Aus der Klinik für Rinder
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Die Leberverfettung der Milchkuh
Untersuchungen zur nicht-invasiven Diagnostik des Leberfettgehaltes und zum hepatischen Blutfluss sowie zu deren Beeinflussbarkeit mittels Dexamethason

Habilitationsschrift
zur Erlangung der *Venia legendi*
an der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

vorgelegt von
Dr. med. vet. Alexander Starke
Hannover 2011

Tag der nichtöffentlichen wissenschaftlichen Aussprache: 11. Juli 2011

Vorwort

Die Leberverfettung ist bei hochleistenden Milchkühen die wichtigste und häufigste Parenchymveränderung der Leber. Sie tritt vor allem zu Beginn der Laktation auf. Im fortgeschrittenen Stadium neigen Kühe neben der Entwicklung einer Leberinsuffizienz vermehrt zu metabolischen, infektiösen und reproduktiven Erkrankungen. Die hochgradige Leberverfettung kann damit als Bindeglied zwischen den mit Gravidität, Geburt und Puerperium für das Muttertier verbundenen Anforderungen und den potentiell daraus erwachsenden Gesundheitsstörungen angesehen werden. Sie gewinnt damit entscheidende ökonomische Bedeutung. Für die Buiatrik ergibt sich ein Forschungsbedarf zur Verbesserung der Diagnostik, der weiteren Klärung der Pathogenese und der Prüfung von Therapieverfahren.

Die vorliegende Habilitationsschrift umfasst eine zusammenfassende Darstellung von Untersuchungen zur nicht-invasiven Diagnostik des Leberfettgehaltes und zum hepatischen Blutfluss bei Milchkühen mit unterschiedlichem Leberfettgehalt. Darüber hinaus wurde der Einfluss von Dexamethason, einem bei Stoffwechselerkrankungen des Rindes etablierten Therapeutikum, auf die Glucosenettoabgabe in der Leber geprüft. Der Schrift liegen acht wissenschaftliche Arbeiten zugrunde. Diese sind als erfolgte Veröffentlichungen (1-5, 7), als zur Veröffentlichung angenommenes (6) oder zur Publikation vorbereitetes Manuskript (8) aufgenommen. Die den Studien zugrunde liegenden Untersuchungen an Milchkühen waren dem Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Dezernat 33 Tierschutzdienst, Oldenburg angezeigt (Az: 33.42502/06A372) oder von diesem als Tierversuch (Az: 33-42502-05.08.05) genehmigt. Teile der Arbeit entstanden aus Dissertationsprojekten, welche durch die H. Wilhelm Schaumann Stiftung, Hamburg, und die Studienstiftung des Deutschen Volkes, Bonn, gefördert worden waren.

Die Schrift beginnt mit einer einleitenden Literaturübersicht. Eine kurze Darstellung des Studiendesigns und der Methodik sowie die wichtigsten Ergebnisse der einzelnen Arbeiten befinden sich im Abschnitt Ergebnisse. In diesem Teil der Arbeit wird auf eine detaillierte Darstellung von Methoden und Ergebnissen verzichtet. Hierfür wird auf die jeweiligen Publikationsmanuskripte verwiesen. Nach der Ergebnisdarstellung erfolgt die studienübergreifende Diskussion des Gesamtprojekts der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

	Der Habilitationsschrift zugrunde liegende Publikationen	11
1.	**Einleitung**	13
1.1.	Wesen und wirtschaftliche Bedeutung der Leberverfettung beim Milchrind	13
1.2.	Ätiologie und Pathogenese der Leberverfettung	14
1.3.	Morphologische und hämodynamische Veränderungen bei einer Fetteinlagerung in die Leber	17
1.4.	Analyse des Leberfettgehaltes	18
1.5.	Methoden zur sonographischen Bestimmung des Leberfettgehaltes	20
1.6.	Erfassung des hepatischen Blutflusses	22
1.7.	Einsatz von Glucocorticoiden in der Behandlung des Lipomobilisationssyndroms	24
1.8.	Problemstellung und Zielsetzung	27
2.	**Ergebnisse**	29
2.1.	Entwicklung einer Methode zur Analyse des Totallipid- und Triacylglycerolgehaltes in der Leber bei Milchkühen	29
2.2.	Die computergestütze Analyse des Leberfettgehaltes bei Milchkühen mittels kalibrierter B-Mode-Ultraschallbilder	31
2.3.	Sonographische Untersuchungen zu Form und Größe der Leber von Milchkühen mit unterschiedlichem Leberfettgehalt	34
2.4.	Dopplersonographische Untersuchungen zum portalen Blutfluss bei Milchkühen mit unterschiedlichem Leberfettgehalt	36
2.5.	Entwicklung einer Methode zur minimal-invasiven Katheterisierung der V. portae, V. hepatica, V. mesenterica cranialis und der Aorta abdominalis zur quantitativen Erfassung des hepatischen Stoffwechsels bei Milchkühen	38
2.6.	Der Effekt einer einmaligen Dexamethasonbehandlung auf den hepatischen Blutfluss und die hepatische Glucosenettoabgabe bei Milchkühen	40
3.	**Übergreifende Diskussion**	42
3.1.	Besprechung des verwendeten Patientengutes	42

3.2. Analyse des hepatischen Triacylglycerolgehaltes als Goldstandard für den Grad der Leberverfettung 44
3.3. Sonographie als nicht-invasive Möglichkeit zur Analyse des Leberfettgehaltes 46
3.4. Einfluss der hepatischen Fetteinlagerung auf Organform und -größe sowie den portalen Blutfluss 47
3.5. Wirkung einer Dexamethasonbehandlung auf den Fettgehalt, die Glucosenettoabgabe und die Durchblutung der Leber 50

4. Zusammenfassung 55

5. Summary 59

6. Literaturverzeichnis 63

7. Erklärung zum eigenen Anteil an den Publikationen 79

Publikationsmanuskripte

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

BHB	beta-hydroxybutyrate
B-Mode	brightness mode
CPT	Carnitin-Palmitoyltransferase
CAUS	Computer-Aided Ultrasound Diagnosis
CoA	Coenzym A
CV	Coefficient of variation
DEXA	Dexamethason
Fig.	Figure
FW	fresh weight
GLUT	Glucosetransporter
HPLC	high pressur liquid chromatography
LDA	Left side displaced abomasum
Lubrol	Nonaethylene glycol monododecyl ether
MeanEcho	mean echo level
NEFA	non-esterified fatty acids
PAH	Para-Aminohippursäure
PBF	portal blood flow
r	Korrelationskoeffizient
r^2	Bestimmtheitsmaß
ResAtt	Residual attenuation
ROC	Receiver Operating Characteristic Analyse
TAG	Triacylglycerol
TL	Totallipid
v_{max}	peak maximum velocity
v_{mean}	mean maximum velocity
v_{min}	peak minimum velocity
VPI	venöser Pulsatilitätsindex
VLDL	very low density lipoproteins

Der Habilitationsschrift zugrunde liegende Publikationen

1. Computer-aided B-mode ultrasound diagnosis of hepatic steatosis: A feasibility study (2008)
   Thijssen, J. M., **A. Starke**, G. Weijers, A. Haudum, K. Herzog, P. Wohlsein, J. Rehage, and C. L. De Korte
   IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control. 55(6):1343-54

2. Technical note: Analysis of total lipid and triacylglycerol content in small liver biopsy samples in cattle (2010)
   Starke, A., A. Haudum, R. Busche, M. Beyerbach, S. Dänicke, and J. Rehage
   J. Anim. Sci. 88(8):2741-50

3. Noninvasive detection of hepatic lipidosis in dairy cows with calibrated ultrasonographic image analysis (2010)
   Starke, A., A. Haudum, G. Weijers, K. Herzog, P. Wohlsein, M. Beyerbach, C. L. De Korte, J. M. Thijssen, and J. Rehage
   J. Dairy Sci. 93:2952–2965

4. Interactive vs. automatic ultrasound image segmentation methods for staging hepatic lipidosis (2010)
   Weijers, G., **A. Starke**, A. Haudum, J. M. Thijssen, J. Rehage, and C. L. De Korte
   Ultrasonic Imaging 32:143-153

5. Ultrasonographic assessment of liver dimensions in dairy cows with different hepatic triacylglycerol content (2011)
   Haudum, A.*, **A. Starke***[1], M. Beyerbach, P. Wohlsein, and J. Rehage
   *gleichberechtigte Erstautorenschaft, 1 – korrespondierender Autor
   J. Anim. Sci. 89:1392–1400

6. Minimally-invasive catheterization of the portal, hepatic and cranial mesenteric veins and the abdominal aorta for quantitative determination of hepatic metabolism in dairy cows (2012)
   Starke, A., K. Wussow, L. Matthies, M. Kusenda, R. Busche, A. Haudum, A. Beineke, C. Pfarrer, and J. Rehage
   Vet. J. 192:403-411

7. Evaluation of portal blood flow using transcutaneous and intraoperative Doppler ultrasonography in dairy cows with fatty liver (2011)

Starke, A., S. Schmidt, A. Haudum, T. Scholbach, P. Wohlsein, M. Beyerbach, and J. Rehage
J. Dairy Sci. 94:2964–2971

8. Effect of a single dose Dexamethason application on the hepatic blood flow and the hepatic glucose net output in dairy cows (2011)
   Starke, A., K. Wussow, L. Matthies, M. Kusenda, A. Haudum, R. Busche, M. Beyerbach, M. Piechotta, H. M. Hammon, and J. Rehage
   zur Publikation vorbereitet

Die Erklärung zum eigenen Anteil an den Publikationen befindet sich auf den Seiten 79 bis 86.

1. Einleitung

1.1. Wesen und wirtschaftliche Bedeutung der Leberverfettung beim Milchrind

Mit der Leberverfettung oder fettiger Leberdegeneration wird die über die Norm erhöhte Fetteinlagerung in das Leberparenchym bezeichnet. Ab etwa 5-6% des Lebertrockengewichtes werden Fetttropfen in den Hepatozyten lichtmikroskopisch sichtbar (Trautwein, 1991). Unterstellt man einen Wassergehalt im Lebergewebe von ca. 70% (Devatkal et al., 2004), entspräche dies umgerechnet einer Masse von etwa 15 - 18 mg Fett pro g Leberfrischgewicht [fresh weight (**FW**)]. Physiologischerweise befinden sich in den Hepatozyten des Rindes lediglich geringe Mengen an nicht proteingebundenem Fett in Form mikroskopisch darstellbarer Fetttropfen. Sie werden bis zu 6% des Lebertrockengewichtes als weitgehend physiologisch betrachtet (Christie, 1981; Fürll, 1989). Grundsätzlich handelt es sich bei der erhöhten Fettablagerung in die Hepatozyten um einen reversiblen Prozess. Dennoch ist sie Indikator für eine Zellschädigung. Die Irreversibilität der Verfettungen von Leberzellen ist lichtmikroskopisch aufgrund regressiver Kernveränderungen (Pyknose, Karyorrhexis, –lyse) erkennbar [=degenerative Verfettung (Trautwein, 1991)]. In diesen Fällen endet die initiale Zellfunktionsstörung mit dem Absterben der Zelle. Der Übergang von einer reparablen zur irreparablen Funktionsstörung ist ebenso wie der zwischen physiologischer und pathologischer Leberverfettung fließend (Trautwein, 1991). Da ein Großteil der Milchkühe mit einer Leberverfettung auch eine Ketose entwickelt (Herdt, 2000), werden beide üblicherweise unter dem Begriff des Lipomobilisations- oder Fettlebersyndroms zusammengefasst (Morrow, 1976; Gruffat et al., 1996).

Bei hochleistenden Milchkühen ist die übermäßige Fetteinlagerung die wichtigste und häufigste Parenchymveränderung der Leber. Sie tritt vornehmlich in den ersten Laktationswochen auf (Morrow, 1976; Roberts et al., 1981; Bobe et al., 2004) und betrifft etwa 50% der Kühe (Reid and Collins, 1980; Gerloff et al., 1984, 1986; Jorritsma et al., 2001; Raoofi et al., 2001). Im Rahmen des Lipomobilisationssyndroms werden bei Milchkühen vermehrt metabolische, infektiöse und reproduktive Störungen sowie Labmagenverlagerungen und Lahmheiten festgestellt. Darüber hinaus besitzen Kühe mit hohem Leberfettgehalt die Prädisposition zur Entwicklung einer Leberinsuffizienz. Durch die damit verbundenen Produktionsverluste, Behandlungskosten und vorzeitige Verwertung betroffener Tiere gewinnt die Leberverfettung ökonomische Bedeutung

(Morrow, 1976; Gerloff et al., 1986; Herdt, 1988; Rehage et al., 1996; Wensing et al., 1997; Jorritsma et al., 2000; Bobe et al., 2004; Overton and Waldron, 2004; Dann et al., 2005; Beever, 2006; Geelen and Wensing, 2006; Mulligan and Doherty, 2008; Duffield et al., 2009). Da sie vornehmlich als Ursache und Wegbereiter anderer Erkrankungen fungiert oder auch deren Verlauf erschwert und die Krankheitsdauer verlängert (Hill et al., 1985), sind die durch sie verursachten Kosten schwierig abzuschätzen.

1.2. Ätiologie und Pathogenese der Leberverfettung

Die Leberverfettung wird hauptsächlich auf eine negative Energiebilanz zurückgeführt (Block et al., 2001; Drackley et al., 2001; Grummer et al., 2004). Ursache ist, dass Milchkühe den Bedarf an Glucose u.a. für die Laktoseproduktion infolge geringer Resorption aus dem Darm vornehmlich aus der Gluconeogenese in der Leber decken (Reynolds et al., 1988; Aschenbach et al., 2010). Während der Phase der negativen Energiebilanz kann der Bedarf an Propionat als wichtigstem Vorläufermolekül für die Gluconeogenese (Reynolds et al., 2003; Overton and Waldron, 2004; Larsen and Kristensen, 2009) nicht mehr über die Resorption im Pansen gedeckt werden. Eine Verknappung von Oxalacetat im Citratcyclus der Hepatozyten ist die Folge. Dieses Defizit ruft eine hormonell induzierte Mobilisierung von körpereigenen Energiereserven, vor allem eine Lipolyse hervor (Bell, 1995). Dabei werden in den Fettdepots verstärkt nicht veresterte Fettsäuren (non-esterified fatty acids – **NEFA**) aus Triacylglycerol (**TAG**) freigesetzt (Herdt, 2000). Gehen die Blutspiegel an Glucose und beim Wiederkäuer v.a. Propionat als Vorläufer der Gluconeogenese zurück, kommt es zu einer Reduktion der Insulinfreisetzung aus den β-Zellen des Pankreas (Aschenbach et al., 2010). Der die Lipolyse hemmende Effekt des Insulins geht damit zurück. Die Lipolyse wird verstärkt (Löffler et al., 1997). Normalerweise senkt Insulin, als wichtigstes anaboles Hormon, den Blutglucosespiegel, indem es die Gluconeogeneserate in der Leber reduziert und den Glucoseverbrauch in der Körperperipherie steigert. Aus Untersuchungen an Kälbern und erwachsenen Schafen geht hervor, dass Insulin die Gluconeogenese in der Leber nicht direkt senkt (Brockman and Laarveld, 1986a; Donkin and Armentano, 1995; Scheuer et al., 2006). Dieser intrahepatische Glucosestoffwechsel ist beim Wiederkäuer wahrscheinlich nahezu insulinresistent (Donkin and Armentano, 1995; Scheuer et al., 2006). Daher induziert Insulin eher die Umverteilung der

Vorläufersubstanzen der Gluconeogenese an die Muskulatur. Es kommt zu einer Reduktion der Aufnahme in die Leber (Brockman, 1978). Der Glucoseverbrauch in der Körperperipherie wird durch gesteigerte Exprimierung des insulinabhängigen Glucosetransporters Typ 4 (**GLUT-4**) der Muskelzellen stimuliert (Friedman et al., 1991; Marette et al., 1992). Insulin reguliert auch die hormonsensitive Lipase im Fettgewebe. Es stimuliert damit die Lipogenese und hemmt die Lipolyse (Drackley, 1999). Darüber hinaus fördert Insulin die hepatische Enzymaktivität der Reveresterung von NEFA zu TAG (Zammit, 1996; Cardoniga-Valino et al., 1997). Möglicherweise reduziert es über eine Verminderung der Carnitin-Palmitoyl-transferase 1 (**CPT-1**) vermittelten, mitochondrialen Aufnahme der NEFA deren hepatische mitochondriale sowie peroxisomale Oxidation (Lomax and Baird, 1983; Drackley et al., 1991; Zammit, 1996; Xu et al., 2009; Aschenbach et al., 2010). Anders als beim Insulin steigen die Glucagonkonzentrationen im Blut bei niedrigem Blutglucosespiegel. Glucagon stimuliert die Lipolyse im Fettgewebe und die Gluconeogenese in der Leber. Neben den Hormonen Insulin und Glucagon greifen u.a. die Catecholamine, Epinephrin und Norepinephrin sowie das bovine Wachstumshormon in die Regulation den Metabolismus des Fettgewebes ein. Sie hemmen die Lipogenese und stimulieren die Lipolyse (Herdt, 2000). Die Plasmakonzentrationen der NEFA korrelieren eng mit dem Grad der Fettmobilisation in den Fettdepots des Organismus und der NEFA-Aufnahme in die Leber sowie deren oxidativer Umsetzung (Bauman et al., 1988; Cadorniga-Valino et al., 1997; Reynolds et al., 2003). In den Hepatozyten können NEFA im Cytosol zu TAG reverestert oder als Acyl-Coenzym A (**CoA**) über den Carnitin-Shuttle in die Mitochondrien überführt werden. Dort werden sie in der Beta-Oxidation zu Acetyl-CoA gespalten und entweder gebunden an Oxalacetat in den Citratzyklus eingeschleust oder zu Ketonkörpern metabolisiert (Krebs, 1966; Baird, 1982; Drackley, 1999). Grundsätzlich wird nicht der Citratzyklus, sondern die Gluconeogenese bevorzugt mit Oxalacetat bedient. Deshalb steht v.a. unter den Bedingungen der hohen NEFA-Anflutung nicht genug Oxalacetat als Substrat für den weiteren Aufschluss des Acetyl-CoA zur Verfügung (Weekes, 1991; Aschenbach et al., 2010). Demzufolge wird ein erheblicher Anteil davon zu Ketonkörpern [Aceton, Acetacetat, Beta-hydroxybutyrate (**BHB**)] verstoffwechselt oder zu TAG reverestert (Krebs, 1966; Drackley, 1999). Letztere werden an Lipoproteine [hauptsächlich Very Low Density Lipoproteins (**VLDL**)] gebunden und aus dem Cytosol ausgeschleust. Die Leber des Wiederkäuers besitzt nur eine geringe Kapazität zur Produktion und Sekretion von VLDL (Kleppe et al., 1988; Mazur et al., 1988; Pullen et al.,

1989; Katoh, 2002). Bei einer hohen TAG-Produktion verbleiben diese daher zunehmend im Cytosol und werden als Fetttröpfchen gespeichert (Drackley, 1999; Herdt, 2000). Als Speicherform des Fettes innerhalb der Leberzelle hat TAG somit bei der Verfettung des Organs eine besondere Bedeutung (Grummer, 1993; Drackley, 1999).

Schreitet die Fetteinlagerung in das Lebergewebe voran, nimmt neben dem TAG, auch der Gehalt weiterer Lipidfraktionen z. B. Cholesterol, Cholesterolester und NEFA zu. Lediglich die Konzentration an Phospholipiden bleibt nahezu unverändert (Brumby et al., 1975; Reid et al., 1977; Collins and Reid, 1980; Bobe et al., 2004). Der Anteil der TAG am Totallipid (**TL**)-Gehalt der Leber steigt aber zunehmend (Gaal et al., 1983; Reid and Roberts, 1983; Herdt, 1988; Staufenbiel et al., 1993). Wobei insbesondere bei hohen TL-Gehalten die Angaben der Literatur zur prozentualen Verteilung der Fettfraktionen erheblich variieren (Reid et al., 1977; Gaal et al., 1983; Drackley et al., 1991, 1992; Staufenbiel et al., 1991, 1992, 2007; Pershing et al., 2002; Selberg et al., 2005; Carlson et al., 2006; Kalaitzakis et al., 2006, 2007; McFadden et al., 2008). So werden ab TL-Gehalten des Leberparenchyms von ca. 100 mg/g FW zwischen 20% und 70% TAG angegeben (Staufenbiel et al., 1992; Selberg et al., 2005; Kalaitzakis et al., 2006, 2007). Diese Unterschiede können sowohl in der biologischen Varianz als auch in der Genauigkeit der Analysenmethoden liegen. Wobei als Genauigkeit der Grad der Übereinstimmung zwischen gemessenem und richtigem Wert definiert ist (DIN, 1999). Ergebnisse werden dann als genau angesehen, wenn sie neben der guten Richtigkeit eine hohe Präzision aufweisen. Leider werden in vielen Publikationen keine detaillierten Angaben dazu und zur Analysenmethode gemacht, so dass eine weitere Interpretation nicht vorgenommen werden kann.

1.3. Morphologische und hämodynamische Veränderungen bei einer Fetteinlagerung in die Leber

Triacylglycerol wird im Cytosol der Leberzelle in Form von Fetttröpfchen gespeichert (Drackley, 1999). Diese Tröpfchen fusionieren, beginnend aus Liposomen als kleine membrangebundene Fettablagerungen, im endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten zu größeren Fetttropfen. Sie liegen dann frei, nicht membrangebunden im Zytoplasma (Gröhn and Lindberg, 1982). Histologisch stellt sich die Fetteinlagerung initial

kleintropfig dar. Nimmt die Fettspeicherung zu, konfluieren diese kleinen Tropfen zu größeren (Cebra et al., 1997; Kalaitzakis et al., 2007), und das Volumen der Hepatozyten nimmt zu (Reid and Collins, 1980; Johannsen et al., 1993). Im Leberläppchen wird das Fett zunächst in die der Zentralvene (zentrolobulär) nahe liegenden Hepatozyten eingelagert. Anschließend folgen bei Fortschreiten der Fettspeicherung die Zellen der intermediären und peripheren Läppchenzone. Höhergradige Leberverfettungen sind histologisch meist durch eine panlobuläre Fettverteilung gekennzeichnet (Herdt et al., 1982; Cebra et al., 1997; Kalaitzakis et al., 2007). Innerhalb des Organs wird das Fett homogen verteilt eingelagert. Fokale Leberverfettungen, wie von Mohamed et al. (2004) beschrieben, sind beim Rind eher selten (Gröhn and Lindberg, 1982; Gaal and Husveth, 1983).

Wie Untersuchungen an geschlachteten oder sezierten Kühen mit hochgradiger Leberverfettung belegen, verursacht die histologisch erfasste Hypertrophie der Hepatozyten eine makroskopisch nachweisbare Hepatomegalie (Reid and Collins, 1980; Johannsen et al., 1993; McGavin and Zachary, 2007; Braun, 2009). Die straffe, bindegewebige Organkapsel (Liebich, 1999) verhindert bei Fortschreiten der Parenchymschwellung eine unbegrenzte Vergrößerung der Leber. Da bei gleichbleibender Oberfläche die Kugel der geometrische Körper mit maximalem Volumen ist, ändert sich die Form des Organs. Die Leberränder stumpfen ab (Maxie, 2007; McGavin and Zachary, 2007; Braun, 2009). Innerhalb des Organs kommt es, wie Untersuchungen an Nagern und Menschen zeigen, infolge der Parenchymschwellung zu einem Druckanstieg mit einer Kompression der Sinusoide (Orrego et al., 1981). Sonographische Untersuchungen ergaben, dass mit zunehmender Fetteinlagerung die Lumina der Lebergefäße enger werden (Iwao, 1987). Dies alles führt offensichtlich zu einer Reduktion der Makro- und Mikrozirkulation in der Leber (Seifalian et al., 1998, 1999; McCuskey et al., 2004; Farrell et al., 2008). So sinken beim Menschen mit zunehmender hepatischer Fetteinlagerung der an der V. portae dopplersonographisch gemessene venöse Pulsatilitätsindex (**VPI**), als Ausdruck einer Reduktion der Elastizität der Gefäßwände innerhalb der Leber, ebenso wie die Blutflussgeschwindigkeit in diesem Gefäß (Gallix et al., 1997; Balci et al., 2008; Erdogmus et al., 2008). Vor allem die Mikrozirkulationsstörungen lösen lokale Ischämien aus (Sun et al., 2003). Beim Rind beschrieben Gröhn and Lindberg (1985) eine Zunahme des Hepatozytenvolumens und Kompression der Sinusoide bisher lediglich bei Tieren mit unterschiedlichen Ketosegraden,

ohne den Leberfettgehalt zusätzlich anzugeben. Allerdings wurde in sonographischen Untersuchungen auch bei Rindern eine Abnahme des Anteils an Gefäßanschnitten im Parenchym und die ausschließliche Darstellbarkeit großer Gefäße mit zunehmender Fetteinlagerung festgestellt (Braun, 1990). Da eine ungehinderte Perfusion entscheidend für die Aufrechterhaltung der Organfunktion ist (Reynolds et al., 1994, 2003), könnte dies die Zunahme der Leberinsuffizienz bei steigender TAG-Einlagerung teilweise erklären.

