

Aus dem Department für Biologische Wissenschaften und Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Zentrum für Biologische Wissenschaften
(Leiter: O.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Mathias Müller)

Histologische Veränderungen des bovinen Pansenepithels bei subakuter Pansenazidose

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

Vorgelegt von
Nathalie Wagner

Wien, im Juli 2024

Betreuerin:

Prof. Dr. med. vet. Franziska Dengler

Zentrum für Biologische Wissenschaften
Department für Biologische Wissenschaften und Pathologie

Gutachterin:

Assoz. Prof. Dr. Susanne Kreuzer-Redmer

Zentrum für Tierernährung und Tierschutzwissenschaften
Klinisches Department für Nutztiere und Sicherheit von Lebensmittelsystemen

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle übernommenen Textstellen aus fremden Quellen wurden kenntlich gemacht.

Ich habe die entscheidenden Arbeiten selbst durchgeführt und alle zuarbeitenden Täglichen mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht.

Wien, den 10.07.2024

Nathalie Wagner

Abkürzungsverzeichnis

CH ₄	Methan
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
HCO ₃ ⁻	Bicarbonat
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
LPS	Lipopolysaccharide
NH ₄ ⁺	Ammonium-Ion
Nicht-Protein-N-haltig	Nicht-Protein-Stickstoff-haltig
One way RM ANOVA	One Way Repeated Measurements Analysis of Variance
PBS	engl. Phosphate bufferd saline – Phosphatgepufferte Salzlösung
SARA	engl. subacute ruminal acidosis – subakute Pansenazidose
SCFA	engl. short-chain fatty acids – kurzkettige Fettsäuren
TMR	Totale Mischratration

Inhalt

Zusammenfassung.....	1
Abstract	2
1. Einleitung.....	3
2. Literaturübersicht	4
2.1 Aufbau und Funktion des Pansens	4
2.1.1 Makroskopischer Aufbau des Pansens	4
2.1.2 Mikroskopischer Aufbau des Pansens	4
2.1.3 Physiologische Funktionen des Pansens	7
2.2 Pansenazidose	8
2.2.1 Akute Pansenazidose.....	9
2.2.2 SARA	9
2.3 Hypothese	12
3. Material und Methoden.....	13
3.1 Versuchsaufbau	13
3.2 Probennahme.....	13
3.3 Herstellung histologischer Schnitte	14
3.4 Histologische Auswertung	14
3.4.1 Vermessung der Zotten und Epithelschichten.....	15
3.4.2 Verhornung und Pigmentierung.....	16
3.4.3 Entzündungszellen.....	18
3.4.4 Ballonzellen	19
3.5 Auswertung und Statistik	20
4. Ergebnisse	21
4.1 Papillenbreite, Papillenlänge und Zottenbreite.....	21
4.2 Pansenepithel.....	23
4.3 Neutrophile, Verhornung, Pigmentierung, Ballonzellen	25
5. Diskussion.....	29
6. Schlussfolgerung.....	33
Literaturverzeichnis.....	34
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	37

Zusammenfassung

Rinder sind heutzutage, aufgrund steigender Nachfrage nach Milchprodukten, stark auf Leistung gezüchtet. Diese hohe Leistung erfordert viel Energie und dementsprechend muss werden. Diese hohen Kraftfutteranteile können zu Stoffwechselentgleisungen und verschiedenen Erkrankungen führen. Eine häufige Folge ist die subakute Pansenazidose (SARA), bei welcher der pH-Wert im Pansen regelmäßig für > 3h auf einen Wert von < 5,5 fällt. Durch den Abbau leicht verdaulicher Kohlenhydrate kommt es vermehrt zur Entstehung kurzkettiger Fettsäuren (SCFA) im Pansen, die durch physiologische Puffersysteme nicht mehr ausreichend neutralisiert werden können und ernstzunehmende Konsequenzen für die Pansen- sowie die systemische Tiergesundheit haben. Um prophylaktisch und therapeutisch dagegen vorgehen zu können, ist es wichtig, die Anpassungsmechanismen des Pansenepithels zu charakterisieren und therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit histologischen Veränderungen des Pansenepithels, die bei SARA auftreten. Dazu wurde bei einem vorrangegangenen Fütterungsversuch bei N = 11 fistulierten Kühen eine SARA mittels Steigerung des Kraftfutteranteils von 40% auf 60% induziert und nach 2, 3 und 6 Wochen Zottenbiopsien entnommen. Aus diesen wurden histologische Präparate angefertigt und mehrere Parameter in Bezug auf epitheliale Charakteristika verglichen.

Während Zottenbreite, Dicke von Gesamtepithel, *Stratum basale*, *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* zwar Schwankungen, aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Testzeitpunkten aufwiesen, war ein signifikant vermehrtes Auftreten von Ballonzellen bzw. eine Zunahme des Verhorngungsgrads erkennbar. Auch eine Zunahme der Dicke des *Stratum corneum* ($P=0,064$) und eine verminderte Pigmentierung ($P=0,092$) waren als Trend erkennbar, sowie ein vermehrtes Vorkommen von Neutrophilen Granulozyten ($P=0,092$), was als Anzeichen einer Entzündungsreaktion gewertet werden könnte.

Auch wenn es scheint, als würde sich das Pansenepithel erfolgreich an die veränderten Bedingungen anpassen, stellt SARA eine enorme Belastung des Tierwohls dar und sollte vermieden werden.

