz
sAk	Sekundärer Antikörper
SCC	Somatic Cell Count
Se	Selen
SI	Stimulationsindex
SSC	Sideward scatter
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidative Capacity
TCR	T cell receptor
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
uS	ursprüngliche Substanz
V.1	Versuchshälfte 1
V.2	Versuchshälfte 2
xg	Erdbeschleunigung

1 Einleitung

Milchkühe erbringen heutzutage sehr hohe Leistungen, die den Stoffwechsel und auch das Immunsystem erheblich beanspruchen. Ein erhebliches praktisches Problem sind Euterentzündungen, für deren Prophylaxe innovative Bekämpfungsstrategien entwickelt werden müssen (Sordillo et al., 1997). In diesem Zusammenhang scheint die Stärkung der angeborenen Abwehrmechanismen eine sinnvolle Strategie zu sein (Rainard, 2003), wobei die Ernährung einen der wichtigsten Einflussfaktoren darstellt. Auch bei Schweinen stellt die Verbesserung der Tiergesundheit eine stete Herausforderung dar. Ein relevantes Problem bei Ferkeln ist, dass sich das Immunsystem in den ersten Lebenswochen dynamisch von einer passiv vermittelten Ausgangssituation in Richtung einer zunehmend aktiven Immunantwort entwickelt und daraus Risiken für Erkrankungen resultieren. Der Gesundheitsstatus beim Ferkel kann durch temporäre Dysfunktionen der Immunabwehr und durch die veränderte mikrobielle Kolonisation des Darmes negativ beeinflusst werden, besonders durch den Wechsel von Muttermilch auf Festfutter im Zuge des Absetzprozesses.

In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass ein Mangel an Selen zur Beeinträchtigung des Immunsystems führt (Boyne und Arthur, 1986). Neben direkten Effekten auf die Immunfunktion ermöglicht eine adäquate Se-Versorgung eine verbesserte Eliminierung von reaktiven Sauerstoffradikalen und eine bessere Infektionsabwehr (Hoffmann und Berry, 2008).

Selen wird in der Tierernährung in Form anorganischer oder organischer Verbindungen eingesetzt. Die Effekte unterschiedlicher Se-Verbindungen auf Parameter des Se-Stoffwechsels sowie mögliche Wirkungen auf immunologische Prozesse sind bei Rindern und Schweinen nur wenig untersucht worden. Bisher liegen auch keine Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit des Selens aus Milch von Kühen vor, die mit unterschiedlichen Se-Verbindungen gefüttert worden sind.

Ziel der Arbeit war die Untersuchung ausgewählter Effekte von Natriumselenit und Se-Hefe auf immunologische Parameter im peripheren Blut und in der Milch bei Milchkühen und bei ihren Kälbern. Zudem sollte an Absatzferkeln untersucht werden, wie sich die Verfütterung der Milch von Kühen, welche zuvor mit unterschiedlichen Se-Quellen gefüttert worden waren, auf ausgewählte immunologische Parameter auswirkt.

2 Literatur

2.1 Selen

Selen ist ein für Mensch und Tier essenzielles Spurenelement. Es kommt ubiquitär in Bakterien, Archaea und Eukaryoten vor. Jöns Jakob Berzelius hat im Jahr 1817 Selen (Se) im Bleikammerschlamm einer Schwefelsäurefabrik entdeckt und es nach der griechischen Mondgöttin Selene (σελήνη) benannt. Zunächst galt Selen als ein toxisches Element, das bei Tieren zu akuten oder chronischen Vergiftungen (Alkali-Krankheit, Ataxie bzw. Sehstörungen, sog. Blind Stagger-Syndrom) führt (Franke und Painter, 1935). Erst 1957 entdeckten Schwarz und Foltz (1957), dass Selen einer nekrotischen Leberdegeneration bei Ratten vorbeugen kann.

Selen wird aus dem Darm passiv oder aktiv aufgenommen. Anorganisch gebundenes Selen wird sowohl als Selenit oder Selenat über eine passive Diffusion in die Mukosa aufgenommen und konkurriert hierbei mit anorganischem Sulfat (Simonová und Pfannhauser, 2008). Organisch gebundenes Selen, z. B. Se-Methionin, wird über ein Transportsystem aktiv resorbiert. Es handelt sich um das gleiche System wie bei Methionin, wodurch es mit dem an Methionin gebundenen Schwefel konkurriert (Simonová und Pfannhauser, 2008). Im Blut wird Selen in den Erythrozyten mithilfe der Glutathionreduktase reduziert, um dann in verschiedene Proteine eingebaut zu werden. Hierbei kann es sich um selenspezifische, wie z. B. die Glutathion-Peroxidase, oder um unspezifische Proteine handeln. Die Ausscheidung erfolgt hauptsächlich über Urin und Kot (Suzuki, 2005; Simonová und Pfannhauser, 2008).

2.2 Selen in der Tierernährung

Selen ist in den üblichen Futtermitteln wie z. B. Grünfütter und daraus hergestellten Konservaten, Getreide und den meisten eiweißreichen Futtermitteln nur in geringen Konzentrationen von 0,05 - 0,10 mg/kg Trockenmasse (TM) enthalten (Combs und Combs, 1986). Nach den Empfehlungen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie beläuft sich der Bedarf von Milchkühe auf Werte von mind. 0,2 mg/kg Futter-TS und Schweine 0,15–0,25 mg Selen/kg Futter-TS, um Mangelerscheinungen vorzubeugen (GfE, 2001; GfE, 2006).

Maximal tolerierbare Konzentration für Selen sind beim Schwein 4 mg/ kg TS und bei Rindern 5 mg/ kg TS, bei höheren Dosierungen können Intoxikationen auftreten (NRC, 2005).

In anorganisch gebundener Form ist Selen als Natriumselenit und Natriumselenat für alle Tierarten oder Tierkategorien als Futtermittelzusatzstoff zugelassen. Die erlaubte Höchstmenge beträgt dabei insgesamt 0,5 mg Selen pro kg Alleinfutter. Außerdem ist Selen in organischer Form aus *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3060, als Se-Methionin aus *Saccharomyces cerevisiae* NCYC R397 und als Se-Methionin aus *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3399 zugelassen. Bei allen drei Verbindungen handelt es sich um inaktivierte Se-Hefe. Die zugelassenen Se-Verbindungen werden als Zubereitung in Verkehr gebracht, die im Mittel einen Gehalt von 97 - 99 Prozent Se aufweisen. Die zulässigen Höchstgehalte entsprechen denen der anorganischen Se-Quellen (0,5 mg Selen pro kg Alleinfuttermittel mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 12% (BVL, 2008; BVL, 2010)).

2.2.1 Auswirkungen von Selen auf das Immunsystem von verschiedenen Tierarten

Durch die Supplementation von 0,1 ppm Selen konnte bei Mäusen eine verbesserte Fähigkeit zur Eliminierung von *Candida albicans* durch neutrophile Granulozyten im Gegensatz zu Mäusen mit einer Se-Mangeldiät (<0,01 ppm Selen) erreicht werden (Boyne und Arthur, 1986). Die zytotoxische Aktivität von natürlichen Killerzellen in der Milz und von T-Lymphozyten im peritonealen Zellexudat wurde gesteigert, wenn eine adäquate Futtermischung (0,1 ppm Selen) mit einer hohen Konzentration (4 ppm) Selen angereichert wurde (Petrie et al. 1989).

Bei Ratten kam es in Folge eines Se-Mangels (<0,01 ppm Selen) nach Stimulierung der Lymphozyten mit Mitogenen zu einer verminderten Proliferation. Ein Effekt einer Mangeldiät auf alveolare Makrophagen konnte nicht nachgewiesen werden (Eskew et al. 1985). Bei einem adäquaten Se-Haushalt von Ratten wurde durch die zusätzliche Fütterung von Selen (0,5 oder 2 ppm Selen) eine gesteigerte Aktivität der NK-Zellen der Milz erreicht, während die Density-Type-Hypersensitivity-Reaktion deutlich unterdrückt wurde. Die Fütterung einer sehr hohen Se-Dosis von 5 ppm führt zusätzlich zu einer geringeren Antikörperproduktion und einer verminderten Prostaglandin E2 Aktivität. Unabhängig von der Se-Dosierung ist die Interleukin1 Aktivität (Koller et al., 1986).

Die Gabe von 0,22 ppm Selen rief bei Ponys eine höhere Glutathionperoxidaseaktivität sowie eine höhere IgG-Konzentration im Blut hervor. Zudem wurde die primäre Immunantwort nach Injektion von Schaferythrozyten gesteigert (Knight und Tyznik 1990). Die gleiche Beobachtung mit der Supplementation von 0,2 ppm Selen wurde bei Schafen gemacht, die sowohl vor als auch nach einer Infektion mit Parainfluenzaviren eine gesteigerte Glutathionperoxidaseaktivität aufwiesen (Reffett et al., 1988).

Auch Hühner zeigten als Reaktion auf 1 ppm Selen eine verbesserte Antikörperantwort auf eine Injektion mit Salmonellen bzw. Injektion bei gleichzeitiger Aflatoxinbelastung (Hegazy und Adachi, 2000). Wurde Hühnerfutter mit anorganisch oder organisch gebundenem Selen ($\geq 0,1$ ppm Selen) supplementiert, führte dies bei den Hühnern zu einer gesteigerten Glutathionperoxidaseaktivität im Vergleich zu Tieren, die einen Se-Mangel im Futter (< 0,1ppm Selen) hatten. Zwischen den beiden Varianten konnte aber kein Unterschied in der Aktivität der Glutathionperoxidase festgestellt werden (Omeye und Tappel, 1974).

2.2.2 Auswirkungen von Selen auf immunologische Parameter bei Rindern

Selen ist an der Regulierung physiologischer Reaktionen auf oxidativen Stress, Redoxreaktionen und anderen wichtigen zellulären Prozessen in nahezu allen Geweben und auch im angeborenen und erworbenen Immunsystem involviert (Hoffmann und Berry, 2008). Verschiedene Studien an landwirtschaftlichen Nutztieren zeigten bei steigender Se-Aufnahme eine Reaktion der zellulären und humoralen Immunabwehr (Hoffmann und Berry, 2008). Eine Übersicht von Studien bei Rindern zu immunologischen Auswirkungen von Selen ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Übersicht über Studien zum Einfluss von Selen auf das Immunsystem von Rindern

Zellen/Gewebe	Beobachtete Effekte durch Selengabe	Referenz
B-Zellen	In vitro, gesteigerte IgM Produktion der B-Zellen (Durch Selenomethionin war die Steigerung höher als durch Natriumsele-nit)	Stabel et al., 1991
Lymphozyten	Proliferation nach Stimulierung mit CON A erhöht bei Se-Supplementation	Cao et al., 1992
Monozyten	Keine Auswirkung auf die Proliferation-santwort auf Mitogene	Sordillo et al., 1993
Neutrophile Granulozyten	Verbesserte Einwanderung und intrazelluläre Eliminierung von Bakterien	Hogan et al., 1993
Lymphozyten	In vitro-Proliferation verbessert	Ndiweni et al., 1995
Neutrophile Granulozyten	Gesteigerte Aktivität nach Zymosanstimulus	Malbe et al., 1995
Isolierte Tumorzellen aus der Milchdrüse	In vitro: Wachstumshemmung der Tumorzellen durch Zugabe von Selen in das Medium	Hwang et al., 1996
Neutrophile Granulozyten	Verbesserte Einwanderung in die Milchdrüse	Ndiweni et al., 1996
Neutrophile Granulozyten	Verbesserte Migration der neutrophilen Granulozyten durch Se-Gabe	McKenzie et al., 1998
Neutrophile Granulozyten	Se-Defizit reduzierte die Effizienz der intrazellulären Eliminierung von Pathogenen	Spears, 2000
CD8-, CD2 β -, NK-Zellen im Thymus	Reduzierung der Anzahl von CD8-, CD2 β - und NK-Zellen durch Se-Mangeldiät bei Kälbern	Dylewski et al., 2002
Neutrophile Granulozyten	Adhäsionsfähigkeit und Produktion von Superoxid wurde bei höheren Se-Konzentrationen im Blut gesteigert	Cebra et al., 2003
Neutrophile Granulozyten	Schutz durch GSH-Px vor oxidativen Schäden	Arthur et al., 2003

Die Auswirkungen von Selen auf die immunologischen Parameter der Milchdrüse bzw. der Milch waren in den letzten 20 Jahren verschiedentlich Gegenstand tierexperimenteller Untersuchungen. Der Gehalt an somatischen Zellen in der Milch bei mit Selen supplementierten Milchkühen reduzierte sich im Vergleich zu nicht supplementierten Kühen (Weiss et al., 1990; Hemingway, 1999; Malbe et al., 2006). In vitro-Untersuchungen an neutrophilen Granulozyten in der Milch zeigten eine Verbesserung der Phagozytoserate, eine induzierte Aktivität (durch Zymosan stimuliert) sowie eine schnellere Einwanderung in die Milch und intrazelluläre Eliminierung (Grasso et al., 1990; Hogan et al., 1993; Malbe et al., 1995). Grasso et al. (1990) konnten bei neutrophilen Granulozyten keinen Einfluss auf die Viabilität und die intrazelluläre Eliminierung von *Staphylococcus aureus* und *E. coli* durch die Zulage von 2 mg Natriumsele-nit pro Kuh pro Tag feststellen. Weiss (2005) beobachtete, dass die Zellzahl, die Phagozytoseaktivität und der prozentuale Anteil der eliminierten Bakterien durch neutrophile Granulozyten nicht durch Supplementation mit 0,3 ppm Natrium-Selenat oder Se-Hefe im Futter beeinflusst wurden. Die Untersuchung der Phagozyten in der Milch zeigte eine schnellere Einwanderung in die Milch und eine Steigerung der bakteriziden Wirkung durch 0,2 ppm Selenit oder Se-Hefe im Futter (Ali Vehmas et al.1997).

Bei polymorphen Zellen wurde in vitro eine gesteigerte Produktion von neutrophilem Chemotaxin durch die Stimulierung von Makrophagen mit *Staphylococcus aureus* festgestellt. Außerdem wurde eine verbesserte Phagozytoseaktivität beobachtet (Ndiweni et al., 1996). In vivo konnte ein schnelleres Einwandern der polymorphkernigen Neutrophilen in die Milchdrüse und eine Optimierung der intrazellulären Eliminierung von *Staphylococcus aureus* und *E. coli* beobachtet werden, wenn 0,14 ppm Selen zugefüttert wurde (Smith et al., 1997). Eine in vitro Studie zeigte eine vermehrte Produktion von Chemokinen durch Makrophagen, die für die Attraktion neutrophiler Granulozyten bedeutsam sind, wenn Natriumselenit in die Zellkulturen gegeben wurde (Ndiweni et al., 1995). Die Analyse von B-Zellen zeigte, dass deren IgM Produktion gesteigert war, wobei die Anreicherung der Zellkultur mit Se-Methionin zu einer höheren Produktion führte als bei Verwendung von Natriumselenit (Stabel et al., 1991).

2.2.3 Auswirkungen von Selen auf die Selenkonzentration und weitere Parameter im Blut von Schweinen

Bei einer Diät ohne Se-Supplementation betrug die Se-Konzentration im Blut von Schweinen weniger als 0,05 µg/ml. Durch die Se-Mangeldiät konnte keine Auswirkung auf das Differenzialblutbild der Schweine, ausgenommen ein erhöhendes Verhältnis von Myeloidzellen zu Erythrozyten, festgestellt werden. Dies wurde als Anzeichen für eine reduzierte Erythropoese interpretiert (Fontaine et al., 1977). Ebenso konnte bei einer Fütterung von 0,3 bis 20 ppm Selen, sowohl in Form von Natriumselenit als auch von Se-Hefe, im Futter von Sauen kein Einfluss auf den Hämoglobin- oder Hämatokritwert bei Absetzferkeln und Sauen beobachtet werden. Bei Absetzferkeln wurde mit zunehmender Se-Aufnahme der Sauen ein geringerer Hämatokrit festgestellt (Kim und Mahan, 2001a; Kim und Mahan, 2001b). Zudem stieg mit zunehmender Se-Menge im Futter (0,3 – 10 ppm) die Se-Konzentration im Plasma und in der Milch der Sauen sowie im Plasma der Ferkel, insbesondere wenn organisch gebundenes Selen gefüttert wurde (Kim und Mahan, 2001b). Nach Fütterung mit 0,15 und 0,30 mg/kg Selen als Se-Hefe oder Natriumselenit konnte bei Sauen ein Anstieg der Se-Plasmakonzentration festgestellt werden, ohne dass das organische oder anorganische Selen einen Vorteil gegenüber dem anderen aufwies. Im Vergleich dazu wurde bei Ferkeln der mit organisch gebundenem Selen gefütterten Sauen nach 14 Tagen ein höherer Se-Wert im Plasma beobachtet als bei Ferkeln von mit anorganisch gebundenem Selen gefütterten Sauen (Mahan, 2000). Wurde eine Diät mit 0,2 mg/kg Selen, welches als Natriumselenit hinzugefügt wurde, mit einer Se-Mangeldiät, die weniger als 0,02 mg/kg Selen enthielt, verglichen, so war die Se-Konzentration im Blutplasma der Tiere mit der Se-Mangeldiät erwartungsgemäß signifikant niedriger, als bei Tieren mit einer adäquaten Fütterung (Lessard et al., 1991).

Bei dem Vergleich der Se-Konzentration im Serum bei neugeborenen Ferkeln konnte kein Unterschied zwischen einer mit 0,1 mg/kg Selen als Natriumselenit supplementierten Sauengruppe (Versuchsgruppe) und einer Sauengruppe ohne zusätzliche Supplementierung (Se-Gehalt 0,03 ppm) festgestellt werden. Im Alter von drei bzw. sechs Wochen zeigte sich ein signifikant höherer Se-Wert im Serum in der Se-Gruppe (Mahan et al. 1975). Der Se-Gehalt im Blut von Ferkeln direkt nach der Geburt war unabhängig davon, ob die Sauen mit 0,3 mg/kg Natriumselenit oder Se-Hefe gefüttert wurden. Beim Absetzen der Ferkel war allerdings ein signifikant höherer Se-Blutspiegel bei Ferkeln derjenigen Sauen festzustellen, die organisch gebundenes Selen gefüttert bekommen hatten (Quesnel et al., 2008).

2.2.4 Auswirkungen von Selen auf das Immunsystem bei Schweinen

Die Fütterung einer Selen- und Vitamin E-Mangeldiät mit 29 mg Vitamin E und 0,089 mg Selen/kg Futter führte bei Schweinen zu keinem Unterschied in der Proliferation von Lymphozyten nach Stimulierung mit den Mitogenen PWM, PHA-M und CON A (Wuryastuti et al., 1993). Nach einer Injektion von Salmonellen konnte eine geminderte Reaktion der Lymphozyten auf die Mitogene PWM, PHA-M und CON A beobachtet werden, wenn die Lymphozyten mit autologem Serum kultiviert wurden. Wurde das autologe Serum gegen fetales Kälberserum ausgetauscht, konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (Lessard et al., 1991).

Schweine, denen intraperitoneal Schaferythrozyten injiziert wurden, wiesen durch die Gabe von Selen einen gesteigerten Hämagglutinationstiter als Reaktion auf. Dabei erhielten die Schweine entweder 0,5 mg Selen/kg Futter oder ihnen wurden 6 mg Selen intramuskulär injiziert. Hierbei erreichte der Titer von Tieren, die Selen oral erhielten, einen höheren Wert als bei den Tieren, die Selen als Injektion erhielten (Peplowski et al., 1980).

Absetzferkel, die zu ihrer Futterration ein oder fünf Gramm Kolostrum von Kühen pro Tier erhielten, zeigten einen Anstieg der CD3-Zellen in den Peyerschen Plaques des Ileums (iPP). Bei höherer Aufnahme konnte zudem ein Anstieg der CD4-positiven und eine signifikante Abnahme der CD21-positiven Zellen zwischen Versuchsbeginn und Versuchsende in den iPP festgestellt werden. CD8-Zellen waren nicht beeinflusst. Die Phänotypisierung der Lymphozyten in Blut, Milz und in den mesenterialen Lymphknoten wies keinen Unterschied zwischen den Gruppen auf. Weiterhin erfolgte eine Stimulierung der mononukleären Zellen aus Blut, mesenterialen Lymphknoten, iPP und der Milz mit PHA, CON A und LPS. Die Ergebnisse wurden mit dem Stimulationsindex (SI) angegeben. Bei der mit fünf Gramm Kolostrum pro Tier gefütterten Gruppe war der SI für alle Gewebe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Innerhalb der Kolostrumgruppe lag der SI bei Zellen aus dem iPP höher als bei den anderen Geweben (Boudry et al., 2007).

2.2.5 Verfügbarkeit von Selen aus der Kuhmilch bei Schweinen und anderen Tierarten

Der Zusatz von Milchpulver in Rattenfutter mit 280 µg Selen/kg bzw. von Milchpulver, welches 60 µg Selen/kg enthielt und zusätzlich mit Natriumselenit versetzt wurde, bis es ebenfalls 280 µg Selen/kg aufwies, reduzierte das Auftreten von Lebernekrosen und Todesfällen bei Ratten. Allerdings wurde dieser Effekt nicht dem Selen, sondern den hochwertigen Milchproteinen zugeordnet (Mathias et al. 1967). Hühner verendeten bei einem gleichen Versuchsansatz wie bei den Ratten seltener an den Folgen einer exsudativen Diathese, wenn ihrem Futter Milchpulver mit einem hohen Se-Gehalt von 280 µg/kg zugesetzt wurde (Mathias et al. 1967).

Saugferkel, die Milch (1070 µg Selen/kg TM) von Kühen erhielten, die mit Se-Hefe gefüttert worden waren, zeigten im Plasma und in der Muskulatur einen höheren Se-Gehalt als Ferkel, die mit Kontrollmilch (135 µg Selen/kg TM) gefüttert wurden. Gleichzeitig wurden zwei Gruppen von Ferkeln mit der Kontrollmilch gefüttert, die mit Se-Hefe oder Natriumselenat auf den gleichen Se-Gehalt wie die natürlich angereicherte Milch gebracht wurde. Beide Gruppen hatten eine niedrigere Se-Konzentration im Plasma und in der Muskulatur als die Saugferkel, die die natürlich angereicherte Milch bekamen (Uglietta et al., 2008).

2.3 Prinzipieller Aufbau des Immunsystems

Das Immunsystem schützt den Körper vor Umwelteinflüssen und insbesondere pathogenen Mikroorganismen. Diese Aufgabe wird durch die angeborene, unspezifische Abwehr und von der adaptiven spezifischen Abwehr erfüllt.

Die angeborene oder auch unspezifische Abwehr stellt die erste Verteidigungslinie gegenüber Infektionen dar und drängt eindringende Erreger zurück. Zum unspezifischen Abwehrsystem gehören die Haut bzw. Schleimhäute als physikalische Barrieren. Wenn die Erreger diese durchbrochen haben, kommt es mithilfe der zellulären und humoralen angeborenen Abwehr im Normalfall zur Eindämmung der Infektion (Janeway et al., 2005). Zur zellulären Abwehr gehören die Makrophagen, die eosinophilen, basophilen und neutrophilen Granulozyten, die natürlichen Killerzellen (NK) und die dendritischen Zellen, welche die Erreger durch Bindung von pathogen-assoziierten Molekülen, wie z. B. Moleküle der Toll-like Rezeptorfamilie, erkennen können (Saalmüller, 2006). Die humorale Abwehr setzt sich aus Antikörpern, dem Komplementsystem und verschiedenen Zytokinen und Chemokinen zusammen, die von Immunzellen abgesondert werden, um verschiedene Reaktionen, wie z. B. Entzündungskaskaden, zu induzieren. Die humorale Abwehr und die antigenpräsentierenden Zellen (APZ) stellen zudem die Verbindung zur adaptiven Immunabwehr dar (Janeway et al., 2005).

Die adaptive Immunabwehr unterscheidet sich von der angeborenen durch ihre Fähigkeit, eingedrungene pathogene Mikroorganismen gezielt zu bekämpfen und im wiederholten Fall auf spezifische, erworbene Immunmechanismen zurückgreifen zu können. Allerdings erfordern diese Reaktionen einen Zeitraum von vier bis sieben Tagen. Die Immunantwort teilt sich in die T-Zell-vermittelte und in die durch B-Zellen gekennzeichnete humorale Immunantwort auf. Beide Immunantworten interagieren im Sinne eines Netzwerks (Saalmüller, 2006).

T-Lymphozyten können in zwei Untergruppen aufgeteilt werden, die zytotoxischen T-Zellen und die T-Helferzellen (Saalmüller, 2006).

T-Zellen können Antigene von Erregern erkennen, wobei hierbei der Major Histocompatibility Complex (MHC) eine wichtige Rolle spielt. Alle kernhaltigen Körperzellen und Thrombozyten können Peptide an der Zelloberfläche mittels MHC Klasse I-Molekülen präsentieren. Diese Peptide stammen von dem Abbau von Proteinen, die im Zytoplasma vorliegen. Es handelt sich entweder um zelleigene oder mikrobielle Proteine. Oft sind virale Proteine beteiligt, aber auch Peptide, die von bakteriellen Antigenen stammen und durch Membranfusionsvorgänge in das Zytoplasma gelangt sind (Saalmüller, 2006).

Die zytotoxischen T-Zellen erkennen die veränderten MHC I-Moleküle und reagieren, indem sie die Lyse der Zelle auslösen. Hierzu schütten sie auf die Oberfläche der infizierten Zellen über Granula verschiedene Substanzen, z. B. Serinproteasen, Perforin oder Granzyme aus. Ebenso ist die zytotoxische Zelle in der Lage, Interferon- γ (IFN- γ) zu produzieren und zu sezernieren, wodurch andere Zellen zur Differenzierung und Proliferation angeregt werden (Janeway et al., 2005, Saalmüller, 2006).

Die MHC Klasse II-Moleküle befinden sich auf APZ, Monozyten, Makrophagen und auf B-Zellen. Die von diesen Molekülen präsentierten Antigenpeptide stammen von Proteinen aus Endosomen ab, die über den Mechanismus der Endozytose aus dem Extrazellulärraum aufgenommen wurden (Janeway et al., 2005). Die das Peptid präsentierenden MHC II-Moleküle werden von den T-Helferzellen erkannt, wodurch diese Chemokine und Zytokine bilden und sezernieren, die wiederum andere Zellen zur Proliferation oder Sekretion anregen (Janeway et al., 2005, Saalmüller, 2006).

Anhand der Zytokinbildung können die T-Helferzellen in die Untergruppen T₀, TH₁ und TH₂ eingeteilt werden. Während T₀-Zellen sowohl IFN- γ , Interleukin 2 (IL-2), IL-4 und IL-5 bilden, produzieren die TH₁-Zellen IL-2 und IFN- γ , während die TH₂-Zellen IL-4 und IL-5 produzieren (Saalmüller, 2006; Janeway et al., 2005).

Die von den T-Helferzellen gebildeten Zytokine haben einen unterschiedlichen Einfluss auf andere Zellen. IFN- γ fungiert in erster Linie als Aktivator von Makrophagen, während IL-2 die Synthese von IgM und IgG2 durch B-Zellen fördert. IL-4 begünstigt die Produktion von IgG1 und IgE durch Plasmazellen und IL-5 erhöht die Aktivität eosinophiler Granulozyten. Gleichzeitig bilden die T-Helferzellen Zytokine, die die andere Untergruppe regulieren. TH2-Zellen sezernieren IL-10 und Transforming growth factor - β (TGF- β), welche die Aktivierung und das Wachstum von TH1-Zellen hemmen, gleichzeitig hemmt das gebildete IFN- γ der TH1-Zellen die Proliferation der TH2-Zellen (Saalmüller, 2006; Janeway et al., 2005).

Welche Untergruppe der T-Helferzellen gebildet wird, hängt von der Umgebung der T-Zelle ab und wird auch durch Zytokine, die von anderen Zellen gebildet worden sind, beeinflusst. So fördert z. B. IL-12, welches vor allem von Makrophagen und Monozyten gebildet wird, die Differenzierung zu TH1-Zellen (Janeway et al., 2005).

Eine weitere Gruppe der T-Zellen stellen die T-Suppressorzellen dar, welche die Immunantwort herunterregulieren sollen (Kramer, 1997).

Die humorale Immunabwehr wird über die reife, naive B-Zelle oder über die von der B-Zelle abstammenden Plasmazellen vermittelt. Die B-Zellen können Antigene mittels ihres B-Zell-Rezeptors (BZR) direkt erkennen oder werden durch Zytokine der aktivierten TH2-Zellen aktiviert. Die Aktivierung durch die T-Zellen führt bei B-Zellen zur Weiterbildung in Antikörper bildende Plasmazellen (Saalmüller, 2006).

Reife, noch ruhende B-Zellen haben an ihrer Oberfläche die monomeren Immunglobuline M und D als spezifische Antigenrezeptoren. Binden hieran Antigene, werden diese mittels Endozytose aufgenommen. Dieses führt zur Aktivierung der B-Zelle. Es kommt zur verstärkten Expression von MHC II-Molekülen, von kostimulatorischen Molekülen und von Membranrezeptoren für bestimmte Zytokine, wodurch die Bedingungen zur Interaktion mit TH2-Zellen optimiert werden. Die Peptide des Proteinanteils werden im Komplex mit einem MHC II-Molekül an der Zelloberfläche präsentiert. Der Antigen-MHC II-Komplex interagiert mit dem T-Zell-Rezeptor der aktivierten TH2-Zellen und führt zu deren Zytokinausschüttung, die die klonale Expansion und die Differenzierung zur Plasmazelle zur Folge hat. Zudem führen die sezernierten Zytokine der TH2-Zellen zum Klassenwechsel, das heißt, dass von der Plasmazelle statt IgM IgG, IgA oder IgE gebildet und sezerniert wird. Welche Immunglobuline gebildet werden, hängt wiederum von der Art der Zytokine ab. Diese neu gebildeten Immunglobuline zeichnen sich durch spezifische Effektorfunktionen aus (Janeway et al., 2005).

Gleichzeitig werden bei einem Erstkontakt mit einem Antigen durch die Anregung der T-Zell-Zytokine sogenannte Gedächtniszellen gebildet. Bei einem erneuten Kontakt kommt es zu einer schnellen Sekundärantwort, wobei die Gedächtnis-B-Zellen ausreichen, um die T-Zellen zu reaktivieren. Die antigenpräsentierenden dendritischen Zellen sind nicht mehr notwendig, sodass es zu einer schnelleren Eliminierung kommt (Janeway et al., 2005).

Die von den T-Zellen unabhängige Aktivierung der B-Zellen ist nur durch Antigene möglich, die keine Peptide enthalten, wie beispielsweise Lipide oder Polysaccharide, die auf Bakterienoberflächen zu finden sind. Voraussetzung hierfür ist, dass diese Antigene eine Kreuzvernetzung der membrangebundenen Immunglobuline herbeiführen. Durch diese Art der Aktivierung kommt es zur IgM-Freisetzung. Ein Klassenwechsel der Immunglobuline und die Bildung von Gedächtniszellen ist nicht möglich (Janeway et al., 2005).

2.4 Differenzierungsantigene der Lymphozyten beim Rind

Die einzelnen Lymphozytenpopulationen können aufgrund von immunphänotypischen Oberflächenmarkern, die von den meisten Körperzellen produziert werden, unterschieden werden. Hierbei handelt es sich um Glykoproteine, die unter anderem bei Rezeptor- und Signalfunktionen sowie bei Zell-Zell-Interaktionen eine Rolle spielen. Diese

Oberflächenmarker lassen sich mit Hilfe von Antikörpern identifizieren. Es hat sich eine einheitliche Nomenklatur, basierend auf so genannten Cluster of Differentiation (CD), entwickelt (Janeway et al., 2005). Die Nomenklatur beginnt bei CD1 und ist numerisch fortlaufend bis zurzeit CD350. Die in diesem Versuch genutzten Differenzierungsantigene für die Kühe und Kälber sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht über die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle von Immunzellen zur Detektion spezifischer Leukozytenpopulationen des Rindes

CD Expression	Nachweis	Referenz
CD4 ⁺ CD8 ⁻	T-Helferzellen	Park et al., 1992; Saalmüller, 2006
CD4 ⁻ CD8 ⁺	Zytotoxische T-Zellen	Park et al., 1992; Saalmüller, 2006
CD25 ⁺ MHCII ⁻	aktivierte T- und B-Zellen	Isaacson et al., 1998
CD25 ⁻ MHCII ⁺	antigenpräsentierende Zellen, aktivierte T- und B-Zellen	Isaacson et al., 1998; Saalmüller, 2006
CD25 ⁺ MHCII ⁺	Aktivierte T- und B-Zellen	Isaacson et al., 1998
CD4 ⁺ CD25 ⁻	T-Helferzellen	Saalmüller, 2006
CD4 ⁻ CD25 ⁺	aktivierte T- und B-Zellen	Isaacson et al., 1998
CD4 ⁺ CD25 ⁺	aktivierte T-Helferzellen	Saalmüller et al., 2002
CD14 ⁺ CD5 ⁻	Makrophagen und Monozyten	Sopp et al., 1996; Berthon und Hopkins, 1996
CD14 ⁻ CD5 ⁺	T-Zellen und teilweise B-Zellen	Haas und Estes, 2001
CD14 ⁺ MHCII ⁻	Makrophagen und Monozyten	Sopp et al., 1996; Berthon und Hopkins, 1996
CD14 ⁻ MHCII ⁺	Monozyten und Makrophagen, teilweise B-Zellen	Riollet, et al., 2001
CD14 ⁺ MHCII ⁺	aktivierte Makrophagen und Monozyten	Riollet, et al., 2001

CD = Cluster of Differentiation

2.5 Differenzierungsantigene der Lymphozyten beim Schwein

Die in der vorliegenden Studie untersuchten Lymphozyten der Schweine sind mit Hilfe der in Tabelle 3 angegebenen Differenzierungsantigene detektiert worden.