1.4. Analyse des Leberfettgehaltes

Nach wie vor ist die Untersuchung von Leberbioptaten unentbehrlich für die Erfassung des Leberfettgehaltes (Morrow, 1976; Herdt, 1988; Bobe et al., 2004; Gelfert und Staufenbiel, 2007). Da das eingelagerte Fett innerhalb des Lebergewebes weitgehend homogenen verteilt ist, genügen ein Bioptat und kleine Gewebemassen, um den Verfettungsgrad des Gesamtorgans widerzuspiegeln (Gröhn and Lindberg, 1982; Gaal and Husveth, 1983; Herdt, 1988; West, 1990). Das Lebergewebe kann daher als Schneidnadelbiopsie entnommen werden (Gröhn and Lindberg, 1982; Herdt et al., 1983; Simpson, 1985; Buckley et al., 1986; Herdt, 1988; Scholz et al., 1989; Swanson et al., 2000).

Die Analytik des Leberfettgehaltes aus dem Bioptat kann histologisch (Collins and Reid, 1980; Collins et al., 1985; Johannsen et al., 1988) oder biochemisch (Hara and Radin, 1978; Bickhardt et al., 1988; Veenhuizen et al., 1991) erfolgen. Die Abschätzung des Lipidgehaltes über die Änderung des spezifischen Gewichtes des Lebergewebes (Flotationsmethode) spart die aufwendige histologische und biochemische Aufarbeitung des Bioptates. Sie ist damit ein zwar relativ grober, aber für Praxisbedingungen geeigneter Schnelltest (Herdt et al., 1983). Der Vorteil der Histologie liegt darin, dass über den Verfettungsgrad hinaus Größe und Verteilung der Fetttropfen sowie differentialdiagnostisch relevante pathomorphologische Veränderungen erkannt werden können (Collins and Reid, 1980; Gaal et al., 1983). Der Vorteil der biochemischen Anlayse besteht darin, dass im Gegensatz zu den beiden vorher genannten Verfahren, TL und TAG direkt bestimmt werden können. Üblicherweise wird TL mittels organischer Lösungsmittel aus der Gewebeprobe extrahiert und gravimetrisch erfasst (Folch et al., 1957; Atkinson et al., 1972; Hara and Radin, 1978). Dafür werden

Gewebemassen von bis zu 1 g eingesetzt (Hara and Radin, 1978; Gaal et al., 1983; Kalaitzakis et al., 2007). Für die Analyse von TAG wird dieses zunächst enzymatisch (Bucolo and David, 1973; Ziegenhorn, 1975; Bickhardt et al., 1988) oder biochemisch (Chin et al., 1971; Soloni, 1971) durch Hydrolyse aufgespalten. Anschließend wird es kolorimetrisch (Fletcher, 1968), fluorometrisch (Nemeth et al., 1986) oder mittels high performance liquid chromatography [HPLC (Kruempelman and Danielson, 1982)] quantitativ erfasst. Dies erfolgt üblicherweise in Form von Glycerol unter Verwendung kommerzieller Serum-Testkits (Fletcher, 1968; Foster and Dunn, 1973; Gaal et al., 1983; Drackley et al., 1991, 1992). Dafür sind bisher Gewebemassen von bis zu 10 g verwendet worden (Bulter et al., 1961; Bickhardt et al., 1988).

Die Lebergewebeentnahme mittels Feinnadelbiopsie stellt ein minimal-invasives Verfahren dar (Scholz et al., 1989). Dennoch besteht die Gefahr von Infektionen und Blutungen (Smart and Northcote, 1985; Smith et al., 1997; Swanson et al., 2000). Darüber hinaus ist aus Untersuchungen an Menschen bekannt, dass es sich trotz Lokalanästhesie dabei um einen schmerzhaften Prozess handelt (Eisenberg et al., 2003). Neben diesen Einschränkungen ist die Gewinnung und Analyse eines Leberbioptates mit hohem Arbeits- und Zeitaufwand verbunden. Auch werden fokale Befunde im Leberparenchym wie Granulome, Abszesse, leberegelbedingte Veränderungen und Neoplasien über eine einzige Biopsie meist nicht entdeckt (Pearson and Craig, 1980). Sie setzen die Kombination von bildgebenden Verfahren, wie beispielsweise Ultraschall, mit einer gezielten Punktion voraus (Braun, 2009).

Seit längerem wird daher auch bei Milchkühen nach Alternativen zur Biopsie gesucht. Versuche, den Grad der Leberverfettung über Blut- oder Milchuntersuchungen sowie über Body Condition Scoring oder Rückenfettdickemessungen abzuschätzen, lieferten keine zuverlässigen Ergebnisse (Reid et al., 1983; Staufenbiel et al., 1993; Cebra et al., 1997; Schröder and Staufenbiel, 2006). Daher gilt die biochemische Analyse des Fettgehaltes aus invasiv entnommenen Bioptaten nach wie vor als Goldstandard für die Erfassung des Leberfettgehaltes.

1.5. Methoden zur sonographischen Bestimmung des Leberfettgehaltes

Zur nicht-invasiven Gewebeanalyse innerer Organe hat sich die brightness mode (**B-Mode**) Sonographie sowohl in der Human- als auch Veterinärmedizin bewährt und wurde bereits zur Bestimmung des Leberfettgehaltes beim Rind eingesetzt (Grote, 1992; Lauener, 1993; Acorda et al., 1994a; Delling, 2000; Bobe et al., 2008). Für den Kliniker ist von Vorteil, dass die Sonographie als bildgebendes Verfahren zusätzlich zum geschätzten Leberfettgehalt Hinweise auf fokale Veränderungen im Parenchym sowie pathologische Veränderungen an Lebergefäßen, V. cava caudalis und Gallenblase gibt (Braun, 2009). Die Anwendung der B-Mode-Sonographie in der Fettleberdiagnostik basiert auf zwei Hypothesen. Zum einen geht der Anstieg des Leberfettgehaltes mit einer Größen- und Formänderung des Organs einher (Morrow et al., 1979; Reid and Collins, 1980; Iwao, 1987; Herdt, 1988; Johannsen et al., 1993; Maxie, 2007; McGavin and Zachary, 2007; Braun, 2009), zum anderen führt er zu einer Änderung der Gewebeechotextur (Braun, 1990, 2009; Grote, 1992; Lauener, 1993; Acorda et al., 1994a; Braun and Gerber, 1994).

Aufgrund der individuellen absoluten und relativen Schwankungen der Leberdimensionen zwischen den Tieren, waren Versuche, den Leberfettgehalt über die sonographische Vermessung des Organs zu erfassen, nicht erfolgreich (Grote, 1992; Lauener, 1993; Delling, 2000). Erfahrungen aus B-Mode-Untersuchungen an der Leber zeigten, dass die Echogenität des Parenchyms mit steigendem Fettgehalt zunimmt. Sie erscheint im transkutan aufgezeichneten Ultraschallbild heller (Grote, 1992; Lauener, 1993; Acorda et al., 1994a; Delling, 2000). Von den anderen Texturparametern nehmen Echodichte und Grobkörnigkeit des Echomusters (Grote, 1992; Lauener, 1993) sowie Echoabschwächung bei vermehrter Fetteinlagerung zu (Delling, 2000). Unterschiede scheint es zwischen transkutan und intraoperativ mit direkt am Organ aufgesetzten Schallkopf erhobenen Ultraschallbildern zu geben. So nimmt transkutan nur die Echodichte, intraoperativ aber sowohl Echodichte als auch Grobkörnigkeit der Echos mit steigendem Fettgehalt zu (Delling, 2000). Insgesamt ist es aber auf der Basis subjektiv erhobener Echotexturparameter nur begrenzt möglich, den Leberfettgehalt vorherzusagen (Grote, 1992; Lauener, 1993; Acorda et al., 1994a; Delling, 2000). Darüber hinaus weist die subjektive Beurteilung von Leber-ultraschallbildern selbst bei

erfahrenen Untersuchern hohe inter- und intraindividuelle Unterschiede auf, so dass nur eine geringe Genauigkeit der Ergebnisse erreicht wird (Strauss et al., 2007).

Um die Ergebnisse der subjektiven Beurteilung des Leberfettgehaltes zu verbessern, wurde die digitale quantitative Analyse von Ultraschallbildern in der Humanmedizin mehrfach getestet. Die digitale Analyse verschiedener Echotexturparameter in B-Mode-Bildern der Leber des Rindes erbrachte in der Klassifizierung des Leberfettgehaltes bisher nur mäßige Erfolge (Acorda et al., 1994a; Bobe et al., 2008). So konnten für den Grauwert (Statistik 1. Ordnung) lediglich eine Sensitivität von 38% und eine Spezifität von 88%, für die Tiefendämpfung der Ultraschallwellen von 65% und 85% sowie in Kombination der Parameter von 38% und 100% erreicht werden (Acorda et al., 1994a). Alternativ können neben der quantitativen Änderung von Echotexturparametern (Statistik 1. Ordnung) auch deren räumliche Verteilung (Statistik 2. Ordnung) oder beides in Kombination zur Vorhersage des Leberfettgehaltes herangezogen werden (Bleck, 1998; Bleck et al., 2000). Letzteres wendeten Bobe et al. (2008) in einer Untersuchung zum Leberfettgehalt bei Milchkühen an. Sie führten eine zweistufige Berechnung des Leberfettgehaltes aus 17 B-Mode-Echotexturparametern der ersten und zweiten Grauwertstatistik durch. Im ersten Schritt schätzten sie den Grad der Leberverfettung unter Verwendung einer Diskriminanzfunktion innerhalb von vier Stufen ein. Anschließend bestimmten sie den TAG-Gehalt innerhalb der ermittelten TAG-Klasse mittels Regressionsanalyse. Bei der Unterteilung in vier Fettgehaltsstufen konnte der Leberfettgehalt zu 82% vorhergesagt werden, bei zwei Stufen zu 92%. Die hohe Zahl verwendeter Echotexturparameter und die Tatsache, dass für jede Leberfettgehaltsklasse eine eigene Formel benötigt wurde, machen dieses Vorgehen allerdings sehr aufwendig.

1.6. Erfassung des hepatischen Blutflusses

Für die Erfassung der Leberdurchblutung ist die Indikatorverdünnungsmethode an multikatheterisierten Tieren eine etablierte Technik. Vorausgesetzt, die Rate der Extraktion des Indikators ist gleich der Infusionsrate, kann der Plasmafluss an der Leber nach dem Fick´schen Prinzip aus den arteriellen und venösen Indikatorkonzentrationen berechnet werden (Katz and Bergman, 1969b). Unter Einbeziehung des

Hämatokrits ist daraus die Berechnung des Blutflusses möglich (Roe et al., 1966). Bei Untersuchungen am Rind haben sich vor allem Para-Aminohippursäure (**PAH**) und Bromosulphthalein als Indikatoren durchgesetzt (Huntington et al., 1990; Sangsritavong et al., 2002; Reynolds et al., 2003; Kristensen et al., 2007). Bei dieser Methode müssen zu- (V. portae, A. hepatica) und abführende (Vv. hepaticae) Lebergefäße katheterisiert werden (Katz and Bergman, 1969a; Huntington, 1984). Die Applikation der Verweilkatheter erfolgt im Rahmen einer Bauchhöhlenoperation in linker Seitenlage unter Vollnarkose (Huntington et al., 1989). Auch die als alternativer arterieller Zugang verwendete A. carotis externa muss operativ in die Unterhaut platziert werden (McDowell et al., 1966). Aufgrund der direkten Gefäßzugänge besitzt die Methode den Vorteil, dass neben dem Blutfluss auch Stoffumsätze an der Leber erfasst werden können. Solange die Katheter funktionstüchtig sind, können mit dieser Methode problemlos wiederholte Messungen an einem Tier über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden (Eisemann et al., 1987; Huntington et al., 1989; Lapierre et al., 2000; Sangsritavong et al., 2002; Reynolds et al., 2003; Kristensen et al., 2007). Von Nachteil ist, dass der chirurgische Eingriff Stress für das Tier bedeutet, und die Operationstechnik schwierig und zeitaufwendig ist. Wie jede Abdominal-operation kann sie mit postoperativen Komplikationen, wie Peritonitis verbunden sein. Hinzu kommt die Gefahr des irreparablen Ausfalls der Katheterfunktion (Huntington et al., 1989; Olesen et al., 1989). Auch können die Katheter frühestens nach einer postoperativen Rekonvaleszenz von sieben Tagen benutzt werden (Symonds and Baird, 1973; Huntington et al., 1989). Eine temporäre Anwendung zur Klärung pathophysiologischer oder pharmakotherapeutischer Fragestellungen am Patienten scheidet damit aus. Die Indikatorverdünnungsmethode setzt eine optimale Mischung des infundierten Farbstoffs und die Bestimmung von dessen Konzentration während der Infusion voraus. Daher ist es sinnvoll, den mittleren Fluss aus mehreren Entnahmezeitpunkten zu berechnen. Pulsatile oder sich innerhalb von Sekunden oder Minuten abspielende Änderungen des Flusses können nicht erfasst werden (Eisemann et al., 1987).

Alternativ können operativ elektromagnetische oder dopplersonographische Flusssonden direkt an der V. portae positioniert werden, um den hepatischen Blutfluss zu erfassen (Ashley et al., 1992). Bei ersteren wird der Blutfluss anhand der Änderung des elektromagnetischen Feldes in einer das Blutgefäß umgebenden stromdurchflossenen Spule gemessen. Dies wurde bereits zur Messung der Leberdurchblutung bei Schafen

(Prewitt et al., 1975), Ziegen (Barry et al., 1979) und Kälbern (Durand et al., 1988; Ortigues et al., 1995, 1996) eingesetzt. Dopplersonden nutzen den so genannten Dopplereffekt. Dabei wird ein Ultraschallstrahl unter möglichst flachem Winkel auf ein Blutgefäß ausgesendet. Trifft er auf ein bewegtes Teilchen (Erythrozyten), erfährt er eine Frequenzänderung und wird reflektiert. Diese Frequenzverschiebung wird aufgezeichnet und darüber die Flussgeschwindigkeit des Teilchenstroms (Blutfluss) berechnet (Dudwiesus et al., 1993). Vergleiche der mittels moderner elektromagnetischer (Durand et al., 1988) oder Doppler-Sonden (Remond et al., 1998) erfassten Blutflüsse mit denen der Indikatormethode zeigten in Untersuchungen bei verschiedenen Spezies an unterschiedlichen Gefäßen, Geweben oder Organen eine gute Übereinstimmung. Auch an der V. portae von Schafen (Remond et al., 1993) und Rindern wurden derartige Sonden bereits zur Blutflussmessung eingesetzt (Durand et al., 1988; Huntington et al., 1990; Girard et al., 2009). Sie haben den Vorteil, dass Flüsse direkt ohne chemische Analyse einer Indikatorsubstanz über längere Zeit aufgezeichnet werden können und auch kurzfristige Flussänderungen relativ sensitiv erkannt werden (Eisemann et al., 1987; Durand et al., 1988; Girard et al., 2009). Sollen Stoffumsätze erfasst werden, müssen zusätzlich Gefäßzugänge gelegt werden. Da aber die Sondenplatzierung operativ erfolgt, wird dies in den meisten Fällen in einem Arbeitsschritt durchgeführt. Nachteile sind auch bei diesem Vorgehen der für die Operation notwendige Aufwand und die damit verbundene Möglichkeit von Komplikationen. Auch diese Methode ist damit für eine temporäre Anwendung am Patienten ungeeignet.

Als nicht-invasive Methode der Blutflussmessung hat sich die transkutane Dopplersonographie bewährt. Sie ermöglicht eine quantitative Analyse der Hämodynamik und wurde bereits zur Messung des portalen Blutflusses in der Humanmedizin (Ignee et al., 2002; O'Donohue et al., 2004; Balci et al., 2008; Erdogmus et al., 2008) und beim Kleintier eingesetzt (Szatmari et al., 2003, 2004a, b; Sartor et al., 2010). Beim Rind gibt es bereits zahlreiche dopplersonographische Untersuchungen u.a. am Herzen (Buczinski et al., 2006; Hallowell et al., 2007), am Genitalapparat und am Euter (Honnens et al., 2008a, b, 2009; Bollwein et al., 2010; Götze et al., 2010). Die Lebergefäße des Rindes wurden bisher mittels Dopplersonographie nicht untersucht. Von Vorteil ist bei dieser Methode, dass es sich um ein real-time Verfahren handelt, welches primär nicht-invasiv ist. Kurzfristige Flussänderungen können auch bei wiederholten Untersuchungen sicher erfasst werden. Allerdings ist es ohne weitere Katheterisierung von

Gefäßen nur möglich die Hämodynamik, nicht aber Stoffumsätze zu erfassen. Ebenso ist die Methode für Langzeituntersuchungen ungeeignet.

1.7. Einsatz von Glucocorticoiden in der Behandlung des Lipomobilisationssyndroms

In der Behandlung des Lipomobilisationssyndroms von Milchkühen sind Glucocorticoide etabliert. Ihre klinische Wirksamkeit wurde mehrfach geprüft (Metzner et al., 1993; Shpigel et al., 1996). Sie induzieren einen Anstieg der Glucose- und einen Abfall der Ketonkörperkonzentration im Plasma (McDowell, 1983; Andersson and Olsson, 1984; Brockman and Laarveld, 1986b; Wierda et al., 1987; Shpigel et al., 1996; Maciel et al., 2001; Jorritsma et al., 2004; Fürll und Jäckel, 2005). Die Aussagen der Literatur zu den Effekten einer Glucocorticoidbehandlung auf die Stimulation der Gluconeogenese beim Wiederkäuer sind nicht kongruent. Vor allem in älteren Arbeiten wurde eine Anregung der Gluconeogenese in der Leber nach einer Behandlung mit Glucocorticoiden unterstellt (Baird and Heitzman, 1969; Hamada et al., 1987). Diese Theorie geht auf Studien zurück, die *in vivo* (Seitz et al., 1976; Allan and Titheradge, 1984; Fleig et al., 1984) und *in vitro* (Exton et al., 1976; Krone et al., 1976; Sistare and Haynes, 1985; Jones et al., 1993) an Ratten durchgeführt wurden. In den Untersuchungen an gesunden (Baird et al., 1968; Baird and Heitzman, 1969, 1970) und ketotischen (Baird and Heitzman, 1971) Milchkühen wurde nach Glucocorticoidbehandlung zunächst lediglich eine Konzentrationserhöhung der Zwischenstufen des Citratzyklus in den Hepatozyten festgestellt. Genannte Autoren konnten aber nicht in jedem Falle Steigerungen der Aktivitäten der Schlüsselenzyme der Gluconeogenese, wie von Jitrapakdee et al. (1999), Pilkis und Granner (1992) oder Kraus-Friedmann (1984) beschrieben, nachweisen. Daher unterstützten auch Baird und Heitzman bereits 1971 die von Bassett et al. (1966) für Schafe aufgestellte These, wonach die Hyperglycaemie nach Dexamethason (**DEXA**)-Behandlung auch beim Rind durch das Unvermögen peripherer Gewebe bedingt ist, Glucose aufzunehmen. Jüngere Untersuchungen an Kälbern untermauerten diese Vermutung, da die hepatische Gluconeogenese durch Glucocorticoidbehandlung nicht gesteigert werden konnte (Scheuer et al., 2006). Untersuchungen an Hunden (Gauthier et al., 1986) und Nagern lassen sogar eine Verringerung der Gluconeogenese nach Glucocorticoidbehandlung vermuten (Viana et al., 2006).

Vergleichbare Untersuchungen zur Glucoseproduktion an der Leber des erwachsenen Rindes unter Glucocorticoideinfluss fehlen bisher. Die Alternative, wonach die Reduktion des Verbrauchs an Glucose in der Körperperipherie (Muskel- und Fettgewebe) für die Erhöhung der Glucoseblutspiegel nach Glucocorticoidbehandlung verantwortlich ist (Bassett et al., 1966), wird durch die Erkenntnis bestätigt, dass es bei Ratten nach Glucocorticoidapplikation zu einer peripheren Insulinresistenz kommt (Qi et al., 2004). Mittlerweile haben Clamp-Untersuchungen an mehreren Spezies dies bestätigt, so beim Menschen (Tappy et al., 1994; Andrews and Walker, 1999; Nicod et al., 2003; Binnert et al., 2004), an Pferden (Tiley et al., 2007, 2008; Haffner et al., 2009), Hunden (Chap et al., 1986), Kälbern (Sternbauer et al., 1998; Scheuer et al., 2006) und jüngst auch an Kühen (Kusenda et al., 2011a). Die Hemmung der insulinabhängigen Glucoseverwertung nach Glucocorticoidbehandlung wird bisher mit einer Beeinflussung des zellulären Glucosetransportsystems und einer Reduktion der intrazellulären Glucoseoxidation in diesen Geweben erklärt (Tappy et al., 1994).

Als weiterer, klinisch positiver Effekt nimmt unter Glucocorticoidbehandlung der Leber-Glycogengehalt zu (Baird and Heitzman, 1969; Fürll und Fürll, 1998). Zum Leberfettgehalt gibt es unterschiedliche Angaben. So konnten einige Autoren eine Abnahme (Fürll und Fürll, 1998), andere wiederum keine Änderung feststellen (Jorritsma et al., 2004). Auch zum Verhalten der NEFA-Konzentrationen im Plasma nach Glucocorticoidbehandlung differieren die Angaben. So sprechen einige Autoren von einer Abnahme (McDowell, 1983; Andersson and Olsson, 1984; Brockman and Laarveld, 1986b; Wierda et al., 1987; Shpigel et al., 1996; Maciel et al., 2001; Fürll und Jäckel, 2005), andere Untersucher beobachteten keine Änderung der NEFA-Konzentration im Plasma (Baird et al., 1972; Shpigel et al., 1996; Rehage et al., 2002; Jorritsma et al., 2004). Übereinstimmend wurde speziesübergreifend eine Erhöhung des Insulinspiegels nach Glucocorticoidapplikation nachgewiesen [Hund (Chap et al., 1986); Mensch (de Jongh et al., 2004); Rind (Hammon et al., 2003, 2005; Jorritsma et al., 2004; Fürll und Jäckel, 2005)]. Diese Hyperinsulinaemie führt aufgrund der antilipolytischen Wirkung des Hormons zu einer Reduktion der NEFA-Freisetzung aus den Fettdepots. Ebenso wird dem Insulin eine Anregung der Glycogensynthese in der Leber unterstellt (Baird and Heitzman, 1971; McDowell, 1983).

Hinweise auf den Einfluss von Glucocorticoiden auf die Durchblutung der Leber gibt es bisher lediglich aus der Humanmedizin. Demnach kommt es unter dem Einfluss von endogenem Cortisol zu einer Erhöhung des Blutdruckes infolge eines positiven inotropen Effekts am Herzen und einer Vasokonstriktion von peripheren Gefäßen (Andrews and Walker, 1999; Dodt et al., 2009). Der physiologische Hintergrund dabei ist, den lebenswichtigen, zentralen Organen, wie Leber und Gehirn, kurzfristig Nährstoffe zur Verfügung zu stellen. Die Erhöhung des Herzminutenvolumens (Sambhi et al., 1965) und der Leberdurchblutung (Myers and Taylor, 1952) konnte auch nach Glucocorticoidbehandlung bestätigt werden. Darüber hinaus wird Glucocorticoiden eine Dämpfung der physiologischen vasodilatatorischen Effekte von Insulin an der Muskulatur unterstellt (Scherrer et al., 1993). Beim Rind wurde bisher lediglich eine Reduktion der Euterdurchblutung nach Glucocorticoidbehandlung festgestellt (Hartmann and Kronfeld, 1973). Weitere Untersuchungen sind bis jetzt in der gesichteten Literatur (pubmed-Suche am 23.1.2011 mit den Stichwörtern: cattle, cow, blood flow, glucocorticoide, dexamethason) nicht vermerkt.