Abstract

Cattle are nowadays heavily bred for performance due to the increasing demand for dairy products. This high performance requires a lot of energy and, accordingly, feed management must be adapted and the proportion of concentrates in the ration increased. This high proportion of concentrates can lead to metabolic imbalances and various diseases. One common consequence is subacute rumen acidosis (SARA), in which the pH value in the rumen regularly falls to a value of < 5.5 for > 3h. The degradation of easily digestible carbohydrates leads to an increased formation of short-chain fatty acids (SCFA) in the rumen, which can no longer be sufficiently neutralized by physiological buffer systems and can have serious consequences for rumen and systemic animal health. In order to be able to take prophylactic and therapeutic action against this, it is important to characterize the adaptation mechanisms of the rumen epithelium and identify therapeutic targets.

This thesis deals with histological changes in the rumen epithelium that occur in SARA. For this purpose, SARA was induced in N = 11 fistulated cows by increasing the concentrate content from 40% to 60% and villus biopsies were taken after 2, 3 and 6 weeks in a previous feeding trial. Histological preparations were made from these biopsies and several parameters regarding epithelial characteristics were compared.

While villus width, thickness of the total epithelium, *stratum basale*, *stratum spinosum* and *stratum granulosum* showed fluctuations but no significant differences between the individual test times, a significant increase in the occurrence of balloon cells and an increase in the degree of keratinization was discernible. An increase in the thickness of the *stratum corneum* ($P=0.064$) and reduced pigmentation ($P=0.092$) were also recognizable as a trend, as well as an increased occurrence of neutrophil granulocytes ($P=0.092$), which could be interpreted as a sign of an inflammatory reaction.

Even if it appears that the rumen epithelium is successfully adapting to the changed conditions, SARA represents an enormous burden on animal welfare and should be avoided.

1. Einleitung

Heutzutage möchte jeder mehr für weniger, so ist es auch in der Landwirtschaft. Die Nachfrage nach billigen Milchprodukten ist groß. Die Viehhaltung hat sich dem angepasst und die Tiere auf immer höhere Leistung gezüchtet. So liefert eine Milchkuh-Rasse wie die Holstein Friesian mittlerweile bis zu 9.000 kg Milch pro Laktation (zum Vergleich 1950: 2.600 kg/Kuh/Laktation) (1). Dementsprechend muss auch die Fütterung an die Leistung der Rinder angepasst werden, da die Rinder für die Milchsynthese eine enorme Menge an Energie benötigen. Daher besteht die moderne Milchviehfütterung aus vergleichsweise geringen Raufutteranteilen bei hohem Kraftfutteranteil. Doch diese energiereiche Fütterung hat auch Auswirkungen auf die Gesundheit der Kühne. Der vermehrte Kraftfutteranteil in einer Ration führt hochfrequent zu subakuten Pansenazidosen (engl. *subacute rumen acidosis*, SARA) (2, 3), die weiterhin auch systemische Konsequenzen wie Klauenrehe und Fruchtbarkeitsproblematiken bis hin zum Ausscheiden einzelner Tiere aus der Herde haben können (1). Dieses Problem betrifft nicht nur das Tierwohl, welches in der Lebensmittelproduktion an erster Stelle stehen sollte, sondern auch der wirtschaftliche Aspekt ist zu beachten. So können z.B. Tierarztkosten und Leistungseinbußen ein Verlustgeschäft verursachen (4).

Es ist also von großer Wichtigkeit, die Pathophysiologie von SARA und Anpassungsmechanismen des Pansenepithels besser zu charakterisieren und so mögliche therapeutische oder vorbeugende Ansatzpunkte zu identifizieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Veränderungen im Aufbau des Pansenepithels während der Entstehung einer experimentell induzierten SARA mit histologischen Methoden anhand von Zottenbiopsien zu quantifizieren.

2. Literaturübersicht

2.1 Aufbau und Funktion des Pansens

Ein Großteil des Verdauungssystem der Rinder besteht aus dem ausgeprägtem Vormagensystem. Das Vormagensystem besteht aus Pansen (*Rumen*), Haube (Netzmagen; *Retikulum*) und Blättermagen (*Psalter*) (5). Der Pansen ist der erste Abschnitt dieses Systems und zugleich der größte der drei Vormägen. Er umfasst allein schon ca. 80% des gesamten Magenvolumens, der Netzmagen beinhaltet 5% und der Blättermagen 8%. Auf den Labmagen entfallen letztendlich nur noch 7% des Gesamtvolumens (6).

2.1.1 Makroskopischer Aufbau des Pansens

Der Pansen nimmt mit einem Fassungsvermögen von 60-100 Litern ca. 80% des ganzen Vormagensystems ein. Er wird anatomisch in verschiedene Abschnitte eingeteilt, die durch die Pansenpfeiler (*Pilae ruminis*) gekennzeichnet sind, welche der Kontraktion des Pansens und damit der Durchmischung der Ingesta dienen. Die Hauptabschnitte sind der dorsale und ventrale Pansensack, der caudodorsale und caudoventrale Blindsack, sowie das *Atrium ruminis* (Pansenvorhof). Das *Atrium ruminis* ist auch bekannt als Schleudermagen, da Nahrungsbrei, welcher noch nicht ausreichend vorverdaut ist, vom Netzmagen zurückgeschleudert wird (6, 7). Die innere Wand des Pansens bildet eine drüsenlose kutane Schleimhaut mit Zotten (außer auf den Pansenpfeilern), welche je nach Beanspruchung physiologisch verhornt sein können. Die Größe der Zotten ist dabei abhängig von der Fütterung. Bei energiereichem, rohfaserarmen Futter sind sie länger, um die Resorptionskapazität für kurzkettige Fettsäuren zu erhöhen und ein Abfallen des pH-Werts zu vermindern, wohingegen sie sich bei energiearmem und rohfaserreichen Futter eher verkürzen (6, 8).