Tabelle 3: Übersicht über Oberflächenmoleküle von Immunzellen zur Detektion spezifischer Leukozytenpopulationen beim Ferkel

CD Expression	Nachweis	Referenz
CD2 ⁺ CD5 ⁻	NK-Zellen	Duncan et al., 1989; Yang und Parkhouse, 1996; Gerner et al., 2009
CD2 ⁻ CD5 ⁺	B-Zellen und CD2- $\gamma\delta$ -T-Zellen	Saalmüller und Bryant, 1994; Charerntantanakul und Roth, 2007
CD2 ⁺ CD5 ⁺	$\alpha\beta$ -T-Zellen (gesamt), CD2 ⁺ - $\gamma\delta$ -T-Zellen	Charerntantanakul und Roth, 2007
SWC3 ⁺ CD21 ⁻	Myeloide Zellen (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen)	Piriou-Guzylack und Salmon, 2008
SWC3 ⁻ CD21 ⁺	B-Zellen	Butler et al. 2006; Piriou-Guzylack und Salmon, 2008
CD14 ⁺	Makrophagen und Monozyten	Piriou-Guzylack und Salmon, 2008
TCR1 ⁺ CD8 α ⁻	$\gamma\delta$ -T-Zellen	Yang und Parkhouse, 1996
TCR1 ⁻ CD8 α ⁺	zytotoxische T-Zellen, CD8 α ⁺ - $\gamma\delta$ -T-Zellen, NK-Zellen	Pauly et al., 1996; Arriëns et al., 1998; Saalmüller et al., 2002; Charerntantanakul und Roth, 2007
TCR1 ⁺ CD8 α ⁺	TCR- $\gamma\delta$ -T-Zellen	Gerner et al., 2009
CD8 α ⁺	zytotoxische T-Zellen, CD8 α ⁺ - $\gamma\delta$ -T-Zellen, NK-Zellen	Pauly et al., 1996; Arriëns et al., 1998; Saalmüller et al., 2002; Charerntantanakul und Roth, 2007
CD4 ⁺ CD8 β ⁻	T-Helferzellen	Saalmüller et al., 2002; Charerntantanakul und Roth, 2007
CD4 ⁻ CD8 β ⁺	zytotoxische T-Zellen	Denyer et al., 2006; Piriou-Guzylack und Salmon, 2008
CD4 ⁺ CD8 β ⁺	zytotoxische T-Zellen	Denyer et al., 2006; Piriou-Guzylack und Salmon, 2008
CD4 ⁺ CD25 ⁻	T-Helferzellen	Saalmüller et al., 2002
CD4 ⁺ CD25 ⁺	aktivierte T-Helferzellen, regulatorische T-Zellen	Saalmüller et al., 2002; Gerner et al., 2009
CD5 ⁺ MHCII ⁻	B-Zellen, antigenpräsentierende Zellen, NK-Zellen	Appleyard und Wilkie, 1998; Butler et al., 2006
CD5 ⁻ MHCII ⁺	antigenpräsentierende Zellen, NK-Zellen	Saalmüller, 2006; Gerner et al., 2009
CD5 ⁺ MHCII ⁺	B-Zellen, ggf. T-Zellen (ruhende CD8 ⁺ -Zellen)	Butler et al. 2006
CD45RC ⁺	Aktivierte T-Helferzellen herunterreguliert; auch Expression auf NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen möglich	Saalmüller et al., 2002; Gerner et al., 2009
CD14 ⁺ CD21 ⁻	Makrophagen und Monozyten	Piriou-Guzylack und Salmon, 2008
CD14 ⁻ CD21 ⁺	B-Zellen	Butler et al. 2006
CD2 ⁺ CD16 ⁻	$\gamma\delta$ -T-Zellen	Charerntantanakul und Roth, 2007
CD2 ⁻ CD16 ⁺	NK-Zellen, Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen	Piriou-Guzylack und Salmon, 2008
CD2 ⁺ CD16 ⁺	NK-Zellen	Piriou-Guzylack und Salmon, 2008

CD = Cluster of Differentiation, modifiziert nach PaBlack (2010)

2.6 Abwehrmechanismen der Milchdrüse beim Rind

Der erste Abwehrmechanismus gegenüber Keimen bei der Milchdrüse ist der Strichkanal, der eine physikalische Barriere darstellt, wenn er geschlossen ist. Keime, die in die Milchdrüse eindringen, müssen zunächst den *M. sphincter papillae* am *distalen* und den Fürstenbergischen Venenring am *proximalen* Ende des 1 cm langen Strichkanals überwinden, um über die folgende Zitzenzisterne in die Drüsenzisterne zu gelangen. Nach dem Melken dauert es ca. zwei Stunden, in denen Bakterien leichter eindringen können, bis der *M. sphincter papillae* den Strichkanal wieder fest verschlossen hat (Targowski, 1983; Rainard und Riollot, 2006). Zwischen den Melkzeiten und in der Trockenstehzeit ist der Strichkanal durch einen Keratinpfropfen verschlossen. Keratin ist in der Lage, kapsellose Bakterien, die eine Mastitis verursachen können, zu binden und so ein Einwandern in die Drüsenzisterne zu verhindern (Rainard und Riollot, 2006; Sordillo et al., 1997). Ebenso übernehmen gesättigte und nicht gesättigte Fettsäuren die Funktion von Bakteriostatika und sind mit dem Keratin des Strichkanals assoziiert (Miller et al., 1992).

Ist der Strichkanal überwunden, werden die angeborenen humoralen und zellulären Abwehrmechanismen der Milchdrüse aktiviert, um die pathogenen Keime zu bekämpfen. Hierzu gehören bei der humoralen Abwehr neben dem Komplementsystem die Proteine Lakto- und Transferrin. Beide Proteine sind eisenbindend und schützen vor oxidativen Radikalen, die mit Hilfe von freiem Eisen katalysiert wurden (Legrand, et al., 2004). Sie sind aber nur in geringen Konzentrationen in der Milch vorhanden. Das Enzym Xanthinoxidase kommt in der Membran von Milchfetttröpfchen vor und wandelt anorganisches Nitrit, das von Bakterien gebildet werden kann, in Stickstoffmonoxid um. Dadurch zeigt Xanthinoxidase nach der Zugabe von Nitrit eine bakteriostatische Wirkung gegenüber *E. coli*-Bakterien in Milch (Hancock et al., 2002). Ebenso sind natürliche Antikörper mit Toxin-neutralisierender Wirkung und Fähigkeit zur Opsonierung, hier insbesondere IgM, in der Milch vorhanden (Hill et al., 1983; Rainard und Riollot, 2006).

Zur zellulären Abwehr der Milchdrüse gehören neben den Makrophagen, den neutrophilen Granulozyten und den NK auch die Epithelzellen in der Milch (MEZ). Inwieweit die MEZ bei der Mobilisierung von Leukozyten und der lokalen Abwehr mitwirken, ist noch nicht erforscht (Rainard und Riollot, 2006). Im Gewebe der gesunden Milchdrüse findet man eine geringe Anzahl von T- und B-Lymphozyten sowie einige Makrophagen und einzelne Zellen, die die Form von dendritischen Zellen haben. Zusätzlich findet man im subepithelialen Gewebe, insbesondere im Bereich der Zitze, Plasmazellen (Nickerson et al., 1984; Leitner et al., 2003).

Als Hauptzellen in der Milch wurden früher die MEZ angesehen (Schalm et al. 1971). Eine spätere Studie zeigte allerdings, dass MEZ nur vereinzelt in der Milch zu finden waren, während die Makrophagen den Hauptzelltyp im Gewebe und im Sekret der Milchdrüse darstellten (McDonald und Anderson, 1981).

2.7 Somatische Zellzahl (SCC)

Die somatische Zellzahl setzt sich aus Makrophagen, Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Epithelzellen zusammen (Pillai et al., 2001). Des Weiteren können eosinophile und basophile Granulozyten vorkommen. In der Tabelle 4 ist das Zelldifferenzialbild von Kuhmilch dargestellt.

Die routinemäßige Bestimmung der somatischen Zellzahl ist der schnellste und gängigste Test, mit dem die Gesundheit der Milchdrüse überprüft werden kann. Bei der gesunden Milchdrüse einer Kuh kann die somatische Zellzahl unter 20.000 Zellen pro ml Milch liegen, wobei der Grenzwert bei bis zu 100.000 Zellen pro ml Milch liegt. Bei Zahlen über diesem Wert geht man von einer Entzündung in der Milchdrüse aus (DVG,

2000). Rainard und Riollet (2006) berichten, dass die SCC in nicht infizierten und nicht entzündeten Eutervierteln unter 100.000/ ml Milch liegen.

Bei Sekretionsstörungen kommt es aufgrund der geringeren Verdünnung zu einer erhöhten Zellzahl, wohingegen der Anstieg der SCC bei einer Entzündung durch die intensive Einwanderung der neutrophilen Granulozyten in die Milch bedingt ist.

Tabelle 4: Zelldifferenzialbild von Milch gesunder Kühe (in % der Gesamtzellzahl)

Makrophagen	Lymphozyten	PMN	Epithelzellen	Referenz
0 ¹	5	95	0	Paape et al., 1979
3 ²	22	75	0	Paape et al., 1979
80	16	3	1	Lee et al., 1980
60	28	10	2	Paape et al., 1981
63	1,5	34	2,4	Kurzhals et al., 1985
48	15	37	-	Wever u. Emanuelson, 1989
30	24	26	19	Miller et al., 1991
74	14	12	-	Östensson, 1993
13		29	45	Leitner et al., 2000
6 ³	77	12	5	Dosogne et al., 2003
10 ⁴	59	27	4	Dosogne et al., 2003
14	78	9		Hamed et al., 2010

PMN = neutrophile Granulozyten, 1 = Kühe, 2 = Färsen; 3 = frühe Laktation, 4 = mittlere Laktation; modifiziert nach Schröder (2003)

Insgesamt soll in gesunden Milchdrüsen nur eine geringe Anzahl an Neutrophilen vorkommen, die sich aber zur Trockenstehzeit um 40% erhöhen kann (Rainard und Riollet, 2006). Bei Verteilung der Lymphozyten kommen in der gesunden Milchdrüse hauptsächlich CD8⁺ Lymphozyten vor, während bei Entzündungen hauptsächlich CD4⁺ Zellen zu finden sind. Diese werden durch antigenpräsentierende B Lymphozyten und Makrophagen aktiviert (Park et al., 2004). Zu finden sind die CD8⁺ Zellen im Bereich der Alveolen, während die CD4⁺ Zellen hauptsächlich im interalveolaren Gewebe der Milchdrüse vorkommen (Leitner et al., 2003).

2.8 Die Auswirkungen der unterschiedlichen Laktationsphasen auf die Immunzellen im peripheren Blut von Milchkühen

Bei Vergleich der verschiedenen Laktationsphasen tritt während der peripartalen Phase die relativ niedrigste Zahl der T-Lymphozyten in der Milch auf. In der späten Laktationsphase kann dann ein deutlicher Anstieg des prozentualen Anteils der T-Lymphozyten festgestellt werden. Im Gegensatz dazu sind die B-Zellen und Makrophagen am stärksten in der peripartalen Phase vertreten und sinken in der späten Laktationsphase deutlich ab (Hurley et al., 1990, Park et al., 1992).

Im Blut variiert der prozentuale Anteil der Subpopulationen der T-Zellen während der peripartalen Phase, insbesondere um den Zeitpunkt der Geburt. MHC II-positive B-Zellen bleiben bis nach der Geburt relativ konstant, bevor sie dann auf ein niedrigeres Niveau abnehmen. Bei tragenden Tieren ist der prozentuale Anteil an MHC II-positiven B-Zellen vergleichbar mit dem von gesunden nicht tragenden Tieren. Tragende Tiere

haben allerdings zu fast allen Zeitpunkten einen geringeren prozentualen Anteil an allen T-Zell-Subpopulationen als nicht tragende Tiere, was durch den physikalischen und metabolischen Stress verursacht werden soll (van Kampen und Mallard, 1997).

2.9 Die Besonderheiten der Entwicklung des Immunsystems bei jungen Ferkeln

Eine anatomische Besonderheit bei Schweinen ist der reverse Aufbau der Lymphknoten. Im Gegensatz zu allen anderen Säugetieren befindet sich das Markgewebe im peripheren Bereich, während das Rindenparenchym zentral liegt. Dieser Aufbau wird als Typus inversus bezeichnet (König und Liebich, 2008).

Die zugeführte Lymphe wird in der zentralen Zyste gemischt und dann über das gesamte Lymphgewebe verteilt (Nickel et al., 1996).

Aufgrund der epithelio-chorialen Plazenta beim Schwein können keine mütterlichen Antikörper auf den Fetus übertragen werden. Die Ferkel kommen dadurch mit einem unvollständigen Immunsystem auf die Welt. Damit das Immunsystem sich vollständig entwickeln kann, sind die Ferkel zum einen davon abhängig, die maternalen Antikörper über die Milch aufzunehmen, und zum anderen müssen sie externen Reizen ausgesetzt sein. Das intestinale Immunsystem erreicht seine volle Funktionsfähigkeit im Absetzalter, d. h. mit frühestens acht Wochen. Kommt es zu keiner oder nur zu einer limitierten externen Stimulation, resultiert das in reduzierten T-Zellzahlen (Sinkora et al., 1998; Sinkora et al., 2005, Lallès et al., 2007). Dagegen differenzieren sich die Thymus $CD4^+CD8^+$ -Zellen bereits ab dem 70. Tag der Trächtigkeit zu $CD4^+CD8^-$ oder $CD4^-CD8^+$ -Zellen (Sinkora et al., 2000).

Die Lymphozyten werden nach Ausbildung des T-Zell-Rezeptors in $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen unterteilt (Yang und Parkhouse, 1996; Charerntantanakul und Roth, 2007). Die $CD4^+CD8^-$ naiven T-Helferzellen, $CD4^+CD8_{low}$ T-Gedächtniszellen, $CD4^-CD8_{high}$ zytotoxische T-Zellen und $CD4^-CD8_{low}$ -T-Zellen mit bisher noch ungeklärter Funktion bilden Subpopulationen der $\alpha\beta$ -T-Zellen. $CD4^-CD8_{high}$ und $CD4^-CD8_{low}$ Zellen werden meistens als $CD4^-CD8^+$ Zellen zusammengefasst. Die $CD4^+CD8^+$ Zellen findet man bei anderen Tierarten lediglich im Thymus, insofern weist das Schwein hier eine Spezifität auf (Pescovitz et al., 1985; Saalmüller et al., 1987, 1989, Saalmüller und Bryant, 1994).

Die $\gamma\delta$ -T-Zellen werden durch die $CD2^+-\gamma\delta$ -T-Zellen und durch die $CD2^- \gamma\delta$ -T-Zellen repräsentiert. $CD2^+-\gamma\delta$ -T-Zellen sind in der Lage, MHC II- und CD80/CD86-Co-stimulierende Moleküle zu exprimieren und dadurch eine antigenpräsentierende Funktion übernehmen (Takamatsu et al., 2002). Zusätzlich weist die Subpopulation $CD2^+CD4^-CD8_{low}-\gamma\delta$ -T-Zellen eine antigenunspezifische zytotoxische Aktivität auf (Saalmüller et al., 1994; Pauly et al., 1996). Die $CD2^- \gamma\delta$ -T-Zellen scheinen keine immunologische Effektorfunktion aufzuweisen, da sie weder durch Antigen, noch durch Mitogene stimuliert werden können (Hammerberg und Schurig, 1986; Binns, 1994). Andere Funktionen, die diese Zellen übernehmen, sind bisher noch nicht bekannt.

Der prozentuale Anteil der $\gamma\delta$ -TCR-Zellen an der T-Zellpopulation in den Lymphknoten bleibt, unabhängig vom Alter der Ferkel, konstant, während im Blut und in der Milz ein Anstieg mit zunehmendem Alter zu verzeichnen ist. Hierbei ist das Verhältnis der $CD8^+/CD8^-$ -Zellen der $\gamma\delta$ -TCR Lymphozyten im Blut und in der Milz konstant, in den Lymphknoten findet eine altersabhängige Vermehrung statt. Gleichzeitig wird mit zunehmendem Alter ein signifikanter Anstieg der $CD4^+/CD8^+$ doppelt positiven Zellen im Blut und in Geweben gefunden (Stepanova et al., 2007). Im Alter von 12 – 17 Tagen nehmen die intraepithelialen Lymphozyten im Darm deutlich zu und erfahren bis zum

dritten Lebensmonat einen weiteren Anstieg. Zwischen Tieren im Alter von einem Jahr und Tieren mit viereinhalb Jahren war keine Zunahme mehr zu verzeichnen (Rothkötter et al., 1999).

2.10 Fragen, die durch die Studie beantwortet werden sollen

Die Bioverfügbarkeit von anorganisch bzw. organisch gebundenem Selen ist nicht vollständig geklärt. Bei dem ersten Teil des Versuches (V1) sollte über einen Zeitraum von sechzehn Wochen die Auswirkung von Selen auf immunologische Parameter in der Milch von Kühen untersucht werden. Hierbei erhielten die Kühe 4 mg Selen pro Tag während der Trockenstehzeit und 6 mg Selen pro Tag während der Laktation. Es wurden die Effekte verschiedener Se-Quellen auf die lymphozytäre und phagozytäre Immunantwort der Milch und des Blutes von Kühen und ihren Kälbern im ersten Drittel der Laktation untersucht.

Im zweiten Teil des Versuches (V2) sollten die Bioverfügbarkeit bzw. der Carry-Over von Selen aus den unterschiedlichen Milchqualitäten aus V1 bei abgesetzten Ferkeln untersucht werden. Weiterhin sollten als funktionelle Aspekte ausgewählte Immunparameter erfasst werden. Die Ferkel wurden hierzu am Lebenstag 35-37 eingeschläfert.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für die erste Hälfte des Versuches (V.1) wurden insgesamt 16 Milchkühe, die sich in ihrer ersten bis vierten Laktation befanden, und 14 Kälber (Holstein Friesian am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin) genutzt. Die Abkalbungen erfolgten zwischen Juni 2008 und März 2009. In diesem Zeitraum wurden die Kühe auf drei Gruppen aufgeteilt (Kontrollgruppe (Kontrolle): 5 Kühe, 5 Kälber; Versuchsgruppe mit Natriumselenitzufütterung (AS): 5 Kühe, 4 Kälber; Versuchsgruppe mit Se-Hefezufütterung (OS): 6 Kühe, 5 Kälber), wobei darauf geachtet wurde, dass die Gruppen gleichmäßig über das Jahr verteilt waren. Eine Kuh aus der AS-Gruppe hatte nach der Geburt eine Labmagenverlagerung, so dass sie für einen Tag tagsüber in der Klauentierklinik stand. Die Kuh wurde noch am selben Tag zurück zum BfR gebracht und hat weiterhin am Versuch teilgenommen.

In der zweiten Hälfte des Versuchs (V.2) wurden 9 Sauen (Topigs-SNW) und 30 Ferkel (Topigs x Piétrain) verwendet. Die Ferkel wurden mit 23 ± 1 Tagen abgesetzt und gleichmäßig auf drei Gruppen aufgeteilt, die mit Milch der Kühe des Versuchsabschnitts V1 gefüttert wurden (Kontrollgruppe (Milch aus V1 Kontrolle), Versuchsgruppe AS (Milch aus V1 AS), Versuchsgruppe OS (Milch aus V1 OS)).

3.2 Haltung

V.1 Kühe und Kälber

Die Kühe wurden auf dem Versuchsgut des Bundesinstitutes für Risikobewertung in einem Laufstall (befestigter Boden mit Blattscheideschieber) mit Liegebuchten, der durch Absperrungen in zwei Abteile unterteilt werden konnte, gehalten. Abkalbeboxen befanden sich im gleichen Stallgebäude, von dem dem Liegeboxenstall durch einen Treib- und Versorgungsgang getrennt. Die trockenstehenden und die laktierenden Kühen waren jeweils getrennt voneinander in einem der Laufställe untergebracht. Zusätzlich hatten die Tiere bei trockenem Wetter tagsüber Zugang zu einem Sandpaddock. Das Umstallen in die Abkalbeboxen erfolgte eine Woche vor dem errechneten Geburtstermin. Die Kühe verblieben dort bis zum siebten Tag nach der Geburt.

Morgens und abends wurden die Kühe im Melkstand gemolken. In den Abkalbeboxen wurden die Kühe mithilfe einer mobilen Melkkanlage gemolken. Frisches Wasser stand den Tieren jederzeit über einen Wassertrog zur Verfügung. Die Fütterung des Milchleistungsfutters erfolgte über einen Automaten, an dem die Kühe über den Tag hinweg ihre Ration in mehreren kleineren Portionen mithilfe eines Transponders individuell abrufen konnten. Die Fütterung der Totalen Mischration (TMR) erfolgte ad libitum über einen durch ein Fressgitter abgegrenzten Futtertisch. Die Kälber wurden nach der Geburt in einem abgesonderten Bereich in einer Kälberbox, welche mit Stroh eingestreut war, untergebracht. Die Milchtränke, in Form von einer Warmtränke, erfolgte dreimal täglich mithilfe eines Saugeimers, während Wasser zur freien Verfügung stand.

V.2 Sauen und Ferkel

Die Sauen wurden bis drei Tage vor der Geburt in Boxen mit planbefestigtem Boden gehalten. Sieben Abferkelboxen waren mit Stroh ausgelegt und hatten einen Ferkelschlupf, über dem eine Rotlichtlampe hing, die durchgehend eingeschaltet war. Zwei Abferkelboxen waren mit einem Metallgitter zur Fixierung der Sauen ausgestattet. Der Boden war zum Teil mit einem Ferkelspaltenboden versehen und zum Teil planbefestigt. Beide Boxen hatten ebenfalls einen Ferkelschlupf mit Rotlichtlampe. Bis zur Ge-

burt wurden die Sauen zweimal, nach der Geburt dreimal täglich über einen Futtertrog gefüttert. Frisches Wasser stand den Tieren über eine Nippeltränke ad libitum zur Verfügung. Die Ferkel wurden nach dem Absetzen zu jeweils drei Tieren in Boxen mit Gummimatten oder befestigtem Boden und Stroh gehalten. Zusätzlich war im hinteren Bereich der Box eine Rotlichtlampe als Wärmequelle angebracht, welche 24 Stunden am Tag eingeschaltet war. Die Fütterung erfolgte über einen Futtertrog dreimal täglich, während frisches Wasser über eine Nippeltränke oder einen Trog zur freien Verfügung stand.

3.3 Versuchsfutter und Fütterung

V.1 Kühe und Kälber

Als Grundfutter wurde eine von dem Versuchsgut selbst hergestellte TMR gefüttert, die vom 15.03. bis zum 14.06.2008 und vom 07.10.2008 bis zum 04.06.2009 zusätzlich mit Futterrüben angereichert war (Tabelle 5). Die TMR hatte einen Gehalt von 0,15 – 0,20 mg Selen pro kg Trockenmasse. Die tägliche Trockenmasseaufnahme wurde mit 10 kg angenommen. Die laktierenden Kühe erhielten ein kommerzielles Kraftfutter als Milchleistungsfutter, welches ohne zusätzliche Se-Beimischung hergestellt wurde. Durch die TMR war rechnerisch die benötigte Energie für den Erhaltungsbedarf und für ca. 12 Liter Milch pro Kuh abgedeckt. Die Kühe erhielten ein Äquivalent von 1 kg Kraftfutter für zwei Liter Milch. Die Kontrollgruppe V.1 erhielt ein Maisschrot ohne Se-Beimischung. Bei Versuchsgruppe V1.AS wurde dem Maisschrot Natriumselenit und bei Versuchsgruppe V.1.OS Se-Hefe (Sel-Plex 1000; Batch No. 71658-2, CNCM-I 3060) zugesetzt, sodass eine Se-Menge von 200 mg pro kg Maisschrot eingestellt war. Der Se-Gehalt der Maisschrotmischung wurde mithilfe der Atomabsorptionsspektrophotometrie (AAS) überprüft. Die Se-haltige Maisschrotmischung wird im weiteren Verlauf als Versuchsfutter bezeichnet. Jeden Morgen zur Melkzeit wurden den Kühen vor der Geburt 20 Gramm und während der Laktation 30 Gramm des Versuchsfutters gefüttert, sodass sie 4 mg Selen pro Tag während der Trockenstehzeit und 6 mg Selen pro Tag während der Laktation erhalten haben. Auf das Gesamtfutter umgerechnet, wäre dies mit 0,4 ppm Selen versetzt gewesen, was zwischen der Empfehlung der GfE für Milchkühe (0,2 ppm Selen) und der gesetzlich erlaubten Höchstmenge für Selen (0,5 ppm Selen) liegt. Die Kälber wurden ausschließlich mit dem Kolostrum bzw. mit der Milch ihrer Mütter gefüttert. Dreimal täglich bekamen die Kälber mit Hilfe eines Tränkeimers je zwei Liter Kolostrum bzw. Milch.

Tabelle 5: Zusammensetzung und Selengehalt der Totalen Mischration (TMR) sowie Nährstoffzusammensetzung und Energiegehalt des Kraftfutters für die Milchkühe

Futterkomponente	%TMR (FM)	Selen ($\mu\text{g}/\text{kg}$ FM)	$\pm\text{SE}$	n
Maissilage	75,6	12,2	0,001	2
Heu	4,44	20,6	4,00	2
Stroh	4,44	27,0	0,05	2
Rüben	4,44	153	16,7	6
Sojaextraktionsschrot	2,22	227	15,0	5
Rapsschrot	4,44	87,6	9,00	3
Vitamiertes Mineralfutter ¹	4,44	1681	110	5
Kraftfutter ²		178	102	9
Nährstoffzusammensetzung und Energiegehalt der TMR				
Trockenmasse %	49,5		0,89	6
Rohprotein (%TS)	10,7		0,01	6
Rohfett (%TS)	2,66		0,01	6
Rohasche (%TS)	5,29		0,02	6
Rohfaser (%TS)	17		0,15	6
Neutral-Detergenzien-Fasern (%TS)	53,1		4,05	4
Säure-Detergenzien-Fasern (%TS)	17,3		0,28	4
Stärke (%TS)	13,1			
Zucker (%TS)	0,69			
nRp (%TS) ³	13,6			
RNB ³	-0,11			
NEL (MJ/kg) ³	6,31			

¹ 5,5% Ca, 1,5% P, 2,5% Mg, 4,20% Na; 460.000 IU Vitamin A, 33.500 IU Vitamin D3, 500 IU Vitamin E und 490 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ je kg, Energiegehalt 3,6 MJ NEL/kg

² 0,78% Ca, 0,5% P, 0,3% Na; 10000 IU Vitamin A, 800 IU Vitamin D3, 90 IU Vitamin E und 13 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ je kg, Energiegehalt 7 MJ NEL/Kg. Ab 12 l Milch wurden je 2 l Milch 1 kg von dem Kraftfutter zusätzlich gegeben.

³ Diese Angaben wurden rechnerisch ermittelt

V.2

Die Sauen erhielten während der Trächtigkeit und nach der Geburt jeweils eine kommerzielle Futtermischung auf Basis von Gerste, Weizen und Sojaextraktionsschrot (Tabelle 6). Das Futter wurde ohne eine zusätzliche Se-Supplementierung hergestellt und enthielt 184 bzw. 180 μg Selen pro kg lufttrockene Substanz (88% TM), sodass es den Empfehlungen der GfE (2006) für Sauen entsprach. Die Ferkel erhielten nach dem Absetzen die Milch aus V.1 (Tabelle 7), der zusätzlich noch eine selenfreie Spurenelement - Ergänzungsmischung untergemischt wurde, um den Bedarf der Ferkel zu decken.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Mischfutters für die Sauen sowie Nährstoff- und Energiegehalte des Sauenfutters

Komponenten	Trächtigkeitsfutter (% FM)	Laktationsfutter (% FM)
Gerste	46,5	45,0
Weizen	18,0	29,0
Sojaextraktionsschrot, dampferhitzt	6,00	17,0
Weizenkleie	14,0	2,00
Calciumcarbonat	0,65	1,30
Sojaöl	1,50	1,00
Monocalciumphosphat	0,65	1,00
Melasse	1,00	1,00
Melasseschnitzel	4,00	1,00
Natriumchlorid	0,50	0,60
Weizengrießkleie		0,50
Magnesiumoxid		0,10
Zusatzstoffe ¹	1,20	0,50
Nährstoff- und Energiegehalte des Sauenfutters		
ME (MJ/kg)	11,6	13,0
Rohprotein (%TS)	13,5	17,0
Rohfett (%TS)	3,50	2,40
Rohfaser (%TS)	7,50	4,50
Rohasche (%TS)	4,56	6,00
Lysin (%TS)	0,68	1,00
Calcium (%TS)	0,68	0,80
Phosphor (%TS)	0,65	0,60
Natrium (%TS)	0,22	0,25

¹Zusatzstoffe: 9.600 IE Vitamin A, 1.440 IE Vitamin D3, 96 mg Vitamin E, 12 mg Kupfer (als Kupfer-(II)-Sulfat, Pentahydrat) L-Lysin-HCL

Die Milch der Kühe wurde im Zeitraum zwischen der neunten und zwölften Laktationswoche an drei bis fünf aufeinander folgenden Tagen von den Kühen aller Versuchsgruppen mit dem Ziel gesammelt, diese Milch später an Ferkel zu verfüttern. Die Milch wurde in Flachbeuteln aus Aluminium-Verbundfolie (Long Life for Art, Eichstetten, Deutschland) zu je 1,5 – 2 Liter Milch abgefüllt, Vakuum verschweißt und bei minus 20 °C bis zur Verfütterung an die Ferkel eingefroren. Während des Versuches V2 wurde die jeweils benötigte Zahl an Aluminiumbeuteln am Abend vor dem Verfüttern aus der Gefrierzelle geholt und bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Ferkel erhielten grundsätzlich Gemische aus Milchen von jeweils zwei Kühen entsprechend der Versuchsanordnung, die in einem Eimer gemischt und mit einem Tauchsieder auf 38 °C erwärmt wurden. Mit einem Messbecher wurde die entsprechende Milchmenge pro Box abgemessen und dann das Spurenelement - Ergänzungsfutter (Tabelle 8) eingemischt.

Die Ferkel erhielten in der ersten Woche täglich 1,5 Liter, in der zweiten Woche zwei Liter Milch pro Tier und Tag. In die Milch wurden 60 g eines Spurenelement - Ergänzungsfutters pro Ferkel und Tag zugegeben, um den Bedarf der Tiere zu decken. Dabei erhielt die Gruppe V.2.Kontrolle die Milch aus der Gruppe V.1.Kontrolle, V.2.AS Milch aus der Gruppe V.1.AS und V.2.OS Milch aus der Gruppe V.1.OS. Die Inhalts-

stoffe der Milch für die jeweiligen Gruppen sind in Tabelle 7, die Zusammensetzung des Spurenelement - Ergänzungsfutters ist in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 7: Angaben zu den mittleren Nährstoff- und Se-Gehalten in der Kuhmilch in Abhängigkeit von dem Fütterungsregime, die die Ferkel der verschiedenen Gruppen erhielten

Inhaltsstoffe	V.2 Kontrolle (g/l)	V.2 AS (g/l)	V.2 OS (g/l)
Fettgehalt	40	40	40
Eiweiß	30	30	30
Laktose	50	50	50
Trockenmasse	130	130	140
Selen (µg/l)	18,4	21,4	25,6

Tabelle 8: Mittlere Zusammensetzung des für die Ferkel eingesetzten Spurenelement - Ergänzungsfutters

Komponenten	(g/kg)
Maisstärke	831
Zellulose (kristallin)	166
Zinkchlorid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)	0,83
Mangan-II-Sulfat-Monohydrat (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)	0,28
Eisen-3-chlorid-hexahydrat (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)	1,99

3.4 Versuchsdurchführung

V.1 Se-Fütterung an Milchkühe

Die tragenden Kühe aus der Herde des Versuchsgutes wurden nach ihrem voraussichtlichen Abkalbetermin einer von drei Gruppen zugeteilt. Dem Versuch vorgeschaltet wurde eine Fütterungsperiode von acht Wochen, in der die Kühe einheitlich mit einer vergleichsweise Se-armen TMR gefüttert wurden. Sechs Wochen vor dem errechneten Geburtstermin erhielten die Tiere dann ihre jeweilige Versuchsration. Um sicherzustellen, dass jede Kuh nur ihr eigenes Versuchsfutter aufnehmen konnte, wurden sie morgens mit Hilfe des Fanggitters jeweils an einem Futterplatz fixiert, bis sie ihre Ration aufgefressen hatten. Eine Gesundheitskontrolle erfolgte bei den Kühen vor der Geburt täglich beim Füttern, während die laktierenden Kühe täglich beim Melken kontrolliert wurden.