1.8. Problemstellung und Zielsetzung

Aufgrund der Bedeutung des Lipomobilisationssyndroms für die Milchkuh und des aktuellen Wissensstandes zu diesem Thema ergeben sich aus klinischer Sicht für die folgende Arbeit zwei Ansatzpunkte. Zum Ersten sollen *morphologische und hämodynamische Veränderungen an der Leber von Kühen mit Leberverfettung* und zum Zweiten *Effekte der üblicherweise bei Kühen mit Lipomobilisationssyndrom durchgeführten Glucocorticoidbehandlung* untersucht werden. Darüber hinaus sollen die diagnostischen Voraussetzungen geschaffen werden, um diese Fragestellungen zukünftig auch auf Bestandsebene zu bearbeiten.

Für die Bearbeitung des Themas ist zunächst die genaue Kenntnis des Leberfettgehaltes des Einzeltieres Voraussetzung. Goldstandard dafür ist nach wie vor die biochemische Bestimmung von TL und TAG im Lebergewebebioptat. Neben erhöhtem Arbeits- und Zeitaufwand für Gewinnung und Aufarbeitung großer Leberbioptate ist es auch aus Gründen des Tierschutzes erstrebenswert, dabei die eingesetzte Bioptatmenge ohne Verlust an analytischer Genauigkeit zu reduzieren. Darüber hinaus besteht Bedarf an einer nicht-invasiven, real-time Methode zur Bestimmung des Leberfettgehaltes bei Milchkühen, zum einen als Alternative zum Gewebebioptat, zum anderen als Verfahren zur routinemäßigen Anwendung an größeren Tierzahlen im Bestand.

Obwohl die Zunahme der Größe und Änderung der Form der Leber im Zusammenhang mit einer vermehrten Fetteinlagerung grundsätzlich vorausgesetzt wird, gibt es bisher keine kontrollierten Studien, in welchen diese Hypothese an Kühen bestätigt wurde. Ebenso gibt es für das Rind keine Untersuchungen zum hepatischen Blutfluss in Bezug zum Leberfettgehalt. Hinweise aus der Humanmedizin, wonach es in Abhängigkeit vom steigenden Leberfettgehalt zu Änderungen des hepatischen Blutflusses kommt, könnte einen Beitrag zur Klärung der Störung der Leberfunktion beim Lipomobilisationssyndrom leisten.

Nachdem die Effekte einer Glucocorticoidbehandlung auf die Glucoseutilisation mittels Clamp-Technik bereits bei Kälbern und jüngst auch Kühen untersucht wurden, fehlen Studien zu deren Wirkungsweise an der Leber von Milchkühen. Aufgrund der zentralen Stellung dieses Organs sind gerade derartige Untersuchungen sowie zur Physiologie und Beeinflussbarkeit der Organfunktion von großem klinischen Interesse. Daher besteht Bedarf an der Entwicklung einer minimal-invasiven Untersuchungstechnik zur

Erfassung der Nettoentnahme bzw. -abgabe von Substraten an der Leber, welche auch temporär am Patienten eingesetzt werden kann und mit welcher derartige Fragestellungen bearbeitet werden können.

Ziele der vorliegenden Arbeit sind daher:

- Etablierung einer genauen Analysenmethode für den Leberfettgehalt aus kleinen Organproben mit geringer Masse
- Entwicklung einer auf der B-Mode-Sonographie basierenden digitalen Methode zur nicht-invasiven Erfassung des Leberfettgehaltes
- Untersuchung der Veränderung der Leberdimension und –form sowie des hepatischen Blutflusses bei Kühen mit unterschiedlichem Grad der Leberverfettung
- Entwicklung einer minimal-invasiven Methode zur Erfassung der Nettoentnahme bzw. -abgabe von Substraten an der Leber
- Quantitative Erfassung der Glucosenettoabgabe an der Leber nach Glucocorticoidbehandlung.

2. Ergebnisse

2.1. Entwicklung einer Methode zur Analyse des Totallipid- und Triacylglycerolgehaltes in der Leber bei Milchkühen

Starke, A., A. Haudum, R. Busche, M. Beyerbach, S. Dänicke, and J. Rehage (2010). Technical note: Analysis of total lipid and triacylglycerol content in small liver biopsy samples in cattle. J. Anim. Sci. 88(8):2741-50

Das Ziel dieser Studie war es, eine Methode zur Analyse des Leberfettgehaltes aus einer geringen Gewebemasse (<100 mg) zu entwickeln, welche hohe Präzision und Richtigkeit der Ergebnisse gewährleistet. Es sollte damit möglich sein, sowohl den TL als auch den TAG in zwei aufeinander folgenden Arbeitsschritten zu erfassen.
In einem ersten Teil der Studie wurden Lebergewebeproben von 10 Deutsch-Holstein-Milchkühen mit linksseitiger Labmagenverlagerung (left side displaced abomasum - **LDA**) zur Methodenentwicklung verwendet. Die Entnahme der Lebergewebeproben erfolgte im Zuge der Omentopexie (Dirksen, 1967). Das Lebergewebestück wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei –80 °C tiefgefroren. Der TL-Gehalt wurde gravimetrisch und der TAG-Gehalt anschließend enzymatisch an einem Analysenautomaten aus dem TL-Extrakt bestimmt. Für die gravimetrische TL-Analyse in Milligramm pro Gramm FW wurde TL aus der homogenisierten Gewebeprobe mittels Hexan:Isopropanol (3:2, 20 °C, 24 h) extrahiert. Die Routinemethode wurde durch einen zusätzlichen Hexanextraktionsschritt ergänzt, um die Lipidextraktion zu optimieren. Im Anschluss wurde die Lipidtrockensubstanz mit Hexan resuspendiert und dem TL-Gehalt entsprechend aliquotiert. Um eine vollständige Hydrolyse der TAG sicherzustellen, wurden diese Aliquots unter Einsatz einer mikrobiellen Lipase und des Detergenz Nonaethylene glycol monododecyl ether (**Lubrol**) 16 h inkubiert. Die enzymatische TAG-Analyse erfolgte anschließend mittels eines kommerziellen Testkits. Zur Qualitätskontrolle wurde Triolein als interner Standard verwendet.
Wiederholte TL-Analysen (n = 3) von Gewebeproben der 10 Kühe (TL-Spannweite: 40 – 314 mg/g FW) ergaben einen mittleren Variationskoeffizienten (coefficient of variation - **CV**) von 2,2%, während die wiederholten TAG-Analysen (TAG-Spannweite: 4 – 260 mg/g FW) einen mittleren Intraday-CV von 2,5% (n = 5) und einen mittleren Interday-CV von 3,4% (n = 4) ergaben. Intraday-CV (n = 5) und Interday-CV (n = 4) für die wiederholten Messungen des TAG im Trioleinstandard waren <1% bzw. <3%. Die

Wiederfindungsrate von TAG im Trioleinstandard variierte zwischen 99% und 103%. Um die Methode an einer größeren Menge an Proben zu verifizieren, wurden in einem zweiten Teil der Studie TL und TAG aus Lebergewebeproben von 150 Deutsch-Holstein-Kühen bestimmt. Für die TL-Analyse wurden drei, für die TAG-Analyse fünf Wiederholungsmessungen mit einem mittleren CV von <2,8% bzw. <1,5% durchgeführt. Das Verhältnis von TAG relativ zu TL nahm bis zu einem Scheitelpunkt, welcher bei ca. 100 mg TL/g FW lag, linear zu. An diesem Punkt erreichte das Verhältnis von TAG relativ zu TL ein Plateau bei ca. 68%. Das zeigt, dass bei weiterer Zunahme des TL ab diesem Punkt auch andere Fettfraktionen innerhalb der Leber akkumulieren. Mittels eines broken-line Modells ($r^2 = 0,98$) ist es mit sehr hoher Sicherheit möglich, den TAG-Gehalt aus dem TL-Gehalt zu berechnen. Ab einem TL von ca. 40 mg/g FW weicht der berechnete TAG nur etwa ±15% vom gemessenen TAG ab.
Die hier beschriebene Methode ermöglicht somit, den TL- als auch TAG-Gehalt aus einem Leberbioptat geringer Masse (<100 mg) mit hoher Genauigkeit zu bestimmen.

2.2. Die computergestütze Analyse des Leberfettgehaltes bei Milchkühen mittels kalibrierter B-Mode-Ultraschallbilder

Thijssen, J. M., A. Starke, G. Weijers, A. Haudum, K. Herzog, P. Wohlsein, J. Rehage, and C. L. De Korte (2008). Computer-aided B-mode ultrasound diagnosis of hepatic steatosis: A feasibility study. IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control. 55(6):1343-54

Starke, A., A. Haudum, G. Weijers, K. Herzog, P. Wohlsein, M. Beyerbach, C. L. De Korte, J. M. Thijssen, and J. Rehage (2010). Noninvasive detection of hepatic lipidosis in dairy cows with calibrated ultrasonographic image analysis. J. Dairy Sci. 93:2952–2965

Weijers, G., A. Starke, A. Haudum, J. M. Thijssen, J. Rehage and C. L. De Korte (2010). Interactive vs. automatic ultrasound image segmentation methods for staging hepatic lipidosis. Ultrasonic Imaging 32:143-153

Das Ziel dieser Untersuchung war die Entwicklung und Etablierung einer auf der B-Mode-Sonographie basierten, nicht-invasiven, computergestützten Methode zur Bestimmung des Leberfettgehaltes bei Milchkühen. Die Studie gliedert sich in drei Abschnitte. Zunächst wurde ein Computerprogramm [Computer-Aided Ultrasound Diagnosis (**CAUS**)] zur Analyse des Leberfettgehaltes an einer kleinen Tierzahl (n = 12) entwickelt (Thijssen et al., 2008) und an einer größeren Tierzahl überprüft (n = 151) (Starke et al., 2010b). Im Folgenden wurde weiter an Optimierung und Handhabung des Programms CAUS gearbeitet (Weijers et al., 2010).
Für die Entwicklung und weitere Überprüfung der Methode wurden Deutsch-Holstein-Kühe mit LDA verwendet. Die LDA wurde mittels Laparotomie und Omentopexie behoben (Dirksen, 1967). Vor und während der Operation wurden Ultraschallbilder (n = 5) von der Leber mit standardisierter Gerätegrundeinstellung aufgezeichnet (Power Vision 6000, Toshiba, Tokio/Japan, Konvexsonde; B-Mode, 4.2 MHz). Während der Operation wurde eine Leberbiopsie entnommen. Der TAG-Gehalt diente als Goldstandard des Leberfettgehaltes. In der pathohistologischen Untersuchung des Lebergewebes wurden über die Leberverfettung hinausgehende Parenchymveränderungen ausgeschlossen. Basierend auf den intraoperativ und transkutan aufgezeichneten

Ultraschalldatensätzen (n = 12) wurde eine für diese Anwendung spezifische Software zur computergestützten Ultraschallanalyse (CAUS) entwickelt. Dabei dienten ein kommerzielles Ultraschallphantom sowie Leberultraschallbilder von Kühen ohne vermehrte Fetteinlagerung in die Leber zur Kalibrierung. Über verschiedene innovative pre- und postprocessing Schritte wurden die transkutanen Ultraschalldatensätze bearbeitet, um den Einfluss von aufnahme- und gerätebedingten Artefakten (tiefenabhängige Speckleform, –größe und Grauwertdämpfung) sowie der Bauchwand (Grauwertdämpfung) auszuschließen. Dafür wurden die Bildgrauwerte in logarithmische Echolevel (decibel, dB) übertragen. Dies ermöglichte die Korrektur der transkutan aufgezeichneten Ultraschalldatensätze.

Im Ergebnis entstand ein Programm (CAUS), welches die Möglichkeit der nicht-invasiven Fettgehaltsvorhersage von transkutan aufgezeichneten B-Mode-Ultraschallbildern auf der Basis kalibrierter Datensätze eröffnet. Bei der Überprüfung von CAUS an den transkutan aufgezeichneten B-Mode-Bildern von 151 Deutsch-Holstein-Kühen (TAG-Spannweite: 4,6 – 292,4 mg/g FW) wurden hohe Korrelationen zwischen TAG und den Ultraschallparametern mittlerer Echolevel (**MeanEcho**) (r = 0,59) und Residual attenuation (**ResAtt**) (r = 0,80) gefunden. Beide Parameter korrelierten auch untereinander (r = 0,76). Die 151 untersuchten Kühe wurden randomisiert in ein Trainingsset (n = 76) und ein Testset (n = 75) unterteilt. Aus den Daten des Trainingssets (n = 76) wurde mittels schrittweiser multipler Regressionsanalyse eine auf der Verwendung von ResAtt (r^2 = 0,69) basierende Formel zur Vorhersage des TAG erstellt. Unter Einbeziehung der berechneten TAG des Testsets (n = 75) wurde eine Receiver Operating Characteristic (**ROC**)-Analyse durchgeführt, um die Genauigkeit und den Vorhersagewert der Regressionsformel zu prüfen. Die auf der ROC-Analyse basierende Fläche unter der Kurve für die Unterscheidung verschiedener Fettgehaltsstufen war 0,94 (<50 vs. ≥50 mg TAG/g FW), 0,83 (<100 vs. ≥100 mg TAG/g FW) und 0,97 (<50 vs. >100 mg TAG/g FW). Im Folgenden wurde an den transkutan und intraoperativ aufgezeichneten Ultraschalldatensätzen (n = 151) geprüft, inwiefern eine automatische Selektion von Blutgefäßanschnitten in den B-Mode-Bildern gleiche oder bessere Ergebnisse als die manuelle Selektion liefert. Dafür wurden zunächst die B-Mode-Bilder unabhängig voneinander von zwei Untersuchern manuell mit CAUS ausgewertet. Es konnte festgestellt werden, dass mit steigendem Leberfettgehalt weniger Gefäßanschnitte im Ultraschallbild sichtbar waren und damit weniger Bildanteile herausselektiert werden mussten. Die entwickelte Methode zur automatischen Selektion der

Gefäßanschnitte wurde mit dem zeitaufwendigen, manuellen Prozedere verglichen. Neben einer hohen Korrelation der Ultraschallparameter (MeanEcho: r = 0,99; ResAtt: r = 0,98) zwischen den beiden Untersuchern, konnten im Vergleich zur manuellen Selektion der Gefäßanschnitte die Korrelationen der Parameter zum TAG noch verbessert werden (MeanEcho: r = 0,63; ResAtt: r = 0,81).

Mit CAUS steht damit ein Computerprogramm zur digitalen Analyse von transkutan aufgezeichneten Ultraschallbildern zur Verfügung, welches es ermöglicht, den Leberfettgehalt untersucherunabhängig und nicht-invasiv zu erfassen. Durch die Verwendung von ausschließlich ResAtt als einzigem Ultraschallparameter in der Regressionsformel ist CAUS ideal für die praktische Anwendung geeignet. Aufgrund der automatisierten Arbeitsschritte ist die Software benutzerfreundlich und für den praktischen Einsatz zum Screening des Leberfettgehaltes im Rahmen der Gesundheitsüberwachung von Milchviehherden geeignet. Darüber hinaus hat diese Studie Modellcharakter für die Fettleberdiagnostik in der Humanmedizin.

2.3. Sonographische Untersuchungen zu Form und Größe der Leber von Milchkühen mit unterschiedlichem Leberfettgehalt

Haudum, A., A. Starke, M. Beyerbach, P. Wohlsein, and J. Rehage (2011). Ultrasonographic assessment of liver dimensions in dairy cows with different hepatic triacylglycerol content. J. Anim. Sci. 89:1392–1400

Ziel der Untersuchung war es, die Änderungen von Form und Größe der Leber von Milchkühen in Abhängigkeit vom TAG-Gehalt des Organs sonographisch zu erfassen. Darüber hinaus wurde die Eignung der sonographisch erfassten Dimensionsparameter zur Vorhersage des Leberfettgehaltes geprüft.

Die Untersuchung wurde an 133 Deutsch-Holstein-Kühen mit LDA durchgeführt. Die Tiere wurden mittels Omentopexie operiert (Dirksen, 1967). Die Leber der Tiere wurde transkutan sonographisch untersucht (Power Vision 6000, Toshiba, Tokio/Japan, Konvexsonde, B-Mode, 4,2 MHz), um raumfordernde Prozesse (Abszesse, Tumoren) innerhalb des Organs auszuschließen. Darüber hinaus wurden der Leberwinkel am ventralen Rand des Organs, die Dicke des Organs über der V. portae und der V. cava caudalis sowie die Längenausdehnung der Leber im 10. und 11. Interkostalraum sonographisch vermessen (Linearsonde, B-Mode, 6 MHz). Eine intraoperativ entnommene Lebergewebeprobe diente zur biochemischen Analyse des TAG (Starke et al., 2010a) als Goldstandard für den Leberfettgehalt sowie zum histologischen Ausschluss von über die Fetteinlagerung hinausgehenden Parenchymveränderungen. Die 133 Kühe (TAG-Spannweite: 5 - 292 mg/g FW) wurden in Abhängigkeit vom Leber-TAG-Gehalt in vier Gruppen eingeteilt (TAG >150 mg/g FW, n = 32; >100 – 150 mg/g FW, n = 34; ≥50 – 100 mg/g FW, n = 38; <50 mg/g FW, n = 29).

Zwischen den sonographisch erfassten Dimensionsparametern der Leber und dem TAG wurden, wenn auch teils geringgradige, aber durchweg positive Korrelationen gefunden (r = 0,26 – 0,49). Das weist auf eine Zunahme der Lebergröße bei gleichzeitigem Abstumpfen der Organränder mit zunehmendem Leberfettgehalt hin. Die mittleren, sonographisch gemessenen Dimensionsparameter der Leber unterschieden sich zwischen den Kühen der unterschiedlichen TAG-Klassen ($P < 0{,}001$), wobei die Tiere in der Klasse mit einem TAG von >150 mg/g FW die höchsten Werte aufwiesen. Für die schrittweise multiple lineare Regressionsanalyse ($r^2 = 0{,}34$, $P < 0{,}001$) ebenso wie für die schrittweise Diskriminanzanalyse wurden neben den im 10. Interkostalraum

erfassten Leberdimensionsparametern, lediglich das Alter der Tiere verwendet. Die Ergebnisse der Regressionsanalyse zeigten, dass bei der Vorhersage des TAG die TAG-Gehalte in den niedrigen Fettgehaltsstufen deutlich über- und in den hohen unterschätzt werden. Die, basierend auf der Diskriminanzanalyse, für die Differenzierung zwischen den TAG-Klassen ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten lagen bei 0,61 und 0,61 (<50 vs. ≥50 mg/g FW), 0,67 und 0,71 (<50 vs. ≥100 mg/g FW), 0,83 und 0,82 (<50 vs. ≥150 mg/g FW), 0,70 und 0,77 (<100 vs. ≥100 mg/g FW), und 0,83 und 0,85 (<100 vs. ≥150 mg/g FW).

Die Ergebnisse zeigten, dass die Leber des Rindes ab einem TAG von etwa 100 mg/g FW an Größe zunimmt, und die Organränder abrunden. Eine deutliche Zunahme dieser Formveränderung ist bei den Kühen mit dem höchsten Leberfettgehalt (TAG >150 mg/g FW) zu verzeichnen. Aufgrund der hohen Varianz zwischen den Tieren ist der diagnostische Wert dieser sonographisch erfassbaren Größenzunahme des Organs und Änderung des Leberwinkels zur Vorhersage des Leberfettgehaltes bei Milchkühen jedoch begrenzt.

2.4. Dopplersonographische Untersuchungen zum portalen Blutfluss bei Milchkühen mit unterschiedlichem Leberfettgehalt

Starke, A., S. Schmidt, A. Haudum, T. Scholbach, P. Wohlsein, M. Beyerbach, and J. Rehage (2011). Evaluation of portal blood flow using transcutaneous and intraoperative Doppler ultrasonography in dairy cows with fatty liver. J. Dairy Sci. 94:2964–2971

Das Ziel der Untersuchung war es, den Blutfluss an der V. portae [portal blood flow (**PBF**)] bei Kühen mit unterschiedlichem Leberfettgehalt dopplersonographisch zu erfassen.

In die Studie wurden 80 laktierende Deutsch-Holstein-Kühe vor dem 100. Laktationstag einbezogen. Alle Kühe litten an einer LDA und wurden mittels Omentopexie operiert (Dirksen, 1967). Vor der Operation wurde die Leber der Tiere transkutan sonographisch untersucht (Power Vision 6000, Toshiba, Tokio/Japan, Konvexsonde, B-Mode, 4,2 MHz), um Stauungserscheinungen an der V. cava caudalis und innerhalb des Organs sowie raumfordernde Prozesse (Abszesse, Tumoren) im Parenchym auszuschließen. Darüber hinaus wurden die Leberdimensionen sonographisch vermessen (Haudum et al., 2011). Der PBF wurde dopplersonographisch sowohl transkutan als auch intraoperativ direkt von der Leberoberfläche aus erfasst. Die Blutflussgeschwindigkeiten [velocities (peak maximum (**v_{max}**), peak minimum (**v_{min}**), mean maximum (**v_{mean}**)] wurden aufgezeichnet und daraus der VPI berechnet. Da bei 58 der 80 Kühe während der transkutanen Ultraschalluntersuchung kein Dopplersignal aufgezeichnet werden konnte, wurden lediglich die intraoperativ aufgezeichneten Bilder weiter ausgewertet. Eine intraoperativ entnommene Lebergewebeprobe diente zur biochemischen Analyse des TAG (Starke et al., 2010a) als Goldstandard für den Leberfettgehalt sowie zum histologischen Ausschluss von über die Fetteinlagerung hinausgehenden Parenchymveränderungen.

Die 80 Kühe wurden ihrem Leber-TAG-Gehalt (TAG-Spannweite: 5 - 292 mg/g FW) entsprechend in Fettgehaltsklassen eingeteilt (TAG >150 mg/g FW, n = 27; >100 – 150 mg/g FW, n = 18; ≥50 – 100 mg/g FW, n = 19; <50 mg/g FW, n = 16). Mit zunehmendem TAG nahm bei den Tieren der VPI ab (r = -0,55). Der VPI unterschied sich zwischen den Kühen der beiden höchsten TAG-Klassen nicht, aber zwischen den Tieren dieser Klassen und denen mit einer gering- bis mittelgradigen Leberverfettung. Die Blutflussgeschwindigkeiten (v_{mean}, v_{min}, v_{max}) korrelierten negativ mit dem TAG-

Gehalt (r = -0,26 bis -0,37). Die mittlere Blutflussgeschwindigkeit war bei den Kühen der höchsten TAG-Klasse (>150 mg/g FW) am niedrigsten. Die Blutflussparameter korrelierten negativ mit den Leberdimensionsparametern (r = -0,06 bis -0,35).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der geringere VPI und die niedrigeren Blutflussgeschwindigkeiten bei Kühen mit vermehrter Fetteinlagerung ebenso wie deren negative Korrelationen mit dem TAG-Gehalt durch eine reduzierte Elastizität der Gefäße innerhalb der Leber (compliance) erklärt werden können. Offensichtlich beeinflusst auch die Kompression der Sinusoide und der Blutgefäße innerhalb der Leber die Organdurchblutung. Diese Veränderungen sind wahrscheinlich auf die Parenchymschwellung zurückzuführen. Sie werden besonders deutlich, wenn der TAG-Gehalt 150 mg/g FW übersteigt.