2.1.2 Mikroskopischer Aufbau des Pansens

Mikroskopisch ist die Pansenwand von einem mehrschichtigen verhornten Plattenepithel bedeckt (Abb. 1, 2). Die *Lamina epithelialis mucosae* besteht aus vier Schichten: *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum*. Je nach Futterangebot verändern sich die einzelnen Schichten in ihrer Ausprägung (9, 10).

Das *Stratum basale* ist die unterste der vier Epithelschichten. Sie besteht aus iso- bis hochprismatischen, basophilen Zellen, die über Hemidesmosomen eng mit der Basalmembran verbunden sind. Somit ist das Epithel fest mit dem darunterliegenden Bindegewebe verknüpft.

Die Zellen des *Stratum basale* haben ein hohe Mitoserate und sorgen durch die stetige Zellteilung für eine Erneuerung des Epithels (11).

Stratum spinosum und *granulosum* lassen sich lichtmikroskopisch nicht genau voneinander trennen. Das *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht) besteht überwiegend aus isoprismatischen, polygonalen Zellen, die über Zytoplasmaausläufer und daran anschließende Desmosomen miteinander verbunden sind. Im *Stratum granulosum* (Körnerzellschicht) sind die Zellen abgeflachter und treten in drei bis fünf Lagen auf (11). Es besitzt tight junctions, die dem Epithel eine mechanische Integrität verleihen (9, 11, 12). Die Körnerzellen erhalten ihren Namen durch eine Einlagerung von stark basophilen Keratohyalingranula. Es findet eine beginnende Degeneration von Kernen und Zellorganellen statt (11).

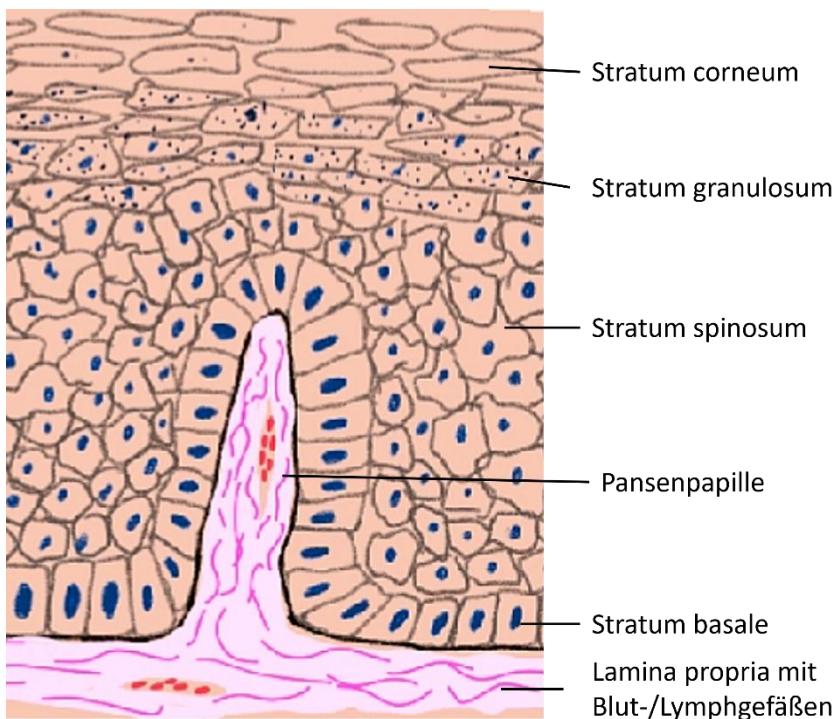


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Schichtaufbaus der *Lamina epithelialis mucosae* des Pansens

Das *Stratum corneum* ist z.T. durch abgestorbene Keratinozyten stark verhornt und zwischen den Zellen können große Lücken durch fehlende Desmosomen bestehen. Bei hohem Kraftfutteranteil sind mehr Zellschichten vorhanden als bei höherem Raufutteranteil in der Ration (10). Je nach Quellungszustand und Lage der Hornzellen gibt es die drei Subtypen A, B und C. Typ A Zellen liegen ganz basal und bilden eine dichte Struktur, die darauf folgenden

Zellen von Typ B sind mittelgradig gequollen und Typ C Zellen sind am stärksten gequollen und werden deshalb auch als Ballonzellen bezeichnet (13). Die Literatur ist sich jedoch nicht einig unter welchen Umständen Typ C Zellen vermehrt vorhanden sind. So beschreiben Tahas *et al.*, dass bei Antilopen die Ballonzellen bei überwiegender Raufuttergabe auftreten (14), wohingegen bei anderen Untersuchungen in Schafen und Wildwiederkäuern Ballonzellen eher bei leicht verdaulichen Kohlenhydraten und niedrigerem Pansen-pH aufzufinden waren (15–17). Die abgestorbenen Zellen des *Stratum corneum* dienen den unterliegenden noch lebenden Zellschichten des Epithels als Schutzschicht gegenüber dem Inhalt des Pansens (9).