V.2 Verfütterung von Se-haltiger Kuhmilch an Ferkel

Die Sauen wurden während der Trächtigkeit mit dem Trächtigkeits- und nach der Geburt mit dem Laktationsfutter dreimal täglich gefüttert und alle zwei Tage auf ihre Gesundheit kontrolliert. Eine Wägung erfolgte vor dem Einstellen und beim Absetzen der Ferkel. Zwischen dem ersten und dritten Lebenstag erhielten die Ferkel einen ml Eisendextran 20 (Bremer Pharma GmbH, Deutschland) pro Tier. Die Ferkel wurden zwischen dem 23. und 25. Tag abgesetzt und anhand ihres Geschlechts und der Körpermasse in eine von drei Gruppen zufällig aufgeteilt und in Dreiergruppen in den jeweiligen Buchten gehalten. Die Fütterung der Ferkel erfolgte an einem Rundtrog dreimal täglich. Die Milch wurde vor dem Verfüttern auf 38 °C erwärmt und anschließend mit dem untergerührten Spurenelement - Ergänzungsfutter verfüttert. Die Futteraufnahme wurde bei jeder Mahlzeit pro Box erfasst und notiert. Eine Gesundheitskontrolle der Ferkel erfolgte täglich, während sie vor dem Absetzen wöchentlich und nach dem Absetzen zweimal wöchentlich gewogen wurden. Insgesamt erstreckte sich die Fütterungsphase auf 13 - 15 Tage, wobei an jedem dieser Tage je drei Ferkel aus zwei und vier aus einer Gruppe getötet wurden. Die Fütterung am Tötungstag erfolgte ca. zwei Stunden vor der Tötung.

3.5 Probengewinnung und Sektionsgang

V.1

Den Kühen wurde zur Feststellung des Se-Gehaltes sechs und drei Wochen vor dem errechneten Geburtstermin, am Tag der Geburt, sowie eine und 12 Wochen p. p. Blut abgenommen. Für die immunologischen und hämatologischen Untersuchungen wurde eine Woche und 12 Wochen p. p. gewonnenes Blut genutzt. Das Blut wurde aus der Vena jugularis mit Hilfe einer Kanüle (Strausskanüle, Dispomed Witt ohG, Gelnhausen, Deutschland) entnommen und für die Se-Untersuchungen in jeweils vier 8 ml Serumröhrchen (S-Monovette® 8 ml Serum Z, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Für die immunologischen Untersuchungen wurde Lithium-Heparin-Blut in zwei 8 ml Plasmaröhrchen (S-Monovette® 8 ml Lithium-Heparin, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) und für die hämatologischen EDTA – Blut in einem 8ml Röhrchen (S-Monovette® 8 ml Kalium-EDTA, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verwendet.

Bei den Kälbern wurde eine Woche nach dem Abkalben Blut entnommen, um immunologische und hämatologische Parameter sowie den Se-Gehalt zu untersuchen. Darüber hinaus wurde der Se-Status zusätzlich am Tag der Geburt erhoben. Die Probenentnahme erfolgte auch hier aus der Vena jugularis. Das Blut wurde in jeweils zwei Se-

rumröhrchen und in je einem EDTA- bzw. Lithium-Heparin-Plasmaröhrchen gefüllt. Die Milchproben wurden beim täglichen Melken gewonnen und in 1 l Weithalsflaschen HDPE (Nalgene Labware, Roskilde, Dänemark) aufbewahrt. Bis zur Analyse wurden diese bei 4°C gekühlt gelagert. Für die Erhebung der immunologischen Parameter wurden Milchproben neun und 12 Wochen p. p. gewonnen. Für die Bestimmung des Se-Status, der für eine parallel durchgeführte Dissertationsarbeit erhoben wurde (Salmann, 2010), wurden eine und 12 Wochen p. p. Milchproben gezogen.

V.2

Von den Sauen wurde am siebten und 13. Tag p. p. Milch gewonnen, um den Se-Gehalt zu ermitteln. Hierzu wurde den Sauen morgens beim Füttern fünf Minuten vor dem Melken 3 ml Oxytocin (Depotocin, Veyx Pharma GmbH, Schwarzenborn, Deutschland) gespritzt. Pro Sau wurden 10 – 15 ml Milch gewonnen und bis zur Analyse bei -20°C eingefroren. Den Ferkeln wurde am Tag des Absetzens (22. ± 1 Lebenstag) Blut aus der Vena jugularis entnommen. Am 36. ± 1 Lebenstag wurden sie mit Ketaminhydrochlorid (Ursotamin®, 10%ig, Serumwerk Bernburg AG Deutschland) und Azaperon (Stresnil®, Jansen-Cilag, Neuss, Deutschland) intramuskulär (0,2 ml/ 0,1 ml pro kg KM) sediert. Danach wurden sie durch eine intrakardiale Gabe eines Kombinationspräparates bestehend aus Tetracainhydrochlorid, Mebezoniumiodid und Embutramid (T61®, Intervet, Deutschland) eingeschlafert.

3.6 Futtermitteluntersuchung

Nach den Vorschriften der Weender Analyse (Naumann und Bassler, 2004) wurden die Rohnährstoffgehalte der Futtermischungen analysiert. Die genauen Angaben der Geräte und Chemikalien befinden sich in Tabelle 9 und 10.

3.6.1 Rohnährstoffe (Weender Analyse)

Trockensubstanz (TS)

Das Probenmaterial wurde zur Bestimmung der Trockensubstanz in einem Porzellantiegel eingewogen und bei 105°C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach Abkühlung im Exsikkator auf Zimmertemperatur wurden die Proben erneut gewogen und der TS-Gehalt berechnet, der in Prozent der ursprünglichen Substanz (uS) angegeben wurde.

Rohasche (Ra)

Die Ermittlung der Rohasche erfolgte unmittelbar nach der TS-Bestimmung. Hierfür erfolgte eine Veraschung der Proben über neun Stunden im Muffelofen bei 600°C und eine Wägung nach dem Abkühlen im Exsikkator.

Rohprotein (Rp)

Über die Messung des Stickstoffgehaltes mit Hilfe eines Makro-Elementaranalysators wurde das Rohprotein der Probe bestimmt.

Rohfett (Rfe)

Für die Rohfettanalyse wurde eine Extraktion des Fettes für sechs Stunden mit Petroläther nach Soxhlet durchgeführt. Um den Petrolether anschließend abzdampfen, schloss sich eine Trocknung bei 80°C im Trockenschrank für eine Stunde an. Durch die Gewichtsbestimmung des Probengefäßes mit und ohne Rohfett wurde die Menge an Rohfett rechnerisch ermittelt.

Auf den Säureaufschluss wurde verzichtet, da sich daraus keine Unterschiede der Analyse ergeben.

Rohfaser (Rfa)

Der Rohfasergehalt wurde mittels eines Rohfaser-Analysators bestimmt. Hierzu wurden die Proben in 1,25 %iger Schwefelsäure gekocht, die flüssige Phase abgesaugt, 1,25 %ige Natronlauge hinzugefügt und danach mit heißem destilliertem Wasser gespült. Die Glasfiliertiegel wurden nach der Entnahme aus dem Analysator im Trockenschrank bei 105 °C getrocknet, gewogen und dann bei 500 °C im Muffelofen verascht. Durch die Subtraktion des Gewichtes der Rohasche vom Gewicht des getrockneten Inhalts der Glasfiliertiegel wird der Rohfasergehalt berechnet.

Tabelle 9: Für die Futtermitteluntersuchung genutzte Geräte

Gerät, Bezeichnung	Hersteller	Ort
Exsikkator: Typ Novus NS 24/29	Schott/Duran	Mainz, Deutschland
Heraeus® Trockenschrank T5042	Heraeus electronic	Hanau, Deutschland
Makro-Elementaranalysator vario max CN	Elementar Analysesystem GmbH	Hanau, Deutschland
Muffelofen: Heraeus® Thermicon® P	Thermo Scientific	Karlsruhe, Deutschland
Rohfaser-Analysator Ankom ²⁰⁰⁰ Fibre Analyser	Ankom Technology	Macedon, USA

Tabelle 10: Für die Futtermitteluntersuchung genutzte Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Natronlauge	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Petroleumbenzin, reinst.	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure (95-97 %)	J.T.Baker	Griesheim, Deutschland

3.7 Analyse der Milch

Inhaltstoffe der Milch

Die Inhaltsstoffe der Milch wurden am BfR untersucht. Zur Bestimmung von Fett-, Eiweiß- und Laktosegehalt wurde das Gerät Milco-Scan 133 B der Firma Foss Deutschland GmbH, Hamburg, genutzt.

Zellzahl (SCC)

Die Zellzahl der Milch wurde mit einem DeLaval Zellzahlmessgerät DCC der Firma DeLaval International AB, Tumba, Schweden, am BfR ermittelt. Bei dem Gerät werden 60 µl Milch in eine Kassette angesaugt. Hier werden die Zellkerne mit einem DNA-spezifischen fluoreszierenden Material eingefärbt, von einer Digitalkamera fotografiert und dann vom Gerät gezählt.

3.8 Immunologische Parameter

3.8.1 Differenzialblutbild

V.1

Im Laufe des Versuches wurden den Kühen zweimal und den Kälbern einmal Blut für ein Differenzialblutbild entnommen. Eine Woche nach der Geburt wurden sowohl der Kuh als auch dem Kalb, 12 Wochen p. p. nur dem Muttertier, mit einer EDTA- und einer Lithium-Heparin-Monovette (S-Monovette® 8 ml Kalium-EDTA bzw. Lithium-Heparin, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) Blut aus der Vena jugularis entnommen. Die EDTA-Röhrchen wurden an das Labor der Klinik für Klauentiere der Freien Universität Berlin weitergegeben und dort einer Differenzialblutbildanalyse unterzogen. Das Lithium-Heparinblut wurde an beiden Probetagen für die Phänotypisierung der mononukleären Zellen, der Untersuchung der Proliferationskapazität der Lymphozyten und der Bestimmung der Phagozytoseaktivität der Granulozyten und Monozyten genutzt.

V.2

Bei den Ferkeln wurde am Tag des Absetzens das Blut mit einer EDTA- und Lithium-Heparin-Monovette aus der Vena jugularis entnommen. Am Tötungstag wurde Blut bei den anästhesierten Ferkeln kurz vor der Euthanasie entnommen. Ebenso wie bei den Rindern erfolgte die Weitergabe der EDTA-Röhrchen an ein externes Labor, während das Heparin-Blut für die Phänotypisierung der mononukleären Zellen und der Bestimmung der Phagozytoseaktivität der Granulozyten und Monozyten genutzt wurde.

3.8.2 Zelldifferenzialbild in der Milch

V.1

Das Zelldifferenzialbild der Milch wurde mit Hilfe des Kieler Sedimentausstriches untersucht. Diese Ausstrichmethode geht auf Selemann et al. (1936) zurück. Die Milch wurde für 1 Minute bei 85 °C inkubiert und dann bei 1350xg für 30 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Fett wurde abgeschöpft und der Überstand dekantiert. Mit Hilfe einer Öse wurde das Sediment auf einem Objektträger übertragen und an der Luft getrocknet. Der Ausstrich wurde für 10 min mit Methylenblau (siehe Anhang) abgedeckt und danach unter fließendem Wasser gewaschen, bis alle Überstände entfernt waren. Danach erfolgte eine erneute Lufttrocknung, bevor der Ausstrich unter einem Lichtmikroskop Axiostar plus (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit Immersionsöl (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 1000facher Vergrößerung ausgewertet wurde.

3.8.3 Durchflusszytometrie (FACS) zur Untersuchung der immunologischen Parameter

Das Verfahren der Durchflusszytometrie wurde für die Phänotypisierung der Immunzellen und zur Bestimmung der Phagozytoseleistung aus dem peripheren Blut der Kühe, Kälber und Schweine und aus der Milch der Kühe verwendet. Ebenso wurde es genutzt, um die Proliferation der Immunzellen aus dem peripheren Blut der Versuchstiere zu bestimmen.

Die FACS-Methode („Fluorescent-Activated Cell Sorting“) ermöglicht das Zählen, die Differenzierung und das Sortieren von Zellen, die mit fluoreszierenden Stoffen markiert

wurden. Das Prinzip beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zellen einer Probe, die in einer Flusskammer einzeln einen Laserstrahl im rechten Winkel passieren. Das von den Zellen gestreute Licht wird mittels Photodetektor erfasst und mit einem Photomultiplier verstärkt. Die Menge des abgestrahlten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle und mit ihrer Granularität. Der Forward Scatter misst die Strahlung in Vorwärtsrichtung (180°) und ist das Maß für das Volumen der Zelle. Die im 90° Winkel gemessene Seitwärtsstreuung (Sideward Scatter) ist das Maß für die Granularität der Zelle. Gleichzeitig wird das emittierte Fluoreszenzsignal registriert, welches durch die Anregung der Farbstoffmarkierungen auf den Zellen durch den Laser entsteht.

Mit dem Computerprogramm CellQuest pro® (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA) wurden die gemessenen Daten ausgewertet. Zur Darstellung wurden das Streudiagramm (density plot) und das Histogramm gewählt. Die einzelnen Zellpopulationen können mithilfe des Streudiagramms anhand verschiedener Merkmale wie Morphologie und Bindung von Antikörpern voneinander abgegrenzt und mit Hilfe eines Rahmens weiter untersucht werden. Mit dem Histogramm wurde die Phagozytoserate von Granulozyten und Monozyten ausgewertet.

Die verwendeten Geräte und Materialien sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Für die durchflusszytometrischen Analysen eingesetzte Geräte und Materialien

Bezeichnung	Hersteller		Ort, Staat
Bromdeoxyuridin	Sigma-Aldrich GmbH	Biochemie	Hamburg, Deutschland
Brutschrank	Heraeus Instruments		Osterode, Deutschland
CellQuest pro®	Becton Dickinson	Bioscience	San José, USA
Cellstar® 96-Well-Microplates	Greiner bio-one		Frickenhausen, Deutschland
CO ₂ -Inkubator:biocenter BC170	SalvisLab		Rotkreuz, Schweiz
Concanavalin A	Sigma-Aldrich GmbH	Biochemie	Hamburg, Deutschland
DNAase	Sigma-Aldrich GmbH	Biochemie	Hamburg, Deutschland
Ethanol (96 %)	Fa. Roth		Karlsruhe, Deutschland
FACS Calibur®	Becton Dickinson	Bioscience	San José, USA
FACS Clean	Becton Bioscience	Dickinson	San José, USA
FACS Rinse	Becton Bioscience	Dickinson	San José, USA
FACS-Röhrchen	Falcon (Becton Dickinson)		Franklin Lake, USA
Ficoll	Biochrom AG		Berlin, Deutschland
Greiner Röhrchen 50 ml	Greiner bio-one		Frickenhausen, Deutschland
Greiner Röhrchen 15 ml	Greiner bio-one		Frickenhausen, Deutschland
Heraeus®Megafuge®1.0R	Thermo Scientific		Karlsruhe, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG		Lauda-Königshofen, Deutschland
PBS	Biochrom AG		Berlin, Deutschland
Perm2Puffer	Becton Bioscience	Dickinson	San José, USA
Phythämagglutinin	Sigma-Aldrich GmbH	Biochemie	Hamburg, Deutschland
Pokeweed mitogen	Sigma-Aldrich GmbH	Biochemie	Hamburg, Deutschland
S-Monovette® 7,5ml Li-Heparinat	Sarstedt		Nümbrecht, Deutschland
Testkit Phagotest®	Orpegen Pharma		Heidelberg, Deutschland
Trypanblau, 0,5 %	Biochrom AG		Berlin, Deutschland

3.8.3.1 Isolierung der Immunzellen aus dem peripheren Blut, der Kuhmilch und der Schweinemilz

Periphere Blutzellen

V.1

Die Isolierung der Immunzellen aus dem Rinderblut erfolgte mit Hilfe von frisch angesetztem Gey's Lysepuffer (siehe Anhang). Dafür wurde frisches heparinisieretes Vollblut mit dem sterilen eisgekühlten Lysepuffer 1:5 gemischt, fünf Minuten auf Eis gekühlt und für 10 Minuten bei 450xg und 4°C zentrifugiert. Dadurch lagern sich die mononukleären Zellen und die Granulozyten als Pellet am Boden des Gefäßes ab. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment zweimal in sterilem PBS (Phosphate Buffered Saline) mit Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 450xg gewaschen und daraufhin mit einem ml Zellkulturmedium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 10 µl mit 90 µl Trypanblau verdünnt und mit 10 µl dieser Verdünnung eine Neubauer-Zählkammer beschickt. Es erfolgte die Zählung von 16 Kleinstquadraten (Volumen 1 µl) und mithilfe folgender Formel die Konzentration der Zellen in einem ml der Zellsuspension zu bestimmen:

$$\text{Zellen in 1 ml} = \text{Anzahl der gezählten lebenden Zellen} \times \text{Kammerfaktor (104)} \\ \times \text{Volumen der Zellsuspension (1)} \times \text{Verdünnung in Trypanblau (10)}$$

Anhand der berechneten Zellzahl wurde mit sterilem Zellkulturmedium eine Zellsuspension für die Phänotypisierung mit der Konzentration von 1×10^7 und für die Proliferation von 4×10^6 Zellen pro ml hergestellt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

V.2

Durch eine Gradientenzentrifugation mit Ficoll, ein aus Epichlorhydrin und Saccharose synthetisch hergestelltes Polysaccharid, konnten die mononukleären Zellen aus dem peripheren Schweineblut isoliert werden. Hierfür wurde frisch entnommenes Heparinblut 1:2 mit PBS verdünnt und im folgenden Schritt auf Ficoll geschichtet. Es erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 400xg und Raumtemperatur. Der Dichtegradient führt zu einer Phasentrennung der einzelnen Blutbestandteile. Die leichteren mononukleären Zellen sammeln sich in der Interphase, während die durch Aggregation mit den Granulozyten schweren Erythrozyten sich am Boden befinden. Nach Überführung der Interphase in eiskaltes PBS wurde mit den Zellen wie bei V1 ab dem Waschschrift weiter verfahren.

Mononukleäre Milchzellen (V1)

Gekühlte Milch (600 ml) vom Abendgemelk wurden 1:2 mit eisgekühlter PBS verdünnt und für 15 min bei 1000xg und 4°C zentrifugiert. Hierbei lagerte sich das Milchfett im oberen Bereich des Röhrchens ab, während sich die Zellen am Boden befanden. Nach Entfernen des Milchfettes und erneutem Waschen der Zellen mit PBS wurde das Zentrifugat in 6 ml PBS resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde über 3 ml Ficoll geschichtet und für 30 min bei 1350xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Durch den Dichtegradienten sammelten sich auch hier die mononukleären Zellen in der Interphase, während die Granulozyten sich in der unteren Phase befanden. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS wurde der Überstand verworfen und das Zentrifugat in 1 ml RPMI, welches mit Kälberserum versetzt war, aufgenommen. Aus dieser Zellsuspension wurden 10 µl mit 10 µl Trypanblau verdünnt. Mittels der Neubauer Zählkammer wurde die Konzentrationen der Zellen bestimmt und auf die Konzentration auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Bei einer niedrigeren Konzentration wurden alle vorhandenen Zellen der Suspension genutzt.

Isolierung der Leukozyten aus der Milz (V2)

Von der Milz wurde ein ca. 5 x 5 x 2 cm großes Stück entnommen und mit Skalpellklingen in ca. 2 mm kleine Stückchen zerschnitten. Diese wurden in RPMI aufgenommen und die Suspension anschließend durch eine Gaze mit einer Maschengröße von 200 µm filtriert. Nach einer Zentrifugation über 10 min bei 320xg und 4°C wurden die Zellen in 7 ml RPMI aufgenommen. Im Folgenden wurde 1 ml der Zellsuspension in 5 ml Puffer, der zur Auflösung der Erythrozyten diente (Erythrozyten-Lyse-Puffer), gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Leukozyten befanden sich nach erneuter Zentrifugation im Sediment, welches in 1 ml RPMI resuspendiert wurde und zur Zählung der Zellen mit der Neubauer Zählkammer genutzt wurde.

3.8.3.2 Phänotypisierung der peripheren mononukleären Zellen, der mononukleären Zellen aus der Milch und der Milz

Mononukleäre Zellen tragen auf ihrer Oberfläche populationspezifische Zelloberflächenproteine (Cluster of Differentiation, CD). An die CD binden spezifische primäre Antikörper (monoklonale Antikörper mAk), die wiederum spezifische sekundäre Antikörper (sAk), die einen fluoreszierenden Farbstoff tragen, binden und so markiert werden können. Für die durchgeführten Versuche wurden Phycoerythrin (PE) und Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) als Farbstoff verwendet, da bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm beide das Licht in einer unterschiedlichen Wellenlänge emittieren. Phycoerythrin ergibt mit einer Wellenlänge von 570 – 600 nm eine Rotfluoreszenz, während Fluoreszeinisothiocyanat eine Grünfluoreszenz im Wellenlängenbereich von 500 – 570 nm abstrahlt. Dadurch ist eine Doppelfärbung der einzelnen Zellen möglich, da mithilfe der Durchflusszytometrie beide Farbstoffe gleichzeitig gemessen werden können.

Durchführung der Phänotypisierung

Für die Phänotypisierung wurden für jede Färbung 100 µl aus der auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellten eiskühlter Zellsuspension entnommen, jeweils 50 µl der entsprechenden primären Antikörpersuspension (siehe Tabelle 12 und 13) hinzugefügt und der Ansatz für 25 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Probenröhrchen mit 2 ml FACS-Puffer (siehe Anhang) befüllt und für 5 min bei 4°C und 450xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proben mit je 50 µl der benötigten sekundären Antikörpersuspension (Tabelle 14) versetzt, bevor sie weitere 25 Minuten unter Lichtabschluss auf Eis inkubiert wurden. Nach einem erneuten Hinzugeben von 2 ml FACS-Puffer und einer Zentrifugation (5min, 4°C, 450xg) wurde das Sediment in 300 ml FACS-Puffer resuspendiert und bis zur durchflusszytometrischen Messung auf Eis und vor Licht geschützt gelagert. Die Messung erfolgte mit dem Gerät FACS Calibur® (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA).

Tabelle 12: Verwendete primäre Antikörper zur Phänotypisierung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut der Kühe und teilweise der Kälber sowie aus der Milch

Primäre Antikörper	Isotyp	Hersteller	Verdünnung	Sekundäre Antikörper
Mouse Anti-Bovine CD4	IgG1	Serotec, Deutschland	1:200	Anti-Mouse IgG1 RPE
Mouse Anti-Bovine CD8	IgG2a	Serotec, Deutschland	1:200	Anti- Mouse IgG2a FITC
Mouse Anti-Equine MHC class II	IgG1	Serotec, Deutschland	1:100	Anti-Mouse IgG1 RPE
Mouse Anti-Bovine CD25	IgG2a	Dunn, Deutschland	1:50	Anti-Mouse IgG2a FITC
Mouse Anti-bovine CD 5	IgG1	Serotec, Deutschland	1:100	Anti-Mouse IgG1 RPE
Mouse Anti-bovine CD 14	IgG2a	Biologend, USA	1:4	Anti-Mouse IgG2a FITC

CD = Cluster of Differentiation

Tabelle 13: Verwendete primäre Antikörper zur Phänotypisierung der mononukleären Zellen der Ferkel aus dem peripheren Blut und der Milz

Primäre Antikörper	Isotyp	Hersteller	Verdünnung	Sekundäre Antikörper
Mouse Anti-pig SWC3	IgG2b	Becton Dickinson, USA	1:200	Anti- Mouse IgG2b FITC
Mouse Anti porcine CD21	IgG1	Southern Biotech, USA	1:100	Anti-Mouse IgG1 RPE
Mouse Anti porcine CD14	IgG2b	Serotech, Deutschland	1:100	Anti- Mouse IgG2b FITC
Mouse Anti porcine TCR1	IgG1	VMRD, USA	1:200	Anti-Mouse IgG1 RPE
Mouse Anti porcine CD8 α		Southern Biotech. USA	1:100	Selbst konjugiert mit RPE
Mouse Anti porcine CD8 β	IgG2a	VMRD, USA	1:100	Anti- Mouse IgG2a PE
Mouse Anti porcine CD25	IgG1	Acris, Deutschland	1:100	Anti-Mouse IgG1 RPE
Mouse Anti-pig CD2	IgG2a	Vet. Med. Universität Wien, Österreich	Unverdünnt (33 μ l)	Anti- Mouse IgG2a FITC
Mouse Anti-pig CD5	IgG1	Vet. Med Universität Wien, Österreich	Unverdünnt (33 μ l)	Anti-Mouse IgG1 RPE
Mouse Anti-pig CD4		Southern Biotech., USA	1:50	Selbst konjugiert mit FITC
Mouse Anti porcine MHCII	IgG2a	VMRD, USA	1:200	Anti- Mouse IgG2a FITC
Mouse Anti-pig CD45RC	IgG1	Vet. Med Universität Wien, Österreich	Unverdünnt (33 μ l)	Anti-Mouse IgG1 RPE
Mouse Anti porcine CD16	IgG1	Acris, BRD	1:100	Anti-Mouse IgG1 RPE

CD= Cluster of Differentiation

Tabelle 14: Verwendete sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper	Hersteller	Farbstoff	Verdünnung
Anti-Mouse IgG1 RPE	Southern Biotechnology Ass., USA	Phycoerythrin (PE)	1:200
Anti-Mouse IgG2a FITC	Southern Biotechnology Ass., USA	Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)	1:100

Auswertung der Phänotypisierung

Mithilfe des Computerprogramms CellQuest pro[®] (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA) wurde der prozentuale Anteil der Zellen, die CD4⁺CD8⁻ (T-Helferzellen), CD4⁻CD8⁺ (zytotoxische Zellen) und CD4⁺CD8⁺ (aktivierte T-Helferzellen), CD14⁺ (Makrophagen), CD21⁺ (B-Zellen), TCR1⁺ (γδ-T-Zellen), TCR1⁺CD8α⁺ (γδ-T-Zellen mit nachgewiesener zytotoxischer Aktivität), CD2⁺CD5⁺ (T-Zellen gesamt), CD2⁺CD5⁻ (NK-Zellen), CD2⁻CD5⁺ (B-Zell Subset), CD45RC⁺ (wird in aktivierten T Zellen herunter reguliert), CD2⁺CD16⁻ (γδ-T-Zellen), CD2⁻CD16⁺ (NK-Zellen, Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen), CD2⁺CD16⁺ (NK-Zellen) sind, bestimmt. Dazu wurden zunächst die morphologischen Parameter Granularität (sichtbar im Sideward Scatter, SSC-H) und Größe (sichtbar im Forward Scatter, FSC-H) gegeneinander aufgetragen. Aus den sich daraus ergebenden Punktwolken wurden dann die einzelnen Populationen von Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagen und Zellresten (Debris) identifiziert (Abbildung 01). Über den so identifizierten Bereich der Lymphozytenpopulation wurde ein Gate gelegt, welches als Grundlage für eine weitere Auswertung diente. Die Zellpopulation aus dem Gate wurde in das Diagramm FITC gegen PE eingefügt, um mit Hilfe von gebildeten Quadranten den relativen Anteil an FITC-positiven, PE-positiven und PE und FITC- doppelt positiven Zellen zu ermitteln (Abbildung 01).

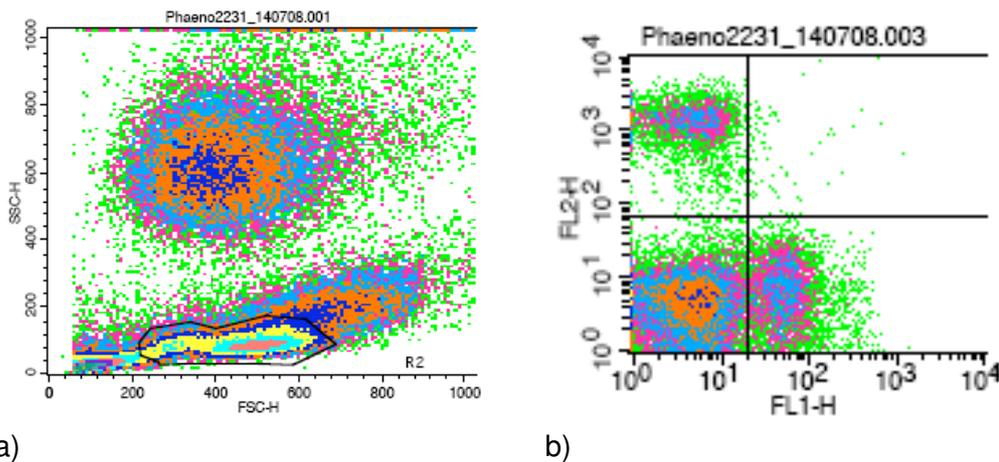


Abbildung 1: Zweiparameterdarstellung im Density Plot nach Festlegung einer Region um die Lymphozyten am Beispiel von CD4 und CD8 markierten T-Lymphozyten

- Es wurde eine Region (R2) um die Punkte gelegt, die aufgrund der Fluoreszenzmarkierung im PE/FITC-Diagramm als Lymphozyten identifiziert worden waren.
- In diesem PE/FITC-Diagramm wurden nur die Zellen aus Region 2 zugelassen und mithilfe der Quadranten der prozentualen Anteile der naiven T-Helferzellen (CD4⁺CD8⁻) und der zytotoxischen T-Zellen (CD4⁻CD8⁺) bestimmt.

3.8.3.3 Proliferation der peripheren mononukleären Zellen (V1)

Die mononukleären Zellen wurden mit verschiedenen Mitogenen stimuliert, um die Zellen aus dem Blut zu einer Proliferation anzuregen. In der vorliegenden Arbeit wurden hierzu Pokeweed Mitogen (PWM), Concanavalin A (CON A) und Phythämagglutinin (PHA-M) als Mitogene verwendet. Aufgrund der Zugabe von dem Thymidin - Analogon Bromdeoxyuridin (BrdU), welches sich anstelle von Thymidin in die neu synthetisierte DNA einlagert, ist es möglich, mit einem sekundären Antikörper die Anzahl der proliferierten Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie darzustellen. Für eine genauere Darstellung der stimulierten Zellen durch PWM, CON A und PHA-M wurde ein CD5-Antikörper eingesetzt, der hauptsächlich T-Zellen, aber auch ein geringes Maß an B-Zellen markiert (Haas und Estes, 2001)

Durchführung der Lymphozytenproliferation

Von der auf 4×10^6 eingestellten Suspension der mononukleären Blutzellen wurden 100 µl in eine Kavität einer 96 Well-Platte (Cellstar®, Greiner bio-one, Deutschland) pipettiert. Zu diesen wurden 25 µl der vorverdünnten Mitogene hinzugegeben, sodass für PWM eine Endkonzentration von 2,5 µg/ml, für CON A von 5 µg/ml und für PHA-M eine Endkonzentration von 10 µg/ml pro Kavität erreicht wurde. Für die Negativkontrolle wurden 25 µl Zellkulturmedium verwendet. Je nach Ausbeute wurden pro Tier und Mitogen bis zu sechs Kavitäten befüllt und dann für 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ Anteil inkubiert. Danach wurden 12 µl BrdU hinzugegeben, sodass eine Konzentration von 60 µM/ Kavität erreicht und für weitere 24 Stunden inkubiert wurde. Die jeweiligen Ansätze wurden nach der Inkubation in ein FACS-Röhrchen überführt, mit 2 ml FACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (5 min, 4°C, 450xg). Nach Entfernen des Überstandes wurde das Sediment mit 250 µl vorverdünntem Perm2-Puffer re-

suspendiert und für weitere 18 - 24 Stunden auf Eis bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Daraufhin wurden jedem Ansatz 2 ml FACS-Puffer hinzugefügt. Um eine mögliche unspezifische Fluoreszenz, die in einer nicht gefärbten Probe zu sehen wäre, auszuschließen, wurden aus dem Kontrollröhrchen 300 µl entnommen und im weiteren Verlauf nicht mit Farbstoffen behandelt (ungefärbte Kontrolle) und für eine später Kompensation am Durchflusszytometer genutzt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 450xg wurde der Überstand verworfen und allen Probenröhrchen bis auf die ungefärbte Kontrolle mit 50 µl vom vorverdünnten CD5 Antikörper versetzt und für 25 min auf Eis inkubiert. Das Pellet der ungefärbten Kontrolle wurde mit 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und bis zur Messung auf Eis belassen. Die Proben wurden mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (5 min, 4°C, 450xg), der Überstand anschließend verworfen und mit 50µl des sekundären Antikörpers mit PE-Farbstoff für weitere 25 min auf Eis unter Lichtschutz belassen. Nach zweimaligem Waschen und Zentrifugieren (5 min, 4°C, 450xg) wurde das Sediment mit 500 µl Fixierlösung (siehe Anhang) resuspendiert und unter Lichtschutz für 15 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte eine weitere Waschung, bevor das Zentrifugat mit 250 µl einer DNAase I -Verdünnung (DNAase 10 mg/ml 1:10 verdünnt mit DNAase-Puffer siehe Anhang) resuspendiert und für 30 min unter Lichtausschluss im Brutschrank bei 37°C inkubiert wurde. Durch die DNAase wurde die DNA der Proben zersetzt, sodass sie nach der Inkubation in Form von Mono- und Oligonukleotiden vorlag. Danach wurden die Proben gewaschen, das Pellet mit 50µl vorverdünntem FITC-konjugiertem anti-BrdU-Antikörper, der zur Markierung des eingelagerten BrdU der frei vorliegenden Nukleotide eingesetzt wurde, resuspendiert und 30 min abgedunkelt auf Eis inkubiert.