2.5. Entwicklung einer Methode zur minimal-invasiven Katheterisierung der V. portae, V. hepatica, V. mesenterica cranialis und der Aorta abdominalis zur quantitativen Erfassung des hepatischen Stoffwechsels bei Milchkühen

Starke, A., K. Wussow, L. Matthies, M. Kusenda, R. Busche, A. Haudum, A. Beineke, C. Pfarrer, and J. Rehage (2012). Minimally-invasive catheterization of the portal, hepatic and cranial mesenteric veins and the abdominal aorta for quantitative determination of hepatic metabolism in dairy cows. Vet. J. 192:403-411

Das Ziel dieser Studie war die Etablierung einer minimal-invasiven Technik zur Katheterisierung intraabdominaler Blutgefäße, um Nettoentnahme bzw. -abgabe von Substraten an der Leber quantitativ zu erfassen.
Am ersten Tag der Untersuchung wurde acht klinisch gesunden Deutsch-Holstein-Kühen unter sonographischer Führung je ein Katheter in die V. portae, V. hepatica und V. mesenterica cranialis implantiert. Ein weiterer Katheter wurde in die Aorta abdominalis gelegt. Die Durchgängigkeit der Katheter wurde von Tag 1 bis 14 täglich geprüft. Am sechsten Untersuchungstag wurde ein Versuch zur Erfassung der hepatischen Glucosenettoabgabe sowie zur Laktat-, NEFA- und Sauerstoff (**O_2**)-nettoentnahme durchgeführt, um die Funktionstüchtigkeit der Methode zu testen. Dafür wurde die Leberdurchblutung über die Indikatorverdünnungsmethode (Indikator: PAH) bestimmt. Zusätzlich wurden die Glucose-, Laktat-, NEFA- und O_2-konzentration in den katheterisierten zu- und abführenden Lebergefäßen bestimmt. Die Nettoentnahme bzw. -abgabe wurde mittels der Konzentrationsdifferenz am Organ und dem hepatischen Plasmafluss berechnet. Aus technischen Gründen wurden die Nettoentnahme bzw. -abgabe nur bei sieben Tieren bestimmt. Am Tag 14 wurden die Kühe euthanasiert und im Rahmen der Sektion die Katheterposition überprüft sowie sämtliche im Zusammenhang mit der Katheterisierung stehenden pathologischen Veränderungen erfasst.
Alle Katheter (n = 32) waren erfolgreich implantiert worden. Bis auf einen Katheter, aus welchem ab dem achten Tag der Untersuchung kein Blut mehr aspiriert werden konnte, blieben alle über den vierzehntägigen Versuchszeitraum funktionstüchtig. Der am sechsten Tag an der Leber gemessene portale Plasmafluss betrug 736 ± 174 l/h, der hepatische Plasmafluss 966 ± 229 l/h und der arterielle Plasmafluss 230 ± 152 l/h. Letzteres entspricht einem arteriellen Anteil von 23 ± 14% am hepatischen

Plasmafluss. Die berechnete hepatische Glucosenettoabgabe betrug 305 ± 72 mmol/h (n = 7). Die mittlere Energieaufnahme der Tiere korrelierte signifikant mit dem hepatischen Plasmafluss (r = 0.91; *P* = 0.004), der hepatischen Glucosenettoabgabe (r = 0.81; *P* = 0.027) und der hepatischen Nettoentnahme von Laktat (r = -0.70; *P* = 0.08) bzw. O_2 (r = -0.77; *P* = 0.039). Ebenso korrelierte die Glucosenettoabgabe mit der Nettoentnahme von Laktat an der Leber (r = -0.92; *P* = 0.004). Die Sektion ergab, dass 31 der 32 Katheter korrekt im Gefäß platziert wurden. Lediglich ein V. mesenterica-Katheter lag in einer Schleife im Gefäß. Die Mündung des Katheters befand sich 5 cm vor der Porta hepatis. Die Öffnung des V. portae-Katheters mit Funktionsverlust ab dem achten Versuchstag war durch eine Fibrinpfropf verschlossen. Im Bereich des Eintritts der Katheter in die Leber waren auf der Organoberfläche jeweils geringgradige, umschriebene, fibrinöse Perihepatitiden nachweisbar.

Die ultraschallgeführte Katheterimplantation in die V. portae, V. hepatica und V. mesenterica cranialis ebenso wie die Katheterisierung der Aorta abdominalis erwiesen sich als sichere, minimal-invasive Technik, welche zur Erfassung der Nettoentnahme bzw. -abgabe von Substraten an der Leber des Rindes geeignet erscheint.

2.6. Der Effekt einer einmaligen Dexamethasonbehandlung auf den hepatischen Blutfluss und die hepatische Glucosenettoabgabe bei Milchkühen

Starke, A., K. Wussow, L. Matthies, M. Kusenda, A. Haudum, R. Busche, A. Beyerbach, M. Piechotta, H. M. Hammon, and J. Rehage (2011). Effect of a single dose Dexamethason application on the hepatic blood flow and the hepatic glucose net output in dairy cows. zur Publikation vorbereitet

Die positive klinische Wirkung einer Glucocorticoidbehandlung beim Lipomobilisationssyndrom der Milchkühe wurde mehrfach bestätigt (Abschnitt 1.6.). Nach wie vor gibt es aber unterschiedliche Angaben zu den Effekten dieser Therapie auf Organebene. Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag zu deren Aufklärung geleistet werden. So sollte untersucht werden, inwieweit DEXA, als synthetisches Glucocorticoid, Einfluss auf die Glucose- und BHB-Nettoabgabe in der Leber nimmt, und ob sich die Organdurchblutung unter der Behandlung ändert.

Die Untersuchungen wurden an sieben gesunden, laktierenden, multikatheterisierten [Publikation 6 (Starke et al., 2011b)] Deutsch-Holstein-Milchkühen (Alter: 3.3 ± 0.1 Jahre, 365 ± 44 Tage post partum, Körpergewicht: 552 ± 28 kg, Milchleistung: 14.9 ± 3.2 kg/d; Mittelwert ± SEM) durchgeführt. Die Kühe wurden in Einzelboxen gehalten und *ad libitum* gefüttert. Die Studie dauerte 12 Tage. Beginnend am sechsten Tag nach der Katheterisierung wurden der hepatische Blut- und Plasmasfluss sowie der Nettoumsatz [Publikation 6 (Starke et al., 2011b)] ausgewählter Nährstoffe im Plasma (Glucose, Lactat, NEFA, Cholesterol, BHB, Glycerol), O_2 und Insulin vor (Tag 0) und dreimal nach (Tag 1, 2, 5) einer Behandlung mit Dexamethason-21-isonicotinat (**DEXA**; Voren®, 100 µg/kg, Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, intramuskulär) bestimmt. Unter sonographischer Kontrolle wurden an den Tagen 0, 2 und 5 Lebergewebeproben entnommen und auf TL-, TAG- und Glycogengehalt untersucht.

Im Ergebnis der DEXA-Behandlung nahm der hepatische Plasma- und Blutfluss zu, wobei der arterielle Anteil am hepatischen Blutfluss bereits zum ersten Tag nach Behandlung anstieg. Die Glucose- und Insulinkonzentrationen stiegen in allen untersuchten Blutgefäßen bis zum zweiten Tag nach DEXA-Applikation an. Indess die Glucosekonzentration danach zum fünften Tag absank, aber über dem Basalniveau blieb, hielt der Anstieg der Insulinkonzentration an. Auch die Lactatkonzentration stieg nach der DEXA-Applikation zunächst an, fiel aber dann bis zum fünften Tag ab. Die BHB-,

NEFA-, Glycerol-, Cholesterol- und O_2-Konzentrationen fielen nach DEXA-Applikation ab. Die hepatische Glucosenettoabgabe nahm bis zum zweiten Tag nach DEXA-Behandlung ab und stieg am fünften Tag wieder auf das Basalniveau an. Der hepatische Lactat- und NEFA-Nettoverbrauch blieben einen Tag nach der Behandlung unverändert, nahmen aber dann bis zum fünften Tag nach der Behandlung hin ab. Glycerol-, BHB-, Cholesterol- und Insulinverbrauch blieben unverändert. Der hepatische O_2-Nettoverbrauch nahm einen Tag nach der Behandlung zu und blieb bis zum fünften Tag nach der Behandlung auf diesem Niveau. Der Leberfettgehalt (TAG, TL) fiel nach der DEXA-Behandlung bis zum siebenten Tag nach Behandlung ab. Der Glycogengehalt im Lebergewebe stieg bis zwei Tage nach DEXA-Applikation an.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es bei den Kühen der Untersuchung nach DEXA-Behandlung zu einer Hyperglycaemie kam, diese aber nicht mit einer Erhöhung der Glucosebereitstellung über eine Anregung der Gluconeogenese in der Leber erklärt werden kann. Die Glycogenreserven der Leber wurden aufgefüllt, und es kam eher zu einem Rückgang der Glucosenettoabgabe am Organ. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es nach DEXA-Behandlung zu einer insulinbedingten Reduktion der Lipolyse und zu einer Stimulation der Utilisation von NEFA und BHB in der Körperperipherie kommt. Die BHB-Nettoabgabe an der Leber wurde nicht beeinflusst. Unter der Behandlung wurden die oxidativen Prozesse in der Leber forciert. Es wurde mehr O_2 verbraucht. Dass es auch zu einem Abbau an intrahepatischem Speicherfett kam, könnte auf eine Anregung der Beta-Oxidation zurückgeführt werden. Dies sowie die Steigerung der Durchblutung der Leber können klinisch als positiver Effekt für das Organ gewertet werden.

3. Übergreifende Diskussion

3.1. Besprechung des verwendeten Patientengutes

Das Ziel der vorliegenden Habilitationsschrift, Untersuchungen zur nicht-invasiven Diagnostik des Leberfettgehaltes und zum Blutfluss an der Leber durchzuführen und die bei Leberverfettung des Rindes auftretenden morphologischen und hämodynamischen Veränderungen an der Leber zu erfassen, setzte ein Patientengut mit unterschiedlichem Leberfettgehalt voraus. Da das Lipomobilisationssyndrom vor allem Milchkühe in den ersten zwei bis vier Wochen nach der Abkalbung betrifft (Reid, 1980; Gerloff et al., 1984, 1986; Jorritsma et al., 2001; Raoofi et al., 2001), sind Tiere in diesem Laktationsstadium für derartige Untersuchungen prädisponiert. Die LDA als typische Erkrankung von Milchkühen in der Frühlaktation tritt in 57% der Fälle bis zwei und in 80% bis vier Wochen post partum auf (Constable et al., 1992; Wittek et al., 2007). Darüber hinaus ist bekannt, dass eine LDA sehr häufig mit einer Leberverfettung einhergeht, und bei Patienten mit LDA gering-, mittel- und hochgradige Leberverfettungen nahezu normal verteilt vorliegen (Herdt et al., 1982; Holtenius und Niskanen, 1985; Rehage et al., 1996). Die Fetteinlagerung in die Leber ist bei Kühen mit LDA ausgeprägter als bei solchen mit einer rechtsseitigen Labmagenverlagerung (Holtenius und Niskanen, 1985; Taguchi et al., 1992; Kretzschmar, 2007). Damit erfüllen Kühe mit LDA die Voraussetzung als Modell für das Lipomobilisationssydrom (Rehage, 1996). Die eigenen Untersuchungen zur Etablierung der nicht-invasiven Diagnostik wurden an 151 Deutsch-Holstein-Kühen mit LDA und einem sehr breiten Leberfettgehaltsspektrum (Abschnitt 2.2.; TAG-Spannweite: 4,6 – 292,4 mg/g FW) von fehlender bis hochgradiger Fetteinlagerung durchgeführt. Sie waren damit für die Bearbeitung der vorliegenden Fragestellung optimal geeignet. Für die Entwicklung einer Methode zur nicht-invasiven Diagnostik des Leberfettgehaltes und die Erfassung des Blutflusses an der Leber bedarf es neben Tieren mit verschiedenen Leberfettgehalten auch der Aufnahme von möglichst artefaktfreien B-Mode- und Doppler-Ultraschallbildern. Da vor allem die unterschiedlich dicke Bauchwand der Tiere die Bildqualität negativ beeinflusst (Gerber, 1993; Delling, 2000; Zamir et al., 2003; Publikation 1, Thijssen et al., 2008), empfiehlt sich die Bilderfassung direkt am Organ. In Voruntersuchungen an euthanasierten Tieren stellte sich heraus, dass post mortem nicht nur die perkutane Aufzeichnung der Hämodynamik erwartungsgemäß unmöglich war, sondern aufgrund von massiven Artefakten auch die Gewebetextur der Leber nicht beurteilt werden konnte. Daher erforderte die Fragestellung eine

Aufzeichnung von intraoperativen Ultraschallbildern am lebenden Tier. Aufgrund der in der hiesigen Klinik ohnehin routinemäßig durchgeführten Laparotomie von rechts [Omentopexie nach Dirksen (1967)] sind Patienten mit LDA für die Durchführung der intraoperativen B-Mode- und Doppler-Ultraschalluntersuchung der Leber gut geeignet. Neben den genannten Anforderungen an Patienten und Methode, setzt die Analyse eines Gewebebioptats zur Bestimmung des Fettgehaltes der gesamten Leber eine homogene Verteilung des eingelagerten Fettes innerhalb des Organs voraus. Frühere Untersuchungen ergaben, dass dies bei Kühen gewährleistet ist (Gröhn and Lindberg, 1982; Gaal and Husveth, 1983; Herdt, 1988; West, 1990). Eine geeignete Methode, dies zu überprüfen, wäre die Sektion der Tiere (Trautwein, 1991). Bei der vorliegenden Arbeit handelte es sich aber um *in vivo*-Untersuchungen. Alternativ wurden daher die Kühe klinisch untersucht, und die Leber während der Laparotomie beurteilt. Des Weiteren wurde eine sonographische Grunduntersuchung der Leber durchgeführt, und eine Gewebeprobe histologisch beurteilt. Alle diese Untersuchungen dienten auch dem Zweck, weitere, über eine reine Fettspeicherung hinausgehende Parenchymerkrankungen, welche ggf. die Leberfunktion, -form und Hämodynamik beeinflussen könnten, bestmöglich auszuschließen. So können beispielsweise mittels B-Mode-Sonographie fokale Veränderungen des Leberparenchyms besonders während einer intraoperativ durchgeführten Untersuchung mit hoher Sicherheit erkannt werden (Delling, 2000; Braun, 2009). Bei den in die Studie einbezogenen Kühen gab es weder während der intraoperativ direkt am Organ, noch während der transkutan durchgeführten, sonographischen Grunduntersuchung des Parenchyms Hinweise auf fokale Veränderungen (Abschnitt 2.2.). In der histologischen Untersuchung der Lebergewebeproben (n = 151; Abschnitt 2.2.) lag bei den Tieren mit nachweisbarer Fetteinlagerung (n = 127) in jedem Fall eine gleichmäßige Fettverteilung vor. Unter den gegebenen Voraussetzungen kann daher davon ausgegangen werden, dass das ausgewählte Patientengut für die Durchführung der Untersuchungen zur Leberverfettung des Rindes geeignet war.

Für die Untersuchungen zur Etablierung einer minimal-invasiven Technik der Katheterplatzierung in V. portae, V. hepatica, V. mesenterica cranialis und Aorta abdominalis sowie zu den Effekten einer Glucocorticoidbehandlung bei Kühen, wurden Tiere verwendet, bei welchen die Abkalbung bereits länger zurück lag. Dies wurde gemacht, da Milchkühe in diesem Laktationsstadium weniger anfällig für Erkrankungen sind, und sich Milchleistung und Futteraufnahme über den Versuchszeitraum von zwei Wochen

kaum ändern (Grummer, 1995; Goff and Horst, 1997; Drackley, 1999; Grabowski, 2000). Diese Tiere sind daher für eine derartige Pilotstudie sehr gut geeignet. Auch wenn die Ergebnisse zu Nettoentnahme bzw. -abgabe von Substraten und Blutflüssen an der Leber noch an Kühen anderer Laktationsstadien und an Tieren, welche am Lipomobilisationssyndrom erkrankt sind, überprüft werden müssen, sind die nachgewiesenen Behandlungseffekte prinzipiell übertragbar.

3.2. Analyse des hepatischen Triacylglycerolgehaltes als Goldstandard für den Grad der Leberverfettung

Untersuchungen zur nicht-invasiven Diagnostik des Leberfettgehaltes und zur Leberverfettung bei Milchkühen an sich setzen neben geeignetem Patientengut eine genaue Methode voraus, den Leberfettgehalt zu bestimmen. Da in Publikationen zu diesem Thema fast ausnahmslos keine detaillierten Angaben zur analytischen Prozedur oder zur Genauigkeit der Methode gemacht wurden, wird im ersten Teil der Arbeit (Abschnitt 2.1.) die Etablierung einer Methode zur Bestimmung des Leberfettgehaltes vorgestellt. Zudem werfen die bisherigen Untersuchungen zur Leberverfettung bei Milchkühen die Fragen auf, inwieweit die analytische Genauigkeit der eingesetzten Analyseverfahren ausreichend war [Publikation 2, Abbildung 1; (Starke et al., 2010a)], und welcher genauen Dynamik die eingelagerten TAG im Lebergewebe bei zunehmender Leberverfettung folgen. Die Methode sollte darüber hinaus die Bedingung erfüllen, TL und TAG in einem analytischen Ansatz unter Verwendung von maximal 100 mg Gewebe sicher zu erfassen, um die minimal-invasive Schneidnadelbiopsie (Scholz et al., 1989) als Entnahmetechnik anwenden zu können.

Bei der eingesetzten Methode wurde zunächst TL aus dem Lebergewebe extrahiert und gravimetrisch quantifiziert [modifiziert nach (Hara and Radin, 1978)]. Aus dem TL-Extrakt wurde im Anschluss TAG enzymatisch am Analysenautomaten gemessen (Abschnitt 2.1.). Mit intraday CV´s <3% und interday CV´s <4% für TL, TAG und den mit gemessenen Triolein-Standard sowie Wiederfindungsraten für TAG um 100% hat sich die Methode als präzise und richtig herausgestellt. Sie ist darüber hinaus bei kleinen Gewebemassen bis 100 mg FW einsetzbar und erfüllt damit die für die weiteren Untersuchungen zur Leberverfettung gestellten Anforderungen (Abschnitte 2.2. – 2.6.).

Zur Frage nach der Dynamik des Leber-TAG-Gehaltes bei zunehmendem TL ist zu sagen, dass die in der Literatur beschriebene sehr enge lineare Korrelation zwischen beiden Parametern (Gaal et al., 1983; Reid and Roberts, 1983; Herdt, 1988; Staufenbiel et al., 1993), auch in der vorliegenden Studie bestätigt wurde [r^2 = 0,97; Publikation 2 (Starke et al., 2010a)]. Bisher war allerdings beim Rind unbekannt, dass der proportionale Anteil von TAG an TL [Publikation 2; Abbildung 4 (Starke et al., 2010a)] zunächst linear ansteigt, dann jedoch ab Leber-TL-Gehalten von etwa 100 mg/g FW nahezu konstant bei ca. 70% bleibt. Eine derartige Abweichung vom kontinuierlichen Anstieg des eingelagerten Speicherfettes wurde bisher nur für Ratten beschrieben (Gauthier et al., 2004). Es ist also davon auszugehen, dass sich bei hochgradiger Leberverfettung neben der weiteren absoluten Zunahme des TAG-Gehaltes auch vermehrt Nicht-TAG-Lipide in den Hepatozyten anreichern. Die Untersuchung der Mechanismen, welche dieser Verteilung und der Begrenzung des TAG-Anteils an TL zugrunde liegen, war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Auch bleibt die Frage nach der genauen Zusammensetzung des Nicht-TAG-Anteils und, inwieweit sich die Verschiebung des Verhältnisses zwischen den als TAG gebundenen und den anderen Lipidfraktionen auf Zellstoffwechsel, -integrität und –funktion ausübt, offen. Aus der Humanmedizin gibt es Hinweise, wonach die Lipotoxizität, als wesentlicher ätiologischer Faktor im Rahmen der Steatohepatitis des Menschen, nicht an die Zunahme an intrazellulär gespeichertem TAG, sondern an die nicht-TAG-Fettsäuremetaboliten gekoppelt ist (Neuschwander-Tetri, 2010a, b). Das neue Wissen um die Dynamik der Fetteinlagerung und die Kenntnis, dass Kühe mit zunehmendem Leberfettgehalt zur Entwicklung einer Leberinsuffizienz neigen (Herdt, 1988; Rehage, 1996), lässt ähnliche Rückschlüsse beim Rind zu. Inwieweit dies allerdings wirklich Einfluss auf die Pathogenese des Lipomobilisationssyndroms der Milchkühe nimmt, kann bisher nicht beantwortet werden. Von praktischer Relevanz ist die Beobachtung insofern, als unter Verwendung eines Broken-Line Modells eine Regressionsgleichung entwickelt wurde, mit welcher der Leber-TAG-Gehalt aus dem TL-Gehalt oder umgekehrt, mit sehr hoher mathematischer Sicherheit (r^2 = 0,98) berechnet werden kann. Damit wird die Bestimmung eines der beiden Parameter (TL, TAG) entbehrlich, was den analytischen Aufwand in wissenschaftlichen Studien reduziert.

3.3. Sonographie als nicht-invasive Möglichkeit zur Analyse des Leberfettgehaltes

Der Versuch, den Leberfettgehalt anhand der Größen- und Formveränderung des Organs (Maxie, 2007; McGavin and Zachary, 2007; Braun, 2009) zu erfassen, scheitert nach wie vor an den hohen absoluten und relativen individuellen Schwankungen [Publikation 5 (Haudum et al., 2011)]. Das Vorgehen lieferte damit trotz einer Weiterentwicklung in der Ultraschallgerätetechnik keine zuverlässigen Ergebnisse und bestätigte die Erfahrungen früherer Untersuchungen (Grote, 1992; Lauener, 1993; Delling, 2000). Daher sollte die sonographische Beurteilung der Gewebetextur des Leberparenchyms bei Kühen unterschiedlicher Fettgehaltsstufen Basis dieser Diagnostik sein. Derartige Versuche lieferten auch bei Rindern bereits vielversprechende Ergebnisse (Braun, 1990, 2009; Grote, 1992; Lauener, 1993; Acorda et al., 1994a, b; Braun and Gerber, 1994; Delling, 2000; Bobe et al., 2008). Ziel war es, neben den aus der subjektiven Beurteilung von Leberultraschallbildern resultierenden inter- und intraindividuellen Unterschieden (Strauss et al., 2007), auch die untersuchungs- und gerätebedingten Artefakte sowie den Einfluss der Bauchwand des Tieres zu eliminieren. Daher wurde speziell für diese Anwendung eine Analysesoftware CAUS entwickelt [Abschnitt 2.2. (Thijssen et al., 2008)]. Bei diesem Programm wurde im Unterschied zu bisherigen Studien (Acorda et al., 1994a; Gaitini et al., 2004, 2005; Bobe et al., 2008) zunächst eine Kalibrierung des Ultraschallgerätes durchgeführt. Darüber hinaus beinhaltet das Programm auf der Basis von intraoperativ und transkutan aufgezeichneten Ultraschalldatensätzen entwickelte Bildkorrekturschritte [Abschnitt 2.2. (Thijssen et al., 2008)]. Vor der Auswertung wird damit eine Bearbeitung der B-Mode-Bilder durchgeführt. Für die Evaluation der diagnostischen Sicherheit von CAUS in der Erkennung einer Leberverfettung wurden zunächst sowohl TAG- als auch der TL-Gehalt des Lebergewebes als Goldstandard verwendet. Da TAG und TL sehr eng korrelieren ($r^2 = 0{,}98$; Abschnitt 2.1.) ergaben sich bezogen auf die CAUS-Parameter nahezu identische Ergebnisse. Daher wurde im Folgenden auf die Darstellung der Ergebnisse beider Parameter verzichtet. Es wurde nur der Leber-TAG-Gehalt dargestellt, da dieser als Speicherform der Lipide den Leberfettgehalt am besten wiedergibt (Grummer, 1993; Drackley, 1999). Die bisher zur digitalen Analyse eingesetzten Computerprogramme setzen bei der Auswahl der zu analysierenden Bildfläche (Region of interest) die manuelle Selektion von Bildartefakten und Blutgefäßanschnitten voraus (Acorda et al., 1994a; Bleck,

1998; Bleck et al., 2000; Bobe et al., 2008; Haudum et al., 2010). Ein weiterer innovativer Schritt in der CAUS-Entwicklung war daher die automatische Selektion von Blutgefäßanschnitten und Bildartefakten in den B-Mode-Bildern. Dies vereinfacht die Handhabung der Software deutlich und macht die Auswertung unabhängig von subjektiven Einflüssen. Im Vergleich liefert dieses Vorgehen bessere Ergebnisse als die manuelle Selektion und verkürzt die Auswertungszeit enorm [Abschnitt 2.2. (Weijers et al., 2010)]. Von Vorteil ist auch, dass CAUS in der Auswertung der digitalen Datensätze ausschließlich auf einen Ultraschallparameter (ResAtt) zurückgreift [Publikation 1 (Thijssen et al., 2008)]. Das erleichtert die Anwendung und vereinfacht es, das Programm in ein kommerzielles Ultraschallgerät zu integrieren. Im Vergleich zu anderen Untersuchungen (Acorda et al., 1994a; Bobe et al., 2008; Haudum et al., 2010) liefert CAUS in der Analyse von transkutan aufgezeichneten B-Mode-Bildern bessere Ergebnisse in der Bestimmung des Leberfettgehaltes bei Milchkühen. Die entwickelte Software genügt damit den Erfordernissen der Praxis, die Kühe ihrem Leberfettgehalt entsprechend zu klassifizieren. Einschränkend bleibt festzustellen, dass die für das Einzeltier mittels CAUS vorherberechneten Leberfettgehalte zum Teil erheblich von den biochemisch im Lebergewebe ermittelten TAG-Gehalten abweichen. Um CAUS daher in wissenschaftlichen Untersuchungen, in welchen eine hohe Genauigkeit der Analyse des Fettgehaltes für jedes Tier erforderlich ist, als Alternative zur Fettgehaltsbestimmung aus einem Bioptat einzusetzen, bedarf es einer weiteren Optimierung. Dennoch ist es mit der Programmentwicklung gelungen, eine praxisnahe Methode zur nicht-invasiven Klassifizierung des Leberfettgehaltes bei Kühen zu schaffen. Ein nächster Schritt in Richtung der routinemäßigen Anwendung in Programmen zur Überwachung der Herdengesundheit wäre, diese Software in handelsübliche Ultraschallgeräte zu integrieren.