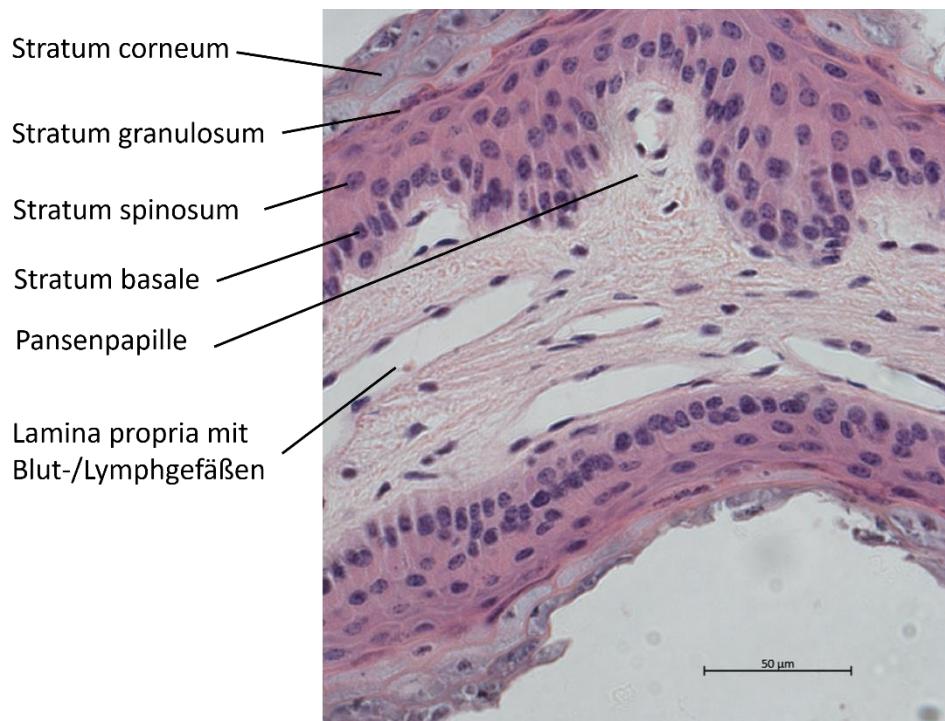


Abbildung 2: Darstellung des Schichtaufbaus des *Lamina epithelialis mucosae* des Pansens anhand eines histologischen Präparats einer Pansenzotte

Unter der Epithelschicht folgt die *Lamina propria mucosae* mit einem ausgeprägten Papillarkörper. Diese Schicht besteht aus kollagenem und elastischem Bindegewebe, sowie einigen Leukozyten, Mastzellen und Plasmazellen. In dieser Schicht verlaufen ebenso Blut- und Lymphgefäße, sowie Nervenfasern (13).

Die *Lamina propria mucosae* geht in die *Tela submucosa* über, auf diese folgt eine zweischichtige *Tunica muscularis* und schließlich die *Tunica serosa* (11).

2.1.3 Physiologische Funktionen des Pansens

Im Pansen von Rindern herrscht eine durchschnittliche Temperatur von 39°C, dies ist die optimale Temperatur für die Pansenmikroben, bestehend aus überwiegend anaeroben Bakterien, Protozoen und Pilzen (18). Die Mikroorganismen bilden eine Symbiose mit dem Rind, dessen Vormagensystem ihnen als optimaler Lebensraum dient. Im Gegenzug fermentieren sie durch mikrobiellen Abbau für das Rind sonst nicht nutzbare Stoffe wie pflanzliche Zellwandbestandteile zu kurzkettigen Fettsäuren (engl. *short-chain fatty acids*, SCFA). Außerdem dienen die Mikroben der Bildung essentieller und nicht-essentieller Aminosäuren, wasserlöslicher Vitamine und mikrobiellen Proteins (7, 18–20). Der Hauptteil des mikrobiellen Abbaus wird von den Bakterien durchgeführt (20). Die Bakterienflora ist variabel, je nach Fütterung kann es sich um überwiegend cellulolytische Bakterien bei rohfaserreicher Fütterung und eher amylolytische Bakterien wie Streptokokken, Laktobazillen und Laktatverwerter bei überwiegend stärkereicher Fütterung handeln (7, 18–20).

Die Menge an Protozoen ist im Vergleich zu den Bakterien eher variabel, den wichtigsten Einfluss haben v.a. die Menge an Kraftfutter und der Häufigkeit der Fütterung. Sie spalten Kohlenhydrate, Proteine und Fette mittels ihrer Enzyme. Außerdem sind sie in einem gewissen Maß in der Lage leicht fermentierbare Kohlenhydrate zu speichern, was als Schutzmechanismus für das Rind dient, um z.B. das Risiko einer Pansenazidose zu verringern. Protozoen dienen auch als biologisch hochwirksames Protein, wenn sie selbst durch den Wirt verdaut werden (7, 18).

Die Pilzpopulation wächst mit einem vermehrten Rohfasergehalt. Sie dienen der Auflockerung der Zellwände für die weitere Verarbeitung, haben z.T. proteolytische Eigenschaften und können einige Kohlenhydrate spalten (7, 18, 21).

Die o.g. Mikroorganismen hydrolysieren Zellwandbestandteile zu Pyruvat, welches wiederum zu SCFA, CO₂ und CH₄ weiterverdaut wird. Je nach Futterzusammensetzung bildet Acetat den Hauptbestandteil, gefolgt von Propionat und Butyrat (19). Es ist für das ruminale Milieu wichtig, dass die SCFA resorbiert werden, um einem pH-Abfall entgegenzuwirken. 50-85% werden über die Vormagenwand direkt resorbiert, da dieser Teil der SCFA in undissoziierter und damit lipophiler Form vorliegt, der andere hydrophile Anteil wird über Transportproteine wie z.B. einen SCFA/HCO₃⁻-Antiporter ausgeschleust. Die entstandenen SCFA werden intraepithelial weiter metabolisiert. Aus Butyrat können Ketonkörper wie Acetoacetat und β-Hydroxybutyrat hergestellt werden, aus Propionat kann Lactat entstehen und von Acetat wird höchstens ein

kleiner Teil zu Ketonkörpern verarbeitet. Alle SCFA können zu CO₂ metabolisiert werden und als Energielieferanten dienen (7, 18, 19).