Tabelle 15: Für die Lymphozytenproliferation verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller	Farbstoff	Verdünnung	
primär	Mouse Anti-bovine IgG1 CD 5	Serotec, Düsseldorf, Deutschland	Phycoerythrin (PE)	1:100
sekundär	Anti-Mouse IgG1 RPE	Southern Biotechnology Ass., Birmingham, USA	Phycoerythrin (PE)	1:200
	Mouse anti-BrdU FITC	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA	Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)	1:5

Auswertung der Lymphozytenproliferation

Zur Auswertung der Lymphozytenproliferation wurde ebenfalls das Computerprogramm CellQuest pro[®] (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA) genutzt. Bei der Untersuchung der durch PWM, CON A oder PHA-M stimulierten T- bzw. B-Lymphozyten wurde die Oberfläche dieser zusätzlich durch den Antikörper CD5 markiert. Die Lymphozyten wurden anhand ihrer Größe (FSC-H) und Granularität (SSC-H) identifiziert und mit einem Gate umschlossen. Die in dem Gate enthaltenen Zellen wurden in ein Diagramm FITC gegen PE übertragen und mittels Quadranten der Anteil der FITC positiven (BrdU enthaltenden) Zellen ermittelt (Abbildung 2).

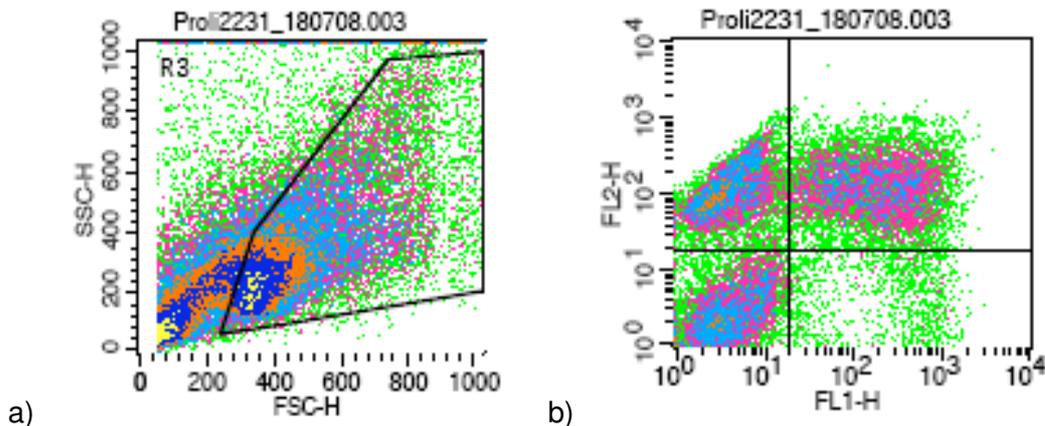


Abbildung 2: Zweiparameterdarstellung im Density Plot der mit CON A stimulierten peripheren mononukleären Blutzellen

- a) Es wurde eine Region (R3) um die Punkte gelegt, die aufgrund der Fluoreszenzmarkierung im PE/FITC-Diagramm als T- (und B-) Lymphozyten identifiziert worden waren.
- b) Die Zellen der R3 wurden in ein FL1-H/FL2-H- Diagramm übertragen, um mithilfe der Quadrantenbildung den Anteil der BrdU positiven Zellen (Quadrant oben rechts) zu ermitteln.

3.8.3.4 Lymphozytenproliferation mit anschließender Phänotypisierung

Durchführung der Lymphozytenproliferation mit anschließender Phänotypisierung
 Ebenso wie bei der oben beschriebenen Lymphozytenproliferation wurden 100µl von der auf 4×10^6 Zellen/ml eingestellten Suspension der mononukleären Blutzellen in eine Kavität einer 96 Well-Platte (Cellstar®, Greiner bio-one, Deutschland) pipettiert. Zu diesen wurden 25 µl der vorverdünnten Mitogene hinzugegeben, sodass für CON A eine Endkonzentration von 5µg/ml und für PHA-M eine von 10 µg/ml pro Kavität erreicht wurde. Für die Negativkontrolle wurden 25 µl Zellkulturmedium verwendet. Je nach Ausbeute wurden pro Tier und Mitogen bis zu sieben, für die Negativkontrolle acht Kavitäten befüllt und dann für 72 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ Anteil inkubiert. Nach der Inkubation wurden jeweils zwei identische Ansätze in ein FACS-Röhrchen überführt und mit einem Milliliter PBS aufgefüllt. Zur späteren Kompensation der Färbung mit Fluoreszeinisothiocyanat am FACS wurde eine Kavität vom Ansatz mit CON A und für die PE-Färbung eine Kavität vom Ansatz mit PHA-M in ein Röhrchen überführt und ebenfalls mit einem Milliliter PBS aufgefüllt. Die Proben wurden für 5 min bei 4°C und 450xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und allen Proberöhrchen bis auf die ungefärbte Kontrolle wurden 50 µl von den vorverdünnten primären Antikörpern zugesetzt und für 25 min auf Eis unter Lichtschutz inkubiert. Daraufhin wurden die Probenröhrchen mit 1 ml PBS befüllt und erneut zentrifugiert (5 min, 4°C, 450xg). Der Überstand wurde verworfen und die Proben mit je 50 µl der benötigten sekundären Antikörpersuspension (siehe Tabelle 13) versetzt, bevor sie weitere 25 Minuten unter Lichtabschluss auf Eis inkubiert wurden. Nach einem erneuten hinzugeben von 2 ml FACS-Puffer und einer Zentrifugation (5min, 4°C, 450xg) wurde das Sediment in 300 ml FACS-Puffer resuspendiert und bis zur durchflusszytometrischen Messung auf Eis und vor Licht geschützt gelagert. Die Messung erfolgte mit dem Gerät FACS Calibur® (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA)

Auswertung der Lymphozytenproliferation mit anschließender Phänotypisierung
Der prozentuale Anteil der durch CON A oder PHA-M stimulierten Zellen wurde wie folgt differenziert: CD4⁺CD8⁻ (T-Helferzellen), CD4⁻CD8⁺ (zytotoxische Zellen) und CD4⁺CD8⁺ (aktivierte T-Helferzellen), CD4⁺CD25⁻ (T-Helferzellen), CD4⁻CD25⁺ (aktivierte T- und B-Zellen), CD4⁺CD25⁺ (aktivierte T-Helferzellen), CD25⁺MHCII⁻ (aktivierte T- und B-Zellen), CD25⁻MHCII⁺ (antigenpräsentierende Zellen, aktivierte T- und B-Zellen) und CD25⁺MHCII⁺ (aktivierte T- und B-Zellen). Zur Auswertung diente das Computerprogramm CellQuest pro[®] (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA). Die Lymphozyten wurden anhand ihrer Größe (FSC-H) und Granularität (SSC-H) identifiziert und mit einem Gate umschlossen. Die in dem Gate enthaltenen Zellen wurden in ein Diagramm FITC gegen PE eingefügt, um mit Hilfe von gebildeten Quadranten den relativen Anteil an FITC-positiven, PE-positiven und PE und FITC- doppelt positiven Zellen zu ermitteln.

3.8.3.5 Phagozytoseaktivität von Monozyten und Granulozyten im peripheren Blut und in der Milch

Es wurde ein Testkit (Phagotest[®], Orpegen Pharma, Heidelberg, Deutschland) zur Untersuchung der Phagozytoseleistung der Granulozyten und Monozyten verwendet. Als Probenmaterial wurden 300 µl heparinisieretes Vollblut genutzt, woraus drei Ansätze hergestellt wurden. Ein Ansatz diente hierbei als Negativkontrolle. Zu den drei Ansätzen wurde jeweils 20 µl eisgekühlte FITC-markierte *E. coli*-Suspension hinzugegeben und gut durchmischt. Während die Negativkontrolle auf Eis verblieb, wurden die anderen beiden Proben für 10 min (Blutproben) bzw. 15 min (Milchproben) in einem 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Zur Unterbrechung der Phagozytoseaktivität wurden die Proben hiernach sofort auf Eis gestellt und zu jedem Ansatz 100 µl eisgekühlte Quenlösung hinzugegeben. Danach wurden die Proben zweimal mit 3 ml einer eisgekühlten Waschlösung versetzt, zentrifugiert (5 min, 4°C, 250xg) und der Überstand dekantiert. Mit einer Lyselösung wurden die in den Proben enthaltenen Erythrozyten über eine 20minütige Inkubation bei 37°C im Brutschrank lysiert. Nach erneutem Waschen und Zentrifugieren (5 min, 4°C, 250xg) wurde den Ansätzen von einer DNA-Färbelösung 200 µl zugegeben und für 10 Minuten inkubiert. Dann wurden die Proben durchflusszytometrisch gemessen.

Auswertung der Phagozytoseaktivität

Auch hier wurde die Analyse der Phagozytoseleistung der Granulozyten und Monozyten mit dem Computerprogramm CellQuest pro[®] (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA) ausgewertet. Hierzu wurden zuerst die Bereiche der Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten und Zellreste anhand der Größe (FSC-H) und Granularität (SSC-H) identifiziert (Abbildung 03). Daraufhin wurden die Regionen der Monozyten und Granulozyten festgelegt und einzeln in einem Histogramm (FITC positive Zellen/ Anzahl der gezählten Zellen) ausgewertet.

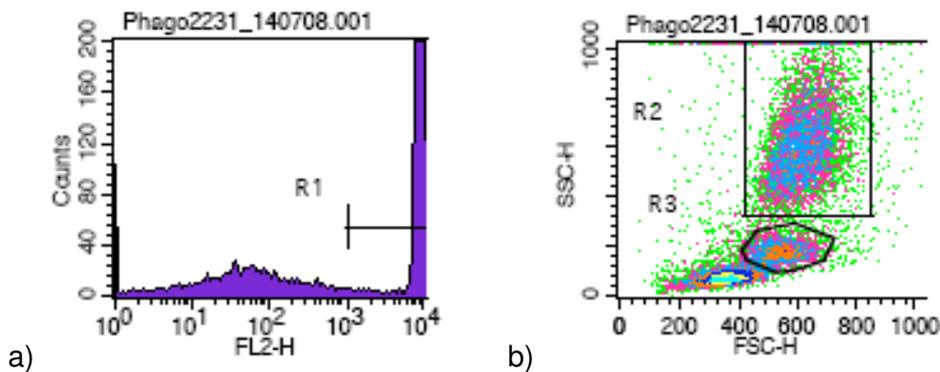


Abbildung 3: Zweiparameterdarstellung im Histogramm (a) und im Density Plot (b) zur Identifizierung der Granulozyten und Monozyten

- a) Es wurde eine Region 1 (R1) um die Lymphozyten gelegt, die durch das Programm als Spitze dargestellt wurden.
- b) Die Granulozyten und Monozyten wurden aufgrund ihrer Fluoreszenzmarkierung identifiziert. Die Granulozyten wurden mit der Region 2 (R2) und die Monozyten mit der Region (R3) umschlossen. Diese wurden für weitere Analysen im Histogramm genutzt.

Da die Kontrollproben immer eine gewisse FITC-Fluoreszenz aufwiesen, wurden zunächst die Histogramme für diese Proben gebildet und deren Eigenfluoreszenz mit dem Marker M1 gekennzeichnet (Abbildung 04). Dieser Marker wurde in die Histogramme der Versuchsansätze übertragen und ein zweiter Marker über den Bereich der stärkeren Fluoreszenzintensität, die als Phagozytoseaktivität interpretiert wurde, gelegt. Mithilfe dieser Auswertung konnten der prozentuale Anzahl der phagozytierenden Zellen als auch die mittlere Fluoreszenzstärke, die Auskunft über die Anzahl der aufgenommenen Bakterien pro Leukozyt gibt, ermittelt werden.

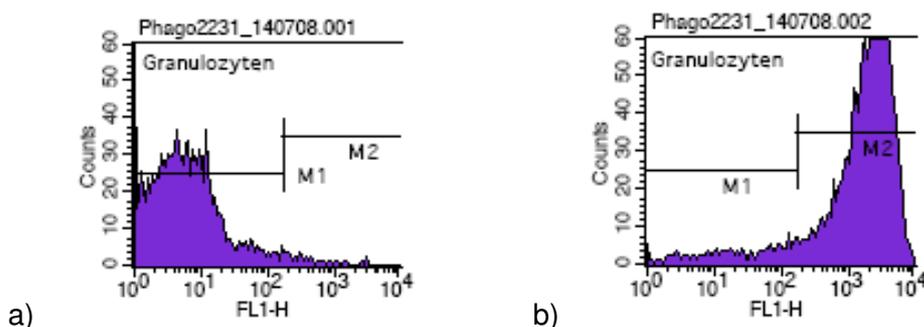


Abbildung 4: Zweiparameterdarstellung im Histogramm zur Beurteilung der Phagozytoseaktivität der Granulozyten und Monozyten

- a) In dem Histogramm wurde die FITC-Fluoreszenzstärke gegen die Anzahl der gezählten Zellen einer Kontrollrobe für die Granulozyten aufgetragen. Mit M1 wurde der Bereich festgelegt, bis zu welcher Fluoreszenzstärke noch nicht von einer phagozytosebedingten Fluoreszenz ausgegangen wurde.
- b) Das Histogramm (FITC-Fluoreszenzstärke/ Anzahl der gezählten Fälle) zeigt die Ergebnisse einer Versuchsprobe für die Granulozyten. Die phagozytierenden Granulozyten wurden unter M2 zusammengefasst.

3.9 Zusatzuntersuchungen der Blut- und Milchproben

3.9.1 Untersuchungen des Serums der Kühe und Kälber auf den Selenstatus und der antioxidativen Kapazität

Im Rahmen des hier beschriebenen Versuches wurden bei einer anderen Arbeit auch der Se-Status und die antioxidative Kapazität im Blut der Kühe und Kälber untersucht. Hierzu wurden den Kühen sechs und drei Wochen a. p., am Tag der Kalbung sowie eine und 12 Wochen p. p. Blut abgenommen. Das Blut der Kälber wurde innerhalb von 12 Stunden nach der Geburt und eine Woche p. n. gewonnen.

Zu Beginn des Versuches unterschieden sich die Kühe in ihrem Se-Gehalt im Serum nicht. In der Kontrollgruppe sank der Se-Gehalt von Beginn des Versuches bis zur Geburt von $47,9 \pm 5,94 \mu\text{g/l}$ auf $30,6 \mu\text{g/l}$ bis es nach der Geburt ein Plateau von $35 \mu\text{g/l}$ erreichte. Sowohl bei Fütterung von anorganisch gebundenem Selen (AS) als auch in der Fütterung mit organisch gebundenem Selen (OS) zeigten die Tiere bei der Geburt einen ebenfalls kurzfristigen fallenden Se-Gehalt im Serum. Beide Gruppen hatten zu allen Zeitpunkten einen signifikant höheren Se-Gehalt im Serum als die Kontrollgruppe. Nur die AS-Gruppe unterschied sich zum Zeitpunkt der Abkalbung nicht von den beiden anderen Gruppen. Die AS- und die OS- Gruppe unterschieden sich zu den anderen Zeitpunkten nicht signifikant voneinander (Salman, 2010).

Die antioxidative Kapazität wurde mit Hilfe der Trolox Equivalent Antioxidative Capacity (TEAC) zu verschiedenen Zeitpunkten im Serum gemessen. Zeitliche signifikante Unterschiede konnten in keiner der drei Gruppen ermittelt werden. Zwischen den Gruppen hatte die OS-Gruppe mit $577 \mu\text{mol TE/l}$ einen signifikant höheren Wert als die anderen beiden Gruppen und auch die AS-Gruppe lag mit $570 \mu\text{mol/l}$ höher als die Kontrollgruppe mit $566 \mu\text{mol TE/l}$. Im Gegensatz zu den Kühen, kam es bei den Kälbern neben einem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, auch zu einer signifikanten Abnahme der TEAC-Werte eine Woche nach der Geburt innerhalb der Gruppen (Salman, 2010).

3.9.2 Untersuchungen der Kuhmilch auf den Selenstatus und deren antioxidativen Kapazität

Ebenfalls wurden während des Versuches der Se-Status und die antioxidative Kapazität in der Milch der Kühe bei einer parallel laufenden Arbeit untersucht (Salman, 2010). Hierbei zeigte sich, dass der Se-Gehalt im Kolostrum bei der Kontrollgruppe bei $35,3 \pm 1,03 \mu\text{g Selen/l}$, bei der AS-Gruppe bei $39,1 \pm 2,56 \mu\text{g Selen/l}$ und bei der OS -Gruppe bei $67,7 \pm 4,11 \mu\text{g Selen/l}$ lag. Bei dem Se-Gehalt in der Milch zeigte sich insgesamt niedrigere Gehalte für Selen bei der Kontroll-, der AS- und der OS-Gruppe mit $11,6 \pm 1,55$, $14,4 \pm 3,24$ und $28,3 \pm 6,84 \mu\text{g Selen/l}$. Sowohl beim Kolostrum als auch bei der Milch war der Se-Gehalt bei der OS-Gruppe signifikant höher als bei den anderen beiden Gruppen (Salman, 2010).

Die antioxidative Kapazität wurde mit Hilfe der Trolox Equivalent Antioxidative Capacity (TEAC) zu verschiedenen Zeitpunkten der Laktation in der Milch gemessen. Im Durchschnitt konnte die TEAC bei der Kontrollgruppe mit $540 \pm 0,64 \mu\text{mol/l}$, bei der AS-Gruppe mit $557 \pm 0,97 \mu\text{mol/l}$ und bei der OS-Gruppe mit $586 \pm 0,95 \mu\text{mol/l}$ ermittelt werden. Die TEAC Werte der Kontrollgruppen lagen somit signifikant niedriger als bei der AS- und der OS-Gruppe und die Werte der OS-Gruppe waren signifikant höher als die der AS-Gruppe (Salman, 2010).

Insgesamt zeigten sich gering gradige Unterschiede in den TEAC-Werten der Milch in Abhängigkeit von dem Laktationsstadium (Salman, 2010).

3.10 Atomabsorptionsspektrometrie zur Bestimmung von Selen

Die Atomabsorptionsspektrometrie ist eine Analysenmethode zur quantitativen Bestimmung einzelner Elemente in einer Probe. Eine Lichtquelle emittiert Licht verschiedener Wellenlängen in einer bestimmten Intensität vor einer Atomisierungseinrichtung. Ziel der Atomisierungseinrichtung ist es, möglichst viele freie Atome im Grundzustand und möglichst wenig angeregte oder ionisierte Atome zu erzeugen und diese möglichst lange im Absorptionsvolumen zu halten. Bei den Messungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Hydridtechnik zur Atomisierung verwendet, da einige Elemente, wie auch Selen, mit Natriumborhydrid gasförmige Hydride bilden. Diese Hydride sind bei Raumtemperatur stabil, zerfallen aber bei Temperaturen von 800 – 1000 °C relativ schnell in ihre Atome. Dazu werden die Hydride durch Argon (ein Inertgas) aus ihrer Lösung getragen und in eine beheizbare Gasküvette überführt, in der sie dann bei den entsprechenden Temperaturen in Wasserstoff und in das hier zu bestimmende Element Selen zerfallen. Nach Schwächung des Lichtstrahls durch die Absorption in der Atomwolke wird die Intensität hinter der Atomisierungseinrichtung gemessen und mit der Intensität des ungeschwächten Lichtstrahls gemessen. Es wird detektiert, wie viel des eingestrahnten Lichtes einer bestimmten Wellenlänge durch das Selen absorbiert wurde. Mit steigender Se-Konzentration in der Probe steigt die Schwächung des eingestrahnten Lichtes (Extinktion) proportional. Um die Konzentration bestimmen zu können, muss die Extinktion von Kalibrierungsstandards bekannter Konzentrationen aufgenommen, eine Kalibrierkurve erstellt und Proben mit unbekannter Konzentration gegen diese Kalibrierung aufgenommen und die Konzentration durch die Computersoftware Win AAS 3.15.0 (Analytik Jena AG) ausgewertet werden.

3.10.1 Messung der Selenkonzentrationen in der Kuhmilch, die als Futter für die Ferkel diente, und im Plasma der Ferkel

Milch und Plasma

Von den aufgetauten Proben werden jeweils 0,5 ml in ein Quarz-Probengefäß gegeben und mit 3 ml Salpetersäure (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 0,5 ml Perchlorsäure (Rotipuram® Supra, 70%, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) versetzt. Die Probengefäße wurden in einen programmierbaren Heizblock gestellt, der auf 140 °C aufgeheizt wurde und bei dieser Temperatur für 30 min verblieb. Nach dieser Zeit wurden zu den Proben jeweils 0,5 ml Schwefelsäure (Baker B.V., Deventer, Holland) hinzugegeben und diese für weitere 15 min bei 140 °C inkubiert. Im weiteren Verlauf wurde der Heizblock auf 210 °C, 250 °C und auf 300 °C aufgeheizt, wobei die Proben für 20 min auf der jeweiligen Temperaturstufe inkubiert wurden. Nach dieser Prozedur blieben die Gefäße über Nacht zum Auskühlen stehen und wurden am nächsten Tag mit 20 ml Salzsäure (6 M) versetzt und erneut im Heizblock bei 100 °C für 30 min gekocht. Die Flüssigkeit wurden in ein 25 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit Aqua bidest. auf 25 ml aufgefüllt. Hiervon wurden 15 ml in ein AAS-Meßgefäß gegeben und für die Untersuchung genutzt.

3.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Es wurde der arithmetische Mittelwert sowie der Standardfehler als Maß für die Streuung berechnet. Die Daten wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Für nicht normalverteilte Daten wurde der Kruskal-Wallis Test verwendet. Bei normalverteilten Daten wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt und bei einem positiven Ergebnis der Bonferroni-Test zum

Gruppenvergleich angewandt. Bei Varianzungleichheit wurde der Tamhane2-Test verwendet. Für die Vergleiche von zwei Zeitpunkten wurde der T-Test für unabhängige Parameter angewandt. Zusätzlich wurde eine zweifaktorielle ANOVA durchgeführt, um eine Zeit-Gruppen-Interaktion auszuschließen. Die Überschreitungswahrscheinlichkeit (p-Wert) wurde mit $p \leq 0,05$ als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse aus V.1

4.1.1 Entwicklung der Lebendmasse der Kühe und der Kälber

Die Lebendmassen der Kühe wiesen über den Versuchszeitraum keine fütterungsbedingten Unterschiede auf (Tabelle 16).

Tabelle 16: Mittlere Lebendmasse (kg) der Kühe der drei Versuchsgruppen während der Versuchszeit

Gruppe	Versuchsbeginn (6 Wochen a. p.)	Kalbung	1 Woche p. p.	Versuchsende (12 Wochen p. p.)
Kontrolle (n ¹ =5)	655 (605/690)	671 (607/759)	644 (582/745)	552 (352/713)
AS (n=5)	704 (618/762)	684 (627/741)	654 (566/714)	631 (522/686)
OS (n=6)	651 (540/714)	663 (553/765)	635 (524/714)	615 (498/659)

¹ Anzahl der gültigen Fälle; Alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

Die Kälber der verschiedenen Gruppen unterschieden sich in ihrer Lebendmasse während des Versuches nicht (Tabelle 17).

Tabelle 17: Mittlere Lebendmasse (kg) der Kälber der drei Versuchsgruppen

Gruppe	Tag der Geburt	1. Woche p. p.
Kontrolle (n ¹ =5)	43,3 (38,0/51,0)	49,5 (42,0/57,0)
AS (n=4)	43,2 (39,6/47,0)	49,7 (43,0/57,8)
OS (n=5)	45,9 (43,3/49,0)	52,4 (47,0/59,2)

¹ Anzahl der gültigen; Fälle Alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

4.1.2 Erkrankungen der Kühe

In der Tabelle 18 sind die Anzahl der medikamentellen Behandlungen der Kühe zu sehen. Hierbei ist der Behandlungsgrund eingeteilt in Mastitis und andere Erkrankungen, unter die Klauenerkrankungen, Nachgeburtverhalten, Labmagenverlagerung, Metritis und Abszesse fallen. Die Kälber erkrankten während des Versuchszeitraumes nicht.

Tabelle 18: Anzahl der medikamentellen Behandlungen der Kühe, aufgeteilt nach Erkrankung

Gruppe	Mastitiserkrankungen Behandlungen/ Anzahl Kühe	Andere Erkrankungen Behandlungen/ Anzahl Kühe
Kontrolle (n ¹ =5)	13/ 4 Kühe	19/ 4 Kühe
AS (n=5)	5/ 3 Kühe	30/ 5 Kühe
OS (n=6)	15/ 3 Kühe	28/ 4 Kühe

¹ Anzahl der gültigen Fälle

4.1.3 Ergebnisse der Blutuntersuchungen aus V.1

4.1.3.1 Differenzialblutbild

Zwischen den drei Versuchsgruppen kam es zu keinen Unterschieden im Differenzialblutbild (Tabelle 19).

Tabelle 19: Differenzialblutbild der Kühe zu den verschiedenen Zeitpunkten

	Gruppe					
	Kontrolle (n ¹ =5)	AS (n=5)	OS (n=6)	Kontrolle (n=5)	AS (n=5)	OS (n=6)
	1. Woche p. p.			12 Wochen p. p.		
WBC G/l	6,00 (4,70/7,60)	5,50 (4,30/7,90)	8,00 (5,70/13,3)	7,30 (6,20/8,60)	6,08 (4,60/7,60)	6,78 (5,30/8,00)
RBC T/l	6,00 (5,50/6,50)	6,84 (6,60/7,30)	6,21 (5,80/6,90)	6,11 (5,30/6,80)	6,17 (5,30/7,00)	6,08 (5,30/6,80)
HGB g/l	101 (94,0/106)	113 (108/121)	107 (100/113)	101 (83,0/108)	94,0 (85,0/101)	98,3 (84,0/116)
HCT %	29,7 (27,4/31,8)	32,8 (30,6/34,6)	31,1 (29,4/33,6)	29,5 (25,0/32,4)	28,0 (24,1/32,0)	28,2 (24,1/31,6)
MCV µm ³	50,0 (49,0/52,0)	48,0 (46,0/51,0)	50,2 (45,0/55,0)	48,4 (46,0/52,0)	45,6 (41,0/48,0)	46,5 (43,0/49,0)
MCH pg/Zelle	17,0 (16,1/17,6)	16,6 (16,2/17,0)	17,3 (15,8/19,5)	16,6 (15,8/17,6)	15,4 (13,6/17,0)	16,3 (14,4/18,1)
MCHC %	34,1 (33,0/35,1)	34,6 (33,3/36,3)	34,5 (32,4/35,6)	34,4 (33,1/36,7)	33,7 (31,3/36,9)	34,9 (33,2/37,2)
PLT G/L	549 (417/701)	471 (266/748)	506 (74,0/833)	565 (515/631)	379 (326/414)	461 (133/704)
Lym %	53,4 (46,0/63,0)	71,6 (65/78)	56,2 (28,0/75,0)	50,8 (31,0/64,0)	61,2 (54,0/72,0)	58,0 (45,0/65,0)
Seg %	38,2 (17,0/50,0)	19,0 (10/31)	34,5 (20,0/49,0)	42,6 (27,0/67,0)	33,2 (23,0/40,0)	39,0 (29,0/51,0)
Stab %	4,60 (0,00/15,0)	4,80 (0,00/13,0)	5,00 (0,00/18,0)	1,20 (0,00/4,00)	0,40 (0,00/1,00)	1,00 (0,00/2,00)
Eosinophile %	2,60 (0,00/6,00)	2,60 (0,00/4,00)	2,17 (0,00/5,00)	2,60 (1,00/6,00)	4,60 (3,00/7,00)	3,17 (1,00/5,00)
Monozyten %	1,00 (0,00/3,00)	1,38 (0,00/5,00)	1,33 (0,00/3,00)	0,80 (0,00/2,00)	0,60 (0,00/2,00)	0,33 (0,00/2,00)
Basophile %	0,20 (0,00/1,00)	0,20 (0,00/1,00)	0,50 (0,00/1,00)	1,20 (0,00/4,00)	0,00 (0,00/0,00)	0,67 (0,00/3,00)

¹ Anzahl der gültigen Fälle; Alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

Bei allen Kälbern wurde im Differenzialblutbild eine Anisozytose festgestellt. Fütterungsbedingte Unterschiede zwischen den Gruppen gab es nicht (Tabelle 20).

Tabelle 20: Differenzialblutbild der Kälber aus den drei Versuchsgruppen

	Gruppe		
	Kontrolle (n ¹ =5)	AS (n=4)	OS (n=5)
	1. Woche p. n.		
WBC G/l	8,30 (5,30/10,5)	6,38 (4,70/8,30)	8,22 (6,80/9,30)
RBC T/l	7,23 (5,00/9,00)	6,73 (5,90/8,00)	6,68 (5,30/8,60)
HGB g/l	91,2 (62,0/107)	87,0 (74,0/100)	84,4 (71,0/107)
HCT %	28,2 (17,6/34,2)	26,4 (23,1/29,9)	25,7 (20,6/33,7)
MCV µm ³	38,4 (35,0/41,0)	39,3 (37,0/41,0)	38,4 (38,0/39,0)
MCH pg/ Zelle	12,6 (12,0/14,0)	12,9 (13,0/14,0)	12,7 (11,0/14,0)
MCHC %	32,6 (31,0/34,9)	32,9 (31,9/34,3)	33,0 (30,0/35,5)
PLT G/L	732 (9,3/1194)	742 (699/786)	899 (564/1348)
Lym %	61,2 (53,0/65,0)	65,5 (60,0/73,0)	57,8 (50,0/70,0)
Seg %	35,2 (30,0/45,0)	30,3 (23,0/37,0)	38,8 (26,0/48,0)
Stab %	0,60 (0,00/2,00)	1,50 (0,00/2,00)	1,20 (1,00/2,00)
Eosinophile %	0,40 (0,00/1,00)	0,75 (0,00/1,00)	0,80 (0,00/2,00)
Monozyten %	1,40 (0,00/4,00)	0,75 (0,00/2,00)	1,00 (0,00/3,00)
Basophile %	1,60 (1,00/3,00)	1,25 (0,00/3,00)	0,40 (0,00/2,00)

¹ Anzahl der gültigen Fälle; Alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

4.1.3.2 Phänotypisierung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) der Kühe

In der Untersuchung zur Phänotypisierung der Lymphozyten konnte keine signifikante Abweichung zwischen den Gruppen festgestellt werden (Tabelle 21).

Tabelle 21: Relativer Anteil der CD4-, CD8-, CD25- und MHCII-Lymphozyten (%) des peripheren Blutes der Kühe in der ersten und 12. Woche *post partum*

	Gruppe					
	Kontrolle (n ¹ =5)	AS (n=5)	OS (n=6)	Kontrolle (n=5)	AS (n=5)	OS (n=6)
	1. Woche p. p.			12 Wochen p. p.		
CD4 ⁺ CD8 ⁻	52,3 (36,8/60,9)	30,9 (19,3/44,8)	30,4 (1,44/54,9)	43,4 (24,1/64,6)	46,8 (31,8/61,1)	49,0 (29,6/58,5)
CD4 ⁻ CD8 ⁺	16,9 (6,74/22,4)	16,0 (11,5/22,9)	12,5 (9,35/16,3)	14,1 (7,40/17,9)	16,9 (11,2/20,8)	13,9 (12,3/19,5)
CD25 ⁺ MHCII ⁻	11,2 (6,32/15,3)	9,59 (5,61/13,9)	11,3 (3,94/14,5)	17,0 (7,33/52,9)	12,5 (6,40/30,7)	12,5 (1,65/47,3)
CD25 ⁻ MHCII ⁺	41,0 (19,8/48,4)	38,1 (32,0/44,9)	37,3 (5,62/59,6)	35,9 (3,47/46,1)	29,9 (1,82/44,0)	35,0 (0,99/52,8)
CD25 ⁺ MHCII ⁺	2,07 (0,01/5,17)	1,56 (0,67/2,34)	2,82 (0,01/7,27)	2,14 (0,67/3,98)	2,00 (1,49/2,41)	2,34 (1,06/6,06)
CD4 ⁺ CD25 ⁺	n.m.	n.m.	n.m.	4,67 (2,57/6,62)	7,66 (3,50/16,1)	5,55 (1,95/13,5)

¹ Anzahl der gültigen Fälle; CD = Cluster of Differentiation; n.m. = nicht gemessen; alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

4.1.3.3 Phänotypisierung der PBMC der Kälber

Im Blut der Kälber konnte kein Unterschied zwischen den drei Gruppen beim relativen Anteil der lymphozytären Subpopulationen festgestellt werden (Tabelle 22).