3.4. Einfluss der hepatischen Fetteinlagerung auf Organform und -größe sowie den portalen Blutfluss

Es wird allgemein unterstellt, dass die im Zusammenhang mit dem Lipomobilisationssyndrom der Milchkühe stehende hepatische Fetteinlagerung mit einer Organvergrößerung und Änderung der äußeren Form einhergeht (Trautwein, 1991; Maxie, 2007). Allerdings waren bislang keine Studien bekannt, in welchen bei Kühen das Organ

vermessen und der Fettgehalt direkt quantifiziert wurden, und dieser Zusammenhang bestätigt werden konnte. Die in eigenen Untersuchungen [Publikation 5 (Haudum et al., 2011)] gefundenen positiven Korrelationen (r = 0,26 – 0,49) zwischen den sonographisch erfassten Dimensionsparametern der Leber und dem TAG weisen auf eine Vergrößerung des Organs bei gleichzeitigem Abstumpfen der Ränder mit zunehmendem Leberfettgehalt hin. Obwohl es, wie bereits in früheren Untersuchungen (Grote, 1992; Lauener, 1993; Braun, 2009), nicht zur Vorhersage des Leberfettgehaltes genügte, bestätigt sich dieser Trend auch in der Zunahme der Dimensionsparameter bei den Kühen der höheren TAG-Klassen [Publikation 5 (Haudum et al., 2011)]. Über die Änderung der äußeren Form und Größe des Organs hinausgehend gibt es Hinweise aus Untersuchungen am Menschen sowie an Ratten und Mäusen, wonach es mit zunehmender Fetteinlagerung zu einer Beeinflussung des portalen Blutflusses und der Mikrozirkulation in der Leber kommt (Seifalian et al., 1999, 2001; McCuskey et al., 2004; Balci et al., 2008; Erdogmus et al., 2008; Farrell et al., 2008). Verantwortlich ist dafür ein intrahepatischer Druckanstieg (Orrego et al., 1981), welcher im Zuge der Parenchymschwellung zu einer Kompression der Sinusoide und Blutgefäße führt (Iwao, 1987). Die bereits von anderen Autoren während der Lebersonographie auch beim Rind beobachtete Abnahme des Durchmessers der Lebergefäße und des Anteils an Gefäßanschnitten im Parenchym insgesamt (Braun, 1990, 2009) konnte in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden [Publikation 4 (Weijers et al., 2010)].

Vor dem Hintergrund einer Beeinflussung der Organdurchblutung durch die Volumenzunahme der Hepatozyten (Orrego et al., 1981; Seifalian et al., 1998, 1999) ist es umso wichtiger, die Leberdimensionen und den Blutfluss *in vivo* sicher zu erfassen. In der Humanmedizin ist die sonographische Vermessung des Organs mittlerweile eine Standardmethode (Kremer et al., 1993). Sie wurde auch bei Kühen, teils in vergleichenden Untersuchungen mit Sektionsergebnissen, als Methode zur Erfassung der Organgröße und –form mehrfach geprüft (Braun, 1990; Grote, 1992; Braun and Gerber, 1994). Demgegenüber sind Studien zu dopplersonographischen Untersuchungen der hepatischen Blutgefäße, wie es in der Humanmedizin oder beim Kleintier üblich ist (Ignee et al., 2002; Szatmari et al., 2003, 2004a, b; O'Donohue et al., 2004; Balci et al., 2008; Erdogmus et al., 2008; Sartor et al., 2010), bisher für das Rind nicht bekannt. In den eigenen dopplersonographischen Untersuchungen der Leber [Publikation 7 (Starke et al., 2011a)] beschränkt sich die Auswertbarkeit der Bilder gerade bei den Tieren der höheren TAG-Klassen fast ausnahmslos auf die intraoperativ

aufgezeichneten Datensätze. Lediglich bei etwa 25% der Tiere konnte transkutan ein Dopplersignal an der V. portae erfasst werden, welches eine Beurteilung der Flussprofile ermöglichte [Publikation 7 (Starke et al., 2011a)]. Damit erklärt sich zum Teil, dass die dopplersonographische Blutflusserfassung an der Leber des Rindes keine Routinetechnik ist. Ihr Einsatz beschränkt sich beim derzeitigen Entwicklungsstand der üblicherweise eingesetzten Aufnahmetechnik auf die Anwendung im Rahmen wissenschaftlicher Studien und die Auswertung intraoperativ direkt am Organ aufgezeichneter Ultraschallbilder.

Bei den Kühen der eigenen Untersuchung war die intrazelluläre Fetteinlagerung nachweislich die einzige variable Größe, welche das Leberparenchym der Tiere voneinander unterschied [Publikation 3 (Starke et al., 2010b)]. Es gab weder klinisch noch sonographisch oder histologisch Hinweise auf stauungsbedingte oder andere über die Fetteinlagerung hinausgehende Befunde, welche Ursache einer veränderten Organgröße oder –durchblutung sein könnten. Übereinstimmend mit der Literatur (Braun and Gerber, 1994) beeinflusste von den erfassten Patientendaten lediglich das Alter der Tiere sicher die Größe der Leber. Dieser Parameter ging daher in die statistische Korrektur der Dimensionsparameter ein [Publikation 5 (Haudum et al., 2011)]. Somit können die Unterschiede von Leberform und –größe ebenso wie die der Hämodynamik neben der interindividuellen Streuung auf den unterschiedlichen Grad der Verfettung zurückgeführt werden (Johannsen et al., 1993; Kremer et al., 1993; McGavin and Zachary, 2007; Braun, 2009). Diese zunehmende Fetteinlagerung führte in der V. portae zu einer Reduktion der Blutflussgeschwindigkeiten und Abnahme des VPI [Publikation 7 (Starke et al., 2011a)]. Die Ergebnisse stimmen mit den auch beim Menschen gemachten Beobachtungen überein (Gallix et al., 1997; Dietrich et al., 1998; Balci et al., 2008; Erdogmus et al., 2008). In der Pathogenese der Steatohepatitis des Menschen wird den infolge der Störung der Mikrozirkulation ausgelösten lokalen Ischämien entscheidende Bedeutung beigemessen. Sie werden im Rahmen einer nicht-alkoholischen Fettleber nicht nur für Einschränkungen in der Organfunktion (Seifalian et al., 2001), sondern mittlerweile als eine der Hauptursachen einer Leberfibrose angesehen (Wanless and Shiota, 2004; Barshop et al., 2008; Lewis and Mohanty, 2010). Derartig gravierende Veränderungen konnten in den histologischen Untersuchungen des eigenen Patientengutes nicht festgestellt werden [Publikation 3 (Starke et al., 2010b)]. Auch frühere Untersucher stuften die bei Kühen neben der Fettspeicherung nachweisbaren histologischen Veränderungen eher als untergeordnet ein (Mertens, 1992).

Dabei gilt es zu bedenken, dass es sich bei Kühen meist um eine temporäre, reversible Fetteinlagerung in die Leber handelt. Sie betrifft den Zeitraum von Wochen oder maximal Monaten (Herdt, 1988; Bobe et al., 2004; Vernon, 2005). Indess wirken Noxen, welche beim Menschen eine nicht-alkoholische Fettleber auslösen, meist mehrere Jahre (Lewis and Mohanty, 2010). Da eine ungehinderte Perfusion Voraussetzung der Organfunktion ist (Reynolds et al., 1994, 2003; Reynolds, 1995), wären aber im Rahmen des Lipomobilisationssyndroms auch beim Rind zumindest transiente Ausfälle denkbar. Derartige Untersuchungen liegen allerdings fürs Rind bisher nicht vor.

Die eigenen Ergebnisse zur Vermessung des Organs [Publikation 5 (Haudum et al., 2011)] und zur dopplersonographischen Untersuchung des portalen Blutflusses [Publikation 7 (Starke et al., 2011a)] bestätigen die Hypothese, wonach es mit zunehmender Fetteinlagerung zu einer Vergrößerung und Formänderung der Leber und zur Beeinflussung der Hämodynamik kommt. Sowohl die Änderungen der Leberdimension, als auch die des Blutflusses werden erst auffällig, wenn der Leber-TAG-Gehalt 100 mg/g FW überschreitet. Besonders prominent werden die Unterschiede bei Tieren, welche einen Leber-TAG-Gehalt von >150 mg/g FW aufweisen.

3.5. Wirkung einer Dexamethasonbehandlung auf den Fettgehalt, die Glucosenettoabgabe und die Durchblutung der Leber

Für die Überprüfung der vorliegenden Fragestellung zur Glucocorticoidwirkung bei Milchkühen bietet sich der Einsatz des synthetischen Wirkstoffes Dexamethason (9-Fluor-16α-methylprednisolon) insofern an, als dass Präparate mit diesem zu den am häufigsten in der Behandlung sowie in wissenschaftlichen Studien zum Lipomobilisationssyndrom beim Rind eingesetzten Medikamenten gehören (Andersson and Olsson, 1984; Wierda et al., 1987; Metzner et al., 1993; Shpigel et al., 1996; Jorritsma et al., 2004; Fürll und Jäckel, 2005).
Die erhöhten Plasmaglucosespiegel nach einer Glucocorticoidbehandlung (McDowell, 1983; Andersson and Olsson, 1984; Brockman and Laarveld, 1986b; Wierda et al., 1987; Shpigel et al., 1996; Maciel et al., 2001; Jorritsma et al., 2004; Fürll und Jäckel, 2005; Kusenda et al., 2011a; Starke et al., 2011c) sind als positiver therapeutischer Effekt zu werten und damit sicher ein Grund für deren klinische Wirksamkeit in der

Behandlung des Lipomobilisationssyndroms (Metzner et al., 1993; Shpigel et al., 1996). Die Aussagen der Literatur zur Ursache dieser Hyperglycaemie sind allerdings widersprüchlich. Der früheren Annahme, wonach es nach DEXA-Behandlung zu einer Anregung der hepatischen Gluconeogenese kommt (Baird and Heitzman, 1969; Hamada et al., 1987), standen bisher v.a. Ergebnisse aus Clamp-Studien an Kälbern (Scheuer et al., 2006) und Kühen (Kusenda et al., 2011a) entgegen. Für die genannten Autoren liegt die Ursache der Erhöhung der Glucoseverfügbarkeit in einer Reduktion der peripheren Glucoseaufnahme infolge einer Insulinresistenz. Die Glucoseverwertung in der Körperperipherie wurde in der vorliegenden Arbeit nicht direkt untersucht. Für eine Insulinresistenz der Gewebe in der Körperperipherie nach DEXA-Behandlung spricht aber das Absinken des revised quantitative insulin sensitivity check index (**RQuicki**) bei den untersuchten Kühen (Holtenius and Holtenius, 2007; Kusenda et al., 2011b). Da bei Kälbern auch keine Steigerung der Aktivität der Schlüsselenzyme der hepatischen Gluconeogenese nach DEXA-Behandlung zu verzeichnen war, konnte vermutet werden, dass die endogene Glucoseproduktion unverändert bleibt (Hammon et al., 2003, 2005). Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals für Milchkühe der Nachweis dafür erbracht [Publikation 8 (Starke et al., 2011c)]. Es war sogar ein Rückgang der hepatischen Glucosenettoabgabe zu verzeichnen, was bisher lediglich aus Untersuchungen an Hunden (Gauthier et al., 1986) und Nagern (Viana et al., 2006) bekannt war.

Die Glucoseaufnahme in die Hepatozyten erfolgt im Wesentlichen konzentrationsabhängig über GLUT-2 Transporter (Leturque et al., 2009). Daher führte die Erhöhung der Bereitstellung von Glucose offensichtlich über eine Autoregulation (Moore et al., 1998, 2003) zum Rückgang der Glucosenettoabgabe in der Leber. Dass die auch in der vorliegenden Arbeit erhöhten Insulinspiegel [Publikation 8 (Starke et al., 2011c)] dafür verantwortlich waren, scheint eher unwahrscheinlich. Zwar reduziert Insulin beim Monogastrier über die Hemmung der PEPCK die hepatische Gluconeogenese (Hanson and Reshef, 1997), aus Untersuchungen an Leberzellkulturen von Rindern geht aber hervor, dass Insulin die hepatische Gluconeogenese nicht beeinflusst (Donkin and Armentano, 1995). Der Leber der Wiederkäuer wird eher eine Insulinresistenz unterstellt (Donkin and Armentano, 1995; Scheuer et al., 2006). Die auch in anderen Studien nach Glucocorticoidbehandlung nachgewiesene Erhöhung der Glycogenkonzentrationen im Lebergewebe (McDowell, 1983; Amatruda et al., 1985; Fürll und

Knobloch, 1993; Hammon et al., 2003; Scheuer et al., 2006) lassen allerdings vermuten, dass dies eventuell nicht für die Glycogensynthese gilt (Donkin and Armentano, 1995). Andererseits wird vermehrt zur Verfügung stehende Glucose in den Hepatozyten vornehmlich in Glycogen überführt (Al-Trad et al., 2009). Daher könnten auch die nach DEXA-Behandlung erhöhten Glucosekonzentrationen in der V. portae Ursache der Stimulation der Glycogensynthese sein. Sie vermitteln insulinunabhängig neuronal gesteuert über das sogenannte „portale Glucosesignal“ eine Anregung des intrahepatischen Glucoseumsatzes (Moore et al., 2003; Dardevet et al., 2006). Für eine Anregung der Stoffumsätze in der Leber, v.a. der oxidativen, spricht der erhöhte hepatische Sauerstoffverbrauch nach DEXA-Behandlung [Publikation 8 (Starke et al., 2011c)]. Neben der Glycolyse könnte dieser auch auf eine DEXA-vermittelte Stimulation der Beta-Oxidation (Tappy et al., 1994) zurückzuführen sein. Zwar war die NEFA-Nettoentnahme an der Leber bei den Kühen nach DEXA reduziert [Publikation 8 (Starke et al., 2011c)], der auch bereits von anderen Autoren (Fürll und Fürll, 1998; Kusenda et al., 2011a) beobachtete Abbau der intrahepatischen Fettspeicher (TAG) würde jedoch für eine Stimulation der Lipolyse sprechen. Die insulinvermittelte Hemmung der CPT-1 (Al-Trad et al., 2010) scheint dabei unter DEXA-Einfluss reduziert zu sein.

Andererseits erreichten die Leber trotz Zunahme der Organdurchblutung weniger NEFA und Glycerol aus den Fettdepots [Publikation 8 (Starke et al., 2011c)]. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen anderer Autoren aus Untersuchungen an Kälbern (Hammon et al., 2003) und Kühen (Fürll und Fürll, 1998; Kusenda et al., 2011a) überein. Ob dafür eine durch Insulin vermittelte Hemmung der Lipolyse (McDowell, 1983) oder eine infolge insulinresistenter Glucoseverwertung erhöhte NEFA-Verwertung in der Peripherie die Ursache ist, wurde bisher nicht endgültig aufgeklärt. Es ist allerdings zu vermuten, dass bei einer Reduktion der Verwertbarkeit von Glucose, als Gegenregulation der Umsatz von NEFA erhöht wird (Randle et al., 1963; Hue and Taegtmeyer, 2009).

Unter DEXA-Behandlung kam es bei den Kühen zu einer Zunahme der hepatischen Durchblutung. Dies wurde erstmals in Untersuchungen beim Menschen beobachtet (Myers and Taylor, 1952) und kann als Ausdruck der aus der Humanmedizin bekannten positiv inotropen Wirkung von Glucocorticoiden gewertet werden (Sambhi et al., 1965; Andrews and Walker, 1999; Dodt et al., 2009). Vor dem Hintergrund, dass im Rahmen der vermehrten Fetteinlagerung in die Leber eher mit einer Reduktion der Organdurchblutung zu rechnen ist (Dietrich et al., 1998; Seifalian et al., 1999; Balci et

al., 2008; Erdogmus et al., 2008; Starke et al., 2011a), kann dies als positiver Behandlungseffekt gewertet werden. Vor allem die selektive Zunahme des prozentualen Anteils des arteriellen Zuflusses [Publikation 8 (Starke et al., 2011c)] scheint Indiz für eine DEXA-vermittelte Umverteilung des Blutes aus der Peripherie zur Leber zu sein (Sambhi et al., 1965; Andrews and Walker, 1999; Dodt et al., 2009). In Stresssituationen endogen ausgeschütteten Glucocorticoiden wird eine derartige Vasokonstriktion in Geweben der Körperperipherie unterstellt, damit zentrale Organe (Gehirn, Leber) vermehrt mit Blut versorgt werden können (Dodt et al., 2009). Auch für DEXA ist bekannt, dass es direkt eine Vasokonstriktion bewirken kann (Altura and Altura, 1974; d'Emmanuele di Villa Bianca et al., 2003). Zum anderen dämpft es die physiologischen, vasodilatatorischen Effekte von Insulin an der Muskulatur (Scherrer et al., 1993). Bei Kühen wurde beispielsweise eine Reduktion der Euterdurchblutung nach DEXA-Behandlung nachgewiesen (Hartmann and Kronfeld, 1973) und (Wierda et al., 1987). Dies kann aber den trotz unveränderter Futteraufnahme und erhöhter Plasmaglucosespiegel nach DEXA-Behandlung auch bei den Kühen der vorliegenden Untersuchung beobachteten Milchleistungsrückgang offenbar nicht allein erklären (Hartmann and Kronfeld, 1973; Wierda et al., 1987; Lough et al., 1990; Delamaire and Guinard-Flament, 2006; Guinard-Flament et al., 2006). Eher verdichten sich die Hinweise, wonach es unter DEXA-Einfluss nicht zu einer Reduktion der Glucosebereitstellung im Euter sondern eher zu einer Beeinflussung des Transports an den Zellen oder Blutgefäßen kommt. Das führt zu einer veränderten Verteilung der Glucose (Kronfeld and Hartmann, 1973). Im gewissen Sinne könnte auch hier eine Insulinresistenz vorliegen. Zwar wurde immer davon ausgegangen, dass der Glucosetransport im Euter ausschließlich insulinunabhängig reguliert wird (Laarveld et al., 1981; Komatsu et al., 2005), weil der insulinunabhängige GLUT-1 der am häufigsten im Euter nachgewiesene Glucosetransporter ist (Zhao and Keating, 2007). Allerdings ist nach diesem GLUT-8 der am zweithäufigsten im laktierenden Euter von Kühen vorgefundene Glucosetransporter. Ihm wird im Gegensatz zu GLUT-1 eine Insulinabhängigkeit unterstellt (Zhao et al., 2004; Zhao and Keating, 2007; Schmidt et al., 2009).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die folgenden, in der vorliegenden Arbeit beobachteten direkten oder indirekten Effekte, die klinische Wirksamkeit einer DEXA-Behandlung beim Lipomobilisationssyndrom mit erklären:

- Hyperglycaemie und darüber Hinweise auf die Stimulation des Glucoseumsatzes in der Leber

- Abnahme der Lipomobilisation in der Körperperipherie und damit Absinken der NEFA-Konzentrationen im Blutplasma
- Reduktion des TAG-Gehaltes und Stimulation der Glycogenspeicherung in der Leber
- Stimulation der Leberdurchblutung.

4. Zusammenfassung

Bei einem Großteil der hochleistenden Milchkühe wird in den ersten Laktationswochen eine übermäßige Fetteinlagerung in die Leber beobachtet. Das sich potentiell daraus entwickelnde Lipomobilisationssyndrom wird nicht nur als Hauptursache für eine Leberinsuffizienz, sondern auch für zahlreiche weitere Erkrankungen während dieser Zeit verantwortlich gemacht.

Klinische Untersuchungen zur Leberverfettung der Milchkühe setzen die Kenntnis des Leberfettgehaltes des Einzeltieres voraus. Bisher war keine Analysemethode bekannt, mit welcher Lebertotallipid (**TL**)- und –triacylglycerol (**TAG**)-Gehalt in einer geringen Bioptatmasse mit hoher analytischer Genauigkeit bestimmt werden konnten. In der vorliegenden Arbeit wurde eine zweistufige Analysemethode etabliert, bei welcher der TL-Gehalt zunächst gravimetrisch und anschließend der TAG-Gehalt enzymatisch bestimmt werden. Die Überprüfung an 150 Deutsch-Holstein-Kühen bestätigte, dass damit sowohl der TL- als auch der TAG-Gehalt in einem Leberbioptat geringer Masse (<100 mg) mit hoher Genauigkeit bestimmt werden können. Aufgrund der engen Korrelation beider Parameter ist es auf der Basis eines broken-line Modells mit sehr hoher Sicherheit möglich, den TAG-Gehalt aus dem TL-Gehalt oder umgekehrt zu berechnen. Damit kann ggf. auf die Bestimmung eines der beiden Parameter verzichtet werden.

Für die Anwendung der Fettleberdiagnostik als Routineverfahren in größeren Tierbeständen bedarf es einer zuverlässigen, real-time Methode zur Klassifizierung des Leberfettgehaltes. Aus Gründen des Tierschutzes sollte diese nicht-invasiv sein. Basierend auf der transkutanen brightness mode (**B-Mode**) Sonographie wurde daher ein Computerprogramm [Computer-Aided Ultrasound Diagnosis (**CAUS**)] zur Analyse des Leberfettgehaltes entwickelt. Mit CAUS werden die in einer standardisierten Gerätegrundeinstellung transkutan aufgenommenen B-Mode-Ultraschalldatensätze der Leber zunächst kalibriert. Damit wird erreicht, den Einfluss von im Zuge der Bildaufzeichnung entstandenen Artefakten sowie der Bauchwand des Tieres auf die Analysenergebnisse zu korrigieren. Bei der Überprüfung an 151 Deutsch-Holstein-Kühen bestätigte sich die Eignung von CAUS zur digitalen Analyse des Leberfettgehaltes. Es ist damit möglich, Kühe dem TAG-Gehalt des Organs entsprechend

untersucherunabhängig und nicht-invasiv zu klassifizieren. Aufgrund der Automatisierung der Arbeitsschritte ist die Software benutzerfreundlich und für den Einsatz in der Praxis zum Screening des Leberfettgehaltes im Rahmen der Gesundheitsüberwachung von Milchviehherden geeignet.

Die durch die Fetteinlagerung in die Hepatozyten hervorgerufene Schwellung des Parenchyms führt zur Vergrößerung der Leber und einem Abstumpfen der Organränder. Die Dimensionsänderungen können sonographisch erfasst werden. Wie die Untersuchungen an 133 Deutsch-Holstein-Kühen ergaben, werden sie ab einem Leber-TAG-Gehalt von etwa 100 mg/g Leberfrischgewicht [fresh weight (**FW**)] nachweisbar und besonders prominent ab einem TAG von 150 mg/g FW. Aufgrund der hohen absoluten und relativen interindividuellen Varianz des mittels multipler Regression aus den Dimensionsparametern berechneten Leberfettgehaltes ist der diagnostische Wert der Organmaße zur Vorhersage des Leberfettgehaltes bei Milchkühen jedoch begrenzt.

Infolge der Parenchymschwellung kommt es nicht nur zur Änderung der Form der Leber, sondern auch zur Druckerhöhung innerhalb des Organs. Diese führt zu einer Kompression der Sinusoide und Blutgefäße. Intraoperativ durchgeführte dopplersonographische Untersuchungen an der V. portae von 80 laktierenden Deutsch-Holstein-Kühen mit unterschiedlichem Leberfettgehalt bestätigten, dass es infolgedessen zu einer Beeinflussung der Organdurchblutung kommt. Mit zunehmendem Leberfettgehalt nahmen bei den Kühen die Blutflussgeschwindigkeit und der venöse Pulsatilitätsindex an der V. portae ab. Dies beruht auf einer Reduktion der Elastizität der Gefäße innerhalb der Leber infolge der Fetteinlagerung. Die Veränderungen werden besonders deutlich, wenn der TAG-Gehalt 150 mg/g FW übersteigt.