Proteine und Nicht-Protein-N-haltige Verbindungen werden mittels Proteasen enzymatisch abgebaut (19, 20). Diese stammen überwiegend von Bakterien. Durchschnittlich werden 30-70% des Gesamtproteins im Pansen abgebaut. Kleinere Peptide und Aminosäuren können von Mikroorganismen aufgenommen und zu Ammoniak und Carbonsäure abgebaut oder zur Bildung von neuem mikrobiellem Protein genutzt werden. Endprodukte sind v.a. NH₄⁺, CO₂ und organische Säuren. Der gebildete Ammoniak wird in die Pansenflüssigkeit abgegeben, zur Synthese von mikrobiellem Protein genutzt oder nach ruminaler Resorption in der Leber zur Harnstoffbildung verwendet (20). Harnstoff gelangt über den ruminohepatischen Kreislauf wieder in den Vormagen und der gebundene Stickstoff kann von den Mikroorganismen weiterverwendet werden (7, 18, 19).

Fette werden ebenfalls durch hydrolytische Spaltung abgebaut. Die entstehenden ungesättigten Fettsäuren werden hydriert und das entstehende Glycerol weiter zu SCFA umgebaut (7, 18).

Der normale pH-Wert des Panseninhalts liegt bei 5,5 - 7,0. Bei ausgewogener Fütterung wird der Panseninhalt durch den mit Bikarbonat und Phosphat angereicherten alkalischen Speichel der Rinder, welcher bei hohen Raufuttermengen und entsprechender Wiederkautätigkeit in Mengen von bis zu 180 Litern/Tag produziert wird (18, 20), und die Bikarbonatsekretion des Pansenepithels gepuffert. So ist er in der Lage, die SCFA, welche durch Kohlenhydratfermentation durch Mikroorganismen entstehen und nicht vom Pansenepithel resorbiert werden, zu neutralisieren und den pH-Wert im Pansen stabil zu halten (7).

Wird dieses Gleichgewicht bspw. durch falsche Fütterung gestört kommt es zu pathologischen Veränderungen des ruminalen pH-Werts. Im Falle einer Verringerung des pH-Werts spricht man von einer Pansenazidose.

2.2 Pansenazidose

Bei veränderter Fütterung wie z.B. einer sehr hohen Kraftfutterration mit vielen leicht fermentierbaren Kohlenhydraten und wenig Struktur kommt es zur Störung des Gleichgewichts zwischen Pufferkapazität und Produktion von SCFA. Das vermehrte Vorkommen von SCFA

führt zu einem Absinken des pH-Werts. Fällt dieser unter 5,2 spricht man von einer Pansenazidose (3).

Eine Pansenazidose lässt sich nach der Verlaufsform in drei Formen unterteilen. Es wird zwischen der akuten, subakuten und perakuten Form unterschieden. Dabei hat die perakute Form eine sehr schlechte Prognose und die Tiere werden meist ohne vorherige klinische Symptome schon komatos oder tot aufgefunden (3). Häufiger kommen akute und subakute Pansenazidosen vor, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

2.2.1 Akute Pansenazidose

Bei einem Abfall des $\text{pH} < 5,2$ über spricht man von einer akuten Pansenazidose (3, 22). Der Pansen ist nicht mehr in der Lage, die entstehenden Säuren (Laktat, SCFA) abzupuffern und übersäuert (23). Aufgrund des niedrigen pH-Wertes kommt es zu einem erhöhten Anteil von undissoziierten lipophilen SCFA, die in dieser Form schnell in die Epithelzellen diffundieren, dort aufgrund des zellulären pH-Werts von 7,4 aber dissoziieren. Dadurch wird die Zelle vermehrt mit Protonen belastet, es kommt zur Azidose in der Zelle und die intrazellulären Puffersysteme und Transportmechanismen werden überfordert. Dies kann bis zu Schädigung und Auflösung der Epithelzellen führen. Durch die gestörte epitheliale Barriere gelangen die überschüssigen Säuren in den Blutkreislauf und führen zu einer systemischen Azidose (7). Diese führt zu einer Entgleisung des Säuren-Basen-Haushalts und somit zu schweren klinischen Symptomen. Zu diesen gehören unter anderem Hyperthermie, Hypovolämie, Tachykardie, Tachypnoe, Anorexie, Diarrhoe, und neurologische Symptome. Die Prognose hängt davon ab, wie weit die Azidose schon fortgeschritten ist. Bei einem Blut-pH < 7,2 und einem pH-Wert im Pansen von < 4,5 sowie schweren klinischen Symptomen ist sie schlecht (3). Bei leichten Fällen kann therapeutisch eine orale Verabreichung von Natriumhydrogencarbonat und Wasser ausreichen. Ist die Erkrankung jedoch ausgeprägter, kann man versuchen den Patienten mittels Infusion von Natriumhydrogencarbonat zu stabilisieren, sowie den Pansen zu spülen und Panseninhalt von gesunden Rindern zu überführen. Außerdem sollten sekundäre Probleme wenn möglich symptomatisch behandelt werden (3, 7).