Tabelle 22: Relativer Anteil der lymphozytären Subpopulationen (%) des peripheren Blutes der Kälber

	Gruppe		
	Kontrolle (n ¹ =5)	AS (n=4)	OS (n=5)
	1. Woche p. n.		
CD4 ⁺ CD8 ⁻	42,8 (27,0/55,5)	35,6 (21,4/49,4)	31,9 (16,6/40,6)
CD4 ⁻ CD8 ⁺	17,4 (12,1/21,3)	20,2 (13,1/31,7)	18,8 (12,1/25,0)
CD25 ⁺ MHCII ⁻	24,6 (17,2/35,1)	18,5 (14,1/24,9)	20,3 (13,5/27,7)
CD25 ⁻ MHCII ⁺	14,8 (7,62/24,1)	15,8 (5,88/20,2)	19,4 (11,8/33,2)
CD25 ⁺ MHCII ⁺	2,31 (0,32/6,22)	1,37 (0,23/2,56)	0,89 (0,46/1,45)

¹ Anzahl der gültigen Fälle; CD = Cluster of Differentiation; n.m. = nicht gemessen; alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

4.1.3.4 Phagozytoseleistung der Granulozyten und Monozyten im Blut

Zwischen den Gruppen zeigten sich keine fütterungsbedingten Unterschiede in der Phagozytoseleistung der Granulozyten und Monozyten. Innerhalb der Gruppe AS war der prozentuale Anteil der phagozytierenden Monozyten 12 Wo p. p. signifikant niedriger ($p=0,05$) als eine Wo p.p. (Tabelle 23).

Tabelle 23: Prozentualer Anteil der phagozytierenden Granulozyten und Monozyten im Blut der Kühe ein und 12 Wochen *post partum*

	Gruppe					
	Kontrolle (n ¹ =5)	AS (n=5)	OS (n=6)	Kontrolle (n=5)	AS (n=5)	OS (n=6)
	1. Woche p. p.			12 Wochen p. p.		
Granulozyten	87,3 (80,3/94,8)	80,5 (65,9/95,0)	84,9 (66,1/94,1)	78,6 (63,3/90,2)	77,1 (71,1/83,0)	81,8 (76,2/88,9)
Monozyten	68,6 (45,4/83,8)	75,1 (65,3/87,3) ^a	56,4 (27,3/74,2)	59,4 (50,2/67,2)	57,5 (42,1/73,0) ^b	61,4 (50,1/69,5)

¹ Anzahl der gültigen Fälle; Alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max); a, b: Signifikanz innerhalb einer Gruppe, p≤0,05

Das Blut der Versuchskälber wies bei der Phagozytoseaktivität der Granulozyten und Monozyten keine Unterschiede auf (Tabelle 24).

Tabelle 24: Prozentualer Anteil der phagozytierenden Granulozyten und Monozyten im peripheren Blut der Kälber

	Gruppe		
	Kontrolle (n = 5 ¹)	AS (n = 4)	OS (n = 5)
	1. Woche p. n.		
Granulozyten	81,2 (63,5/93,1)	88,7 (82,7/96,4)	89,5 (85,5/97,4)
Monozyten	64,7 (54,5/75,5)	66,8 (62,1/70,7)	68,5 (±61,5/73,8)

¹ Anzahl der gültigen Fälle; alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

Die Betrachtung der Fluoreszenzintensität der phagozytierenden Granulozyten und Monozyten der Kühe eine und zwölf Wochen p.p. zeigte ebenfalls keine Unterschiede auf (Tabelle 25).

Tabelle 25: Mittlere Fluoreszenzintensität der phagozytierenden Granulozyten und Monozyten im peripheren Blut der Kühe

	Gruppe					
	Kontrolle (n ¹ =5)	AS (n=5)	OS (n=6)	Kontrolle (n=5)	AS (n=5)	OS (n=6)
	1. Woche p. p.			12 Wochen p. p.		
F.I. Gran	1254 (590/2799)	1016 (373/2314)	1040 (582/2415)	1295 (610/2290)	1175 (658/2255)	976 (710/1229)
F.I. Mon	614 (272/1367)	518 (266/1067)	379 (138/854)	541 (333/986)	485 (272/904)	430 (353/534)

¹ Anzahl der gültigen Fälle; FI = Fluoreszenzintensität (dimensionslos); alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

Bei der Fluoreszenzintensität der phagozytierenden Granulozyten und Monozyten der Kälber konnten keine Signifikanzen zwischen den Gruppen festgestellt werden (Tabelle 26).

Tabelle 26: Mittlere Fluoreszenzintensität der phagozytierenden Granulozyten und Monozyten im peripheren Blut der Kälber

	Kontrolle (n = 5 ¹)	AS (n = 4)	OS (n = 5)
Zeitpunkt	1. Woche p. n.		
F.I. Gran	975 (427/2031)	1197 (643/2344)	1048 (507/2518)
F.I. Mon	595 (292/1202)	518 (312/954)	464 (297/883)

¹ Anzahl der gültigen Fälle; FI = Fluoreszenzintensität (dimensionslos); alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

4.1.3.5 Lymphozytenproliferation

Bei der Lymphozytenproliferation wurde bei keinem der verwendeten Mitogene ein fütterungsbedingter Unterschied zwischen den drei Gruppen nachgewiesen (Tabelle 27).

Tabelle 27: Relativer Anteil proliferierter Lymphozyten (%) im peripheren Blut der Kühe nach Behandlung mit den Mitogenen PHA-M, CON A und PWM

	Gruppe					
	Kontrolle (n ¹ =5)	AS (n=5)	OS (n=6)	Kontrolle (n=5)	AS (n=5)	OS (n=6)
	1. Woche p. p.			12 Wochen p. p.		
PWM CD5 ⁺ BrdU ⁺	18,2 (2,94/29,1)	25,9 (12,5/42,8)	11,5 (0,06/24,0)	10,7 (4,98/14,9)	14,7 (0,55/28,0)	14,8 (5,37/23,8)
CON A CD5 ⁺ BrdU ⁺	25,3 (1,16/32,1)	27,6 (17,4/40,2)	12,7 (0,06/28,1)	16,5 (3,71/25,8)	21,8 (4,47/34,5)	13,3 (6,91/22,1)
PHA-M CD5 ⁺ BrdU ⁺	7,00 (3,67/14,8)	12,9 (1,49/27,0)	5,58 (0,01/18,9)	5,13 (0,92/13,2)	12,1 (5,43/32,0)	5,75 (0,59/12,3)

¹ Anzahl der gültigen Fälle; Alle Werte sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

Unabhängig vom Mitogen konnte kein Unterschied bei dem relativen Anteil der proliferierten Zellen zwischen den Gruppen der Kälber beobachtet werden (Tabelle 28).

Tabelle 28: Relativer Anteil proliferierter Lymphozyten (%) im peripheren Blut der Kälber nach Behandlung mit den Mitogenen PHA-M, CON A und PWM

	Gruppe		
	Kontrolle (n ¹ =5)	AS (n=4)	OS (n=5)
	1 Woche p. n.		
PWM CD5 ⁺ BrdU ⁺	12,7 (2,38/25,7)	17,5 (1,53/38,8)	16,5 (2,29/53,0)
CON A CD5 ⁺ BrdU ⁺	9,87 (2,45/15,9)	24,6 (1,51/48,1)	19,9 (2,47/60,1)
PHA-M CD5 ⁺ BrdU ⁺	3,12 (0,80/5,82)	9,11 (0,37/26,1)	5,97 (0,08/25,5)

¹ Anzahl der gültigen Fälle; Alle Werte sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

4.1.3.6 Lymphozytenproliferation mit anschließender Phänotypisierung der Lymphozytensubpopulationen

Bei der Proliferation ohne Mitogen konnten bei der anschließenden Phänotypisierung der Lymphozytensubpopulation keine versuchsbedingter Abweichungen zwischen den Gruppen festgestellt werden (Tabelle 29).

Tabelle 29: Relativer Anteil der lymphozytären Subpopulationen (%) nach Proliferation ohne Mitogen im peripheren Blut der Kühe 12 Wochen *post partum*

	Gruppe		
	Kontrolle (n ¹ =5)	AS (n=5)	OS (n=6)
CD4 ⁺ CD8 ⁻	24,4 (15,4/35,1)	29,1 (21,3/41,3)	23,1 (13,3/37,1)
CD4 ⁻ CD8 ⁺	13,9 (8,42/16,1)	17,1 (11,2/22,7)	14,9 (6,41/33,1)
CD4 ⁺ CD25 ⁺	2,88 (0,48/5,76)	3,53 (0,77/6,88)	3,83 (0,01/9,36)
CD25 ⁺ MHCII ⁻	3,63 (1,10/8,08)	3,25 (1,13/5,24)	9,49 (1,16/22,9)
CD25 ⁻ MHCII ⁺	30,1 (19,1/43,8)	35,8 (28,3/41,0)	38,0 (7,09/52,7)
CD25 ⁺ MHCII ⁺	5,13 (1,15/8,51)	6,24 (5,83/6,67)	3,81 (0,02/5,80)

¹ Anzahl der gültigen Fälle; CD= Cluster of Differentiation; alle Werte sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

Zwischen den drei Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied bei den untersuchten Subpopulationen unter der Verwendung des Mitogens CON A bei der Proliferation beobachtet (Tabelle 30).

Tabelle 30: Relativer Anteil der lymphozytären Subpopulationen (%) nach Stimulation mit dem Mitogen CON A im peripheren Blut der Kühe 12 Wochen *post partum*

	Gruppe		
	Kontrolle (n ¹ =5)	AS (n=5)	OS (n=6)
CD4 ⁺ CD8 ⁻	26,4 (20,3/36,6)	31,1 (25,2/38,7)	20,8 (13,9/38,1)
CD4 ⁻ CD8 ⁺	24,9 (11,9/37,4)	22,8 (15,5/33,8)	19,5 (8,38/33,2)
CD4 ⁺ CD25 ⁺	12,9 (4,55/19,7)	13,4 (2,36/18,8)	9,02 (1,31/17,9)
CD25 ⁺ MHCII ⁻	25,1 (17,4/37,1)	31,8 (26,6/44,5)	20,1 (12,9/41,3)
CD25 ⁻ MHCII ⁺	20,0 (12,6/29,6)	20,9 (17,4/24,2)	27,5 (5,70/36,6)
CD25 ⁺ MHCII ⁺	12,9 (3,68/17,6)	15,3 (7,50/25,4)	15,4 (8,19/22,5)

¹ Anzahl der gültigen Fälle; CD = Cluster of Differentiation; alle Werte sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

Die Daten von der Proliferation mit dem Mitogen PHA-M in den Lymphozytensubpopulationen zeigten keine fütterungsbedingten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf (Tabelle 31).

Tabelle 31: Relativer Anteil der lymphozytären Subpopulationen (%) nach Stimulation mit dem Mitogen PHA-M im peripheren Blut der Kühe 12 Wochen *post partum*

	Gruppe		
	Kontrolle (n ¹ =5)	AS (n=5)	OS (n=6)
CD4 ⁺ CD8 ⁻	23,1 (17,0/29,2)	28,4 (20,3/39,2)	25,0 (15,5/37,7)
CD4 ⁻ CD8 ⁺	14,4 (8,74/17,3)	16,4 (12,1/18,2)	15,9 (8,08/41,4)
CD4 ⁺ CD25 ⁺	3,95 (0,47/6,91)	4,88 (0,69/9,54)	3,97 (0,27/6,56)
CD25 ⁺ MHCII ⁻	7,59 (4,17/16,6)	9,66 (3,15/16,0)	10,8 (4,71/24,5)
CD25 ⁻ MHCII ⁺	29,5 (11,3/56,2)	35,0 (26,5/46,9)	37,2 (12,2/50,1)
CD25 ⁺ MHCII ⁺	3,18 (1,02/5,79)	6,82 (1,97/14,7)	6,51 (3,92/9,22)

¹ Anzahl der gültigen Fälle; CD = Cluster of Differentiation; alle Werte sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

Bei Verwendung des Mitogens CON A kam es bei allen Gruppen zu einer signifikanten Vermehrung der CD25- und MHCII-positiven Zellen ($p \leq 0,03$) im Vergleich zum Ansatz mit dem Mitogen PHA-M und beim Ansatz ohne Mitogen. Bei der Kontroll- und der AS-Gruppe nahmen zusätzlich die CD4- und CD25-positiven Zellen bei Verwendung des Mitogens CON A im Vergleich zu keinem Mitogen und bei der Kontrollgruppe zusätzlich im Vergleich zu PHA-M signifikant zu ($p < 0,01$). Bei der OS-Gruppe kam es hierbei nur zu einer numerischen Vermehrung, die nicht signifikant war. Die CD25-positiven Zellen waren für das Mitogen CON A im Vergleich zu den anderen Ansätzen in allen Gruppen numerisch erhöht. Ein abzusichernder Unterschied zeigte sich aber nur in der Kontrollgruppe ohne Mitogenzusatz ($p < 0,05$) und in der Gruppe AS ohne Mitogenzusatz bzw. nach PHA-M ($p < 0,01$). Bei den CD8-positiven Zellen konnte eine numerische Erhöhung in allen Gruppen für das Mitogen CON A gesehen werden, die aber nur bei Vergleich zum Ansatz ohne Mitogen in der Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,05$) war.

4.1.4 Ergebnisse der Milchanalysen aus V1

4.1.4.1 Milchleistung

Bei der Milchleistung konnte bei den erhobenen Daten keine signifikanten Abweichungen zwischen den Gruppen festgestellt werden (Tabelle 32).

Tabelle 32: Durchschnittliche Milchmenge der Kühe sowie Angaben zu den mittleren Mengen der Inhaltsstoffe und der Zellzahl der Milch

Gruppe	Kontrolle (n ¹ =5)	AS (n=5)	OS (n=6)
Ø Milchmenge/Tag und Tier (M/T) (kg)	26,0 (20,4/31,6)	22,5 (7,78/32,0)	27,0 (9,04/35,4)
Fettmenge (kg pro M/T)	0,97 (0,89/1,02)	0,99 (0,36/1,59)	1,08 (0,39/1,57)
Eiweißmenge (kg pro M/T)	0,84 (0,69/1,01)	0,72 (0,26/0,98)	0,84 (0,29/1,08)
Laktosemenge (kg pro M/T)	1,41 (1,05/2,02)	1,14 (0,39/1,59)	1,37 (0,48/1,77)
TM (kg pro M/T)	3,22 (2,87/3,46)	3,36 (2,26/4,38)	3,48 (1,22/4,67)
Ø Somatische Zellzahl (x 1000/ ml)	166 (20,2/480)	85,9 (28,6/140)	157 (29,2/293)

¹ Anzahl der gültigen Fälle; Alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

4.1.4.2 Milchausstrich

Bei dem Differenzialbild wurde eine signifikant höhere Anzahl an mononukleären Zellen in der AS-Gruppe im Gegensatz zur OS- (p<0,01) und Kontroll- (p=0,01) Gruppe gefunden. Bei den anderen Zellen konnte kein fütterungsbedingter Unterschied ausgemacht werden (Tabelle 33).

Tabelle 33: Differenzialbild in den Milchausstrichen (%)

	Gruppe					
	Kontrolle (n ¹ =5)	AS (n=5)	OS (n=6)	Kontrolle (n=5)	AS (n=5)	OS (n=6)
	9 Wochen p. p.			12 Wochen p. p.		
Mononukleäre Zellen	3,20 (0,00/6,00) ^a	10,2 (5,00/16,0) ^b	2,67 (0,00/5,00) ^a	3,80 (0,00/7,00)	10,2 (2,00/32,0)	3,17 (0,00/9,00)
Lymphozyten	59,6 (17,0/87,0)	66,8 (48,0/76,0)	58,8 (20,0/84,0)	57,2 (20,0/74,0)	64,8 (53,0/73,0)	55,0 (20,0/77,0)
Neutrophile Granulozyten	36,6 (12,0/83,0)	20,0 (7,00/46,0)	37,3 (10,0/78,0)	39,0 (21,0/77,0)	23,2 (3,00/41,0)	42,3 (20,0/79,0)
Basophile Granulozyten	1,00 (0,00/2,00)	1,80 (0,00/5,00)	0,17 (0,00/1,00)	0,00 (0,00/0,00)	0,40 (0,00/1,00)	0,00 (0,00/0,00)
Eosinophile Granulozyten	0,60 (0,00/1,00)	1,20 (0,00/5,00)	1,00 (0,00/3,00)	0,00 (0,00/0,00)	1,40 (0,00/3,00)	0,33 (0,00/1,00)

¹ Anzahl der gültigen Fälle; Alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max); a, b: signifikante Unterschiede in einer Zeile für 9 Wo. p.p., p≤0,01

4.1.4.3 Phänotypisierung der mononukleären Milchzellen

Bei der Untersuchung der Milch konnten keine Unterschiede in den relativen Anteilen der Subpopulationen der mononukleären Zellen festgestellt werden (Tabelle 34).

Tabelle 34: Relativer Anteil der Subpopulationen (%) der mononukleären Zellen aus der Kuhmilch 9 und 12 Wochen *post partum*

	Gruppe					
	Kontrolle (n ¹ =5)	AS (n=5)	OS (n=6)	Kontrolle (n=5)	AS (n=5)	OS (n=6)
	9 Wochen p. p.			12 Wochen p. p.		
CD4 ⁺ CD25 ⁻	4,17 (0,21/8,74)	8,33 (2,46/20,5)	4,42 (0,71/13,1)	7,71 (2,85/14,8)	3,88 (1,37/6,43)	3,20 (1,62/7,45)
CD4 ⁻ CD25 ⁺	11,0 (0,05/23,1)	16,4 (5,20/23,7)	7,01 (0,24/16,8)	7,34 (0,95/13,5)	10,9 (2,20/22,6)	11,0 (3,31/22,6)
CD4 ⁺ CD25 ⁺	1,32 (0,24/2,91)	2,29 (0,65/4,40)	1,56 (0,19/3,49)	2,24 (1,35/4,12)	1,66 (0,44/4,29)	1,26 (0,00/3,60)
CD14 ⁺ MHCII ⁻	43,3 (15,0/62,6)	41,2 (13,4/94,0)	30,2 (0,11/80,7)	31,0 (0,82/56,6)	42,5 (7,30/75,8)	18,9 (4,77/47,3)
CD14 ⁻ MHCII ⁺	3,65 (0,50/9,11)	4,85 (2,83/6,48)	6,53 (0,40/14,6)	4,34 (0,03/9,47)	5,63 (2,82/7,30)	5,24 (2,13/6,55)
CD14 ⁺ MHCII ⁺	19,1 (7,25/31,0)	21,9 (1,09/49,0)	10,8 (0,42/27,0)	23,5 (9,15/35,5)	25,0 (6,26/35,6)	18,8 (4,47/42,5)
CD14 ⁺ CD5 ⁻	64,7 (54,4/75,0)	54,7 (24,8/79,8)	37,5 (0,03/85,3)	37,7 (9,15/81,3)	43,6 (9,19/77,5)	32,3 (15,9/62,9)
CD14 ⁻ CD5 ⁺	8,41 (2,41/14,4)	12,3 (4,53/24,1)	6,20 (2,02/17,9)	8,70 (0,76/25,9)	6,77 (1,01/12,3)	4,45 (0,32/25,9)

¹ Anzahl der gültigen Fälle; CD = Cluster of Differentiation; alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

4.1.4.4 Phagozytoseleistung der phagozytierenden Zellen in der Milch

Bei der Untersuchung der Phagozytoseleistung zeigten sich zwischen den Gruppen keine fütterungsbedingten Unterschiede. Innerhalb der AS-Gruppe war die Phagozytoseleistung in der ersten Laktationswoche signifikant niedriger ($p \leq 0,01$) als in der 12. Woche (Tabelle 35 und 36).

Tabelle 35: Prozentualer Anteil der phagozytierenden Zellen in der Milch

	Gruppe					
	Kontrolle (n ¹ =5)	AS (n=5)	OS (n=6)	Kontrolle (n=5)	AS (n=5)	OS (n=6)
	9 Wochen p. p.			12 Wochen p. p.		
Phagozytie- rende Zellen	1,46 (0,65/4,01)	0,68 (0,35/1,06) ^a	5,68 (0,06/28,8)	5,50 (0,32/24,5)	2,85 (1,21/5,26) ^b	2,37 (0,04/6,12)

¹ Anzahl der gültigen Fälle; Alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max); a, b: signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe, p≤0,01

Tabelle 36: Mittlere Fluoreszenzintensität der phagozytierenden Zellen in der Milch

	Gruppe					
	Kontrolle (n ¹ =5)	AS (n=5)	OS (n=6)	Kontrolle (n=5)	AS (n=5)	OS (n=6)
	9 Wochen p. p.			12 Wochen p. p.		
F.I.	546 (196/766)	658 (274/1028)	630 (307/1063)	657 (383/981)	549 (434/777)	779 (304/2506)

¹ Anzahl der gültigen Fälle; F.I. = Fluoreszenzintensität (dimensionslos); alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

4.2 Ergebnisse aus V2

4.2.1 Sauenmilch

In Tabelle 37 sind die Se-Gehalte der Sauenmilch während der Aufzuchtphase der Ferkel aufgezeigt. Die Gehalte stellen Momentaufnahmen dar und sind durch tierindividuelle Unterschiede, insbesondere bei Sau Nr. 7, geprägt.

Tabelle 37: Selengehalt ($\mu\text{g/l}$) der Sauenmilch während der Aufzuchtphase

Sau	7. Laktationstag	13. Laktationstag
1	41,7	52,1
2	37,4	39,8
3	45,1	34,7
4	46,8	40,5
5	39,2	30,9
6	33,5	34,6
7	102	33,1
8	50,2	27,6
9	19,6	35,3
Ø	46,2	36,5

4.2.2 Lebendmasse der Ferkel

Bei der Lebendmasse der Ferkel konnten während des Versuchzeitraumes keine signifikanten Abweichungen zwischen der Kontroll- und der AS- und OS-Gruppe festgestellt werden (Tabelle 38).

Tabelle 38: Mittlere Lebendmasse (kg) der Ferkel der drei Versuchsgruppen während der 14tägigen Versuchszeit

Gruppe	Absetzen	Tag 4	Tag 7	Tag 14 ± 1
Kontrolle (n ¹ =10)	7,74 (6,75/8,97)	8,45 (7,45/9,56)	9,33 (8,40/10,4)	10,8 (9,80/11,3)
AS (n=10)	7,45 (5,16/9,10)	8,15 (5,74/10,0)	8,93 (6,40/10,9)	10,9 (9,70/12,2)
OS (n=10)	7,55 (6,14/9,23)	8,19 (6,75/9,62)	8,85 (7,30/10,3)	10,1 (8,30/12,0)

¹Anzahl der gültigen Fälle Alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

4.2.3 Ergebnisse der Blutuntersuchungen

4.2.3.1 Differenzialblutbild

Das Differenzialblutbild der Ferkel zeigte altersentsprechende Werte im physiologischen Bereich (Tabelle 39).

Tabelle 39: Differenzialblutbild der Ferkel aus den drei Versuchsgruppen zum Ende des Versuches

	Gruppe		
	Kontrolle (n ¹ =10)	AS (n=10)	OS (n=10)
WBC G/l	12,0 (9,80/15,6)	13,2 (8,30/21,7)	12,2 (8,10/16,5)
RBC T/l	6,83 (6,12/7,98)	7,02 (6,29/8,17)	6,93 (6,01/8,15)
HGB g/l	114 (103/125)	123 (104/155)	116 (97,0/131)
HCT %	33,1 (29,1/37,6)	34,3 (30,1/37,6)	33,4 (27,4/40,3)
MCV µm ³	48,2 (44,0/53,0)	49,0 (45,0/53,0)	48,1 (45,0/52,0)
MCH pg/ Zelle	16,6 (14,4/17,8)	16,9 (15,9/18,8)	16,8 (16,1/18,3)
MCHC %	34,3 (32,8/36,0)	34,6 (33,3/37,0)	34,9 (32,3/36,4)
PLT G/L	675 (504/850)	606 (489/752)	602 (424/791)
Lym %	65,8 (56,0/77,0)	67,1 (51,0/84,0)	62,9 (43,0/80,0)
Seg %	32,0 (18,0/43,0)	29,7 (13,0/48,0)	33,6 (20,0/54,0)
Stab %	1,70 (0,00/5,00)	2,60 (1,00/5,00)	2,50 (0,00/5,00)
Eosinophile %	0,20 (0,00/1,00)	0,20 (0,00/1,00)	0,30 (0,00/2,00)
Monozyten %	0,10 (0,00/1,00)	0,00 (0,00/0,00)	0,20 (0,00/1,00)
Basophile %	0,10 (0,00/1,00)	0,40 (0,00/2,00)	0,50 (0,00/3,00)
Normoblasten %	0,20 (0,00/1,00)	0,20 (0,00/2,00)	0,30 (0,00/1,00)

¹Anzahl der gültigen Fälle (n¹=10) Alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

4.2.3.2 Messung der Selenkonzentrationen im Blutplasma der Ferkel

Bei Beginn des Versuches gab es zwischen den Gruppen keine Unterschiede in der Se-Konzentration im Blutplasma (Tabelle 40). Beim Versuchsende hatte die Gruppe OS eine signifikant höhere Se-Konzentration im Plasma als die Tiere der Gruppe AS (P=0,005) und der Kontrollgruppe (P=0,004). Gleichzeitig war die Se-Konzentration zum Versuchsende in der Gruppe OS signifikant höher als zum Absetzen (P=0,002).

Tabelle 40: Mittlere Selenkonzentrationen (µg/l) im Blutplasma der Ferkel der drei Versuchsgruppen während der 14tägigen Versuchszeit

	Gruppe		
	Kontrolle (n ¹ =10)	AS (n=10)	OS (n=10)
Absetzen	76,6 (59,5/107)	84,8 (67,1/127)	85,5 (59,6/126)
Tag 14 ± 1	84,3 (71,6/112) ^a	84,7 (63,5/124) ^a	109 (94,7/118) ^b

¹Anzahl der gültigen Fälle Alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max); a, b: signifikante Unterschiede innerhalb der Zeile, p<0,01

4.2.3.3 Phänotypisierung der PBMC

Es konnten bei den SWC3⁺CD21⁻, SWC3⁻CD21⁺- und SWC3⁺CD21⁺-Zellen keine Differenzen zwischen den Gruppen festgestellt werden (Tabelle 41).

Tabelle 41: Relativer Anteil der SWC3- und CD21-Leukozyten (%) des peripheren Blutes der Ferkel beim Absetzen

	Gruppe		
	Kontrolle (n ¹ =10)	AS (n=10)	OS (n=10)
SWC3 ⁺ CD21 ⁻	2,63 (1,39/4,38)	3,17 (0,63/11,3)	2,14 (0,38/5,55)
SWC3 ⁻ CD21 ⁺	21,4 (16,0/29,2)	22,8 (14,2/37,7)	20,4 (13,7/29,6)
SWC3 ⁺ CD21 ⁺	0,78 (0,25/1,82)	0,67 (0,11/2,61)	0,38 (0,11/0,70)
CD14 ⁺	3,09 (1,79/5,12)	3,85 (0,73/9,48)	2,65 (0,80/5,10)

¹Anzahl der gültigen Fälle; CD = Cluster of Differentiation; alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), $p > 0,05$

Zwischen den drei Gruppen konnten im Rahmen des Versuches keine Signifikanzen bei dem Anteil der TCR1- und CD8 α - Lymphozyten festgestellt werden (Tabelle 42).

Tabelle 42: Relativer Anteil der TCR1- und CD8 α -Lymphozyten (%) des peripheren Blutes der Ferkel

	Gruppe					
	Kontrolle (n ¹ =10)	AS (n=10)	OS (n=10)	Kontrolle (n=7)	AS (n=7)	OS (n=6)
	Absetzen			Tag 14 \pm 1		
TCR1 ⁺ CD8 α ⁻	16,3 (6,61/35,0)	12,0 (6,10/34,5)	12,6 (7,84/18,2)	15,1 (7,97/31,4)	15,5 (7,82/30,3)	14,1 (9,21/20,3)
TCR1 ⁻ CD8 α ⁺	22,2 (16,3/29,3)	23,6 (14,4/32,2)	25,4 (15,1/39,5)	22,3 (11,9/37,9)	18,3 (12,6/32,8)	20,2 (11,9/29,1)
TCR1 ⁺ CD8 α ⁺	3,70 (1,89/5,05)	3,56 (1,73/8,69)	3,79 (2,39/6,61)	2,60 (1,10/4,51)	3,00 (1,20/4,84)	3,45 (2,11/5,36)
CD8 α ⁺ (n=10)	n.m.	n.m.	n.m.	22,2 (13,0/41,6)	22,1 (15,1/35,8)	22,3 (15,3/41,1)

¹Anzahl der gültigen Fälle; CD = Cluster of Differentiation; n.m. = nicht gemessen; alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

Ein Unterschied zwischen der Kontroll-, AS- und OS-Gruppe konnte durch die hier aufgeführten Ergebnisse nicht dargestellt werden. Innerhalb der Gruppen war der relative Anteil der CD4⁺CD8 β ⁻-und der CD4⁺CD25⁻-positiven Zellen am Tag des Absetzens signifikant höher ($P \leq 0,02$) als am Versuchsende. In der den Gruppen AS und OS war der Anteil der CD4⁺CD8 β ⁺-positiven Zellen beim Absetzen signifikant niedriger ($P \leq 0,014$) als am Versuchsende (Tabelle 43).

Tabelle 43: Relativer Anteil der CD4- und CD8 β -, sowie der CD4- und CD25-positiven Lymphozyten (%) des peripheren Blutes der Ferkel

	Gruppe					
	Kontrolle (n ¹ =10)	AS (n=10)	OS (n=10)	Kontrolle (n=10)	AS (n=10)	OS (n=10)
	Absetzen			Tag 14 \pm 1		
CD4 ⁺ CD8 β ⁻	25,4 (14,4/43,2) ^a	23,9 (18,8/36,6) ^a	22,0 (11,0/32,7) ^a	12,6 (6,09/20,8) ^b	9,58 (2,11/15,5) ^b	9,06 (1,36/16,9) ^b
CD4 ⁻ CD8 β ⁺	9,60 (5,29/27,3)	7,40 (3,72/10,6)	9,11 (3,93/18,7)	8,94 (4,64/24,3)	11,4 (3,46/24,2)	9,92 (3,06/24,7)
CD4 ⁺ CD8 β ⁺	2,02 (0,19/6,51)	1,17 (0,30/2,93) ^a	1,20 (0,23/4,28) ^a	3,51 (1,48/8,31)	3,05 (1,16/4,97) ^b	2,82 (1,54/5,03) ^b
CD4 ⁺ CD25 ⁻	20,2 (11,3/27,6)	20,0 (12,1/30,0)	18,6 (9,23/27,9)	9,27 (4,09/16,2)	9,20 (2,77/16,8)	9,27 (1,66/17,3)
CD4 ⁻ CD25 ⁺	15,3 (9,38/21,6)	15,2 (10,6/24,0)	16,2 (8,32/23,1)	19,3 (5,84/28,2)	19,2 (5,51/30,6)	20,1 (6,65/34,6)
CD4 ⁺ CD25 ⁺	3,34 (2,05/4,51)	3,51 (2,32/5,11)	3,19 (2,13/4,33)	2,68 (0,90/4,17)	2,87 (0,85/6,19)	2,91 (0,66/5,16)

¹Anzahl der gültigen Fälle; CD = Cluster of Differentiation; n.m. = nicht gemessen; alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max); a, b geben signifikante Unterschiede innerhalb einer Zeile wieder, p \leq 0,02

Beim Absetzen der Ferkel gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Am letzten Versuchstag hatte die Gruppe AS eine signifikant höhere Anzahl an CD2⁻CD5⁺-positiven Zellen (B-Zellen und CD2- $\gamma\delta$ -T-Zellen) als die Kontrolltiere (P=0,03) und die Gruppe OS (P=0,02). Die CD2⁺CD5⁻- und die CD2⁺CD5⁺-positiven Zellen wiesen keinen Unterschied zwischen den Gruppen auf. Zu den verschiedenen Zeitpunkten konnte in allen Gruppen ein tendenziell höherer Anteil (P=0,05) an CD2⁺CD5⁺-positiven Lymphozyten am Tag des Absetzens als am letzten Versuchstag festgestellt werden. Bei der Gruppe AS zeigt sich zudem ein signifikant höherer (P=0,01) Anteil an CD2⁻CD5⁺-positiven Lymphozyten am 14. Versuchstag im Gegensatz zum Versuchsbeginn (Tabelle 44).

Tabelle 44: Relativer Anteil der CD2- und CD5-Lymphozyten (%) des peripheren Blutes der Ferkel

	Gruppe					
	Kontrolle (n ¹ =10)	AS (n=10)	OS (n=10)	Kontrolle (n=10)	AS (n=10)	OS (n=10)
	Absetzen			Tag 14 ± 1		
CD2 ⁺ CD5 ⁻	21,9 (15,4/33,6)	23,6 (16,6/32,9)	24,5 (15,8/37,8)	25,9 (12,3/46,4)	23,2 (16,0/27,8)	28,0 (17,5/51,0)
CD2 ⁻ CD5 ⁺	2,21 (0,55/4,26)	2,06 (0,67/4,40) ^B	2,55 (0,92/8,75)	2,69 (1,65/4,41) ^b	4,99 (1,19/10,2) ^{a, A}	2,57 (1,70/4,20) ^b
CD2 ⁺ CD5 ⁺	45,5 (38,6/52,9) ^a	45,3 (41,8/54,5) ^a	43,7 (33,5/56,1) ^a	37,2 (30,6/47,0) ^b	33,9 (23,2/40,8) ^b	35,5 (18,1/47,7) ^b

¹Anzahl der gültigen Fälle, CD = Cluster of Differentiation; n.m. = nicht gemessen; alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max); a, b zeigen signifikante Unterschiede innerhalb einer Zeile an, P≤0,03; A,B geben Unterschiede innerhalb einer Gruppe an, p≤0,01

Die Ergebnisse der CD5⁺MHCII⁻, CD5⁻MHCII⁺- und den CD5⁺MHCII⁺-positiven Lymphozyten zeigten keine fütterungsbedingten Unterschiede zwischen der Kontroll- und den beiden Versuchsgruppen (Tabelle 45).