Obwohl Glucocorticoide zur Behandlung des Lipomobilisationssyndroms der Milchkühe mit nachweislich positiver Wirkung breit angewendet werden, sind deren Effekte an der Leber noch immer nicht eindeutig aufgeklärt. Vor allem Studien zur Glucosenettoabgabe und zum Blutfluss an der Leber von Milchkühen unter Glucocorticoideinfluss fehlten bisher. Die im Rahmen der Arbeit entwickelte, ultraschallgeführte Katheterimplantation in die V. portae, V. hepatica und V. mesenterica cranialis in Verbindung mit der Katheterisierung der Aorta abdominalis schafften eine Voraussetzung dafür, diese Fragestellung an Patienten zu untersuchen. Die Methode stellt eine sichere, minimal-

invasive Technik dar, welche in Kombination mit der Farbstoffverdünnungsmethode zur Erfassung der Nettoentnahme bzw. -abgabe von Substraten bei Milchkühen geeignet ist. So konnte bei sieben Deutsch-Holstein-Kühen unter Einfluss des synthetischen Glucocorticoids Dexamethason-21-isonicotinat (**DEXA**) neben einer Hyperglycaemie und Hyperinsulinaemie eine Zunahme des hepatischen Plasma- und Blutflusses nachgewiesen werden. Vor allem der Anstieg des arteriellen Anteils am hepatischen Blutfluss ist ein indirekter Hinweis auf eine Reduktion der Durchblutung peripherer Organe zugunsten der Leber unter DEXA-Einfluss. Das Ausbleiben des Anstieges der Glucosenettoabgabe in der Leber lässt darauf schließen, dass die erhöhten Glucosespiegel nicht - wie bisher vermutet - auf eine Stimulation der hepatischen Glucosenettoabgabe, sondern auf eine Reduktion des Glucoseverbrauchs in der Körperperipherie zurückzuführen sind. Da die Glucosespiegel im Plasma trotz zunehmender Insulinkonzentrationen nicht zurückgehen, kann von einer Insulinresistenz in der Körperperipherie ausgegangen werden. Dies bestätigte auch das Absinken des revised quantitative insulin sensitivity check index (**RQuicki**) nach DEXA-Behandlung. Die Ergebnisse lassen weiterhin vermuten, dass es nach DEXA-Behandlung zu einer offenbar insulinbedingten Reduktion der Lipolyse in der Körperperipherie kommt. Unter der Behandlung wurden die oxidativen Prozesse in der Leber forciert, und es wurde mehr Sauerstoff im Organ verbraucht. Die Hyperglycaemie, der nachweisliche Rückgang an intrahepatischem Speicherfett und die Steigerung der hepatischen Durchblutung können als positive Effekte für die Leber gewertet werden. Die Ergebnisse können damit als Beitrag zur Erklärung der klinischen Wirksamkeit einer Behandlung mit Glucocorticoiden angesehen werden.

5. Summary

Hepatosteatosis in dairy cows

Studies on non-invasive determination of hepatic fat content and hepatic blood flow and the effects of dexamethasone on these two variables in dairy cows.

In the majority of high-producing dairy cows, excessive fat deposition in the liver occurs during the first few weeks of lactation. This phenomenon may lead to lipid mobilization syndrome, which is the primary cause of hepatic insufficiency as well as numerous other diseases in the early postpartum period.

An accurate knowledge of the fat content of the liver of individual cows is necessary for conducting clinical studies of fatty liver in dairy cows. Until now, there were no precise methods for assessing the total lipid (**TL**) and triacylglycerol (**TAG**) content of small liver biopsy samples. The present study established a two-step analytical method, in which the TL content was assessed gravimetrically followed by enzymatic measurement of the TAG content. The method was tested in 150 German Holstein cows and shown to be highly accurate for determining the TL and TAG contents of very small (<100 mg) liver biopsy samples. Because of the high correlation between the two variables, the broken-line model can be used with a very high degree of confidence to determine the TAG content from the TL content or vice versa. This means that, depending on the study design, it may be acceptable to forego the measurement of one of the two variables.

A reliable real-time method for classifying cows according to their hepatic fat content is required for diagnosing fatty liver on a routine basis in large dairy operations. For animal welfare reasons, the method should be non-invasive. A computer program [Computer-Aided Ultrasound Diagnosis (**CAUS**)] for evaluation of hepatic fat content was therefore developed using transcutaneous brightness mode (**B-mode**) ultrasonography. For this purpose, the liver is scanned transcutaneously using standardised settings for the ultrasound machine to calibrate the images. This allows for the correction of ultrasonographic artefacts and for adverse effects on the images caused by the abdominal wall during scanning of the liver. The usefulness of CAUS as a reliable method for digital analysis of the liver fat content was confirmed in a study involving in 151

German Holstein cows; cows were classified objectively and non-invasively according to the TAG content of the liver. The software provides an automated examination process and is therefore user friendly and well suited for screening of liver fat content in dairy herds as part of a herd health program.

Fat deposition in hepatocytes leads to parenchymal swelling with enlargement of the liver and rounding of its margins. These dimensional changes can be recognised via ultrasonography; a study of 133 German Holstein cows showed that these changes were first detectable in cows with a TAG content of approximately 100 mg/g fresh liver weight (**FW**). Changes were very prominent in cows with a TAG content of 150 mg/g FW or greater. However, the diagnostic usefulness of the size of the liver for predicting fat content of the liver in dairy cows is limited because of the large absolute and relative inter-individual variances, which were calculated from various dimensional variables via multiple regression analysis.

In addition to changes in the size and shape of the liver, swelling of the liver parenchyma also increases the pressure within the organ, leading to compression of the sinusoids and blood vessels. Intraoperative Doppler ultrasonography of the portal vein in 80 German Holstein cows with varying liver fat content revealed that the fat content affected liver perfusion. Blood flow velocity and the venous pulsatility index of the portal vein progressively decreased with an increase in the TAG content of the liver; reduced elasticity of blood vessels because of increased fat content of the liver is believed to account for this. These changes became pronounced when the TAG content of the liver exceeded 150 mg/g FW.

Glucocorticoids are commonly used to treat lipid mobilization syndrome in dairy cattle with good success. However, the exact effects of this treatment are not clear. There have been no studies on glucose net output and blood flow in the liver of dairy cattle treated with glucocorticoids. To study these factors, methods were established in this research project at which in all the cows, indwelling catheters were placed transcutaneously under ultrasonographic guidance into the cranial mesenteric vein, hepatic vein, portal vein, and, without ultrasonographic guidance, in the abdominal aorta. These are safe and minimally-invasive techniques, which in combination with a dye-dilution method, are suited for determination of hepatic metabolism in dairy cows. The

method revealed that there was hyperglycaemia, hyperinsulinaemia and an increase in the hepatic plasma and blood flow in seven German Holstein cows treated with dexamethasone-21-isonicontinate (**DEXA**). The increase in the arterial component of hepatic blood flow is an indirect indication of reduced blood flow to the periphery of the body in cows under the influence of DEXA. The absence of an increase in net glucose production in the liver suggests that increased blood glucose concentration is attributable to decreased glucose use in the periphery rather than stimulation of glucose output by the liver. The lack of a decrease in plasma glucose concentration despite increasing insulin levels is likely attributable to insulin resistance in the peripheral regions of the body. This was supported by a decrease in the revised quantitative insulin sensitivity check index (**RQuicki**) after DEXA administration. The results also suggest that there is an insulin-dependent reduction in lipolysis in peripheral tissues after DEXA treatment. Oxidative processes in the liver were enhanced and oxygen consumption in the liver increased under the influence of DEXA. Thus, hyperglycaemia, the decline in hepatic fat storage, and the increased hepatic perfusion can be interpreted as positive effects of DEXA on the liver. Taken together, the results of the present research project contribute to the elucidation of the mode of action of glucocorticoids in the treatment of hepatosteatosis in dairy cows.

6. Literaturverzeichnis

Acorda, J. A., H. Yamada, and S. M. Ghamsari. 1994a. Evaluation of fatty infiltration of the liver in dairy-cattle through digital analysis of hepatic ultrasonograms. Vet Radiol Ultrasound 35:120-123.

Acorda, J. A., H. Yamada, and S. M. Ghamsari. 1994b. Ultrasonography of fatty infiltration of the liver in dairy-cattle using liver-kidney contrast. Vet Radiol Ultrasound 35:400-404.

Al-Trad, B., K. Reisberg, T. Wittek, G. B. Penner, A. Alkaassem, G. Gäbel, M. Fürll, and J. R. Aschenbach. 2009. Increasing intravenous infusions of glucose improve body condition but not lactation performance in midlactation dairy cows. J Dairy Sci 92:5645-5658.

Al-Trad, B., T. Wittek, G. Gäbel, M. Fürll, K. Reisberg, and J. R. Aschenbach. 2010. Activity of hepatic but not skeletal muscle carnitine palmitoyltransferase enzyme is depressed by intravenous glucose infusions in lactating dairy cows. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 94:685-695.

Allan, E. H., and M. A. Titheradge. 1984. Effect of treatment of rats with dexamethasone in vivo on gluconeogenesis and metabolite compartmentation in subsequently isolated hepatocytes. Biochem J 219:117-123.

Altura, B. M., and B. T. Altura. 1974. Effects of local anesthetics, antihistamines, and glucocorticoids on peripheral blood flow and vascular smooth muscle. Anesthesiology 41:197-214.

Amatruda, J. M., J. N. Livingston, and D. H. Lockwood. 1985. Cellular mechanisms in selected states of insulin resistance: human obesity, glucocorticoid excess, and chronic renal failure. Diabetes Metab Rev 1:293-317.

Andersson, L., and T. Olsson. 1984. The effect of two glucocorticoids on plasma glucose and milk production in healthy cows and the therapeutic effect in ketosis. Nord Vet Med 36:13-18.

Andrews, R. C., and B. R. Walker. 1999. Glucocorticoids and insulin resistance: Old hormones, new targets. Clin Sci (Lond) 96:513-523.

Aschenbach, J. R., N. B. Kristensen, S. S. Donkin, H. M. Hammon, and G. B. Penner. 2010. Gluconeogenesis in dairy cows: the secret of making sweet milk from sour dough. IUBMB Life 62:869-877.

Ashley, K. D., D. N. Herndon, L. D. Traber, D. L. Traber, K. Deubel-Ashley, J. C. Stothert, Jr., and G. C. Kramer. 1992. Systemic blood flow to sheep lung: Comparison of flow probes and microspheres. J Appl Physiol 73:1996-2003.

Atkinson, T., V. R. Fowler, G. A. Garton, and A. K. Lough. 1972. A rapid method for the accurate determination of lipid in animal tissues. Analyst 97:562-568.

Baird, G. D. 1982. Primary ketosis in the high-producing dairy cow: Clinical and subclinical disorders, treatment, prevention, and outlook. J Dairy Sci 65:1-10.

Baird, G. D., K. G. Hibbitt, and G. D. Hunter. 1968. Biochemical aspects of bovine ketosis. Biochem J 107:683-689.

Baird, G. D., and R. J. Heitzman. 1969. Antiketogenic action of glucocorticoids in the cow. Biochem J 114:69.

Baird, G. D., and R. J. Heitzman. 1970. Gluconeogenesis in the cow. The effects of a glucocorticoid on hepatic intermediary metabolism. Biochem J 116:865-874.

Baird, G. D., and R. J. Heitzman. 1971. Mode of action of a glucocorticoid on bovine intermediary metabolism. Possible role in controlling hepatic ketogenesis. Biochim Biophys Acta 252:184-198.

Baird, G. D., R. J. Heitzman, and A. M. Snoswell. 1972. Effects of a glucocorticoid on the concentrations of CoA and carnitine esters and on redox state in bovine liver. Eur J Biochem 29:104-109.

Balci, A., S. Karazincir, H. Sumbas, Y. Oter, E. Egilmez, and T. Inandi. 2008. Effects of diffuse fatty infiltration of the liver on portal vein flow hemodynamics. J Clin Ultrasound 36:134-140.

Barry, J. L., E. Debras, J. Lefaivre, and C. Champredon. 1979. Mesure du débit du sang de la veine porte au moyen d'un débitmètre électromagnétique chez la chêvre. Ann Biol Biochim Biophys 19:733-738.

Barshop, N. J., C. B. Sirlin, J. B. Schwimmer, and J. E. Lavine. 2008. Review article: Epidemiology, pathogenesis and potential treatments of paediatric non-alcoholic fatty liver disease. Aliment Pharmacol Ther 28:13-24.

Bassett, J. M., S. C. Mills, and R. L. Reid. 1966. The influence of cortisol on glucose utilization in sheep. Metabolism 15:922-932.

Bauman, D. E., C. J. Peel, W. D. Steinhour, P. J. Reynolds, H. F. Tyrrell, A. C. Brown, and G. L. Haaland. 1988. Effect of bovine somatotropin on metabolism of lactating dairy cows: Influence on rates of irreversible loss and oxidation of glucose and nonesterified fatty acids. J Nutr 118:1031-1040.

Beever, D. E. 2006. The impact of controlled nutrition during the dry period on dairy cow health, fertility and performance. Anim Reprod Sci 96:212-226.

Bell, A. W. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. J Anim Sci 73:2804-2819.

Bickhardt, K., M. Neumann und C. Steinmann. 1988. Zur Bestimmung von Metaboliten des Energiestoffwechsels in Leber-Biopsieproben. Ein Beitrag zur Charakterisierung der Schafketose. Zentralbl Veterinärmed A 35:790-799.

Binnert, C., S. Ruchat, N. Nicod, and L. Tappy. 2004. Dexamethasone-induced insulin resistance shows no gender difference in healthy humans. Diabetes Metab 30:321-326.

Bleck, J. S. 1998. Parametrischer Ultraschall in der Inneren Medizin am Beispiel der Leber. Habilitation, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover.

Bleck, J. S., M. Gebel und M. P. Manns. 2000. Quantitative Sonographie - Bedeutung und Perspektive. Internist (Berl) 41:10-16.

Block, S. S., W. R. Butler, R. A. Ehrhardt, A. W. Bell, M. E. Van Amburgh, and Y. R. Boisclair. 2001. Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. J Endocrinol 171:339-348.

Bobe, G., J. W. Young, and D. C. Beitz. 2004. Invited review: Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. J Dairy Sci 87:3105-3124.

Bobe, G., V. R. Amin, A. R. Hippen, P. She, J. W. Young, and D. C. Beitz. 2008. Non-invasive detection of fatty liver in dairy cows by digital analyses of hepatic ultrasonograms. J Dairy Res 75:84-89.

Bollwein, H., D. Prost, S. E. Ulbrich, H. Niemann, and A. Honnens. 2010. Effects of a shortened preovulatory follicular phase on genital blood flow and endometrial hormone receptor concentrations in Holstein-Friesian cows. Theriogenology 73:242-249.

Braun, U. 1990. Ultrasonographic examination of the liver in cows. Am J Vet Res 51:1522-1526.

Braun, U. 2009. Ultrasonography of the liver in cattle. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 25:591-609.

Braun, U., and D. Gerber. 1994. Influence of age, breed, and stage of pregnancy on hepatic ultrasonographic findings in cows. Am J Vet Res 55:1201-1205.

Brockman, R. P. 1978. Roles of glucagon and insulin in the regulation of metabolism in ruminants. A review. Can Vet J 19:55-62.

Brockman, R. P., and B. Laarveld. 1986a. Effect of insulin on gluconeogenesis and the metabolism of lactate in sheep. Can J Physiol Pharmacol 64:1055-1059.

Brockman, R. P., and B. Laarveld. 1986b. Hormonal regulation of metabolism in ruminants: A review. Livestock Prod Sci 14:313-334.

Brumby, P. E., M. Anderson, B. Tuckley, J. E. Storry, and K. G. Hibbit. 1975. Lipid metabolism in the cow during starvation-induced ketosis. Biochem J 146:609-615.

Buckley, W. T., G. K. Eigendorf, and W. J. Dornward. 1986. A liver biopsy instrument for large animals. Can J Anim Sci. 66:1137-1140.

Bucolo, G., and H. David. 1973. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. Clin Chem 19:476-482.

Buczinski, S., G. Fecteau, and R. DiFruscia. 2006. Ventricular septal defects in cattle: A retrospective study of 25 cases. Can Vet J 47:246-252.

Bulter, W. M., H. M. Maling, M. G. Horning, and B. B. Brodie. 1961. The direct determination of liver triglycerides. J Lipid Res 2:95-96.

Cadorniga-Valino, C., R. R. Grummer, L. E. Armentano, S. S. Donkin, and S. J. Bertics. 1997. Effects of fatty acids and hormones on fatty acid metabolism and gluconeogenesis in bovine hepatocytes. J Dairy Sci 80:646-656.

Carlson, D. B., N. B. Litherland, H. M. Dann, J. C. Woodworth, and J. K. Drackley. 2006. Metabolic effects of abomasal L-carnitine infusion and feed restriction in lactating Holstein cows. J Dairy Sci 89:4819-4834.

Cebra, C. K., F. B. Garry, D. M. Getzy, and M. J. Fettman. 1997. Hepatic lipidosis in anorectic, lactating holstein cattle: A retrospective study of serum biochemical abnormalities. J Vet Intern Med 11:231-237.

Chap, Z., R. H. Jones, J. Chou, C. J. Hartley, M. L. Entman, and J. B. Field. 1986. Effect of dexamethasone on hepatic glucose and insulin metabolism after oral glucose in conscious dogs. J Clin Invest 78:1355-1361.

Chin, H. P., S. S. Abd el-Meguid, and D. H. Blankenhorn. 1971. An improved method for determination of serum and plasma triglycerides. Clin Chim Acta 31:381-386.

Christie, W. W. 1981. Lipid metabolism in ruminant animals. 1st ed ed. Oxford; New York; Pergamon Press.

Collins, R. A., and I. M. Reid. 1980. A correlated biochemical and stereological study of periparturient fatty liver in the dairy cow. Res Vet Sci 28:373-376.

Collins, R. A., I. M. Reid, L. A. Williams, and P. F. Dennis. 1985. Histological measurement of fat content of liver of dairy cows. J Comp Pathol 95:437-441.

Constable, P. D., G. Y. Miller, G. F. Hoffsis, B. L. Hull, and D. M. Rings. 1992. Risk factors for abomasal volvulus and left abomasal displacement in cattle. Am J Vet Res 53:1184-1192.

d'Emmanuele di Villa Bianca, R., L. Lippolis, G. Autore, A. Popolo, S. Marzocco, L. Sorrentino, A. Pinto, and R. Sorrentino. 2003. Dexamethasone improves vascular hyporeactivity induced by LPS in vivo by modulating ATP-sensitive potassium channels activity. Br J Pharmacol 140:91-96.

Dann, H. M., D. E. Morin, G. A. Bollero, M. R. Murphy, and J. K. Drackley. 2005. Prepartum intake, postpartum induction of ketosis, and periparturient disorders affect the metabolic status of dairy cows. J Dairy Sci 88:3249-3264.

Dardevet, D., M. C. Moore, D. Remond, C. A. Everett-Grueter, and A. D. Cherrington. 2006. Regulation of hepatic metabolism by enteral delivery of nutrients. Nutr Res Rev 19:161-173.

de Jongh, R. T., A. D. Clark, I. J. RG, E. H. Serne, G. de Vries, and C. D. Stehouwer. 2004. Physiological hyperinsulinaemia increases intramuscular microvascular reactive hyperaemia and vasomotion in healthy volunteers. Diabetologia 47:978-986.

Delamaire, E., and J. Guinard-Flament. 2006. Increasing milking intervals decreases the mammary blood flow and mammary uptake of nutrients in dairy cows. J Dairy Sci 89:3439-3446.

Delling, U. 2000. Intraoperative Ultraschalluntersuchung der Leber und der Gallenblase des Rindes. Dissertation, Universität Leipzig, Leipzig.

Devatkal, S., S. K. Mendiratta, N. Kondaiah, M. C. Sharma, and A. S. R. Anjaneyulu. 2004. Physico-chemical, functional and microbiological quality of buffalo liver. Meat Science 68:79-86.

Dietrich, C. F., J. H. Lee, R. Gottschalk, G. Herrmann, C. Sarrazin, W. F. Caspary, and S. Zeuzem. 1998. Hepatic and portal vein flow pattern in correlation with intrahepatic fat deposition and liver histology in patients with chronic hepatitis C. Am J Roentgenol 171:437-443.

DIN, 1999. Direkt wirkende anzeigende elektrische Messgeräte und ihr Zubehör; Messgeräte mit Skalenanzeige; Teil 1: Definitionen und allgemeine Anforderungen für alle Teile dieser Norm (IEC 60051-1:1997). Deutsche Fassung EN 60051-1:1998.

Dirksen, G. 1967. Gegenwärtiger Stand der Diagnostik, Therapie und Prophylaxe der Dislocatio abomasi sinistra des Rindes. Dtsch Tierärztl Wochenschr 74:625-633.

Dodt, C., J. P. Wellhoner, M. Schutt und F. Sayk. 2009. Glukokortikoide und Hypertonie. Internist (Berl) 50:36-41.

Donkin, S. S., and L. E. Armentano. 1995. Insulin and glucagon regulation of gluconeogenesis in preruminating and ruminating bovine. J Anim Sci 73:546-551.

Drackley, J. K. 1999. ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? J Dairy Sci 82:2259-2273.

Drackley, J. K., J. J. Veenhuizen, M. J. Richard, and J. W. Young. 1991. Metabolic changes in blood and liver of dairy cows during either feed restriction or administration of 1,3-butanediol. J Dairy Sci 74:4254-4264.

Drackley, J. K., M. J. Richard, D. C. Beitz, and J. W. Young. 1992. Metabolic changes in dairy cows with ketonemia in response to feed restriction and dietary 1,3-butanediol. J Dairy Sci 75:1622-1634.

Drackley, J. K., T. R. Overton, and D. N. Douglas. 2001. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. J Dairy Sci 84:E100-E112.

Dudwiesus, H., R. Krieg, K. J. Schmidt, H. Dudwiesus, R. Krieg und K. G. Schmidt. 1993. Physikalisch-technische Grundlagen der Dopplersonographie. Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Duffield, T. F., K. D. Lissemore, B. W. McBride, and K. E. Leslie. 2009. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. J Dairy Sci 92:571-580.

Durand, D., D. Bauchart, J. Lefaivre, and J. P. Donnat. 1988. Method for continuous measurement of blood metabolite hepatic balance in conscious preruminant calves. J Dairy Sci 71:1632-1637.

Eisemann, J. H., G. B. Huntington, and C. L. Ferrell. 1987. Blood flow to hindquarters of steers measured by transit time ultrasound and indicator dilution. J Dairy Sci 70:1385-1390.

Eisenberg, E., M. Konopniki, E. Veitsman, R. Kramskay, D. Gaitini, and Y. Baruch. 2003. Prevalence and characteristics of pain induced by percutaneous liver biopsy. Anesth Analg 96:1392-1396.

Erdogmus, B., A. Tamer, R. Buyukkaya, B. Yazici, A. Buyukkaya, E. Korkut, A. Alcelik, and U. Korkmaz. 2008. Portal vein hemodynamics in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Tohoku J Exp Med 215:89-93.

Exton, J. H., T. B. Miller, S. C. Harper, and C. R. Park. 1976. Carbohydrate metabolism in perfused livers of adrenalectomized and steroid-replaced rats. Am J Physiol 230:163-170.

Farrell, G. C., N. C. Teoh, and R. S. McCuskey. 2008. Hepatic microcirculation in fatty liver disease. Anat Rec (Hoboken) 291:684-692.

Fleig, W. E., G. Noetherfleig, H. Roeben, and H. Ditschuneit. 1984. Hormonal-regulation of key gluconeogenic enzymes and glucose-release in cultured-hepatocytes - Effects of dexamethasone and gastrointestinal hormones on glucagon action. Arch Biochem Biophys 229:368-378.

Fletcher, M. J. 1968. A colorimetric method for estimating serum triglycerides. Clin Chem Acta 22:393-397.

Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem 226:497-509.