2.2.2 SARA

Von einer SARA spricht man, wenn der pH-Wert regelmäßig für mehr als drei Stunden pro Tag unter einen pH von 5,5 fällt. Dies kann ebenfalls ausgelöst werden durch z.B. vermehrte

Fütterung von hohen Mengen an Kraftfutter und somit verminderter Pufferung und Akkumulation von SCFA (24, 25). SARA ist meist ein Herdenproblem (4) und kommt sehr häufig in Milchviehhaltungen vor. Die Diagnose einer SARA ist schwer, da die klinischen Symptome eher diskret und verspätet auftreten, sodass die Erkrankung oft lange unerkannt bleibt (2, 4).

Jedoch können auch die Folgen einer SARA schwerwiegende Beeinträchtigungen des Tierwohls sowie des wirtschaftlichen Erfolgs sein und die Behandlung ist aufgrund der späten Diagnosen oft schwer und ineffektiv, weshalb man versuchen sollte ihr möglichst v.a. über das Fütterungsmanagement vorzubeugen (26).

Im Pansen kommt es durch die vermehrten SCFA und fehlende Pufferung zu einem Shift in der Mikrobenpopulation. Bei Untersuchungen wurden v.a. vermehrt Lactobazillen, aber auch *Streptococcus bovis* gefunden (4).

Durch Läsionen der Pansenwand bzw. der Epithelschichten kann es zur Translokation von Mikroorganismen und vermehrt auftretendem LPS (Lipopolysaccharide = Zellwandbestandteile gram-negativer Bakterien) aus dem Pansen ins Blut kommen (9, 27). Diese Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte können zu anderen Organen wandern und dort Probleme und Entzündungen verursachen (2). Die am häufigsten betroffenen Organe sind Leber, Nieren, Herz und Lunge (4, 8, 25), aber auch systemische Entzündungen sind die Folge (2). Die am häufigsten beschriebene Veränderung betrifft die Leber, in ihr kommt es durch die zuvor beschriebenen Prozesse häufig zu Leberabszessen und Schäden der Hepatozyten (24, 27). Auch Klauenprobleme sind häufig, hier kommt es zu Klauenrehe, Sohlenblutungen, Ulzerationen, Abszessen, missgebildeten Klauen und Doppelsohlen. Diese Probleme können zu hohen wirtschaftlichen Verlusten führen (25). Durch die Veränderungen im Stoffwechsel ist auch die Verdauung beeinträchtigt, so kommt es oft zu veränderter Kotkonsistenz in Richtung eines hellen, weichen, gelben Kots mit süß-säuerlichem Geruch und z.T. unverdauten Ingestapartikeln bis hin zu intermittierender Diarrhoe (2, 4, 25). Verminderte Futteraufnahme bis zur Inappetenz und verminderte Pansenmotilität sind ebenfalls Folgen einer SARA und können sogar dazu führen, dass es zur Labmagenverlagerung oder -ulzerationen kommt und eine Operation notwendig wird (4, 9, 28). Eine Mastitis durch metastasierte Bakterien oder vermehrtes Vorkommen von LPS im Blutkreislauf ist ebenfalls möglich, da die Blut-Euter-Schranke eine höhere Permeabilität aufweist. Dies führt wiederum zu Milchleistungsverlust und wirtschaftlicher Einbuße (27). Des Weiteren kann es auch zu Milchfettdepression kommen, wodurch die Qualität der Milch vermindert wird. Blutuntersuchungen zeigen azidotische Veränderungen, eine metabolische

Azidose kann eine Hypercalcämie und Hyperphosphatämie induzieren (4). Auch Serum Amyloid A, ein Akute Phase Protein, welches für eine systemische Entzündung spricht, konnte in erhöhter Zahl im Blut von Rindern mit SARA gefunden werden (9).

Auf ökonomischer Ebene können, wie es Untersuchungen von SARA betroffenen Herden in den USA zeigen, immense Kosten im Jahr entstehen. Die Hauptgründe dafür sind der Milchleistungsverlust, erhöhte Keulungsraten und gesteigerter Austausch in der Herde. Ebenfalls können Fertilitätsstörungen zu wirtschaftlichen Verlusten führen, so kommt es bei Kühen mit SARA häufiger zu Endometritis, Dystokie, schwachen azidotischen Kälbern und Immunsuppression (2, 4).

Durch das regelmäßige Absinken des pH-Wertes kommt es bei einer SARA auch zu Anpassungen und Veränderungen des Pansenepithels. Makroskopisch kann man v.a. eine Veränderung der Zottenlänge und Breite erkennen. Durch vermehrtes Vorkommen von SCFA, v.a. von Butyrat (9, 29, 30), kommt es zur Proliferation der Schleimhaut, wahrscheinlich durch eine Verringerung der Apoptoserate in den Epithelzellenschichten (24) und dadurch zu einer Vergrößerung der Resorptionsfläche (13, 25). Die Pansenzotten von Rindern mit viel Kraftfutteraufnahme sind eher lang und dünn (8), farblich sind sie eher grau bis rosagrau im Vergleich zu Kontrolltieren, bei denen die Zotten eher schwarz-braun sind (28). Jonsson *et al.* beschreiben, dass einige der Tiere in ihrer Untersuchung, in der man den Pansen von Mastrindern, die mit hohen Kraftfuttermengen gefüttert wurden, im Schlachthaus untersucht hat, kleine „papillenkahle“ Bereiche im Pansen aufwiesen und bei einem Tier Anzeichen einer aktiven Entzündung, Exkoration oder Vernarbung der Pansenwand zu erkennen waren (28). Im Vergleich dazu beschreiben Zitnan *et al.* eine Erhöhung der Zottenoberfläche pro cm² Pansenschleimhaut, jedoch keine Zunahme der Zottenzahl (30).