Tabelle 45: Relativer Anteil der CD5- und MHCII-Lymphozyten (%) des peripheren Blutes der Ferkel

	Gruppe		
	Kontrolle (n ¹ =10)	AS (n=10)	OS (n=10)
	Tag 14 ± 1		
CD5 ⁺ MHCII ⁻	45,3 (35,4/52,0)	44,8 (38,6/49,6)	44,1 (32,5/63,3)
CD5 ⁻ MHCII ⁺	19,6 (15,9/26,0)	21,0 (11,3/32,4)	18,0 (11,7/25,4)
CD5 ⁺ MHCII ⁺	6,89 (4,61/11,3)	10,0 (5,37/13,1)	7,57 (4,17/16,2)

¹Anzahl der gültigen Fälle, CD = Cluster of Differentiation; alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

Die CD45RC⁺-Zellen, die Makrophagen und Monozyten (CD14) sowie die B-Zellen (CD21) wiesen keine Signifikanzen zwischen den Gruppen auf. Bei der Gruppe OS war der Anteil der CD45RC⁺-Zellen am Versuchsbeginn signifikant höher (P=0,04) als am Versuchsende (Tabelle 46).

Tabelle 46: Relativer Anteil der 45RC-, CD14- und CD21-Lymphozyten(%) des peripheren Blutes der Ferkel beim Absetzen und am Versuchsende

	Gruppe					
	Kontrolle (n ¹ =10)	AS (n=10)	OS (n=10)	Kontrolle (n=10)	AS (n=10)	OS (n=10)
	Absetzen			Tag 14 ± 1		
CD45RC ⁺	89,3 (85,2/93,3)	87,8 (77,1/93,0)	90,4 (86,1/95,5) ^a	90,5 (83,1/95,7)	87,7 (79,5/92,0)	86,7 (81,0/94,6) ^b
CD14 ⁺ CD21 ⁻	n.m.	n.m.	n.m.	2,47 (1,29/4,56)	3,57 (1,56/5,56)	3,27 (0,81/6,19)
CD14 ⁻ CD21 ⁺	n.m.	n.m.	n.m.	28,4 (19,4/40,7)	30,9 (23,1/44,1)	29,6 (19,4/46,1)

¹Anzahl der gültigen Fälle CD = Cluster of Differentiation; n.m. = nicht gemessen; alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max); a, b geben signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe an, p=0,04

4.2.3.4 Phagozytoseleistung der Granulozyten und Monozyten im Blut

Bei der Phagozytoseaktivität der Granulozyten und Monozyten konnte zu beiden Messzeitpunkten kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen beobachtet werden (Tabelle 47).

Tabelle 47: Prozentualer Anteil der phagozytierenden Granulozyten und Monozyten im Blut der Ferkel während der 14tägigen Versuchszeit

	Gruppe					
	Kontrolle (n ¹ =10)	AS (n=10)	OS (n=10)	Kontrolle (n=10)	AS (n=10)	OS (n=10)
	Absetzen			Tag 14 ± 1		
Granulozyten	78,3 (70,1/86,5)	81,8 (69,1/90,1)	78,2 (63,4/86,9)	70,9 (44,2/85,0)	75,5 (43,3/89,0)	81,1 (66,9/97,9)
Monozyten	46,7 (30,7/61,2)	49,3 (32,2/63,9)	44,8 (30,5/57,3)	42,8 (34,7/50,4)	42,9 (22,2/59,5)	49,5 (38,5/58,8)

¹Anzahl der gültigen Fälle Alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

Die mittlere Fluoreszenzintensität ist eine dimensionslose Größe, die die Anzahl der aufgenommenen Bakterien pro Zelle darstellt. Fütterungsbedingte Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht festgestellt werden. In der Kontrollgruppe war zu Versuchsbeginn die Fluoreszenzintensität signifikant höher als beim Versuchsende (Tabelle 48).

Tabelle 48: Mittlere Fluoreszenzintensität der phagozytierenden Granulozyten und Monozyten im Blut der Ferkel

	Gruppe					
	Kontrolle (n ¹ =10)	AS (n=10)	OS (n=10)	Kontrolle (n=10)	AS (n=10)	OS (n=10)
	Absetzen			Tag 14 ± 1		
F.I. Gran	899 (501/1477) ^a	869 (551/1520)	833 (503/1217)	665 (468/1111) ^b	745 (453/1127)	684 (493/863)
F.I. Mon	249 (143/453)	284 (95,0/477)	262 (138/447)	254 (182/391)	297 (198/451)	278 (151/405)

¹Anzahl der gültigen Fälle. Alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max); a, b: signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe, p<0,05

4.2.4 Phänotypisierung der mononukleären Zellen der Milz

Bei den T-Helferzellen, dargestellt durch die CD4-positiven Zellen, und den zytotoxischen Zellen, welche CD8 β - oder CD4- und CD8 β -positiv sind, konnten keine durch die Fütterung hervorgerufenen Unterschiede festgestellt werden (Tabelle 49).

Tabelle 49: Relativer Anteil der CD4- und CD8 β -Lymphozyten (%) der Milz der Ferkel am Tag 14 \pm 1

	Gruppe		
	Kontrolle (n ¹ =10)	AS (n=10)	OS (n=10)
CD4 ⁺ CD8 β ⁻	12,8 (6,33/17,5)	13,3 (7,34/19,3)	13,7 (7,50/18,1)
CD4 ⁻ CD8 β ⁺	6,73 (3,68/11,2)	9,54 (2,86/20,4)	7,48 (0,73/23,6)
CD4 ⁺ CD8 β ⁺	1,33 (0,08/3,18)	1,65 (0,09/6,03)	0,91 (0,04/2,31)

¹Anzahl der gültigen Fälle, CD = Cluster of Differentiation; alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

Die CD2-positiven Zellen ($\gamma\delta$ -T-Zellen), die CD16- (NK Zellen) sowie die CD2- und CD16- (NK-Zellen, dendritische Zellen, Granulozyten und Makrophagen) positiven Zellen wiesen keine signifikanten Abweichungen zwischen den Gruppen auf (Tabelle 50).

Tabelle 50: Relativer Anteil der CD2- und CD16-Lymphozyten (%) der Milz der Ferkel am Tag 14 \pm 1

	Gruppe		
	Kontrolle (n ¹ =10)	AS (n=10)	OS (n=10)
CD2 ⁺ CD16 ⁻	31,5 (22,2/53,7)	31,9 (18,1/40,6)	33,0 (26,0/41,8)
CD2 ⁻ CD16 ⁺	21,8 (8,37/29,1)	21,7 (12,9/30,4)	20,4 (11,3/27,7)
CD2 ⁺ CD16 ⁺	10,8 (5,28/26,8)	12,3 (4,88/19,3)	12,2 (6,55/18,5)

¹Anzahl der gültigen Fälle, CD = Cluster of Differentiation; alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

Der relative Anteil der B-Zellen (CD21⁺) und der Makrophagen und Monozyten (CD14⁺) an den Lymphozyten in der Milz zeigten keine fütterungsbedingten Unterschiede (Tabelle 51).

Tabelle 51: Relativer Anteil der CD14- und CD21-Lymphozyten (%) der Milz der Ferkel am Tag 14 \pm 1

	Gruppe		
	Kontrolle (n ¹ =10)	AS (n=10)	OS (n=10)
CD14 ⁺ CD21 ⁻	5,44 (2,66/7,52)	6,91 (2,77/10,2)	6,39 (3,72/10,3)
CD14 ⁻ CD21 ⁺	33,6 (25,2/41,0)	30,1 (24,4/40,9)	27,4 (18,1/38,4)

¹Anzahl der gültigen Fälle, CD = Cluster of Differentiation; alle Daten sind arithmetische Mittelwerte (Min/Max), p>0,05

5 Diskussion

5.1 Hintergrund und Ziel der Arbeit

V.1

Die Qualität von Kuhmilch spielt eine wichtige Rolle in der Jungtierernährung und für den Konsumenten. Milch kann nur dann sicher für das Jungtier und den menschlichen Verzehr sein, wenn das Euter effektiv vor mikrobiellen Infektionen geschützt wird, und zwar über seine Abwehrmechanismen, die nicht zuletzt von der Ernährung der Tiere beeinflusst werden können. Unter den verschiedenen Nährstoffen, die das Immunsystem beeinflussen, spielt das Spurenelement Selen eine besondere Rolle. Es ist essenziell für viele biochemische Prozesse. Selen hat zudem Einfluss auf die Tiergesundheit über das Immunsystem und durch seine Mitwirkung an antioxidativen Prozessen. So ist Selen essenziell für die Glutathionperoxidase, einem wichtigen Enzym zur Bekämpfung oxidativer Prozesse, und einiger anderer Enzyme sowie verschiedener Selenoproteine, deren Funktion oft nicht vollständig geklärt ist.

Die bedarfsdeckende Supplementierung von Rationen für Milchkühe mit Selen kann die Abwehr von Infektionen unterstützen und so einen Beitrag zur Sicherheit des Futter- und Lebensmittels Milch zu leisten. Neben den funktionalen Aspekten ist es auf der anderen Seite ein wesentliches Ziel, den Se-Gehalt der Milch zu erhöhen und damit die marginale Versorgung der Jungtiere und der menschlichen Bevölkerung mit diesem Spurenelement zu verbessern. Die Empfehlungen zur Versorgung der Milchkuh mit Selen liegen in den USA zwischen 0,1 und 0,3 mg Selen/kg Futterrockensubstanz (NRC, 2001), die deutsche Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE) empfiehlt Se-Gehalte von 0,15-0,2 mg/kg TS (GfE, 2001). Die Se-Bioverfügbarkeit aus den unterschiedlichen Verbindungen ist von aktuellem Interesse, da in letzter Zeit immer häufiger organische Se-Verbindungen verwendet werden. Diese verhalten sich anders als anorganische, sowohl was ihre Verfügbarkeit betrifft als auch ihren Metabolismus und den Carry-over in die Milch.

V.2

Saug- und Absetzferkel sind aufgrund des zunächst unreifen Immunsystems besonders anfällig für Erkrankungen, die zu hohen Verlusten führen können. Eine Möglichkeit zur Verhinderung von Erkrankungen ist die Optimierung der Immunfunktion, wobei Selen auch hier eine vielversprechende Möglichkeit darstellt. Positive Effekte einer Se-Supplementation auf das zelluläre und humorale Immunsystem bei Tieren stellen sich als sehr komplex dar. Jedoch ist eine Bedeutung von Selen in diesen Prozessen nicht von der Hand zu weisen, da in Studien nachgewiesen werden konnte, dass ein Se-Defizit die Infektanfälligkeit bei Tieren erhöht, da es zu einer verminderten Immunantwort des Körpers nach Erregerexposition kommt (Dhur et al., 1990; Lessard et al., 1991).

Untersuchungen zur Auswirkung organischer und anorganischer Se-Quellen auf das Immunsystem, den Metabolismus und die Gewebeakkumulation zeigen, dass organisch gebundene Se-Quellen besser verwertet werden und in Form von Selenoproteinen eingebaut werden, wohingegen anorganische Se-Quellen eine höhere biologische Verfügbarkeit für die Biosynthese von Peroxidasen aufweisen sollen (Mahan und Parrett, 1996).

Die Thematik wurde bisher beim Ferkel unter der Beachtung anderer Einflussfaktoren bearbeitet. Daten zu der Bedeutung der Milch als selenangereichertes Futter- bzw. Nahrungsmittel liegen nur in sehr begrenztem Umfang vor.

5.2 Diskussion der Versuchsbedingungen und des Studiendesigns

V.1

Die Fütterungsversuche wurden auf dem Versuchsgut des BfR durchgeführt. Die Kühe wurden bis auf eine Woche vor und nach der Geburt in identischen Laufställen gehalten und erhielten, wenn es das Wetter zuließ, die Möglichkeit zum täglichen Gang auf einen Sandauslauf. In dem Zeitraum des Abkalbens waren die Tiere in einer mit Stroh eingestreuten Einzelbox, die sich im gleichen Stallraum wie die Laufboxen befand, sodass die sonstigen Bedingungen für alle Kühe gleich waren. Die Kälber wurden innerhalb der ersten 12 Stunden in eine Kälberbox mit Stroh verbracht und mit einem Saug-eimer dreimal täglich gefüttert. Die Kälberboxen befanden sich im gleichen Stallgebäude wie die Laufboxen, waren aber durch eine Tür abgetrennt.

Die Herstellung der Se-Mischung fand am Institut für Tierernährung statt, wobei die in dem Versuch angegebenen Se-Mengen in Maisschrot eingemischt und den Tieren nach dem Melken zum Fressen vorgelegt wurden. Um zu gewährleisten, dass jede Kuh nur die ihr zustehende Ration frisst, wurden sie hierfür kurzfristig in das Fressgitter eingesperrt.

Zu Beginn und zum Ende des Versuches traten bei einigen Kühen Akzeptanzprobleme auf. Um die Aufnahme zu gewährleisten, wurde deswegen ein Teil der täglichen TMR mit dem Se-haltigen Maisschrot gemischt, wodurch die Tiere wieder zum Fressen animiert wurden. Bei den Kälbern wurde die Muttermilch mittels Saug-eimer ohne Probleme aufgenommen.

Es wurden in der Kontroll- und AS-Gruppe jeweils fünf Kühe und fünf bzw. vier Kälber und in der Gruppe OS sechs Kühe und fünf Kälber untersucht. Die Kälberdifferenz beruht auf zwei Totgeburten, wobei ein Kalb eine nicht geschlossene Bauchdecke aufwies, während bei dem anderen Kalb keine Ursache offensichtlich war. Aussagen über Leistungsdaten sind mit dieser Tierzahl nur eingeschränkt möglich und lagen auch nicht im Fokus dieser Untersuchung.

V.2

Die Sauen befanden sich bis eine Woche vor dem Abferkeltermin in Einzelboxen in zwei verschiedenen Räumen. Aufgrund der räumlichen Gegebenheiten im Versuchsgut konnten die Sauen danach nicht in völlig identischen Abferkelboxen stehen. Zwei Sauen standen in Abferkelboxen mit einer Fixierungsmöglichkeit, in denen der Boden zum Teil planbefestigt, zum Teil mit Spaltenboden versehen war. Die anderen sieben Sauen hatten planbefestigte Abferkelboxen mit Stroh zur Verfügung. In allen Abferkelboxen gab es einen Bereich für die Ferkel mit Wärmelichtlampe.

Ebenfalls aufgrund der räumlichen Gegebenheiten konnten die drei x fünf Ferkelgruppen nicht in völlig identischen Boxen gehalten werden. Die Ferkel wurden in Boxen mit Gummimatten oder befestigtem Boden und Stroh gehalten.

Sowohl die Boxen der Sauen als auch die der Ferkel befanden sich im gleichen Stallgebäude, sodass wiederum die sonstigen Bedingungen (Raumtemperatur, Luftfeuchtigkeit) gleich waren.

Die Milch aus V.1 war bis zum Verfüttern bei -20°C auf dem Versuchsgut eingefroren und wurde erst am Abend vorher bei Raumtemperatur aufgetaut und kurz vor dem Verfüttern auf 38°C angewärmt. Die Herstellung des Spurenelement-Ergänzungsfutters fand am Institut für Tierernährung statt. Nach dem Erreichen der vorgesehenen Temperatur wurde dieses in die Milch eingemischt.

Sowohl bei den Sauen als auch bei den Ferkeln gab es keine Akzeptanzprobleme. Das Futter wurde jeweils restlos aufgenommen.

Es wurden pro Gruppe 10 Tiere untersucht. Aussagen über Leistungsdaten sind mit dieser Tierzahl nur eingeschränkt möglich und lagen wiederum nicht im Fokus dieser Untersuchung.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Effekte von Selen auf die Leistungsparameter der Tiere

V1

Die nicht signifikant voneinander abweichenden Lebendmassen der Kühe sowie die vergleichbaren Milchmengen und deren Zusammensetzung der drei Gruppen zeigen, dass alle Tiere, auch die der Kontrollgruppe, ausreichend mit Selen versorgt wurden und ein Se-Mangel nicht auftrat. Das etwas geringere Gewicht von 352 kg in der Kontrollgruppe stammt von der Kuh mit der Kennnummer 352. Beim Wiegen wurde gleichzeitig eine Adspektion durchgeführt, wobei die Kuh Nr. 352 nicht als zu mager oder als Eingefallen aufgefallen war. Das geringere Gewicht ist deswegen eher durch eine Verwechslung der Anzeigen an der Waage zu interpretieren.

Ebenso waren die Kälber über die Milch ihrer Mütter mit genügend Selen versorgt, so dass die erhobenen Leistungsparameter im Versuchszeitraum vergleichbar waren.

V.2

Die Sau Nr. 7 hatte am 7. Laktationstag mit 102 µg Selen/ l Milch einen doppelt so hohen Se-Gehalt als die anderen Sauen, während sie am 14. Tag mit den anderen Sauen in einem Bereich lag. Mahan (2000) findet in seinem Versuch, nach einer Supplementierung von 0,15 ppm Natriumselenit im Futter, Se-Gehalte von 32-61 µg Selen/ l Milch bzw. Kolostrum. Bei der gleichen Dosierung, aber bei Verwendung von organisch gebundenem Selen, findet er Gehalte von 77 bzw. 133 µg Se/ l Milch bzw. Kolostrum. Hiermit läge die Sau Nr. 7 noch im normalen physiologischen Bereich, was den Se-Gehalt der Milch angeht. Allerdings erhielten die Sauen im hier durchgeführten Versuch anorganisch gebundenes Selen. Eine weitere Möglichkeit für den höheren Se-Gehalt könnte eine geringere Milchbildung sein, die zu einer Aufkonzentration führte. Da die Milchmenge nicht mit erfasst wurde, kann dies aber nicht bestätigt werden.

Insgesamt war der Se-Gehalt von der Sauenmilch aller Sauen ausreichend, um die Ferkel mit Selen zu versorgen. Somit sind die Ferkel ohne einen Se-Mangel und mit den gleichen Voraussetzungen in den Versuch gegangen. Dies wurde auch durch die vergleichbaren Se-Werte der Ferkel am Versuchsbeginn bestätigt. Die erhobenen Leistungsdaten der Ferkel über den gesamten Versuchszeitraum zeigten keine Unterschiede auf. Alle Ferkel hatten festen Kot und es gab keine Anzeichen einer Erkrankung.

5.3.2 Effekte von Selen auf immunologische Parameter im peripheren Blut von Kühen und ihren Kälbern

Die Frage, ob Selen eine Auswirkung auf das Immunsystem hat, wurde anhand von ausgewählten immunologischen Parametern im peripheren Blut untersucht. Die Analyse des Differenzialblutbildes erfolgte bei den Kühen nach einer und nach 12 Wochen nach der Kalbung und bei den Kälbern eine Woche nach der Geburt. Ebenfalls zu diesen Zeitpunkten wurde untersucht, inwieweit Selen einen Einfluss auf das Verhältnis der verschiedenen Subpopulationen von T-Zellen und B-Zellen hatte. Dieses wurde mithilfe eines etablierten Verfahrens zur Phänotypisierung durchflusszytometrisch erfasst. Die funktionellen Auswirkungen wurden mittels Lymphozytenproliferationstests und durch die Messung der phagozytotischen Aktivität der Granulozyten und Monozyten im peripheren Blut untersucht.

Die durchgeführte Blutuntersuchung zeigte im Differenzialblutbild sowohl bei den Kühen als auch bei den Kälbern keinen Unterschied zwischen den Gruppen auf. In der AS-Gruppe konnte eine Woche nach der Kalbung eine Lymphozytose festgestellt werden, die durch eine Kuh mit einer Labmagenverlagerung verursacht wurde. Bei der zweiten Probeentnahme waren alle Werte im Referenzbereich. Bei den Kälbern konnte, unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, ein geringeres Volumen (MCV) und ein geringerer Hämoglobingehalt (MCH) der Erythrozyten im Vergleich zu den Referenzwerten für Kälber beobachtet werden (Dirksen et al., 2002). Gleichzeitig hatten bis auf zwei Tiere alle Kälber eine Anisozytose, die auch die niedrigen MCV- und MCH-Werte erklären kann. Bei keinem der Kälber konnten dabei Symptome einer Erkrankung oder Anzeichen für Blutungen beobachtet werden. Somit kann die Anisozytose der Kälber vermutlich als eine bei Rindern natürlich vorkommende Anisozytose eingeordnet werden, die nicht mit einer Krankheit in Verbindung gebracht werden kann (Jain, 1993).

5.3.2.1 Effekte von Selen auf die Phänotypisierung der Immunzellen im peripheren Blut der Kühe und Kälber

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen ermöglichen eine Identifizierung der Zellen anhand ihrer morphologischen und antigenen Eigenschaften. Dadurch konnten die Immunzellen phänotypisch charakterisiert und ihr Verhältnis im peripheren Blut erfasst werden. Es sollte untersucht werden, inwieweit Selen einen Einfluss auf die Zellen des peripheren Blutes hat und ob sich dies durch den relativen Anteil der Immunzellen widerspiegelt. Insgesamt konnte bei der Untersuchung eine sehr hohe tierindividuelle Schwankung festgestellt werden.

Van Kampen und Mallard (1997) konnten bei einem Kuhversuch ohne Se-Zulage nach der Geburt eine Steigerung des Anteils von CD4- und CD8-positiven Zellen im Blut von Kühen sehen. MHCII-positive Zellen hatten nach der Geburt zunächst einen geringeren Anteil im Blut als vor der Geburt, bis sie 16 Wochen p.p. auf den Ausgangswert zurückkehrten. Die gleichen Beobachtungen konnten für den Anteil der CD4-positiven T-Helferzellen im peripheren Blut für die Gruppen AS und OS in dieser Arbeit gemacht werden. Dieser lag am ersten Probezeitpunkt bei 30% und nach 12 Wochen p. p. bei 43-49%. Die Kontrollgruppe wies einen Wert von 50% eine Woche p.p. auf, welcher aber gegenüber den Vergleichsgruppen nicht abzusichern war. Dadurch konnte hier keine Steigerung des Anteils von CD4-T-Helferzellen beobachtet werden. In allen drei Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Probeentnahmepunkten beobachtet werden. Bei dem durchschnittlichen relativen Anteil der CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen fand bei allen Versuchsgruppen keine Steigerung während des Versuchszeitraumes statt, sodass hier frühere Beobachtungen von van Kampen und Mallard (1997) nicht bestätigt wurden. Bei den aktivierten T-, B- und antigenpräsentierenden Zellen, gekennzeichnet als MHCII-positive Zellen, kam es im Versuchszeitraum zu einer Abnahme von 37-41% auf 30-36% in der Kontroll- AS- und OS-Gruppe, was wiederum mit den Ergebnissen der oben genannten Studie übereinstimmt. Das hier verwendete Selen, unabhängig von der eingesetzten Verbindung, hatte somit anscheinend keinen Einfluss auf die Verteilung der Subpopulationen im peripheren Blut von den Kühen. Dies wird auch durch die hohen tierindividuellen Schwankungen bestätigt, die auf einen größeren Einfluss von Tier- und Umweltfaktoren schließen lassen.

Studien zu den Auswirkungen von natürlich angereicherter Se-Milch durch unterschiedliche Se-Quellen auf die Verteilung der lymphozytären Subpopulationen bei Kälbern liegen zurzeit noch nicht vor. Bei den Kälbern konnte zwischen den drei Versuchsgruppen kein Unterschied bei dem Anteil der T-Helferzellen und der zytotoxischen T-Zellen ermittelt werden. Ebenso wiesen die Ergebnisse zum Anteil an MHCII- und/oder CD25-

positiven Zellen keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll-, AS- und OS-Gruppe auf. Der relative Anteil der doppelt positiven aktivierten T- und B-Zellen war bei den Kälbern im Alter von einer Woche mit 1-2 % so niedrig, dass sie hinsichtlich der Immunfunktion zu diesem Zeitpunkt keine große Auswirkungen haben dürften. Insgesamt hatte in den vorliegenden Untersuchungen die mit unterschiedlichen Se-Quellen natürlich angereicherte Kuhmilch in den untersuchten Kälbern keinen Einfluss auf die Subpopulationen der Lymphozyten.

5.3.2.2 Effekte von Selen auf die Proliferation der Lymphozyten des peripheren Blutes der Kühe und Kälber und anschließende Phänotypisierung bei den Kühen

Der Lymphozytenstimulationstest ist eine etablierte *ex vivo* Methode und dient zur Einschätzung der zellulären Proliferationskapazität. Die antigenspezifischen Lymphozyten müssen proliferieren, bevor sie zu funktionalen Effektorzellen ausdifferenzieren. Dadurch steht für die verschiedenen funktionellen Aufgaben eine ausreichende Zellzahl zur Verfügung (Janeway et al., 2005). Spezifische Antigene stimulieren jeweils nur einen kleinen Anteil an Lymphozyten, daher werden für Labortests polyklonale Mitogene für die Proliferationsinduktion eingesetzt. Diese können bei Lymphozyten unterschiedlicher Spezifität und klonaler Herkunft eine Mitose auslösen, die dem gleichen Prinzip der durch andere Proteinantigene induzierten Proliferation entspricht und einen Rückschluss auf die Lymphozytenreaktivität möglich macht. In den meisten Studien wird der Einbau von ³H-Thymidin in die zelluläre DNA als Maß für die Zellvermehrung herangezogen (Janeway et al., 2005). In dieser Arbeit wurde stattdessen BrdU, das in die DNA der proliferierten Zellen eingebaut wird, als Marker genutzt. Eine Detektion erfolgte durch Markierung mit einem anti-BrdU-mAk und einer Quantifizierung mittels FACS. Es wurden die Mitogene Phytohämagglutinin (PHA-M), Concanavalin A (CON A) und Pokeweed mitogen (PWM) eingesetzt. PHA und CON A stellen typische T-Zell-Mitogene dar. Dagegen wurde PWM als B- und T-Zell-Mitogen eingesetzt. Dargestellt wurde die funktionelle Proliferationsleistung im prozentualen Anteil der BrdU-positiven Lymphozyten an der Gesamtlmphozytenpopulation.

Auffällig war, dass die Reaktion der Zellen auf das Mitogen PWM numerisch geringer war als bei den anderen beiden Mitogenen. Außerdem war die Proliferation beim ersten Untersuchungspunkt in der Kontrollgruppe bei allen Mitogenen numerisch höher als in der Gruppe OS, doch konnte aufgrund der tierindividuellen Gegebenheiten kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Parallel wurde zur Lymphozytenproliferation 12 Wochen p. p. eine Variante des Proliferationstests angesetzt, um die Verteilung der Lymphozytenpopulation zu untersuchen. Da BrdU sich teilweise negativ auf die Bindung der primären Antikörper an die Zellen auswirkt, wurde es bei diesem Ansatz nicht hinzugegeben, sodass die Anzahl der Zellen, die proliferiert und dabei BrdU eingebaut haben, nicht mit angegeben werden kann. Es wurden die Mitogene PHA-M und CON A zur Stimulierung der T-Zell-Population verwendet und zum Vergleich ein Ansatz ohne Mitogen angesetzt. Zur Markierung der Lymphozyten wurden die gleichen mAk wie bei der Phänotypisierung im peripheren Blut genutzt.

Die Verteilung der proliferierenden Subpopulationen der Lymphozyten ohne Mitogen unterschied sich nicht von der generellen Proliferation der Lymphozyten nach Stimulierung mit dem Mitogen PHA-M im peripheren Blut. Wenn das Mitogen CON A verwendet wurde, konnte eine Verschiebung der lymphozytären Subpopulationen im peripheren Blut im Vergleich zu den Ansätzen ohne Mitogen und mit PHA-M gesehen werden. Der relative Anteil der CD8-positiven zytotoxischen Zellen, der CD4- und CD25-positiven aktivierten T-Helferzellen, der CD25-positiven aktivierten T- und B-Zellen, der CD25- und MHCII-positiven aktivierten T-, B- und antigenpräsentierenden Zellen nahm zu. Ein fütterungsbedingter Unterschied konnte nicht ermittelt werden.

Die Zufütterung von Selen zeigte unabhängig von der Quelle keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsleistung der Lymphozyten im peripheren Blut der Kühe und ihrer Kälber, was die Ergebnisse von Sordillo et al. (1993) bestätigt. Diese konnten ebenfalls keinen Einfluss von Selen auf die Proliferationsaktivität der PBMC ermitteln. Die stärkere Proliferation von Lymphozyten bei Verwendung des Mitogens CON A nach Supplementation mit Selen konnte bei der Untersuchung der funktionellen Proliferationsleistung in der hier vorliegenden Arbeit nicht nachvollzogen werden (Cao et al. 1992). Betrachtet man hingegen die Verteilung der lymphozytären Subpopulationen, konnte bei Verwendung des Mitogens CON A eine deutliche Zunahme der einzelnen Populationen mit Ausnahme der MHCII-positiven und der CD4-positiven Zellen beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung, warum dieses nicht in der Untersuchung der funktionellen Proliferationsleistung reflektiert wurde, könnte zum einen sein, dass das BrdU von einigen Zellen trotz Proliferation nicht eingebaut wurde. Eine andere Möglichkeit wäre, dass andere Anteile der Subpopulation im Ansatz mit CON A verringert und in den Ansätzen mit PWM und PHA-M vermehrt wurden, die hier nicht ermittelt wurden, sodass bei der funktionellen Proliferationsleistung kein Unterschied ausgemacht werden konnte. Somit konnten die Ergebnisse von Cao et al. (1992) zwar nicht hinsichtlich der Proliferationsleistung, aber im Hinblick auf die Zunahme einzelner Subpopulationen bestätigt werden, allerdings unabhängig von der Se-Fütterung.

Eine verminderte Proliferationsleistung von T-Zellen auf die Mitogene PHA-M und CON A war bei Ratten mit Se-Mangelernährung festzustellen (Eskew et al., 1984). Entsprechendes konnte in dieser Studie nicht beobachtet werden. Die Kühe in der Kontrollgruppe erhielten allerdings keine Mangeldiät, sodass eine verminderte Proliferationsleistung nicht zu erwarten war. Obwohl die zusätzliche Supplementierung von Selen zu höheren TEAC-Werten im Blut führte (Salman, 2010), konnte keine verbesserte Lymphozytenantwort auf Mitogene beobachtet werden. Inwieweit es bei einer Infektion zu einer unterschiedlichen Reaktion kommen würde, müsste als nächster Schritt in einem Infektionsversuch erforscht werden.

Insgesamt konnte sowohl bei den Kühen als auch bei den Kälbern eine sehr hohe tierindividuelle Schwankung festgestellt werden, was vermuten lässt, dass die Einflüsse der Umwelt- und Tierfaktoren bei den gesunden Tieren größer waren, als die der unterschiedlichen Fütterung.

5.3.2.3 Effekte von Selen auf die Phagozytoseaktivität der Granulozyten und Monozyten im peripheren Blut der Kühe und Kälber

Die ex vivo Untersuchung der Phagozytoseaktivität der Granulozyten und Monozyten wurde mit dem Testkit Phagotest[®] untersucht, welches überwiegend in der Humanmedizin zur klinischen Diagnostik eingesetzt wird. Hierbei wird sowohl die Phagozytoseaktivität (Anzahl der phagozytierten *E. coli* Bakterien pro Zelle) als auch die Anzahl der phagozytierenden Granulozyten und Monozyten untersucht. Wiederum zeigten sich, wie auch bei den anderen immunologischen Parametern, starke tierindividuelle Schwankungen. Zwischen den unterschiedlichen Fütterungsgruppen konnte kein Unterschied an den beiden Untersuchungspunkten ausgemacht werden. Allerdings konnte in der AS-Gruppe eine signifikant niedrigere ($p \leq 0,05$) Anzahl an phagozytierenden Monozyten 12 Wochen p. p. im Vergleich zum ersten Messzeitpunkt ermittelt werden. Referenzwerte für die Phagozytoseaktivität bei Kühen und Kälbern für den Zeitraum nach der Geburt und während der Laktation sind nicht etabliert. Die Beurteilung, ob die Ergebnisse physiologisch für diesen Zeitraum sind, kann deswegen nicht ausreichend abgesichert werden. Die erhöhte Anzahl der phagozytierenden Monozyten im peripheren Blut in der AS-Gruppe ist wahrscheinlich durch eine Erkrankung einer Kuh verursacht. Diese hatte kurz nach der Geburt eine Labmagenverlagerung, wodurch eine Lymphozytose in der AS-Gruppe zu sehen war. Dafür spricht auch, dass die Werte 12 Wochen p. p. niedriger waren, als diese Kuh wieder gesund war.