Foster, L. B., and R. T. Dunn. 1973. Stable reagents for determination of serum triglycerides by a colorimetric Hantzsch condensation method. Clin Chem 19:338-340.

Friedman, J. E., R. W. Dudek, D. S. Whitehead, D. L. Downes, W. R. Frisell, J. F. Caro, and G. L. Dohm. 1991. Immunolocalization of glucose transporter GLUT4 within human skeletal muscle. Diabetes 40:150-154.

Fürll, M. 1989. Vorkommen, Ätiologie, Pathogenese, Diagnose und medikamentelle Beeinflussung von Leberschäden beim Rind. Habilitation, Universität Leipzig, Leipzig.

Fürll, M. und B. Knobloch. 1993. Glukokortikosteroidwirkungen auf den Fettstoffwechsel und die Leberfunktion bei güsten, nichtlaktierenden Kühen. Tierärztl Prax 21:503-506.

Fürll, M. und B. Fürll. 1998. Glukokortikoid- (Prednisolon-) Wirkungen auf einige Blut-, Harn- und Leberparameter bei Kühen in der zweiten Woche post partum. Tierärztl Prax G 26:262-268.

Fürll, M. und F. Jäckel. 2005. Glucocorticoideinflüsse auf Parameter des Fett- und Leberstoffwechsels, auf hämatologische Parameter sowie auf die Milchleistung bei Hochleistungskühen in der Frühlaktation. Berl Münch Tierärztl Wschr 118:247-254.

Gaal, T., and F. Husveth. 1983. Comparison of the liver biopsy sample and the "whole liver" in respect of lipid content and fatty acid composition of lipids. Acta Vet Hung 31:51-56.

Gaal, T., I. M. Reid, R. A. Collins, C. J. Roberts, and B. V. Pike. 1983. Comparison of biochemical and histological methods of estimating fat content of liver of dairy cows. Res Vet Sci 34:245-248.

Gaitini, D., Y. Baruch, E. Ghersin, E. Veitsman, H. Kerner, B. Shalem, G. Yaniv, C. Sarfaty, and H. Azhari. 2004. Feasibility study of ultrasonic fatty liver biopsy: Texture vs. attenuation and backscatter. Ultrasound Med Biol 30:1321-1327.

Gaitini, D., M. Lederman, Y. Baruch, E. Ghersin, E. Veitsman, H. Kerner, B. Shalem, G. Yaniv, C. Sarfaty, and H. Azhari. 2005. Computerised analysis of liver texture with correlation to needle biopsy. Ultraschall Med 26:197-202.

Gallix, B. P., P. Taourel, M. Dauzat, J. M. Bruel, and M. Lafortune. 1997. Flow pulsatility in the portal venous system: A study of doppler sonography in healthy adults. Am J Roentgenol 169:141-144.

Gauthier, C., K. el-Tayeb, M. Vranic, and H. L. Lickley. 1986. Glucoregulatory role of cortisol and epinephrine interactions studied in adrenalectomized dogs. Am J Physiol 250:E393-401.

Gauthier, M. S., K. Couturier, A. Charbonneau, and J. M. Lavoie. 2004. Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic steatosis, adipose tissue fat accumulation, and plasma lipid profile. Int J Obes Relat Metab Disord 28:1064-1071.

Geelen, M. J., and T. Wensing. 2006. Studies on hepatic lipidosis and coinciding health and fertility problems of high-producing dairy cows using the "Utrecht fatty liver model of dairy cows". A review. Vet Q 28:90-104.

Gelfert, C.-C. und R. Staufenbiel. 2007. Zur Stoffwechselüberwachung in Milchviehherden. Tierärztl. Umschau 62:176-182.

Gerber, D. 1993. Sonographische Befunde an der Leber des Rindes. Dissertation, Universität Zürich, Zürich.

Gerloff, B. J., T. H. Herdt, and R. S. Emery. 1984. Association of moderate and severe hepatic lipidosis in cattle with differing reporductive performance. Can J Anim Sci 64(Suppl):250-251.

Gerloff, B. J., T. H. Herdt, and R. S. Emery. 1986. Relationship of hepatic lipidosis to health and performance in dairy cattle. J Am Vet Med Assoc 188:845-850.

Girard, C. L., C. Benchaar, J. Chiquette, and A. Desrochers. 2009. Net flux of nutrients across the rumen wall of lactating dairy cows as influenced by dietary supplements of folic acid. J Dairy Sci 92:6116-6122.

Goff, J. P., and R. L. Horst. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. J Dairy Sci 80:1260-1268.

Götze, A., A. Honnens, G. Flachowsky, and H. Bollwein. 2010. Variability of mammary blood flow in lactating Holstein-Friesian cows during the first twelve weeks of lactation. J Dairy Sci 93:38-44.

Grabowski, N. T. 2000. Körpergewichtsentwicklung, Milchinhaltsstoffe und Milchmengenleistung als Kriterien zur laktationsbegleitenden Beurteilung des Gesundheitszustandes hochleistender DSB-Kühe in Laufstallhaltung. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.

Gröhn, Y., and L. A. Lindberg. 1982. Methodological aspects of the microscopy of bovine liver biopsies. J Comp Pathol 92:567-578.

Gröhn, Y., and L. A. Lindberg. 1985. Ultrastructural changes of the liver in spontaneously ketotic cows. J Comp Pathol 95:443-452.

Grote, D. 1992. Sonographische Untersuchungen zur Leberdiagnostik beim Rind unter besonderer Berücksichtigung des Fettlebersyndroms. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.

Gruffat, D., D. Durand, B. Graulet, and D. Bauchart. 1996. Regulation of VLDL synthesis and secretion in the liver. Reprod Nutr Dev 36:375-389.

Grummer, R. R. 1993. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. J Dairy Sci 76:3882-3896.

Grummer, R. R. 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. J Anim Sci 73:2820-2833.

Grummer, R. R., D. G. Mashek, and A. Hayirli. 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. Vet Clin North Am Food Anim Pract 20:447-470.

Guinard-Flament, J., E. Delamaire, S. Lemosquet, M. Boutinaud, and Y. David. 2006. Changes in mammary uptake and metabolic fate of glucose with once-daily milking and feed restriction in dairy cows. Reprod Nutr Dev 46:589-598.

Haffner, J. C., H. Eiler, R. M. Hoffman, K. A. Fecteau, and J. W. Oliver. 2009. Effect of a single dose of dexamethasone on glucose homeostasis in healthy horses by using the combined intravenous glucose and insulin test. J Anim Sci 87:131-135.

Hallowell, G. D., T. J. Potter, and I. M. Bowen. 2007. Methods and normal values for echocardiography in adult dairy cattle. J Vet Cardiol 9:91-98.

Hamada, H., Y. Seino, and K. Namikawa. 1987. Role of glucocorticoids in the regulation of plasma glucose, insulin and glucagon in sheep. Jpn J Zootech Sci 58:1011-1016.

Hammon, H. M., S. N. Sauter, M. Reist, Y. Zbinden, C. Philipona, C. Morel, and J. W. Blum. 2003. Dexamethasone and colostrum feeding affect hepatic gluconeogenic enzymes differently in neonatal calves. J Anim Sci 81:3095-3106.

Hammon, H. M., C. Philipona, Y. Zbinden, J. W. Blum, and S. S. Donkin. 2005. Effects of dexamethasone and growth hormone treatment on hepatic gluconeogenic enzymes in calves. J Dairy Sci 88:2107-2116.

Hanson, R. W., and L. Reshef. 1997. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. Annu Rev Biochem 66:581-611.

Hara, A., and N. S. Radin. 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. Anal Biochem 90:420-426.

Hartmann, P. E., and D. S. Kronfeld. 1973. Mammary blood flow and glucose uptake in lactating cows given dexamethasone. J Dairy Sci 56:896-902.

Haudum, A., A. Starke, G. Weijers, J. M. Thijssen, M. Beyerbach, P. Wohlsein, C. L. De Korte, H. Bollwein, and J. Rehage. 2010. Ultrasonographic echotexture analysis in dairy cows with hepatic steatosis by using the software Mazda®. In: XXVIth World Buiatrics Congress 2010. Santiago, Chile, November, 14-18, 2010.

Haudum, A., A. Starke, M. Beyerbach, P. Wohlsein, and J. Rehage. 2011. Ultrasonographic assessment of liver dimensions in dairy cows with different hepatic triacylglycerol content. J Anim Sci 89:1392–1400.

Herdt, T. H. 1988. Fatty liver in dairy cows. Vet Clin North Am Food Anim Pract 4:269-287.

Herdt, T. H. 2000. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. Vet Clin North Am Food Anim Pract 16:215-230.

Herdt, T. H., B. J. Gerloff, J. S. Liesman, and R. S. Emery. 1982. Hepatic lipidosis and liver function in 49 cows with displaced abomasums. In: XIIth World Congress in disases of cattle the Netherlands. p 522-526.

Herdt, T. H., L. Goeders, J. S. Liesman, and R. S. Emery. 1983. Test for estimation of bovine hepatic lipid content. J Am Vet Med Assoc 182:953-955.

Hill, A. W., I. M. Reid, and R. A. Collins. 1985. Influence of liver fat on experimental Escherichia coli mastitis in periparturient cows. Vet Rec 117:549-551.

Holtenius, P. und R. Niskanen. 1985. Leberzellverfettung bei Kühen mit Labmagenverlagerung. Dtsch Tierärztl Wschr 92:398-400.

Holtenius, P., and K. Holtenius. 2007. A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows. Acta Vet Scand 49:29.

Honnens, A., H. Niemann, V. Paul, H. H. Meyer, and H. Bollwein. 2008a. Doppler sonography of the uterine arteries during a superovulatory regime in cattle. Uterine blood flow in superovulated cattle. Theriogenology 70:859-867.

Honnens, A., C. Voss, K. Herzog, H. Niemann, D. Rath, and H. Bollwein. 2008b. Uterine blood flow during the first 3 weeks of pregnancy in dairy cows. Theriogenology 70:1048-1056.

Honnens, A., H. Niemann, K. Herzog, V. Paul, H. H. Meyer, and H. Bollwein. 2009. Relationships between ovarian blood flow and ovarian response to eCG-treatment of dairy cows. Anim Reprod Sci 113:1-10.

Hue, L., and H. Taegtmeyer. 2009. The Randle cycle revisited: A new head for an old hat. Am J Physiol Endocrinol Metab 297:E578-591.

Huntington, G. B. 1984. Net absorption of glucose and nitrogenous compounds by lactating Holstein cows. J Dairy Sci 67:1919-1927.

Huntington, G. B., C. K. Reynolds, and B. H. Stroud. 1989. Techniques for measuring blood flow in splanchnic tissues of cattle. J Dairy Sci 72:1583-1595.

Huntington, G. B., J. H. Eisemann, and J. M. Whitt. 1990. Portal blood flow in beef steers: Comparison of techniques and relation to hepatic blood flow, cardiac output and oxygen uptake. J Anim Sci 68:1666-1673.

Ignee, A., M. Gebel, W. F. Caspary und C. F. Dietrich. 2002. Duplexsonographie der Lebergefäße - Eine Übersicht. Z Gastroenterol 40:21-32.

Iwao, T. 1987. Ultrasonographic appearance of diffuse changes in the bovine liver. Jpn J Vet Res 35:130.

Jitrapakdee, S., M. E. Walker, and J. C. Wallace. 1999. Functional expression, purification, and characterization of recombinant human pyruvate carboxylase. Biochem Biophys Res Commun 266:512-517.

Johannsen, U., M. Schäfer und A. Uhlig. 1988. Untersuchungen zur Leberfunktion der Milchkühe im peripartalen Zeitraum. 3. Mitteilung: Vorkommen und Dynamik der Lipideinlagerung in der Leber. Arch exper Vet med, Leipzig 42:118-134.

Johannsen, U., S. Menger, R. Staufenbiel und H. Klukas. 1993. Untersuchungen zur Morphologie und Funktion der Leber von Hochleistungskühen 2 Wochen post partum. Dtsch Tierärztl Wschr 100:177-181.

Jones, C. G., S. K. Hothi, and M. A. Titheradge. 1993. Effect of dexamethasone on gluconeogenesis, pyruvate-kinase, pyruvate-carboxylase and pyruvate-dehydrogenase flux in isolated hepatocytes. Biochem J 289:821-828.

Jorritsma, R., H. Jorritsma, Y. H. Schukken, and G. H. Wentink. 2000. Relationships between fatty liver and fertility and some periparturient diseases in commercial Dutch dairy herds. Theriogenology 54:1065-1074.

Jorritsma, R., H. Jorritsma, Y. H. Schukken, P. C. Bartlett, T. Wensing, and G. H. Wentink. 2001. Prevalence and indicators of post partum fatty infiltration of the liver in nine commercial dairy herds in The Netherlands. Livest Prod Sci 68:53-60.

Jorritsma, R., J. Thanasak, M. Houweling, J. P. Noordhuizen, and K. E. Müller. 2004. Effects of a single dose of dexamethasone-21-isonicotinate on the metabolism of heifers in early lactation. Vet Rec 155:521-523.

Kalaitzakis, E., N. Roubies, N. Panousis, K. Pourliotis, E. Kaldrymidou, and H. Karatzias. 2006. Evaluation of ornithine carbamoyl transferase and other serum and liver-derived analytes in diagnosis of fatty liver and postsurgical outcome of left-displaced abomasum in dairy cows. J Am Vet Med Assoc 229:1463-1471.

Kalaitzakis, E., N. Roubies, N. Panousis, K. Pourliotis, E. Kaldrymidou, and H. Karatzias. 2007. Clinicopathologic evaluation of hepatic lipidosis in periparturient dairy cattle. J Vet Intern Med 21:835-845.

Katoh, N. 2002. Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows. J Vet Med Sci 64:293-307.

Katz, M. L., and E. N. Bergman. 1969a. Hepatic and portal metabolism of glucose, free fatty acids, and ketone bodies in the sheep. Am J Physiol 216:953-960.

Katz, M. L., and E. N. Bergman. 1969b. Simultaneous measurements of hepatic and portal venous blood flow in the sheep and dog. Am J Physiol 216:946-952.

Kleppe, B. B., R. J. Aiello, R. R. Grummer, and L. E. Armentano. 1988. Triglyceride accumulation and very low density lipoprotein secretion by rat and goat hepatocytes in vitro. J Dairy Sci 71:1813-1822.

Komatsu, T., F. Itoh, S. Kushibiki, and K. Hodate. 2005. Changes in gene expression of glucose transporters in lactating and nonlactating cows. J Anim Sci 83:557-564.

Kraus-Friedmann, N. 1984. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. Physiol Rev 64:170-259.

Krebs, H. A. 1966. Bovine ketosis. Vet Rec 78:187-192.

Kremer, H., W. Dobrinski und M. A. Schreiber. 1993. Sonographische Diagnostik - Innere Medizin und angrenzende Gebiete. Urban u. Schwarzenberg, München - Wien - Balitmore.

Kretzschmar, A. M. 2007. Die Aktivität der γ-Glutamyltransferase im Serum des Rindes –Eine retrospektive Studie. Dissertation, Universität Leipzig, Leipzig.

Kristensen, N. B., A. Storm, B. M. Raun, B. A. Rojen, and D. L. Harmon. 2007. Metabolism of silage alcohols in lactating dairy cows. J Dairy Sci 90:1364-1377.

Krone, W., W. B. Huttner, H. J. Seitz, and W. Tarnowski. 1976. Effect of cold-exposure on phosphoenolpyruvate carboxykinase (Gtp) activity and cyclic-Amp concentration in livers of starved rats - Role of glucocorticoids. Biochem Biophys Acta 444:694-703.

Kronfeld, D. S., and P. E. Hartmann. 1973. Glucose redistribution in lactating cows given dexamethasone. J Dairy Sci 56:903-908.

Kruempelman, E., and N. D. Danielson. 1982. Enzymatic determination of tryglycerides in conjunction with high perfromance liquid chromatography. J Liquid Chromatogr 5:1679-1689.

Kusenda, M., A. Starke, M. Kaske, A. Haudum, M. Piechotta, and J. Rehage. 2011a. Effects of a single dose of dexamethasone-21-isonicotinate and dexamethasone-21-disodiumphosphate on the peripheral insulin action of dairy cows in early lactation. submitted

Kusenda, M., A. Starke, M. Kaske, M. Piechotta, and J. Rehage. 2011b. Evaluation of surrogate indices of insulin sensitivity by hyperinsulinemic-euglycemic glucose clamps in dairy cows. submitted

Laarveld, B., D. A. Christensen, and R. P. Brockman. 1981. The effect of insulin on net metabolism of glucose and amino acids by the bovine mammary gland. Endocrinology 108:2217-2221.

Lapierre, H., J. F. Bernier, P. Dubreuil, C. K. Reynolds, C. Farmer, D. R. Ouellet, and G. E. Lobley. 2000. The effect of feed intake level on splanchnic metabolism in growing beef steers. J Anim Sci 78:1084-1099.

Larsen, M., and N. B. Kristensen. 2009. Effect of abomasal glucose infusion on splanchnic and whole-body glucose metabolism in periparturient dairy cows. J Dairy Sci 92:1071-1083.

Lauener, J. W. 1993. Zweidimensionale Sonographie in der Fettleberdiagnostik bei Milchkühen Untersuchungen zur diagnostischen Sensitivität und Spezifität. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.

Leturque, A., E. Brot-Laroche, and M. Le Gall. 2009. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. Am J Physiol Endocrinol Metab 296:E985-992.

Lewis, J. R., and S. R. Mohanty. 2010. Nonalcoholic fatty liver disease: A review and update. Dig Dis Sci 55:560-578.

Liebich, H. G. 1999. Leber. In: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Vol. 3. H. G. Liebich, ed. Schattauer Verlag, Stuttgart, Germany. p 218-228.

Löffler, G., M. Kellerer und H. U. Häring. 1997. Endokrine Funktionen III: Die schnelle Stoffwechselregulation. 7. Aufl. ed. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

Lomax, M. A., and G. D. Baird. 1983. Blood flow and nutrient exchange across the liver and gut of the dairy cow. Effects of lactation and fasting. Br J Nutr 49:481-496.

Lough, D. S., D. L. Beede, and C. J. Wilcox. 1990. Effects of feed intake and thermal stress on mammary blood flow and other physiological measurements in lactating dairy cows. J Dairy Sci 73:325-332.

Maciel, S. M., C. S. Chamberlain, R. P. Wettemann, and L. J. Spicer. 2001. Dexamethasone influences endocrine and ovarian function in dairy cattle. J Dairy Sci 84:1998-2009.

Marette, A., E. Burdett, A. Douen, M. Vranic, and A. Klip. 1992. Insulin induces the translocation of GLUT4 from a unique intracellular organelle to transverse tubules in rat skeletal muscle. Diabetes 41:1562-1569.

Maxie, M. G. 2007. The liver and biliary system. In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals No. 2. Elsevier, Philadelphia, PA. p 310-316.

Mazur, A., E. Gueux, and Y. Chilliard. 1988. Changes in plasma lipoproteins and liver fat content in dairy cows during early lactation. J Anim Physiol Anim Nutr 59:232-242.

McCuskey, R. S., Y. Ito, G. R. Robertson, M. K. McCuskey, M. Perry, and G. C. Farrell. 2004. Hepatic microvascular dysfunction during evolution of dietary steatohepatitis in mice. Hepatology 40:386-393.

McDowell, G. H. 1983. Hormonal control of glucose homoeostasis in ruminants. Proc Nutr Soc 42:149-167.

McDowell, R. E., P. C. Underwood, R. H. Lehmann, and M. S. Barrada. 1966. Procedure for exteriorizing the carotid artery in the bovine. J Dairy Sci 49:78-80.

McFadden, J. W., S. S. Block, and J. K. Drackley. 2008. Assesment of blended sorbital and mannitl as a glucogenic precursor for periparturient dairy cows. Anim Feed Sci Technol 140:233-240.

McGavin, M. D., and J. F. Zachary. 2007. Lipids. In: Pathologic basis of veterinary disease. No. 4. M. D. McGavin and J. F. Zachary, ed. Elservier, Philadelphia, USA, Philadelphia. p 39-42

Mertens, M. 1992. Leberbiopsie beim Rind - Histologische und enzymhistochemische Auswertung von Bioptaten aus Kühen mit Dislocation abomasi sinistra. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.

Metzner, M., W. Hofmann und C. Laiblin. 1993. Untersuchungen zur Wirksamkeit intravenös verabreichter hoher Glukosemengen bei der Behandlung der Ketose des Rindes. Tierärztl Prax 21:289-293.

Mohamed, T., S. Oikawa, T. Kurosawa, K. Takehana, Y. Hosaka, H. Okada, M. Koiwa, and H. Sato. 2004. Focal fatty liver in a heifer: Utility of ultrasonography in diagnosis. J Vet Med Sci 66:341-344.

Moore, M. C., C. C. Connolly, and A. D. Cherrington. 1998. Autoregulation of hepatic glucose production. Eur J Endocrinol 138:240-248.

Moore, M. C., A. D. Cherrington, and D. H. Wasserman. 2003. Regulation of hepatic and peripheral glucose disposal. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 17:343-364.

Morrow, D. A. 1976. Fat cow syndrome. J Dairy Sci 59:1625-1629.

Morrow, D. A., D. Hillman, A. W. Dade, and Y. Kitchen. 1979. Clinical investigation of a dairy herd with the fat cow syndrome. J Am Vet Med Assoc 174:161-167.

Mulligan, F., and M. Doherty. 2008. Production diseases: A major health, welfare and economic problem on dairy farms. Vet J 176:1-2.

Myers, J. D., and W. J. Taylor. 1952. The effects of cortisone and ACTH on splanchnic circulation and metabolism. In: Proceedings of the forty-fourth annual meeting of the American Society for Clinical Investigation held in Atlantic City, NJ. May 5, 1952. p 651-652.

Nemeth, P. M., O. E. Hitchins, L. Solanki, and T. G. Cole. 1986. Flurometric procedures for measuring triglyceride concentrations in small amounts of tissue and plasma. J Lipid Res 27:447-452.

Neuschwander-Tetri, B. A. 2010a. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. Hepatology 52:774-788.

Neuschwander-Tetri, B. A. 2010b. Nontriglyceride hepatic lipotoxicity: The new paradigm for the pathogenesis of NASH. Curr Gastroenterol Rep 12:49-56.

Nicod, N., V. Giusti, C. Besse, and L. Tappy. 2003. Metabolic adaptations to dexamethasone-induced insulin resistance in healthy volunteers. Obes Res 11:625-631.

O'Donohue, J., C. Ng, S. Catnach, P. Farrant, and R. Williams. 2004. Diagnostic value of Doppler assessment of the hepatic and portal vessels and ultrasound of the spleen in liver disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 16:147-155.

Olesen, H. P., E. Sjontoft, and B. Tronier. 1989. Simultaneous sampling of portal, hepatic and systemic blood during intragastric loading and tracer infusion in conscious pigs. Lab Anim Sci 39:429-432.

Orrego, H., L. M. Blendis, I. R. Crossley, A. Medline, A. Macdonald, S. Ritchie, and Y. Israel. 1981. Correlation of intrahepatic pressure with collagen in the Disse space and hepatomegaly in humans and in the rat. Gastroenterology 80:546-556.

Ortigues, I., C. Martin, D. Durand, and M. Vermorel. 1995. Circadian changes in energy expenditure in the preruminant calf: Whole animal and tissue level. J Anim Sci 73:552-564.

Ortigues, I., C. Martin, and D. Durand. 1996. Circadian changes in net nutrient fluxes across the portal-drained viscera, the liver, and the hindquarters in preruminant calves. J Anim Sci 74:895-907.

Overton, T. R., and M. R. Waldron. 2004. Nutritional management of transition dairy cows: Strategies to optimize metabolic health. J Dairy Sci 87:E105-E119.

Pearson, E. G., and A. M. Craig. 1980. The diagnosis of liver disease in equine and food animals. Mod Vet Pract 61:233-237.

Pershing, R. A., S. D. Moore, A. C. Dinges, W. W. Thatcher, and L. Badinga. 2002. Short communication: Hepatic gene expression for gluconeogenic enzymes in lactating dairy cows treated with bovine somatotropin. J Dairy Sci 85:504-506.

Pilkis, S. J., and D. K. Granner. 1992. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. Annu Rev Physiol 54:885-909.

Prewitt, L. R., D. R. Jacobson, R. W. Hemken, and R. H. Hatton. 1975. Portal blood flow as measured by the Doppler shift technique in sheep fed chopped forages. J Anim Sci 41:596-600.