Schon die verschiedenen Beschreibungen der makroskopischen Veränderungen des Pansenepithels bei SARA lassen vermuten, dass das Epithel sich an die neue Situation anzupassen versucht. Daher ist es naheliegend, dass auch ultrastrukturelle Anpassungen im Epithel auftreten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob nach Induktion einer SARA auch auf mikroskopischer Ebene adaptive Veränderungen des Pansenepithels stattfinden.

2.3 Hypothese

In der vorliegenden Arbeit sollte der Hypothese nachgegangen werden, dass es durch einen hohen Kraftfuttereinsatz und dadurch ausgelöste SARA mittel- bis langfristig zu histologischen Veränderungen am Pansenepithel kommt.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau

In einem vorangegangenem Fütterungsversuch wurde bei Kühen eine subakute Pansenazidose induziert und Biopsien der Pansenzotten entnommen, die in der vorliegenden Arbeit histologisch untersucht wurden. Der Tierversuch wurde von der zuständigen Behörde genehmigt (GZ: 2021-0.009.975).

Es handelte sich um elf laktierende Rinder der Rasse Holstein-Friesian, denen eine Pansenfistel zur Probenentnahme eingesetzt wurde. Der Fütterungsversuch erstreckte sich über sieben Wochen. Von Woche 0 bis Woche 2 wurden die Rinder mit einer normalen Laktationsration mit 40% Konzentrat gefüttert. Diese Wochen dienten als Adaptationszeit. Danach wurde die Kraftfuttermenge ab Woche 3 auf 65% Konzentrat erhöht. Der Versuch fand in einem Laufstall am Lehr- und Forschungsgut Kremesberg der Veterinärmedizinischen Universität Wien statt. Dabei wurde den Rindern eine totale Mischnahrung (TMR) *ad libitum* bereitgestellt. Ebenso stand Wasser über den gesamten Zeitraum zur freien Verfügung. Die TMR wurde täglich um 7:00 Uhr durch eine Mischmaschine (Triomatic T-15, Trioliet, NL) vorbereitet und den Tieren in individuellen Trögen angeboten. Der Trockenmassegehalt wurde kontinuierlich überwacht und bei Bedarf angepasst. Futteraufnahme und -verweigerung wurden kontinuierlich manuell und digital überwacht.

3.2 Probennahme

Aus dem Pansen wurden über die Fisteln als Zugang Biopsien der Pansenzotten gewonnen. Dafür wurde der Pansen zum Teil geleert, ein Teil des ventralen Pansensacks exenteriert und die Probenstelle mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gewaschen. Danach wurden die Zotten bioptiert (Abb. 3).

Die Probennahme der Zotten fand in Woche 2 - bei einer Fütterung mit 40% Konzentrat, in Woche 3 – bei Umstellung auf 65% Konzentrat und in Woche 6, also vier Wochen nach Erhöhung der Konzentratmenge, jeweils ca. 2-3 Tage nach Futterumstellung statt.



Bild: S. Kreuzer-Redmer

Abbildung 3: Biopsie der Pansenzotten bei vorgelagertem Pansenepithel durch die geöffnete Pansenfistel (Foto: S. Kreuzer-Redmer)

3.3 Herstellung histologischer Schnitte

Aus den 33 Proben wurden histologische Schnitte zur Auswertung der histologischen Veränderungen des Pansenepithels hergestellt. Für die Herstellung wurden die Bioplate in Formalin (ROTI®Histofix, 4% säurefrei, Carl Roth, Deutschland) fixiert. Die fixierten Proben wurden dann entwässert und in Paraffin eingebettet. Aus dem Paraffin wurden Blöcke gegossen, aus welchen nach dem Erkalten 5µm dicke Schnitte angefertigt wurden. Je zwei Schnitte wurden auf einem Objektträger aufgebracht und getrocknet. Danach wurden die fertigen Objektträger mit einer HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Carl Roth, Deutschland) angefärbt. Diese Färbung zeigt Zellkerne, Knorpel, grampositive Bakterien und Kalk in einem blau-violetten Farnton und Zytoplasma sowie Kollagenfasern und Erythrozyten in rosa (31).

3.4 Histologische Auswertung

Die 33 Proben wurden unter dem Mikroskop (Axioskop, Carl Zeiss AG, Deutschland) betrachtet und nach unterschiedlichen Kriterien bewertet.

Zuerst wurde der am besten zur Auswertung geeignete Schnitt auf jedem Objektträger ausgewählt. Mittels Mikroskopkamera (Axiocam 504 color, Carl Zeiss AG, Deutschland) und

der passenden Computersoftware (Zeiss ZEN®, Carl Zeiss AG, Deutschland) wurden repräsentative Bilder aller Schnitte angefertigt und für die weitere Analyse verwendet.

3.4.1 Vermessung der Zotten und Epithelschichten

Für die Analyse der Epithelschichten wurde eine 200-fache Vergrößerung verwendet und mit Hilfe der Zeiss ZEN Software die im Folgenden erläuterten Messungen durchgeführt.

Zu Beginn wurde geprüft, ob es eine eindeutig erkennbare Zottenspitze und Zottenbasis gibt. Da dies bei vielen Proben nicht der Fall war, wurde mit den Proben so verfahren, dass die Messungen je von beiden Zottenenden und der Mitte genommen wurden. Die Werte dieser drei Lokalisationen wurden darauffolgend gemittelt.