Die Beobachtung von Weiss und Hogan (2005), dass Selen, unabhängig von der Quelle, keinen Einfluss auf die Aktivität der neutrophilen Granulozyten im Blut hat, konnte in diesem Versuch ebenfalls beobachtet werden. Obwohl bei den TEAC-Werten im Blut ein Unterschied zwischen den Gruppen zu sehen war (Salman, 2010), führte der daraus zu erwartende Schutz der Granulozyten und Monozyten vor Radikalen im Blut der Se-Gruppen zu keinem Unterschied in deren Phagozytoseleistung oder -aktivität, wie es Arthur et al. (2003) feststellen konnte. Eine Möglichkeit dafür ist, dass Radikale erst bei einer Infektion vermehrt auftreten. Zudem erhielt die Kontrollgruppe eine relativ hohe Se-Versorgung. Diese könnte bei den gesunden Kontrolltieren ausgereicht haben um die Phagozytoseleistung nicht zu vermindern. Und somit hat es dazu geführt, dass kein Unterschied zu den Kühen der beiden Versuchsgruppen, die eine wesentlich höhere Se-Versorgung erhielten, aufgetreten ist. Die gleiche Untersuchung bei einem Infektionsversuch und einer nicht so hohen Se-Versorgung der Kontrolltiere könnte somit andere Ergebnisse bringen und wäre als nächster Schritt anzudenken. Insgesamt lassen die hohen tierindividuellen Schwankungen bei den Kühen und den Kälbern vermuten, dass die Einflüsse der Umwelt- und Tierfaktoren bei den gesunden Tieren größer waren als die der unterschiedlichen Fütterung.

5.3.3 Effekte von Selen auf immunologische Parameter in der Kuhmilch

Ebenso wie im Blut wurde die Frage, ob Selen eine Auswirkung auf das Immunsystem der Milchdrüse hat, anhand von ausgewählten immunologischen Parametern in der Milch untersucht. Die Analyse des Differenzialmilchbildes erfolgte neun und 12 Wochen p. p.. Ebenfalls wurde zu diesen Zeitpunkten untersucht, inwieweit Selen einen Einfluss auf das Verhältnis der Subpopulationen von Immunzellen hat. Dies wurde mithilfe der durchflusszytometrischen Phänotypisierung erfasst. Die funktionellen Auswirkungen wurden durch die Messung der phagozytotischen Aktivität von Zellen in der Milch untersucht.

Die durchgeführte Milchuntersuchung zeigte bei der Ermittlung der somatischen Zellzahl in der AS-Gruppe eine numerisch niedrigere Zellzahl als in den beiden anderen Gruppen. Dieser Unterschied kam durch jeweils ein Tier in der entsprechenden Gruppe zustande. In der Kontrollgruppe war eine Milchkuh, die eine Mastitis in der vorherigen Laktation hatte. Sie wurde trotzdem für die Studie verwendet, da sie zum entsprechenden Datum klinisch unauffällig war und zu einem geeigneten Zeitpunkt abkalbte. Während des Versuchs zeigte es sich, dass diese Kuh eine chronische Mastitis manifestierte. In der OS-Gruppe befand sich eine zugekaufte Kuh, von deren Vorgeschichte nichts bekannt war. Dieses Tier entwickelte eine immer wiederkehrende Mastitis, die durch eine jeweilige Behandlung gut therapiert werden konnte, sodass die Kuh somit über längere Zeiträume symptomlos war. Als Ursache konnte ein nicht richtig schließender *M. sphincter papillae* identifiziert werden. Durch diese beiden Kühe entstanden die durchschnittlich hohen somatischen Zellzahlen in den jeweiligen Gruppen.

Im Differenzialmilchbild der Kühe konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen, außer bei den mononukleären Zellen, festgestellt werden. Die Kontrolltiere ($p=0,01$) und die OS-Gruppe ($p\leq 0,01$) hatten signifikant weniger mononukleäre Zellen in der Milch als die AS-Gruppe.

In einer von der gesunden Milchdrüse produzierten Milch finden sich als vorherrschende Zellart des Immunsystems mononukleäre Zellen. Kommt es zu einer Infektion, ändert sich das Differenzialbild und die neutrophilen Granulozyten werden die vorherrschenden Zellen in der Milch und der prozentuale Anteil der mononukleären Zellen nimmt ab (Pillai et al., 2001). Die beiden Kühe aus der Kontroll- und OS-Gruppe, die für die numerische Erhöhung der somatischen Zellzahl verantwortlich waren, könnten auch für die signifikant niedrigere Anzahl an mononukleären Zellen verantwortlich sein. Hierfür spricht auch die kompensatorische numerische Erhöhung der neutrophilen Granulozyten in den beiden Gruppen im Vergleich zur AS-Gruppe.

5.3.3.1 Effekte von Selen auf die Phänotypisierung der Immunzellen in der Milch

Ebenso wie im Blut wurde die Durchflusszytometrie zur phänotypischen Charakterisierung der Immunzellen für die Ermittlung ihres relativen Anteils in der Milch eingesetzt. Der relative Anteil der T-Helferzellen lag bei 4-8%, während die doppelt positiven aktivierten T-Helferzellen einen Anteil von 1-2% ausmachten. Die CD25 positiven aktivierten T- und B-Zellen hatten einen relativen Anteil von 7-16% bzw. 7-11% in der neunten bzw. 12. Laktationswoche. Die Untersuchung des relativen Anteils der Makrophagen und Monozyten, der aktivierten Makrophagen und Monozyten und teilweise der B-Zellen wurde mittels der mAk CD14 und MHCII durchgeführt. Der relative Anteil der CD14 positiven Makrophagen und Monozyten lag 9 Wochen p. p. bei 30-43% und 12 Wochen p. p. bei der Kontroll- und der AS-Gruppe bei 31-43%, während er bei der OS-Gruppe bei 19% lag. Doppelt positive aktivierte Monozyten und Makrophagen hatten bei der ersten Untersuchung in der Kontroll- und in der AS-Gruppe einen relativen Anteil von 19-22% und in der OS-Gruppe von 11%. Zum zweiten Untersuchungspunkt lag der relative Anteil in allen Gruppen bei 19-25%. Die MHCII-positiven Zellen markieren den relativen Anteil der Makrophagen, Monozyten und teilweise B-Zellen und hatten einen relativen Anteil von 4-7% während des Fütterungszeitraumes. Mithilfe der mAk CD14 und CD5 sollte der relative Anteil der Makrophagen und Monozyten und der T- und teilweise B-Zellen untersucht werden. Der relative Anteil der Makrophagen und Monozyten lag bei der ersten Untersuchung bei der Kontroll- und der AS-Gruppe bei 55-65%, während die Gruppe OS 38% aufwies. Zum zweiten Untersuchungspunkt lag der relative Anteil bei 32-43%. Der Anteil der T- und teilweise B-Zellen lag bei den Gruppen zwischen 6 und 12%.

Aufgrund der hohen tierindividuellen Schwankungen konnte trotz der großen numerischen Unterschiede des relativen Anteils kein Unterschied zwischen den Gruppen und den Zeitpunkten ausgemacht werden.

Untersuchungen zur Auswirkung von Selen auf die Verteilung der lymphozytären Subpopulationen in der Milch gibt es bisher noch nicht. Die Aussage, dass Makrophagen und Monozyten den größten Anteil der Zellen in der Milch einer gesunden Milchdrüse ausmachen (Lee et al., 1980), konnte in dieser Studie ebenfalls beobachtet werden. Durch das Differenzialzellbild konnte dieses Ergebnis bestätigt werden, das einen größeren Anteil an Lymphozyten aufzeigt als die Phänotypisierung. Eine Erklärungsmöglichkeit dafür ist, dass der mAk CD5 an allen T-Zellen aber nur teilweise an B-Zellen bindet, wodurch eine Verschiebung der Ergebnisse im Differenzialmilchbild erklärt werden kann. Insgesamt hatte die Se-Fütterung, unabhängig von der Quelle, keinen Einfluss auf die Subpopulationen in der Milch. Zudem lassen die hohen tierindividuellen Schwankungen vermuten, dass Umwelt- und Tierfaktoren eine größere Rolle spielten.

5.3.3.2 Effekte von Selen auf die Phagozytoseaktivität der Immunzellen in der Milch

Die ex vivo Untersuchung der Phagozytoseaktivität der phagozytierenden Zellen in der Milch wurden wie im Blut mit dem Testkit Phagotest[®] untersucht. Hierbei wird sowohl die Phagozytoseaktivität (Anzahl der phagozytierten *E. coli* Bakterien pro Zelle) als auch die Anzahl der phagozytierenden Zellen in der Milch untersucht. Eine Unterscheidung der phagozytierenden Zellen in Granulozyten und Monozyten konnte hierbei nicht erfolgen, da die geringe Zellzahl der Milchproben nicht erlaubte, die Zellen sicher zu unterscheiden. Ebenso wie bei der Phänotypisierung zeigten sich starke tierindividuelle Schwankungen, insgesamt konnte aber eine sehr niedrige Rate an phagozytierenden Zellen bei beiden Untersuchungen beobachtet werden. Zwischen den unterschiedlichen Fütterungsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied an beiden Untersuchungspunkten ausgemacht werden, auch wenn die Anzahl der phagozytierenden Zel-

len in der AS-Gruppe numerisch niedriger war als in den beiden anderen Gruppen. Dieses ist durch die bereits oben erwähnten Kühe mit der chronischen bzw. mit der akuten Mastitis zustande gekommen. Dass kein Unterschied zwischen den Gruppen zustande gekommen ist, zeigt, dass die Kühe, mit Ausnahme der beiden oben erwähnten, aus der Kontroll- und OS-Gruppe ebenfalls eine sehr niedrige Anzahl an phagozytierenden Zellen hatten. In der AS-Gruppe konnte zudem eine signifikant niedrigere ($p \leq 0,01$) Anzahl an phagozytierenden Zellen eine Woche p. p. im Vergleich zu 12 Wochen p. p. ermittelt werden.

Bei gesunden Kühen ist eine geringe Zahl an Immunzellen und phagozytierenden Zellen physiologisch, so dass die Ergebnisse bestätigen, dass die Kühe, ausgenommen die beiden bereits erwähnten Tiere, über den Versuchszeitraum unter keinen schwerwiegenden Erkrankungen gelitten haben. Die Zunahme der phagozytierenden Zellen in der AS-Gruppe könnte als Reaktion auf die fortschreitende Laktation und einer vermehrten Auseinandersetzung der Milchdrüse mit Keimen sein. Die Anzahl der Zellen lag immer noch in einem niedrigen Bereich und unterschied sich nicht von den anderen Gruppen, sodass man davon ausgehen konnte, dass die Gesundheit der Milchdrüse, abgesehen von den bereits oben erwähnten Tieren, die die höhere Behandlungsinzidenz in den jeweiligen Gruppen verursacht haben, nicht beeinflusst war (DVG, 2000; Leitner et al., 2000; Pilla et al., 2001).

5.3.4 Effekte von natürlich Selen angereicherter Kuhmilch auf die Selenkonzentration im Plasma von Absetzferkeln

Durch die Verfütterung von der Milch aus V1.OS konnte bei den Ferkeln aus der V.2.OS-Gruppe ein signifikant höherer Se-Gehalt im Serum festgestellt werden als bei den anderen beiden Gruppen. Die Milch aus der Gruppe V.1.OS enthielt im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen aus V.1 einen signifikant höheren Se-Gehalt in der Milch. Zwischen der V.2.Kontroll- und der V.2.AS-Gruppe kam es durch die Verfütterung der jeweiligen Milch zu keinen Unterschieden in der Se-Konzentration im Serum. Dies ist dadurch zu erklären, dass die V.1.AS-Gruppe nur einen numerisch höheren Se-Gehalt als die V.1.Kontrollgruppe in der Milch hatte und keinen Signifikanten. Somit konnten die Ergebnisse von Ulgietta et al. (2008) bestätigt werden, die bei Verfütterung von mit Selen angereicherter Milch durch organisch gebundenes Selen einen höheren Se-Gehalt im Plasma gefunden hatte im Vergleich zu Milch, die mit anorganisch gebundenem Selen versetzt wurde. Die Vermutung, dass Selen aus angereicherter Milch eine höhere Verfügbarkeit hat als eine Milch, die mit Selen versetzt wurde, kann durch die Ergebnisse mit Se-Hefe als Futterzusatz bestärkt werden. Bei der Milch, die von Kühen stammte, die mit Natriumselenit gefüttert worden waren, konnte keine verbesserte Verfügbarkeit festgestellt werden. Inwieweit die höhere Se-Konzentration im Plasma der Ferkel der OS-Gruppe durch eine bessere Bioverfügbarkeit zustande kommt oder durch den höheren Se-Gehalt in der Milch im Vergleich zur AS-Gruppe bewirkt wurde, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

5.3.5 Effekte von Selen auf immunologische Parameter im peripheren Blut von Ferkeln

Die Frage, ob Selen eine Auswirkung auf das Immunsystem der Ferkel hat, wurde anhand von ausgewählten immunologischen Parametern im peripheren Blut untersucht. Die Analyse des Differenzialblutbildes erfolgte am Ende des Versuches. Die Untersuchungen, inwieweit Selen einen Einfluss auf das Verhältnis der Subpopulationen von Immunzellen hat, wurden mit Proben von den Tagen des Absetzens und am Versuchsende durchgeführt. Dieses wurde mithilfe der Phänotypisierung durchflusszytometrisch erfasst. Die funktionellen Auswirkungen wurden durch die Messung der pha-

gozytotischen Aktivität der Granulozyten und der Monozyten im peripheren Blut untersucht.

Im Differenzialblutbild konnte kein fütterungsbedingter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Insgesamt befanden sich die unterschiedlichen Zellarten im physiologischen Bereich für Schweine (Kixmüller, 2004), was durch die klinische Unauffälligkeit der Schweine bestätigt wird. Insgesamt waren keine Veränderungen im Differenzialblutbild wie bei Fontaine et al. (1977) zu erwarten, da es sich weder um eine Se-Mangeldiät handelte noch Selen in toxischen Dosen verabreicht wurde.

5.3.5.1 Effekte von Selen auf die Phänotypisierung der Immunzellen im peripheren Blut und in der Milz der Ferkel

Ebenso wie bei den Milchkühen ermöglicht die durchflusszytometrischen Untersuchung eine Identifizierung der Zellen anhand ihrer morphologischen und antigenen Eigenschaften. Dadurch können Immunzellen phänotypisch charakterisiert und ihr Verhältnis im peripheren Blut und in der Milz der Ferkel erfasst werden. Es sollte untersucht werden, inwieweit Selen aus der Kuhmilch als immunmodulierende Substanz wirkt und sich dies in dem relativen Anteil der Immunzellen darstellt.

Im peripheren Blut wurden die mAk SWC3 und CD21 genommen, um den relativen Anteil der myeloiden Zellen und B-Zellen zu Beginn des Fütterungszeitraumes zu untersuchen. Der mAk CD14 wurde bei Versuchsbeginn dazu genutzt, um den relativen Anteil der Makrophagen und Monozyten zu identifizieren. Ein fütterungsbedingter Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht festgestellt werden.

Zur Markierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen, der zytotoxischen T-Zellen (CD8 α^+ - $\gamma\delta$ -T-Zellen), der NK-Zellen und der $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden die mAk TCR1 und CD8 α genutzt. Aufgrund eines nicht lieferbaren mAk TCR1 erfolgte am Ende des Fütterungszeitraumes eine Charakterisierung der Immunzellen mit TCR1 und 8 α in Kombination nur bei sieben Tieren aus der Kontroll- und der AS-Gruppe sowie bei sechs Tieren in der OS-Gruppe. Die Identifizierung der Immunzellen mit CD8 α als Einzelverfärbung erfolgte bei allen Tieren. Die Markierung des relativen Anteils der TCR- $\gamma\delta$ -T-Zellen wurde mithilfe der Kombination der beiden mAk durchgeführt. Der relative Anteil der CD8 α^+ - $\gamma\delta$ -T-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und den NK-Zellen, wurde durch die Einzelfärbung mit dem mAk CD8 α ermittelt. Im Versuchszeitraum konnte kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen beobachtet werden.

Die mAk CD4 und CD8 β wurden genutzt, um den relativen Anteil der T-Helferzellen und der zytotoxischen T-Zellen zu bestimmen. Die Daten ergaben keinen Unterschied. Die CD4-positiven T-Helferzellen hatten am Beginn des Fütterungszeitraumes einen relativen Anteil von 22-25% und am Ende einen relativen Anteil von 9-12%, wodurch sich ein zeitlich signifikanter Unterschied ergab. Die CD8 β -positiven zytotoxischen Zellen hatten zu Versuchsbeginn einen relativen Anteil von 7-10% und zu Versuchsende von 9-11%, womit kein Unterschied zwischen den Gruppen oder den verschiedenen Zeitpunkten ermittelt werden konnte. Der relative Anteil der doppelt positiven zytotoxischen T-Zellen lag bei der Kontrollgruppe beim Absetzen bei 2%, während er bei der AS- und OS-Gruppe bei 1% lag. Am letzten Versuchstag lag dieser Anteil bei der Kontrollgruppe bei 4% und bei den beiden Se-supplementierten Gruppen bei 3%. Dadurch konnte ein zeitlicher Unterschied bei der AS- und der OS-Gruppe ermittelt werden, der bei der Kontrollgruppe durch die tierindividuellen Schwankungen nicht zu beobachten war. Insgesamt war die Anzahl der doppelt zytotoxischen Zellen mit unter 5% so niedrig, dass dieser, auch wenn es einen zeitlichen Unterschied gab, hinsichtlich der Immunfunktion nicht ins Gewicht fallen dürfte.

Zur Markierung der T-Helferzellen, der aktivierten T-Helferzellen und der regulatorischen T-Zellen wurden die mAk CD4 und CD25 verwendet. Die CD4-positiven T-Helferzellen hatten am Beginn des Fütterungszeitraumes einen relativen Anteil von 19-

20% und am Ende einen relativen Anteil von 9%, wodurch sich der zeitlich signifikante Unterschied aus der Färbung CD4 und CD8 β bestätigte. Die doppelt positiven regulatorischen T-Zellen und die aktivierten T-Zellen hatten sowohl zu Versuchsbeginn als auch am Ende einen Anteil von 3-4%.

Die mAk CD2 und CD5 wurden genommen, um den relativen Anteil der NK-Zellen, der B-Zellen, der CD2 $\gamma\delta$ -T-Zellen, der $\alpha\beta$ -T-Zellen (gesamt) und der CD2 $\gamma\delta$ -T-Zellen zu untersuchen. Die Ergebnisse brachten weder zwischen den Gruppen noch zwischen den beiden Zeitpunkten ein Unterschied hervor. Bei Beginn der Fütterung war der relative Anteil der CD5-positiven B-Zellen und CD2 $\gamma\delta$ -T-Zellen ca. 2-3%. Am letzten Versuchstag lag der Anteil bei der Kontroll- und der OS-Gruppe bei 3%, während er bei der AS-Gruppe mit 5% signifikant höher lag als bei der Kontroll- (P=0,03) und der OS-Gruppe (P=0,02). Zusätzlich war der Anteil in der AS-Gruppe am Ende des Versuches im Gegensatz zum Versuchsbeginn signifikant höher (P=0,01). Die doppelt positiven $\alpha\beta$ -T-Zellen (gesamt) und CD2 $\gamma\delta$ -T-Zellen lagen bei allen Gruppen am Tag des Absetzens mit einem relativen Anteil von 44-46% tendenziell höher (P=0,05) als am letzten Versuchstag mit 34-37%. Zwischen den Gruppen konnte kein Unterschied ausgemacht werden.

Mit der Kombination der mAk CD5 und MHCII wurden die B-Zellen, antigenpräsentierende Zellen, die NK-Zellen und ggf. T-Zellen (ruhende CD8 $^+$ -Zellen) untersucht. Aufgrund eines Lieferproblems beim Hersteller konnte die Kombination dieser beiden mAk nur zum Zeitpunkt des Absetzens verwendet werden. Ein fütterungsbedingter Unterschied zwischen den Gruppen wurde nicht festgestellt.

Der mAk CD45RC markiert $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen, in aktivierten T-Helferzellen wird die Expression herunterreguliert. Der Anteil der CD45RC positiven Zellen lag bei der Kontroll- und der AS-Gruppe bei 88-89% und bei der OS-Gruppe bei 90% zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns. Am letzten Versuchstag war der Anteil bei der Kontroll- und der AS-Gruppe bei 88-91%, während er bei der OS-Gruppe 87% ausmachte. Bei der OS-Gruppe konnte hierbei ein zeitlicher Unterschied (P=0,04) ermittelt werden, während es zwischen den Gruppen keine Unterschiede gab.

Die Kombination der mAk CD14 und CD21 wurden am Versuchsende zur Untersuchung der Makrophagen, Monozyten und B-Zellen genutzt. Ein fütterungsbedingter Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht festgestellt werden.

Studien, die die Auswirkungen von Selen auf die Verteilung der hier untersuchten mononukleären Subpopulationen ebenfalls untersucht haben, gibt es nicht, sodass keine Vergleichsmöglichkeiten bestehen.

Die Ergebnisse, dass die Gabe von Kolostrum keinen Einfluss auf die CD4-, CD8- und CD21-Subpopulationen im Blut hatte (Boudry et al., 2007), konnten in diesem Versuch mit Kuhmilch bestätigt werden. Während Boudry et al. (2007) eine Zunahme der CD4-positiven T-Helferzellen in den iPP nachweisen konnten, ergab sich keine veränderte Anzahl dieser Zellen im Blut. Im Gegensatz dazu konnten Stepanova et al. (2007) in Abhängigkeit vom Alter bei Ferkeln eine Zunahme von CD8 $^+$ CD3 $^+$ CD4 $^-$ $\gamma\delta$ TCR $^-$ -Zellen ermitteln, die von einer Absenkung der CD4 $^+$ -Zellen begleitet wurde. Diese Abnahme der T-Helferzellen konnte auch in allen drei Versuchsgruppen beobachtet werden, wodurch es sich hierbei wahrscheinlich um ein physiologisches, altersabhängiges Phänomen handelt. Eine Zunahme von $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut (Boudry et al., 2007) konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden, sondern es kam zu einer numerischen Abnahme der Population der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Versuchszeitraum, der nur bei der OS-Gruppe signifikant ausfiel. Der Anteil der CD2 $\gamma\delta$ -T-Zellen war in der AS-Gruppe signifikant höher als in den anderen beiden Gruppen.

Insgesamt konnte bei der Phänotypisierung der mononukleären Blutzellen der Ferkel kein Einfluss durch die unterschiedlichen Se-Gehalte in der verfütterten Kuhmilch gesehen werden. Die zeitlichen Unterschiede sind wahrscheinlich eher durch die immunologischen Veränderungen in diesem Alter verursacht.

In der Milz wurden die mAk CD2 und CD16 für die Ermittlung der $\gamma\delta$ -T-Zellen, NK-Zellen, Granulozyten, Makrophagen und der dendritischen Zellen genutzt. Der prozen-

tuale Anteil an CD2-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen machte durchschnittlich 32-33% der Zellen aus, während die CD16-positiven NK-Zellen mit 20-22% vertreten waren. Der Anteil der doppelt positiv markierten NK-Zellen, Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen lag bei 11-12%. Bei dem Vergleich der einzelnen Gruppen konnte kein fütterungsbedingter Unterschied festgestellt werden.

Die Markierung der T-Helferzellen und der zytotoxischen T-Zellen wurde mit den mAk CD4 und CD8 β durchgeführt. Ein Unterschied zwischen den Gruppen konnte durch die gewonnenen Daten nicht ermittelt werden.

Mit den mAk CD14 und CD21 wurden Makrophagen, Monozyten und B-Zellen in der Milz untersucht. Ebenso wie bei den anderen Zellpopulationen in der Milz konnte kein fütterungsbedingter Unterschied zwischen den Gruppen ausgemacht werden.

Stepanova et al. (2007) hatten in einer Studie bei zunehmenden Alter der Ferkel eine Zunahme der $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Milz beobachten können, wobei der prozentuale Anteil bei vier Wochen alten Ferkeln durchschnittlich bei 16,2% lag, während der Anteil der T-Helferzellen 40% war. Der in dieser Studie gefundene Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen von bis zu 33% war somit doppelt so hoch als bei Stepanova et al. (2007). Dafür war die Anzahl an T-Helferzellen in dieser Arbeit mit 13-14% wesentlich geringer. Dadurch lässt sich vermuten, dass Selen einen Einfluss auf die Anteile an diesen Zellen hatte, der aber noch bestätigt werden muss. Der ein- bis zweiprozentige Anteil der CD4⁺CD8⁺-positiven zytotoxischen Zellen in der Milz (Stepanova et al., 2007) konnte in dieser Studie bestätigt werden.

5.3.5.2 Effekte von Selen auf die Phagozytoseaktivität der Granulozyten und Monozyten im peripheren Blut der Ferkel

Die *ex vivo*-Untersuchung der Phagozytoseaktivität der Granulozyten und Monozyten wurde wie schon bei den Kühen mit dem Testkit Phagotest[®] untersucht. Es zeigten sich, wie auch bei den anderen immunologischen Parametern, starke tierindividuelle Schwankungen. Zwischen den unterschiedlichen Fütterungsgruppen konnte für die Phagozytoserate der Granulozyten und Monozyten kein signifikanter Unterschied bei beiden Untersuchungspunkten ausgemacht werden. Allerdings konnte bei der Fluoreszenzintensität, die als Parameter für die aufgenommene Menge an *E. coli* Bakterien pro Zelle gibt, für die Kontrollgruppe ein zeitlich signifikanter Unterschied festgestellt werden. Am Tag des Absetzens haben die Granulozyten signifikant mehr Bakterien aufgenommen als am Ende des Versuches ($p \leq 0,05$). Bei den anderen beiden Gruppen konnte eine numerische Abnahme der aufgenommenen Bakterien gesehen werden. Inwieweit es sich um ein typisches altersabhängiges Phänomen handelt, kann nicht beurteilt werden, da es für Ferkel noch keine Referenzdaten zur Phagozytoseleistung gibt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass bei einer Se-Mangelernährung eine Abnahme der phagozytotischen Aktivität im peripheren Blut von Sauen nachgewiesen wurde (Wuryastuti et al., 1993). Auch wenn die Kontrollgruppe keine Se-Mangeldiät erhielt, stand ihr weniger Selen zur Verfügung als den anderen beiden Gruppen, wodurch möglicherweise der zeitliche Unterschied nur in der Kontrollgruppe signifikant ausfiel.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend ist bei den Kühen festzustellen, dass die gegebene Se-Menge von 0,4 ppm, unabhängig von der Verbindung, keinen signifikanten Einfluss auf die erfassten immunologischen Parameter im peripheren Blut und in der Milch von Kühen und ihrer Kälber hatte. Parallel wurden in einer Arbeit (Salman, 2010) im Blut und in der Milch höhere Se-Konzentrationen sowie TEAC-Werte bei Verwendung von organisch gebundenem Selen im Vergleich zur AS- und Kontrollgruppe gefunden. Selen, in

anorganischer Form gefüttert, führte im Vergleich mit der Kontrollgruppe zu höheren Se-Konzentrationen im Blut und zu höheren TEAC-Werten im Blut und in der Milch (Salman, 2010).

Bei den Absetzferkeln kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die mit unterschiedlichen Se-Quellen angereicherte Kuhmilch keinen Einfluss auf immunologische Parameter im peripheren Blut und der Milz hatte. Die antioxidative Kapazität wurde im Rahmen dieses Versuches nicht untersucht, sodass keine Aussage darüber getroffen werden kann, inwieweit die verschiedenen Se-Gehalte der Milch einen Einfluss hatten.

6 Zusammenfassung

Effekte der Fütterung von Natriumselenit und Selenhefe an Milchkühe auf immunologische Parameter in der Milch und Verfügbarkeit des Selen bei Verfütterung an Absetzferkel

16 Holstein Friesian Kühe und ihre Kälber wurden in drei Fütterungsgruppen eingeteilt, um die Auswirkungen verschiedener Selen (Se)-Supplemente in der Ration auf immunologische Parameter im peripheren Blut und in der Milch zu untersuchen. Die Untersuchungen erstreckten sich über den Zeitraum von sechs Wochen a. p. bis zur 12. Woche p. p.. Weiterhin wurde an 30 Absetzferkeln analysiert, inwieweit diese unterschiedlich zusammengesetzte Kuhmilch Auswirkungen auf die Se-Konzentration im Serum und auf ausgesuchte immunologische Parameter im peripheren Blut und in der Milz hatte. Die Kühe wurden in eine Kontrollgruppe, eine mit anorganisch gebundenem Se gefütterte (AS-) Gruppe und in eine mit organisch gebundenem Se gefütterte (OS-) Gruppe eingeteilt. Die Fütterung basierte auf einer Totalen Mischration (TMR) als Grundfutter, die bei der AS- und OS-Gruppe mit jeweils 4 mg Se a. p. und 6 mg Se p. p. pro Tier und Tag supplementiert wurde. Die TMR enthielt im Mittel 0,18 mg Se/kg Trockenmasse. Von den Kühen wurden Blutproben eine und 12 Wochen p. p. und Milchproben neun und 12 Wochen p. p. genommen. Den Kälbern wurde eine Woche nach der Geburt Blut entnommen und untersucht. Die Milch der Kühe wurde eingefroren, um sie zu einem späteren Zeitpunkt während einer zweiten Versuchsphase an Absetzferkel zu verfüttern, und erst am Tag der Verfütterung wieder auf 38°C für die Ferkel erwärmt. Entsprechend der Milch, die die Absetzferkel erhielten, wurden diese am Tag des Absetzens gleichmäßig auf eine Kontroll-, AS- und OS-Gruppe verteilt und für zwei Wochen mit der Milch gefüttert. Blutproben wurden am Tag des Absetzens und 14±1 Tage später untersucht, am Versuchsende wurde eine Milzprobe entnommen und analysiert. Als immunologische Parameter im peripheren Blut der Kühe wurden die Subpopulationen der Lymphozyten, die Phagozytoseleistung sowie die Proliferationskapazität der Lymphozyten untersucht. In der Kuhmilch und im peripheren Blut der Ferkel wurden die Subpopulationen der Lymphozyten und die funktionelle Phagozytoseleistung betrachtet, während in der Milz die lymphozytären Subpopulationen bestimmt wurden. In einer parallel laufenden Untersuchung (Salman, 2010) konnte ein signifikant höherer Se-Gehalt und eine gesteigerte Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) im Blut der Kühe und der Kälber, die organisch oder anorganisch gebundenes Selen erhielten, im Vergleich mit der Kontrollgruppe beobachtet werden. Gleichzeitig hatte die OS-Gruppe eine signifikant höhere Se-Konzentration in der Milch als die anderen beiden Gruppen. Der TEAC-Wert in der Milch war sowohl für die OS- und AS-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die untersuchten immunologischen Parameter zeigten im peripheren Blut der Kühe und der Kälber ebenso wie in der Milch keine Abhängigkeit von den gefütterten Se-Verbindungen. Bei den Absetzferkeln konnten bei den untersuchten immunologischen Parametern im Blut und in der Milz keine fütterungsbedingten Unterschiede beobachtet werden. Dagegen konnte in der Gruppe, die die Kuhmilch der Gruppe OS erhielt, im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen eine signifikant höhere Se-Konzentration im Serum beobachtet werden. Als Schlussfolgerung ergibt sich, dass Se-Zulagen unabhängig von der Verbindung unter den Bedingungen einer bedarfsdeckenden Se-Versorgung der Kontrollgruppe keinen signifikanten Einfluss auf die erfassten immunologischen Parameter im peripheren Blut und in der Milch von Kühen und ihrer Kälber sowie bei Ferkeln hatten. Allerdings zeigte sich, dass Milch der mit Se-Hefe gefütterten Kühe höhere Se-Konzentrationen im Blut von Ferkeln hervorgerufen hat.

7 Summary

The influence of different sources of dietary selenium on the immune parameters of milk from dairy cows and the availability of selenium from feeding the milk to weaned piglets

Sixteen Holstein-Friesian dairy cows and their calves were divided into control (Control), sodium selenite (AS) and selenium (Se) enriched yeast groups (OS) and investigated 6 weeks ante- to 12 weeks post partum (p. p.). The aim was to analyse the effects of the different Se compounds on selected immunological traits in blood and milk. The control group was maintained on the basal TMR naturally containing 0.18 mg Se/kg dry matter, whereas the AS and OS groups were supplemented with 4 mg Se *ante* and 6 mg Se *post partum*/ animal and day. The effects of milk from these dairy cows on selected immunological traits in the blood and spleen and on Se levels in serum of 30 weaned piglets were also analysed. Ten piglets were divided into control-milk (Control), AS-milk and OS-milk groups from weaning for 14 days. The cow milk was frozen until reheated to 38°C on the day of feeding to the piglets. Blood samples of cows and calves were used for lymphocyte phenotyping and measuring phagocytosis activity and lymphocyte proliferation. The lymphocyte phenotyping and the phagocytosis were done for milk of cows and blood samples of piglets, whereas the spleen was analysed for the lymphocyte subpopulations. Parallel to this study blood and milk samples from the cow trial were analysed for Se content and Trolox Equivalent Antioxidant capacity (TEAC). The OS and AS groups had different Se contents and TEAC values in blood and TEAC values in milk compared to Control. In milk only OS were different for Se content from AS and Control. Lymphocyte subpopulations, lymphocyte proliferation and phagocytosis activity were not affected by different Se sources, neither in cows nor in calves. Immune cells produce more radicals only during an infection, it is unclear, whether phagocytosis activity would be enhanced by the higher TEAC values of Se groups. The next step would be a challenge trial. The selected immunological parameters in the piglet trial were not influenced by different Se milks. The Se content in the serum of OS-group was significant higher compared to both others. In which extent this result is affected through the higher Se content in the milk of the OS group or if the Se in this milk has a better bioavailability must be investigated in further studies.