Pullen, D. L., D. L. Palmquist, and R. S. Emery. 1989. Effect on days of lactation and methionine hydroxy analog on incorporation of plasma fatty acids into plasma triglycerides. J Dairy Sci 72:49-58.

Qi, D., T. Pulinilkunnil, D. An, S. Ghosh, A. Abrahani, J. A. Pospisilik, R. Brownsey, R. Wambolt, M. Allard, and B. Rodrigues. 2004. Single-dose dexamethasone induces whole-body insulin resistance and alters both cardiac fatty acid and carbohydrate metabolism. Diabetes 53:1790-1797.

Randle, P. J., P. B. Garland, C. N. Hales, and E. A. Newsholme. 1963. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. Lancet 1:785-789.

Raoofi, A., T. T. Bazargani, and A. H. Tabatabayi. 2001. An abattoir survey on the frequency of fatty liver syndrome in dairy cows from the suburbs of Tehran. Trop Anim Health Prod 33:15-19.

Rehage, J. 1996. Untersuchungen zur Leberfunktion von Milchkühen mit Leberverfettung am Modell von Patienten mit linksseitiger Labmagenverlagerung. Habilitation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.

Rehage, J., M. Mertens, N. Stockhofe-Zurwieden, M. Kaske, and H. Scholz. 1996. Post surgical convalescence of dairy cows with left abomasal displacement in relation to fatty liver. Schweiz Arch Tierheilkd 138:361-368.

Rehage, J., V. V. Mutius, P. Heimberg, M. Kaske, S. Glaser, and L. Kreienbrock. 2002. Efficiacy of Dexamethasone treatment in cows with fatty liver and abomasal displacement. In: XXII^{sc} World Buiatrics Congress 2002. Hannover, Germany.

Reid, I. M. 1980. Incidence and severity of fatty liver in dairy cows. Vet Rec 107:281-284.

Reid, I. M., G. D. Baird, and R. J. Heitzmann. 1977. Effects of fasting in non lactating cows. A correlated biochemical ans sterological study of fasting - induced fatty liver. J agric Sci, Camb. 89:319-325.

Reid, I. M., and R. A. Collins. 1980. The pathology of post-parturient fatty liver in high-yielding dairy cows. Invest Cell Pathol 3:237-249.

Reid, I. M., and C. J. Roberts. 1983. Subclinical fatty liver in dairy cows. Irish Vet J 37:104-110.

Reid, I. M., G. J. Rowlands, A. M. Drew, R. A. Collins, C. J. Roberts, and R. Manston. 1983. The relationship between post-parturient fatty liver and blood composition in dairy cows. J Agric Sci 101:473-480.

Remond, D., C. Poncet, and J. Lefaivre. 1993. Technical note: Ruminal vein catheterization and continuous blood flow measurement in ruminal arteries of sheep. J Anim Sci 71:1276-1280.

Remond, D., I. Ortigues-Marty, A. Isserty, and J. Lefaivre. 1998. Technical note: Measuring portal blood flow in sheep using an ultrasonic transit time flow probe. J Anim Sci 76:2712-2716.

Reynolds, C. K. 1995. Quantitative aspects of liver metabolism in ruminants. In: Symp. Ruminant Physiol., In: Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction: Proc. 8th Int. Symp.

Ruminant Physiol. W. V. Engelhardt, S. Leonhard-Marek, G. Breves, and D. Giesecke, ed. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgardt, Germany. p 351–371.

Reynolds, C. K., G. B. Huntington, H. F. Tyrrell, and P. J. Reynolds. 1988. Net portal-drained visceral and hepatic metabolism of glucose, L-lactate, and nitrogenous compounds in lactating Holstein cows. J Dairy Sci 71:1803-1812.

Reynolds, C. K., D. L. Harmon, and M. J. Cecava. 1994. Absorption and delivery of nutrients for milk protein synthesis by portal-drained viscera. J Dairy Sci 77:2787-2808.

Reynolds, C. K., P. C. Aikman, B. Lupoli, D. J. Humphries, and D. E. Beever. 2003. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. J Dairy Sci 86:1201-1217.

Roberts, C. J., I. M. Reid, G. J. Rowlands, and A. Patterson. 1981. A fat mobilisation syndrome in dairy cows in early lactation. Vet Rec 108:7-9.

Roe, W. E., E. N. Bergman, and K. Kon. 1966. Absorption of ketone bodies and other metabolites via the portal blood of sheep. Am J Vet Res 27:729-736.

Sambhi, M. P., M. H. Weil, and V. N. Udhoji. 1965. Acute pharmacodynamic effects of glucocorticoids; cardiac output and related hemodynamic changes in normal subjects and patients in shock. Circulation. 31:523-30.

Sangsritavong, S., D. K. Combs, R. Sartori, L. E. Armentano, and M. C. Wiltbank. 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle. J Dairy Sci 85:2831-2842.

Sartor, R., M. J. Mamprim, R. F. Takahira, and M. F. de Almeida. 2010. Hemodynamic evaluation of the right portal vein in healthy dogs of different body weights. Acta Vet Scand 52:36.

Scherrer, U., P. Vollenweider, D. Randin, E. Jequier, P. Nicod, and L. Tappy. 1993. Suppression of insulin-induced sympathetic activation and vasodilation by dexamethasone in humans. Circulation 88:388-394.

Scheuer, B. H., Y. Zbinden, P. Schneiter, L. Tappy, J. W. Blum, and H. M. Hammon. 2006. Effects of colostrum feeding and glucocorticoid administration on insulin-dependent glucose metabolism in neonatal calves. Domest Anim Endocrinol 31:227-245.

Schmidt, S., H. G. Joost, and A. Schürmann. 2009. GLUT8, the enigmatic intracellular hexose transporter. Am J Physiol Endocrinol Metab 296:E614-618.

Scholz, H., G. Zipori und M. Höltershinken. 1989. Erfahrungen mit einem neuen Instrument zur Leberbiopsie. Prakt Tierarzt 71:Col Vet XIX, 21-22.

Schröder, U. J., and R. Staufenbiel. 2006. Invited review: Methods to determine body fat reserves in the dairy cow with special regard to ultrasonographic measurement of backfat thickness. J Dairy Sci 89:1-14.

Seifalian, A. M., V. Chidambaram, K. Rolles, and B. R. Davidson. 1998. In vivo demonstration of impaired microcirculation in steatotic human liver grafts. Liver Transpl Surg 4:71-77.

Seifalian, A. M., C. Piasecki, A. Agarwal, and B. R. Davidson. 1999. The effect of graded steatosis on flow in the hepatic parenchymal microcirculation. Transplantation 68:780-784.

Seifalian, A. M., A. El-Desoky, and B. R. Davidson. 2001. Hepatic indocyanine green uptake and excretion in a rabbit model of steatosis. Eur Surg Res 33:193-201.

Seitz, H. J., W. Krone, and W. Tarnowski. 1976. Physiologic significance of glucocorticoids and insulin in regulation of hepatic gluconeogenesis during starvation in rats. Metabolism 25:1545-1555.

Selberg, K. T., C. R. Staples, N. D. Luchini, and L. Badinga. 2005. Dietary trans octadecenoic acids upregulate the liver gene encoding peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in transition dairy cows. J Dairy Res 72:107-114.

Shpigel, N. Y., R. Chen, Y. Avidar, and E. Bogin. 1996. Use of corticosteroids alone or combined with glucose to treat ketosis in dairy cows. J Am Vet Med Assoc 208:1702-1704.

Simpson, J. W. 1985. A new biopsy needle for use in the diagnosis of fatty liver disease. Vet Rec 117:639-640.

Sistare, F. D., and R. C. Haynes. 1985. Acute stimulation by glucocorticoids of gluconeogenesis from lactate pyruvate in isolated hepatocytes from normal and adrenalectomized rats. J Biolog Chem 260:2754-2760.

Smart, M. E., and M. J. Northcote. 1985. Liver biopsies in cattle. Comp Cont Educ 7:327-332.

Smith, T. R., A. R. Hippen, D. C. Beitz, and J. W. Young. 1997. Metabolic characteristics of induced ketosis in normal and obese dairy cows. J Dairy Sci 80:1569-1581.

Soloni, F. G. 1971. Simplified manual micromethod for determination of serum triglycerides. Clin Chem 17:529-534.

Starke, A., A. Haudum, R. Busche, M. Beyerbach, S. Dänicke, and J. Rehage. 2010a. Technical note: Analysis of total lipid and triacylglycerol content in small liver biopsy samples in cattle. J Anim Sci 88:2741-2750.

Starke, A., A. Haudum, G. Weijers, K. Herzog, P. Wohlsein, M. Beyerbach, C. L. de Korte, J. M. Thijssen, and J. Rehage. 2010b. Noninvasive detection of hepatic lipidosis in dairy cows with calibrated ultrasonographic image analysis. J Dairy Sci 93:2952-2965.

Starke, A., S. Schmidt, A. Haudum, T. Scholbach, P. Wohlsein, M. Beyerbach, and J. Rehage. 2011a. Evaluation of portal blood flow using transcutaneous and intraoperative Doppler ultrasonography in dairy cows with fatty liver. J Dairy Sci 94:2964–2971.

Starke, A., K. Wussow, L. Matthies, M. Kusenda, R. Busche, A. Haudum, A. Beineke, C. Pfarrer, and J. Rehage. 2011b. Minimally-invasive catheterization of the portal, hepatic and cranial mesenteric veins and the abdominal aorta for quantitative determination of hepatic metabolism in dairy cows. Vet J in press.

Starke, A., K. Wussow, L. Matthies, M. Kusenda, A. Haudum, R. Busche, M. Beyerbach, M. Piechotta, H. M. Hammon, and J. Rehage. 2011c. Effect of a single dose Dexamethason application on the hepatic blood flow and the hepatic glucose net output in dairy cows. In preparation.

Staufenbiel, R., D. Lügner, E. Lügner, D. Dargel und N. Rossow. 1991. Zur Beurteilung des Leberfettgehaltes bei der Milchkuh. Mh Vet Med 46:798-805.

Staufenbiel, R., U. Johannsen, H. Dargel und N. Rossow. 1992. Experimentelle Untersuchungen zur Leberverfettung der Milchkuh bei Futterrestriktion. Versuchsmodell und klinisch - chemische Parameter. Mh Vet Med 47:559-566.

Staufenbiel, R., M. Staufenbiel, N. Rossow, H. Klukas und U. Johannsen.1993. Diagnostik der Leberverfettung bei der Milchkuh. Dtsch Tierärztl Wschr 100:225-230.

Staufenbiel, R., M. M. I. Ahmed, W. Baumgartner, and C.-C. Gelfert. 2007. The use of biochemical and hepatic parameters to predict treatment outcome of dairy cows suffering from displacement of the abomasum. Dtsch Tierärztl Wschr 114:225-230.

Sternbauer, K., J. Luthman, and S. O. Jacobsson. 1998. Flumethasone-induced insulin resistance in calves. Zentralbl Veterinärmed A 45:441-443.

Strauss, S., E. Gavish, P. Gottlieb, and L. Katsnelson. 2007. Interobserver and intraobserver variability in the sonographic assessment of fatty liver. Am J Roentgenol 189:320-323.

Sun, C. K., X. Y. Zhang, and A. M. Wheatley. 2003. Increased NAD(P)H fluorescence with decreased blood flow in the steatotic liver of the obese Zucker rat. Microvasc Res 66:15-21.

Swanson, K. S., N. R. Merchen, J. W. Erdman, Jr., J. K. Drackley, F. Orias, G. N. Douglas, and J. C. Huhn. 2000. Technical note: A technique for multiple liver biopsies in neonatal calves. J Anim Sci 78:2459-2463.

Symonds, H. W., and G. D. Baird. 1973. Cannulation of an hepatic vein, the portal vein and a mesenteric vein in the cow, and its use in the measurement of blood flow rates. Res Vet Sci 14:267-269.

Szatmari, V., F. J. van Sluijs, J. Rothuizen, and G. Voorhout. 2003. Intraoperative ultrasonography of the portal vein during attenuation of intrahepatic portocaval shunts in dogs. J Am Vet Med Assoc 222:1086-1092, 1077.

Szatmari, V., J. Rothuizen, and G. Voorhout. 2004a. Standard planes for ultrasonographic examination of the portal system in dogs. J Am Vet Med Assoc 224:713-716, 698-719.

Szatmari, V., F. J. van Sluijs, J. Rothuizen, and G. Voorhout. 2004b. Ultrasonographic assessment of hemodynamic changes in the portal vein during surgical attenuation of congenital extrahepatic portosystemic shunts in dogs. J Am Vet Med Assoc 224:395-402.

Taguchi, K., T. Satoh, and K. Hirota. 1992. Relationship between halftime for sulfobromophthalein clearance and post-surgical prognosis in cows with abomasal displacement. J Vet Med Sci 54:425-428.

Tappy, L., D. Randin, P. Vollenweider, L. Vollenweider, N. Paquot, U. Scherrer, P. Schneiter, P. Nicod, and E. Jequier. 1994. Mechanisms of dexamethasone-induced insulin resistance in healthy humans. J Clin Endocrinol Metab 79:1063-1069.

Thijssen, J. M., A. Starke, G. Weijers, A. Haudum, K. Herzog, P. Wohlsein, J. Rehage, and C. L. De Korte. 2008. Computer-aided B-mode ultrasound diagnosis of hepatic steatosis: A feasibility study. IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control 55:1343-1354.

Tiley, H. A., R. J. Geor, and L. J. McCutcheon. 2007. Effects of dexamethasone on glucose dynamics and insulin sensitivity in healthy horses. Am J Vet Res 68:753-759.

Tiley, H. A., R. J. Geor, and L. J. McCutcheon. 2008. Effects of dexamethasone administration on insulin resistance and components of insulin signaling and glucose metabolism in equine skeletal muscle. Am J Vet Res 69:51-58.

Trautwein, G. 1991. Leber. In: K. Nieberle (ed.) Pathologie der Haustiere No. 1. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena. p 379-394.

Veenhuizen, J. J., J. K. Drackley, M. J. Richard, T. P. Sanderson, L. D. Miller, and J. W. Young. 1991. Metabolic changes in blood and liver during development and early treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows. J Dairy Sci 74:4238-4253.

Vernon, R. G. 2005. Lipid metabolism during lactation: A review of adipose tissue - Liver interactions and the development of fatty liver. J Dairy Res 72:460-469.

Viana, A. Y., H. Sakoda, M. Anai, M. Fujishiro, H. Ono, A. Kushiyama, Y. Fukushima, Y. Sato, Y. Oshida, Y. Uchijima, H. Kurihara, and T. Asano. 2006. Role of hepatic AMPK activation in glucose metabolism and dexamethasone-induced regulation of AMPK expression. Diab Res Clin Pract 73:135-142.

Wanless, I. R., and K. Shiota. 2004. The pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis and other fatty liver diseases: a four-step model including the role of lipid release and hepatic venular obstruction in the progression to cirrhosis. Semin Liver Dis 24:99-106.

Weekes, T. E. C. 1991. Hormonal control of glucose metabolism. Academic Press, San Diego, New York.

Weijers, G., A. Starke, A. Haudum, J. M. Thijssen, J. Rehage, and C. L. De Korte. 2010. Interactive vs. automatic ultrasound image segmentation methods for staging hepatic lipidosis. Ultrason Imaging 32:143-153.

Wensing, T., T. Kruip, M. J. H. Geelen, G. H. Wentink, and A. M. van den Top. 1997. Postpartum fatty liver in high-producing dairy cows in practice and in animal studies. The connection with health, production and reproduction problems. Comp Haematol Intern 7:167-171.

West, H. J. 1990. Effect on liver function of acetonaemia and the fat cow syndrome in cattle. Res Vet Sci 48:221-227.

Wierda, A., J. Verhoeff, J. Dorresteijn, T. Wensing, and S. van Dijk. 1987. Effects of two glucocorticoids on milk yield and biochemical measurements in healthy and ketotic cows. Vet Rec 120:297-299.

Wittek, T., I. Sen, and P. D. Constable. 2007. Changes in abdominal dimensions during late gestation and early lactation in Holstein-Friesian heifers and cows and their relationship to left displaced abomasum. Vet Rec 161:155-161.

Xu, C., J. He, H. Jiang, L. Zu, W. Zhai, S. Pu, and G. Xu. 2009. Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes. Mol Endocrinol 23:1161-1170.

Zamir, D., L. Linova, T. Amir, V. Lebedev, I. Polychuck, I. Leibovitz, T. Reitblat, Z. Weiler, R. Peled, and O. Lebovici. 2003. Prediction of fatty liver: Comparison of body mass index, visceral fat, and subcutaneous fat. J Clin Gastroenterol 36:281-282.

Zammit, V. A. 1996. Role of insulin in hepatic fatty acid partitioning: emerging concepts. Biochem J 314:1-14.

Zhao, F. Q., P. J. Miller, E. H. Wall, Y. C. Zheng, B. Dong, M. C. Neville, and T. B. McFadden. 2004. Bovine glucose transporter GLUT8: Cloning, expression, and developmental regulation in mammary gland. Biochim Biophys Acta 1680:103-113.

Zhao, F. Q., and A. F. Keating. 2007. Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. J Dairy Sci 90 Suppl 1:E76-86.

Ziegenhorn, J. 1975. Improved method for enzymatic determination of serum triglycerides. Clin Chem 21:1627-1629.

7. Erklärung zum eigenen Anteil an den Publikationen

Es wird darauf verwiesen, dass vom Autor die primäre Initiative für sieben der acht Publikationen (1-3, 5-8) ausging. Das Design wurde bei sechs der acht Arbeiten (2-3, 5-8) federführend gestaltet. Aufgrund der Softwareadaptation für die Analyse der Ultraschallbilder war für zwei Publikationen (1, 4) ein maßgeblicher ingenieurtechnischer Anteil notwendig. Dies spiegelt sich im Anteil der Kooperationspartner bei Studiendesign und Initiative ebenso wie in der Autorenreihenfolge wieder. Darüber hinaus wurde bei sechs der acht Arbeiten (2-3, 5-8) die Variante einer gleichberechtigten Erstautorenschaft gewählt, um Doktoranden die Verwendung der publizierten Arbeit für die eigene Promotion zu ermöglichen.

Thijssen, J. M., A. Starke, G. Weijers, A. Haudum, K. Herzog, P. Wohlsein, J. Rehage, and C. L. De Korte (2008). Computer-aided B-mode ultrasound diagnosis of hepatic steatosis: A feasibility study. IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control. 55(6):1343-54

Initiative

Starke, Thjissen, Haudum, Rehage, De Korte

Studiendesign

Thijssen, Starke, Haudum, Weijers, Herzog, De Korte, Rehage

Studiendurchführung

Praktische Untersuchungen

Haudum, Starke

Analytik

Weijers, Haudum, Starke, Wohlsein

Statistische Auswertung

Weijers, Thijssen, Starke, Haudum, De Korte

Manuskripterstellung

Thijssen, Starke, Haudum, De Korte, Rehage

Korrespondierender Autor

Thijssen, J.M.

Starke, A.[#], A. Haudum[#], R. Busche, M. Beyerbach, S. Dänicke, and J. Rehage (2010). Technical note: Analysis of total lipid and triacylglycerol content in small liver biopsy samples in cattle. J. Anim. Sci. 88(8):2741-50

[#] gleichberechtigte Erstautorenschaft

Initiative

Starke, Haudum, Busche, Rehage

Studiendesign

Starke, Haudum, Busche, Rehage

Studiendurchführung

Praktische Untersuchungen

Haudum, Starke

Analytik

Haudum, Busche, Starke

Statistische Auswertung

Starke, Haudum, Beyerbach, Dänicke, Rehage

Manuskripterstellung

Starke, Haudum, Busche, Rehage

Korrespondierender Autor

Starke, A.

Starke, A.[#], A. Haudum[#], G. Weijers[#], K. Herzog, P. Wohlsein, M. Beyerbach, C. L. de Korte, J. M. Thijssen, and J. Rehage (2010). Noninvasive detection of hepatic lipidosis in dairy cows with calibrated ultrasonographic image analysis. J. Dairy Sci. 93:2952–2965

[#] gleichberechtigte Erstautorenschaft

Initiative

Starke, Haudum, De Korte, Thijssen, Rehage

Studiendesign

Starke, Haudum, Rehage, Thijssen, Herzog, De Korte

Studiendurchführung

Praktische Untersuchungen

Haudum, Starke

Analytik

Haudum, Starke, Weijers, Wohlsein

Statistische Auswertung

Starke, Haudum, Beyerbach, Weijers, Rehage

Manuskripterstellung

Starke, Haudum, Thijssen, Rehage

Korrespondierender Autor

Starke, A.

Weijers, G., A. Starke, A. Haudum, J. M. Thijssen, J. Rehage, and C. L. De Korte (2010). Interactive vs. automatic ultrasound image segmentation methods for staging hepatic lipidosis. Ultrasonic Imaging 32:143-153

Initiative

Weijers, Thjissen, Starke, De Korte

Studiendesign

Weijers, Thijssen, Starke, De Korte, Rehage

Studiendurchführung

Praktische Untersuchungen

Weijers, Haudum, Starke

Analytik

Weijers, Haudum, Starke

Statistische Auswertung

Weijers, Thijssen, Starke, Haudum, De Korte

Manuskripterstellung

Weijers, Thijssen, Starke, Haudum, De Korte, Rehage

Korrespondierender Autor

Weijers, G.

Haudum[#], A., A. Starke[#], M. Beyerbach, P. Wohlsein, and J. Rehage (2011). Ultrasonographic assessment of liver dimensions in dairy cows with different hepatic triacylglycerol content. J. Anim. Sci. 2011. 89:1392–1400

[#] gleichberechtigte Erstautorenschaft

Initiative

Starke, Rehage

Studiendesign

Starke, Rehage

Studiendurchführung

Praktische Untersuchungen

Haudum, Starke

Analytik

Haudum, Wohlsein, Starke

Statistische Auswertung

Haudum, Starke, Beyerbach, Rehage

Manuskripterstellung

Haudum, Starke, Rehage

Korrespondierender Autor

Starke, A.

Starke, A.[#], K. Wussow[#], L. Matthies[#], M. Kusenda, R. Busche, A. Haudum, A. Beineke, C. Pfarrer, and J. Rehage (2012). Minimally-invasive catheterization of the portal, hepatic and cranial mesenteric veins and the abdominal aorta for quantitative determination of hepatic metabolism in dairy cows. Vet. J. 192:403-411

[#] gleichberechtigte Erstautorenschaft

Initiative

Starke, Rehage

Studiendesign

Starke, Rehage

Studiendurchführung

Praktische Untersuchungen

Wussow, Starke, Matthies, Haudum

Analytik

Wussow, Starke, Matthies, Beineke, Starke, Busche

Statistische Auswertung

Starke, Wussow, Beyerbach, Rehage

Manuskripterstellung

Starke, Wussow, Rehage, Pfarrer

Korrespondierender Autor

Starke, A.

Starke, A.[#], S. Schmidt[#], A. Haudum[#], M. Beyerbach, P. Wohlsein, T. Scholbach, and J. Rehage (2011). Evaluation of portal blood flow using transcutaneous and intraoperative Doppler ultrasonography in dairy cows with fatty liver. J. Dairy Sci. 94:2964–2971

[#] gleichberechtigte Erstautorenschaft

Initiative

Starke, Rehage

Studiendesign

Starke, Rehage

Studiendurchführung

Praktische Untersuchungen

Schmidt, Haudum, Starke

Analytik

Starke, Schmidt, Wohlsein, Haudum, Scholbach

Statistische Auswertung

Starke, Schmidt, Beyerbach, Rehage

Manuskripterstellung

Starke, Schmidt, Rehage, Scholbach

Korrespondierender Autor

Starke, A.

Starke, A.[#], K. Wussow[#], L. Matthies[#], M. Kusenda, A. Haudum, R. Busche, M. Beyerbach, M. Piechotta, H. M. Hammon, and J. Rehage (2011). Effect of a single dose Dexamethason application on the hepatic blood flow and the hepatic glucose net output in dairy cows. zur Publikation vorbereitet

[#] gleichberechtigte Erstautorenschaft

Initiative

Starke, Rehage

Studiendesign

Starke, Rehage

Studiendurchführung

Praktische Untersuchungen

Wussow, Starke, Matthies, Haudum

Analytik

Wussow, Starke, Matthies, Piechotta, Busche

Statistische Auswertung

Starke, Wussow, Beyerbach, Rehage

Manuskripterstellung

Starke, Wussow, Hammon, Kusenda, Rehage

Korrespondierender Autor

Starke, A.