8 Literaturverzeichnis

Ali-Vehmas, T., Vikerpuur, M., Fang, W., Sandholm, M. (1997):
Giving selenium supplements to dairy cows strengthens the inflammatory response to intramammary infection and induces a growth-suppressing effect on mastitis pathogens in whey.

Zentralbl. Veterinärmed. A. 44, 559-571

Appleyard, G. D., Wilkie, B. N. (1998):
Characterization of porcine CD5 and CD5+ B cells.
Clin. Exp. Immunol. 111, 225-230

Arriëns, M. A., Summerfield, A., McCullough, K.C. (1998):
Differential adhesion molecule expression on porcine mononuclear cell populations cell populations.
Scand. J. Immunol. 47, 487-95

Arthur, J. R., McKenzie, R. C., Beckett, G. J. (2003):
Selenium in the immune system.
J. Nutr. 133, 1457-1459

Berthon, P., Hopkins, J. (1996):
Ruminant Cluster CD 14.
Vet. Immunol. Immunopathol. 52, 245-248

Binns, R.M. (1994):
The Null/gamma delta TCR+ T cell family in the pig.
Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 69-77

Boudry, C., Buldgen, A., Portetelle, D., Collard, A., Théwis, A., Dehoux, J.-P. (2007):
Effects of oral supplementation with bovine colostrum on the immune system of weaned piglets.
Res. Vet. Sci. 83, 91-101

Boyne, R., Arthur, J. R. (1986):
The response of selenium deficient mice to *Candida albicans* infection.
J. Nutr. 116, 816-822

Butler, J. E., Sinkora, M., Wertz, N., Holtmeier, W., Lemke, C. D. (2006):
Development of the neonatal B and T cell repertoire in swine: implications for comparative and veterinary immunology.
Vet. Res. 37, 417-441

BVL (2008):
Liste der für Futtermittel zugelassenen Zusatzstoffe, nach Richtlinie 70/524/EWG und Übergangsregelung Verordnung EG 1831/2003.
www.bvl.bund.de/cin_007/nn_491320/DE/02__Futtermittel/00__doks__download/01__Zusatzstof-fe__70__524/futtermittel_zusatzstoffe_spurenelemente,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/futtermittel_zusatzstoffe_spurenelemente.pdf

BVL (2010):
Liste der für Futtermittel zugelassenen Zusatzstoffe, zugelassen nach Verordnung EG 1831/2003.
www.bvl.bund.de/cln_007/nn_491320/DE/02__Futtermittel/00__doks__download/02__Zusatzstoffe__1831/futtermittel__zusatzstoffe__verbindungen__von__spurenelementen,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/futtermittel_zusatzstoffe_verbindungen_von_spurenelementen.pdf

Cao, Y.-Z., Maddox, J. F., Mastro, A. M., Scholz, R. W., Hildenbrandt, G., Reddy, C. C. (1992):
Selenium deficiency alters the lipoxygenase pathway and mitogenic response in bovine lymphocytes.
J. Nutr. 122, 2121-2127

Cebra, C. K., Heidel, J. R., Crisman, R. O., Stang, B. V. (2003):
The relationship between endogenous cortisol, blood micronutrients, and neutrophil function in post parturient Holstein cows.
J. Vet. Intern. Med. 17, 902-907

Chareerantanakul, W., Roth, J. A. (2007):
Biology of porcine T lymphocytes.
Anim. Health Res. Rev. 7 (1/2), 81-96

Combs, G. F., Combs, S. B. (1986):
The role of selenium in nutrition.
1. Auflage, Academic Press, Inc., Orlando

Denyer, M. S., Wileman, T. E., Stirling, C. M. A., Zuber, B., Takamatsu, H. H. (2006):
Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subsets in pigs allowing phenotypic and functional analysis of Natural Killer, Cytotoxic T, Natural Killer T and MHC un-restricted cytotoxic T-cells.
Vet. Immunol. Immunopathol. 110, 279-292

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) e.V. (2000):
Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern.
1. Aufl., Verlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V., Giessen

Dhur, A., Galan, P., Hercberg, S. (1990):
Relationship between selenium, immunity and resistance against infection.
Comp. Biochem. Physiol. C 96, 271-280

Dirksen, G., Gründer, H.-D., Stöber, M. (2002):
Innere Medizin und Chirurgie des Rindes.
4. Aufl., Parey Verlag, Berlin

Dosogne, H., Vangroenweghe, F., Mehrzad, J., Massart-Leen, A. M., Burvenich, C. (2003):
Differential leukocyte count method for bovine low somatic cell count milk.
J. Dairy Sci. 86, 828-834

Duncan, I. A., Binns, R. M., Duffus, W. P. H. (1989):
The null T cell in pig blood is not an NK cell.
Immunol. 68, 392-395

- Dylewski, M. L., Mastro, A. M., Picciano, M. F., (2002):
Maternal selenium nutrition and neonatal immune system development.
Biol. Neonate 82, 122-127
- Eskew, M. L., Scholz R. W., Reddy, C. C., Todhunter, D. A. Zarkower, A. (1985):
Effects of vitamin E and selenium deficiencies on rat immune function.
Immunol. 54, 173-180
- Filteau, S.M. (2001):
Milk components with immunomodulatory potential.
In: Woodward, B., Draper, H.H. (editors). Advances in nutritional research. Volume 10:
Immunological properties of milk. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York,
327-344
- Fontaine, M., Valli, V. E., Young, L. G., Lumsden, J. H. (1977):
Studies on vitamin E and selenium deficiency in young pigs I. Hematological and
biochemical changes.
Can. J. Comp. Med. 41, 41-51
- Franke, K. W., Painter, E. P. (1935):
Selenium in protein from toxic food.
J. Nutr. 10, 599-611
- Gerner, W., Käser, T., Saalmüller, A. (2009):
Porcine T lymphocytes and NK cells – An update.
Dev. Comp. Immunol. 33, 310–320
- Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (2001):
Ausschuss für Bedarfsnormen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie: Empfeh-
lungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Milchkühe und Aufzuchttrinder.
1. Auflage, DLG Verlag, Frankfurt am Main
- Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (2006):
Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Schweinen.
1. Auflage, DLG Verlag, Frankfurt am Main
- Grasso, P. J., Scholz, R. W., Erskine, R. J., Eberhart, R. J. (1990):
Phagocytosis, bactericidal activity, and oxidative metabolism of milk neutrophils from
dairy cows fed selenium-supplemented and selenium-deficient diets.
Am. J. Vet. Res. 51, 269-274
- Haas, K. M., Estes, D. M. (2001):
The identification and characterization of a ligand for bovine CD5.
J. Immunol. 166, 3158-3166
- Hamed, H., Gargouri, A., Hachana, Y., El Feki, A. (2010)
Comparison between somatic cell and leukocyte variations throughout lactation in
camel (*Camelus dromedaries*) and cow's milk.
Small Rum. Res. 94, 53-57
- Hammerberg, C., Schurig, G. G. (1986):
Characterization of monoclonal antibodies directed against swine leukocytes.
Vet. Immunol. Immunopathol. 11, 107-121

Hancock, J. T., Salisbury, V., Ovejero-Boglione, M. C., Cherry, R., Hoare, C., Eisenthal, R., Harrison, R. (2002):
Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite.
Antimicrob. Agents Chemother. 46, 3308-3310.

Hegazy, S. M., Adachi, Y. (2000):
Comparison of the effects of dietary selenium, Zinc and selenium and zinc supplementation on growth and immune response between chick groups that were inoculated with Salmonella and Aflatoxin or Salmonella.
Poult. Sci. 79, 331-335

Hemingway, R. G. (1999):
The influences of dietary selenium and vitamin E intakes on milk somatic cell counts and mastitis in cows.
Vet. Res. Commun. 23, 481-499

Hill, A. W., Heneghan, D. J., S. Williams, M. R. (1983):
The opsonic activity of bovine milk whey for the phagocytosis and killing by neutrophils of encapsulated and non-encapsulated *Escherichia coli*.
Vet. Microbiol. 8, 293-300.

Hoffmann P. R., Berry, M. J. (2008):
The influence of selenium on immune responses.
Mol. Nutr. Food Res. 52, 1273-1280

Hogan, J. S., Weiss, W. P., Smith, K. L. (1993):
Role of vitamin E and selenium in host defense against mastitis.
J. Dairy Sci. 76, 2795-2803

Holleman, A.F., Wiberg, E. (1995):
Lehrbuch der Anorganischen Chemie.
101. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin/New York

Hurley, D. J., Kensinger, M. H., Mastro, A. M., Wilson, R. A. (1990):
An evaluation of the mononuclear cells derived from bovine mammary gland dry secretions using leukocyte antigen specific monoclonal antibodies, light scattering properties and non-specific esterase staining.
Vet. Immunol. Immunopathol. 25, 177-193

Hwang, K., Milner, J. A. (1996):
Intracellular distribution of selenium and the growth of mammary cells in culture.
Biol. Trace Elem. Res. 51, 133-147

Isaacson, J. A., Flaming, K. P., Roth, J. A.. (1998):
Increased MHC class II and CD25 expression on lymphocytes in the absence of persistent lymphocytosis in cattle experimentally infected with bovine leukemia virus.
Vet. Immunol. Immunopathol. 64, 235-248

Jackson, P. G. G. (2007):
Geburtshilfe in der Tiermedizin.
1. Auflage Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München

- Jain, N.C. (1993):
Essentials of Veterinary Hematology.
Lea & Febiger, Philadelphia
Zitiert in Holsteg, M. (2002): Softwareadaptation und begleitende Evaluation des Hämatologiesystems ADVIA 120 für die Tierart Rind; Erstellung von hämatologischen Referenzbereichen für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und deutsches Fleckvieh. Justus-Liebig-Universität, Gießen, Dissertation
- Janeway Jr., C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J. (2005):
Immunobiology: the immune system in health and disease.
6. Auflage, Thomson Publishing Service, England
- Jeroch, H., Drochner, W., Simon, O. (2008):
Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere.
2. Auflage, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- Katamoto, H., Fukuda, H., Oshima, I., Ishikawa, N., Kanai, Y. (1998):
Nitroblue tetrazolium reduction of neutrophils in heat stressed goats is not influenced by selenium and vitamin E injection.
J. Vet. Med. Sci. 60, 1243-1249
- Kim, Y. Y., Mahan, D. C. (2001a):
Comparative effects of high dietary levels of organic and inorganic selenium on selenium toxicity of growing-finishing pigs.
J. Anim. Sci. 79, 942-948
- Kim, Y. Y., Mahan, D. C. (2001b):
Prolonged feeding of high dietary levels of organic and inorganic selenium to gilts from 25 kg body weight through one parity.
J. Anim. Sci. 79, 956-966
- King, M.R., Kelly, D., Morel, P.C.H., Pluske, J.R. (2003):
Aspects of intestinal immunity in the pig around weaning.
In: Pluske, J.R., Le Dividich, J., Verstegen, M.W.A. (editors). Weaning the pig Concepts and consequences. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, 219-257
- Kixmüller, M. (2004):
Labordiagnostische Referenzbereiche bei unterschiedlichen Schweinerassen sowie histopathologische und immunhistochemische Untersuchung von Gehirnen älterer Sauen und Eber auf transmissible spongiforme Enzephalopathie im Rahmen der TSE-Studie.
Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Dissertation
- Knight, D. A., Tyznik, W. J. (1990):
The effect of dietary selenium on humoral immunocompetence of ponies.
J. Anim. Sci. 68, 1311-1317
- Koller, L. D., Exon, J. H., Talcott, P. A., Osborne, C. A., Henningsen, G. M. (1986):
Immune responses in rats supplemented with selenium.
Clin. Exp. Immunol. 63, 570-576
- König, H. E., Liebich, H. G. (2008):
Anatomie der Haussäugetiere.
4. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart

- Kramer, M. D. (1997):
Immunologie und Immunpathologie.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- Kurzhaus, P., Klima, H., Manz, D. (1985):
Beziehungen zwischen Zellzahl, Zellbild und bakteriologischen Befunden bei der subklinischen Mastitis des Rindes.
Milchwissenschaft 40, 6-9
- Lallès, J.P., Bosi, P., Smidt, H., Stokes, C. R. (2007):
Nutritional management of gut health in pigs around weaning.
Proc. Nutr. Soc. 66, 260-2688
- Lee, C. S., Wooding, F. B. P., Kemp, P. (1980):
Identification, properties, and differential count of cell populations using electron microscopy of dry cow secretions, colostrum and milk from normal cows.
J. Dairy Res. 47, 39-50
- Legrand, D., Elass, E., Pierce, A., Mazurier, J. (2004):
Lactoferrin and host defence: an overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties.
Biomet. 17, 225–229
- Leitner, G., Shoshani, E., Krifucks, O., Chaffer, M., Saran, A. (2000):
Milk leucocyte population patterns in bovine udder infection of different aetiology.
J. Vet. Med. 47, 581-589
- Leitner, G., Eligulashvily, R., Krifucks, O., Perl, S., Saran, A. (2003):
Immune cell differentiation in mammary gland tissues and milk of cows chronically infected with *Staphylococcus aureus*.
J. Vet. Med. B 50, 45-52
- Lessard, M., Yang, W. C., Elliott, G. S., Rebar, A. H., Van Vleet, J. F., Deslauriers, N., Brisson, G. J., Schultz, R. D. (1991):
Cellular immune responses in pigs fed a vitamin E- and selenium deficient diet.
J. Anim. Sci. 69, 1575-1582
- Mahan, D. C. (2000):
Effect of organic and inorganic selenium sources and levels on sow colostrum and milk selenium content.
J. Anim. Sci. 78, 100-105
- Mahan, D. C., Moxon, A. L., Cline, J. H. (1975):
Efficacy of supplemental selenium in reproductive diets on sow and progeny serum and tissue selenium values.
J. Anim. Sci. 40, 624-631
- Mahan, D. C., Parrett, N. A. (1996):
Evaluating the efficacy of selenium-enriched yeast and sodium selenite on tissue selenium retention and serum glutathione peroxidase activity in grower and finisher swine.
J. Anim. Sci. 74, 2967-2974

Malbe, M., Klaassen, M., Fang, W., Myllys, V., Vikerpuur, M., Nyholm, K., Sankari, S., Suoranta, K., Sandholm, M. (1995):
Comparisons of selenite and selenium yeast feed supplements on Se-incorporation, mastitis and leukocyte function in Se-deficient dairy cows.
J. Vet. Med. A 42, 111-121

Malbe, M., Attila, M., Atroshi, F. (2006):
Possible involvement of selenium in Staphylococcus aureus inhibition in cow's whey.
J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 90, 159-164

Mathias, M. M., Hogue, D. E., Loosli, J. K. (1967):
The biological value of selenium in bovine milk for the rat and chick.
J. Nutr. 93, 14-20

McDonald, J. S., Anderson, A. J. (1981):
Total and differential somatic-cell counts in secretions from noninfected bovine mammary-glands - the early nonlactating period.
Am. J. Vet. Res., 42, 1360-1365

McKenzie, R. C. Rafferty, T. S. Beckett, G. J. (1998):
Selenium: an essential element for immune function.
Immunol. Today 19, 342-345

Miller, R.H., Paape, M.J., Fulton, L.A. (1991):
Variation in milk somatic cells of heifers at first calving.
J. Dairy Sci. 74, 3782-3790

Miller, R. H., Bitman, J., Bright, S. A., Wood, D. L., Capuco, A. V. (1992):
Effect of clinical and subclinical mastitis on Lipid-Composition of teat canal Keratin.
J. Dairy Sci. 75, 1436-1442

National Mastitis Council (1996):
Current Concepts of Bovine Mastitis.
4th ed. National Mastitis Council Inc., Madison, WI

Naumann, C., Bassler, C. (2004):
Die chemische Untersuchung von Futtermitteln.
3. Aufl., 5. Ergänzunglieferung 2004, VDLUFA-Verlag, Darmstadt

Ndiweni, N., Finch, J. M. (1995):
Effects of in vitro supplementation of bovine mammary gland macrophages and peripheral blood lymphocytes with alpha-tocopherol and sodium selenite: implications for udder defences.
Vet. Immunol. Immunopathol. 47, 111-121

Ndiweni, N., Finch, J. M. (1996):
Effects of in vitro supplementation with alpha -tocopherol and selenium on bovine neutrophil functions: implications for resistance to mastitis.
Vet. Immunol. Immunopathol. 51, 67-78

Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. (1996):
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band III Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane.
Parey Buchverlag im Blackwell Wissenschaftsverlag GmbH, Berlin

Nickerson, S. C., Pankey, J. W., Boddie, N. T. (1984):
Distribution, location, and ultrastructure of plasma cells in the uninfected, lactating bovine mammary gland.
J. Dairy Res. 51, 209-217

NRC (National Research Council) (2001):
Nutrient requirements of dairy cattle.
7th rev. ed., National Academy Press, Washington D.C., USA

NRC (National Research Council). (2005):
Mineral Tolerance of Animals.
2nd Revised Edition, National Academy of Science, Washington D.C., USA

Omaye, S. T., Tappel, AL. L. (1974):
Effect of dietary selenium on glutathione peroxidase in the chick.
J. Nutr. 104, 747-753

Östensson, K. (1993):
Trafficking of leukocytes and immunoglobulin isotypes in the bovine udder.
Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Dissertation (1993)
Zitierit in: Schröder, A. (2003), Untersuchungen zum Zelldifferentialbild in Milch und Blut unter Berücksichtigung des Gesundheitsstatus der bovinen Milchdrüse, Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation

Paape, M. J., Wergin, W. P., Guidry, A. J., Pearson, U. R. E. (1979):
Leukocytes – second line of defense against invading mastitis pathogens.
J. Dairy Sci. 62, 135–153

Paape, M. J., Wergin, A.W. P., Guidry, A. J., Schultze, W. D. (1981):
Phagocytic defense of the ruminant mammary gland.
Adv. Exp. Med. Biol. 137, 555-578

Park, Y. H., Fox, L. K., Hamilton, M. J. Daws, W. C. (1992):
Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation.
J. Dairy Sci. 75, 998-1006

Park, Y. H., Joo, Y. S., Park, J. Y., Moon, J. S., Kim, S. H., Kwon, N. H., Ahn, J. S., Davis, W. C., Davies, C. J. (2004):
Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows.
J. Vet. Sci. 5, 29-39

Paßlack, N. (2010):
Untersuchungen zum Einfluss von Inulin und thermisch behandelten Ackerbohnen auf immunologische Parameter bei Sauen, Saug- und Absetzferkeln.
Institut für Tierernährung, Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, Dissertation

Pauly, T., Weiland, E., Hirt, W., Dreyer-Bux, C., Maurer, S., Summerfield, A., Saalmüller, A. (1996):
Differentiation between MHC-restricted and non-MHC-restricted porcine cytolytic T lymphocytes.
Immunol. 88, 238-246

Peplowski, M. A., Mahan, D. C., Murray, F. A., Moxon, A. L., Cantor, A. H. Ekstrom, K. E. (1980):

Effect of dietary and injectable vitamin E and selenium in weanling swine antigenically challenged with sheep red blood cells.

J. Anim. Sci. 51, 344-351

Pescovitz, M. D., Lunney, J. K., Sachs, D. H. (1985):

Murine anti-swine T4 and T8 monoclonal antibodies: distribution and effects on proliferative and cytotoxic T cells.

J. Immunol. 134, 37-44

Pescovitz, M. D., Book, B. K., Aasted, B., Dominguez, J., Bullido, R., Trebichavsky, I., Novikov, B., Valpotic, I., Tomaskovic, M., Nielsen, J., Arn, S., Sachs, D. H., Lunney, J. K., Boyd, P. C., Walker, J., Lee, R., Saalmüller, A. (1998):

Analyses of monoclonal antibodies reacting with porcine CD5: results from the Second International Swine CD Workshop.

Vet. Immunol. Immunopathol. 60, 269-273

Petrie, H. T., Klassen, L. W., Klassen, P. S., O'Dell, J. R., Kay, H. D. (1989):

Selenium and the immune response: 2. Enhancement of murine cytotoxic T-lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity in vivo.

J. Leukoc. Biol. 45, 215-220

Pillai, S. R., Kunze, E., Sordillo, L. M., Jayarao, B. M. (2001):

Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health.

J. Dairy Sci. 84, 1413-1420

Piriou-Guzylack, L., Salmon, H. (2008):

Membrane markers of the immune cells in swine: an update.

Vet. Res. 39:54; DOI:10.1051/vetres:2008030)

Quesnel, H., Ranaudin, A., Floc'h, N. L., Jondreville, C., Péré, M. C., Taylor-Pickard, J. A., Dividich, J. L. (2008):

Effect of organic and inorganic selenium sources in sow diets on colostrum production and piglet response to a poor sanitary environment after weaning.

Anim. 2, 859-866

Rainard, P. (2003):

The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections.

Vet. Res. 34, 647-670

Rainard, P., Riollet, C. (2006):

Innate immunity of the bovine mammary gland.

Vet. Res. 37, 269-400

Reffett, J. K., Spears, J. W., Brown, T. T., Jr. (1988):

Effect of dietary selenium and vitamin E on the primary and secondary immune response in lambs challenged with parainfluenza virus.

J. Anim. Sci. 66, 1520-1528

Richter, J. Götze, R. (1993):

Tiergeburtshilfe.

4. Auflage Herausgegeben von Grunert, E., Arbeiter, K., Parey Verlag Berlin/ Hamburg

- Riollet, C., Rainard, P., Poutrel, P. (2001):
Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection.
J. Dairy Sci. 84, 1077–1084
- Rothkötter, H.-J., Möllhoff, S., Pabst, R. (1999):
The influence of age and breeding conditions on the number and proliferation of intraepithelial lymphocytes in pigs.
Scand. J. Immunol. 50, 31-38
- Saalmüller, A. (2006):
New understanding of immunological mechanisms.
Vet. Microbiol. 117, 32–38
- Saalmüller, A., Reddehase, M. J., Buhning, H. J., Jonjic, S., Koszinowski, U. H. (1987):
Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes.
Europ. J. Immunol. 17, 1297-1301
- Saalmüller, A., Hirt, W., Reddehase, M. J. (1989):
Phenotypic discrimination between thymic and extrathymic CD4-CD8- and CD4+CD8+ -porcine T lymphocytes.
Europ. J. Immunol. 19, 2011-2016
- Saalmüller, A., Bryant, J. (1994):
Characteristics of porcine T lymphocytes and T-cell lines.
Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 45-52
- Saalmüller, A., Hirt, W., Maurer, S., Weiland, E. (1994):
Discrimination between two subsets of porcine CD8+ cytolytic T lymphocytes by the expression of CD5 antigen.
Immunol. 81, 578-583
- Saalmüller, A., Werner, T., Fachinger, V. (2002):
T-helper cells from naive to committed.
Vet. Immunol. Immunopathol. 87, 137-145
- Salman, S. (2010):
Effect of selenium supplementation from various dietary sources on the antioxidant and selenium status of dairy cows and trace element status in dairy herds.
Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin,
Dissertation
- Schalm, O. W., Carroll, E., Jain, N. C. (1971):
Number and types of somatic cells in normal and mastitic milk.
Philadelphia: Lea and Febiger
- Schröder, A. (2003):
Untersuchungen zum Zelldifferentialbild in Milch und Blut unter Berücksichtigung des Gesundheitsstatus der bovinen Milchdrüse.
Zentrum für Lebensmitteltechnologie, Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation
- Schwarz, K., Foltz, C. M. (1957):
Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration.
J. Am. Chem. Soc. 79, 3292-3293

- Simonová, A. Pfannhauser, W. (2008):
Selen – Vorkommen, Wirkung und Versorgung.
Nutrition 32, 364-378
- Sinkora, M., Sinkora, J., Rehakova, Z., Splichal, I., Yang, H., Parkhouse, R. M. E., Trebichavsky, I. (1998):
Prenatal ontogeny of lymphocyte subpopulations in pigs.
Immunol. 95, 595-603
- Sinkora, M., Sinkora, J., Rehakova, Z., Butler, J.E. (2000):
Early ontogeny of thymocytes in pigs: sequential colonization of the thymus by T cell progenitors.
J. Immunol. 165, 1832-1839
- Sinkora, M., Sinkorová, J., Holtmeier, W. (2005):
Development of gammadelta thymocyte subsets during prenatal and postnatal ontogeny.
Immunol. 115, 544-555
- Smith, K. L., Hogan, J. S., Weiss, W. P. (1997):
Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality.
J. Anim. Sci. 75, 1659-1665
- Sopp, P., Kwong, L. S., Howard, C. J. (1996):
Identification of bovine CD 14.
Vet. Immunol. Immunopathol. 52, 323-328
- Sordillo, L. M., Hicks, C. R., Wilson, R., Maddox, J. (1993):
Effects of selenium status on bovine mononuclear cell function.
J. Vet. Med. A 40, 615-623
- Sordillo, L. M., Shafer-Weaver, K., DeRosa, D. (1997):
Immunobiology of the mammary gland.
J. Dairy Sci. 80, 1851-1865
- Spears, J. W. (2000):
Micronutrients and immune function in cattle.
Proc. Nutr. Soc. 59, 587-594
- Stabel, J. R., Reinhardt, T. A., Nonnecke, B. J. (1991):
Effect of selenium and reducing agents on in vitro immunoglobulin M synthesis by bovine lymphocytes.
J. Dairy Sci. 74, 2501-2506
- Stepanova, H., Samankova, P., Leva, L., Sinkora, J., Faldyna, M. (2007):
Early postnatal development of the immune system in piglets: The redistribution of T lymphocyte subset.
Cell. Immunol. 249, 73-79
- Suzuki, K. T. (2005):
Metabolomics of selenium: Se metabolites based on speciation studies.
J. Health Sci. 51, 107-114

- Takamatsu, H. H., Denyer, M. S., Wileman, T. E. (2002):
A subpopulation of circulating porcine gammadelta T cells can act as professional antigen presenting cells.
Vet. Immunol. Immunopathol. 87, 223-224
- Targowski, S. P. (1983):
Role of Immune Factors in Protection of Mammary Gland.
J. Dairy Sci. 66, 1781-1789
- Uglietta, R., Doyle, P. T. Walker, G. P., Heard, J. W., Leddin, C. M: Stockdale, C. R., Mcintosh, G. H., Young, G. P., Dunshea, F. R. (2008):
Bioavailability of selenium from selenium-enriched milk assessed in the artificially reared neonatal pig.
Nutr. Dietetics 65, 37-40
- Van Kampen, C. Mallard, B. A. (1997):
Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets.
Vet. Immunol. Immunopathol. 59, 79-91
- Vogel Business Media (2010):
Chemielexikon.
<http://www.process.vogel.de/index.cfm?pid=2995&title=Selen>
- Weiss, W. P., Hogan, J. S., Smith, K. L., Hoblet, K. H. (1990):
Relationships among selenium, vitamin E, and mammary gland health in commercial dairy herds.
J. Dairy Sci. 73, 381-390
- Weiss, W.P., Hogan, J.S. (2005):
Effect of selenium source on selenium status, neutrophil function, and response to intramammary endotoxin challenge of dairy cows.
J. Dairy Sci. 88, 4366-4374
- Wever, P., Emanuelson, U. (1989):
Effects of systematic and intramammary infection on differential and total systematic cell counts in quarter milk samples from dairy cows.
Acta Vet. Scand. 30, 465-474
- Wuryastuti, H., Stowe, H. D., Bull, R. W., Miller, E. R. (1993):
Effects of vitamin E and selenium on immune responses of peripheral blood, colostrum, and milk leukocytes of sows.
J. Anim. Sci. 71, 2464-2472
- Yang, H., Parkhouse, R. M. E. (1996):
Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues.
Immunol. 89, 76-83

Anhang

Lösung zur Färbung der Milchausstriche:

Methylenblau (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	0,50 g
Ethanol 96 % (Roth, Karlsruhe, Deutschland)	30,0 ml
Kaliumhydroxid-Lösung 1% wässrig	1,00 ml
Aqua bidest.	99,0 ml

Der Farbstoff wird im 96 % Alkohol unter Rühren und längerem Stehen lassen gelöst und dann mit der Mischung aus Kaliumhydroxid-Lösung 1% und dem Aqua bidest versetzt.

Lösungen für die Leukozyten Gewinnung

Gey's Lysepuffer:

Stock A:

Ammoniumchlorid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	53,5 g
di-Natriumhydrogenphosphat (Roth, Karlsruhe, Deutschland)	1,50 g
D(+)-Glucose	5,0 g
Kaliumchlorid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	1,85 g
Kaliumhydrogenphosphat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	0,12 g
Phenolrot (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	0,05 g
Aqua bidest.	ad 1000ml

Stock B:

Calciumchlorid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	0,34 g
Magnesiumchlorid	0,42 g
Magnesiumsulfat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	0,14 g
Aqua bidest.	ad 100 ml

Stock C:

Natriumhydrogencarbonat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	2,25 g
Aqua bidest.	ad 100 ml

70 Teile destilliertes Wasser mit 20 Teilen Stock A, 5 Teilen Stock B und 5 Teilen Stock C mischen und durch einen Sterilfilter filtrieren.

Lösungen für die Durchflusszytometrie

FACS-Puffer 0,5 % BSA in PBS (1 Liter):

Albumin Fraktion V (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)	5,00 g
Aqua bidest.	700 ml
10xPBS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)	100 ml

Auffüllen auf 1 Liter mit Aqua bidest. und durch einen Faltenfilter filtrieren

Fixierlösung 1 % Paraformaldehyd/ 0,1% Tween20 in PBS (50 ml):

Paraformaldehyd (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	0,50 g
Aqua bidest.	30,0 ml
Auf dem Magnetrührer unter Erhitzen lösen	
10fach PBS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)	5,00 ml
Tween 20 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	5,00 µl
Aqua bidest.	ad 50 ml

DNAase-Puffer 0,15 M NaCl/4,2 mM MgCl₂/10 µM HCl (500 ml):

NaCl (MW = 58.44)	4,383 g
MgCl ₂ (MW = 203.3)	0,427 g
HCl (1 M)	5,00 µl
Aqua bidest.	ad 500 ml

Zellkulturmedium:

VLE RPMI 1640 (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)	500 ml
Fötale Kälberserum (FCS) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)	50,0 ml
Hepes (2 mM) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)	5,00 ml
Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH Pasching, Austria)	5,00 ml
L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria)	5 ml

Lösungen für die AAS

Salzsäure 6mol/l:	
Salzsäure 30%	634 ml
(Baker B.V., Deventer, Holland)	
Aqua bidest.	366 ml
Oxidationslösung (Salzsäure 3 mol/l):	
Salzsäure 30%	90,0 ml
(Baker B.V., Deventer, Holland)	
Aqua bidest.	810 ml
Reduktionslösung:	
Natriumborhydrid	7,50 g
Natriumhydroxid	2,50 g
Aqua bidest.	1000 ml

Publikationsnachweise

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits auf Tagungen als Poster oder Vortrag vorgestellt.

Poster:

Dinse, D, Saeed, S., Schafft, H., Lahrssen-Wiederholt, M., Zentek, J.
Influence of different selenium supplements on cows and their immune system.
64. Jahrestagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie,
Göttingen, 09-11.03.2010, Proceedings of the Society of Nutrition Physiology (2010)
19, S. 39

Vortrag:

Dinse, D, Saeed, S., Schafft, H., Lahrssen-Wiederholt, M., Zentek, J.
The influence of different sources of dietary selenium on the selenium, antioxidant and immune status of milk from dairy cows.
14th Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition,
Zürich, Schweiz, 06-08.09.2010, Congress Proceedings (2010), S.34

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

...Prof. Dr. Jürgen Zentek für die Überlassung meines Themas und für die Möglichkeit, zu jeder Zeit mit Fragen zu ihm kommen zu können.

...dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) für die Bereitstellung der Versuchstiere, ihre Unterbringung auf dem Versuchsgut und die Bereitstellung der Räumlichkeiten für die Sektion der Ferkel.

...allen Tierpflegern des BfR unter der Leitung von Herrn Uwe Götte und Frau Heide-Marie Lochotzke, die mir mit Rat und Tat bei den Probenahmen der Kühe, der Haltung der Sauen und Ferkel und bei deren Probenentnahmen geholfen haben. Ohne ihre Hilfe wären die Sektionstage nicht so reibungslos verlaufen.

...Frau Monika Hellwig für die Durchführung der Milchroutine und die Erfassung der Leistungsdaten der Kühe.

... Dirk Meyer, Marco Ehling und Florian Just für die große Unterstützung an den Sektionstagen - trotz des frühen Beginns.

...Prof. Dr. Klaus Männer für sein stets offenes Ohr bei jeglichen Fragen zur Schweinezucht.

...Dr. Hilmert und seinen Kollegen für die Erstellung der Blutbilder und Dr. Salman für die Analyse der Sauenmilch.

...Petra Huck für ihre Einweisung in die Laborarbeit und den Umgang mit dem hochsensiblen FACS und die Möglichkeit, sie bei Problemen auch in ihrem Urlaub anrufen zu dürfen.

...Beatrice Meyer, Stefanie Gärtner, Nadine Paßlack und Lydia Tedin für die Unterstützung an den Sektionstagen, ohne die die Proben nicht zu bewältigen gewesen wären.

...meinen Freunden und Kollegen für Ihre Unterstützung und ihr Verständnis während des gesamten Zeitraumes.

... meiner Familie für die Unterstützung bei jeglichen Unterfangen, die ich anfangs.

Selbstständigkeitserklärung

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

Berlin, den 20.12.2010

Daniela Dinse