Die Messungen der Epithelschichten wurden jeweils auf einer Linie und senkrecht zur Epitheloberfläche durchgeführt. Die einzelnen Messabschnitte wurden in Abb. 4 für eine bessere Übersichtlichkeit unterschiedlich gefärbt und parallel verschoben. In Tab. 1 sind die einzelnen Parameter näher erläutert bzw. in Abb. 4 grafisch dargestellt.

Tabelle 1: Parameter zur Analyse der epithelialen Schichten

	Farbe	Vermessener Bereich
Orange	Orange	Breite der Zotte – zur standardisierten Erfassung wurde ein Lot entlang der Fasern der <i>Lamina propria</i> gelegt und dann im 90° Winkel dazu die Messung von Außenseite zu Außenseite (<i>Stratum corneum</i>) der Zotte (gestrichelte Linie Abb.4)
Blau	Blau	Breite der gesamten Epithelschicht von <i>Stratum corneum</i> bis <i>Stratum basale</i>
Gelb	Gelb	<i>Stratum corneum</i>
Grün	Grün	<i>Stratum spinosum + Stratum granulosum</i>
Türkis	Türkis	<i>Stratum basale</i>
Rot	Rot	Länge der Papille
Dunkelrot	Dunkelrot	Breite der Papille – waagerechte Linie vom <i>Stratum basale</i> der einen zum <i>Stratum basale</i> der anderen Seite, ca. in der Mitte der Papille

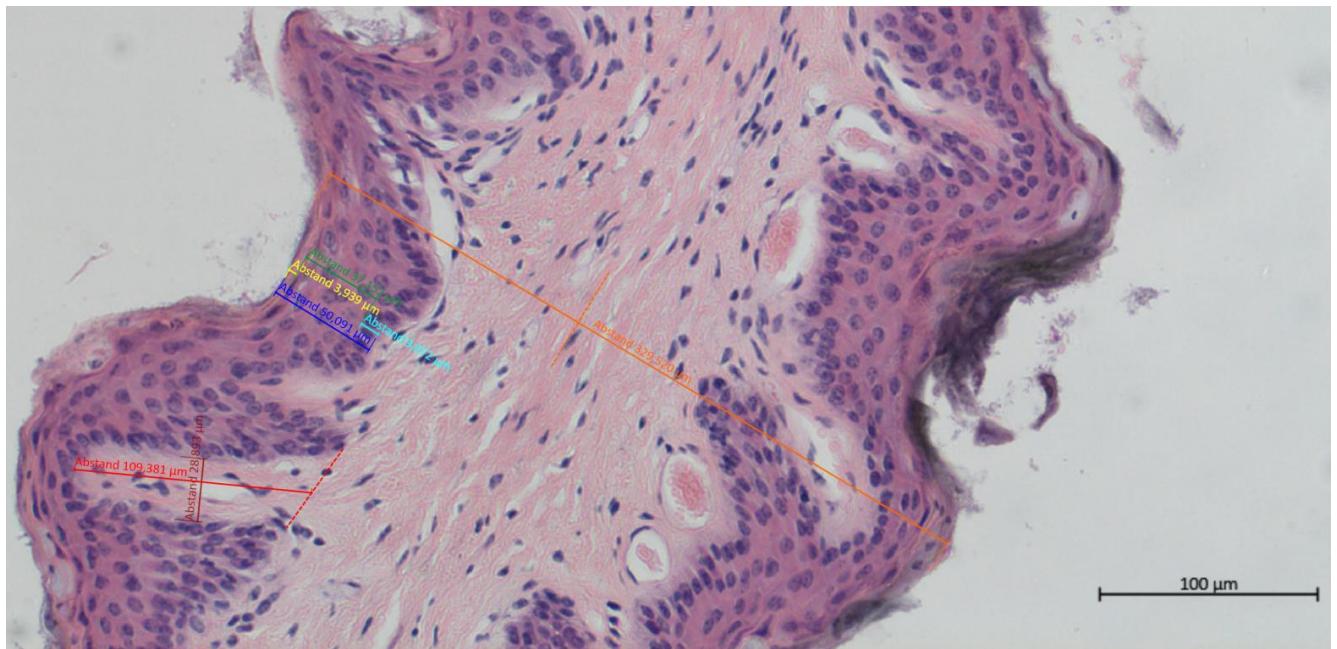


Abbildung 4: Beispielhafte Darstellung der Vermessung von Papillen und Epithel

3.4.2 Verhornung und Pigmentierung

Für die Erfassung der Verhornung und Pigmentierung des Zottenepithels wurde ein Scoring-System verwendet, welches zuvor anhand der Bilder in Score 0-3 (Verhornung) bzw. 1-3 (Pigmentierung) eingeteilt wurde. Die Zuordnung der 33 Schnitte zu den verschiedenen Scores wurde mittels Übersichtsbildern in 100-facher Vergrößerung durchgeführt (Bsp.: Abb. 5, Abb. 6). Sie wurden gemäß der in den folgenden Tabellen 2 und 3 genannten Kriterien verglichen und eingeteilt.

Tabelle 2: Scoring der Verhornung

Score	Definition	Beispiel
Score 0	Keine Verhornung sichtbar	Abb. 5A
Score 1	Leichte Verhornung	Abb. 5B
Score 2	Mittlere Verhornung	Abb. 5C
Score 3	Starke Verhornung	Abb. 5D

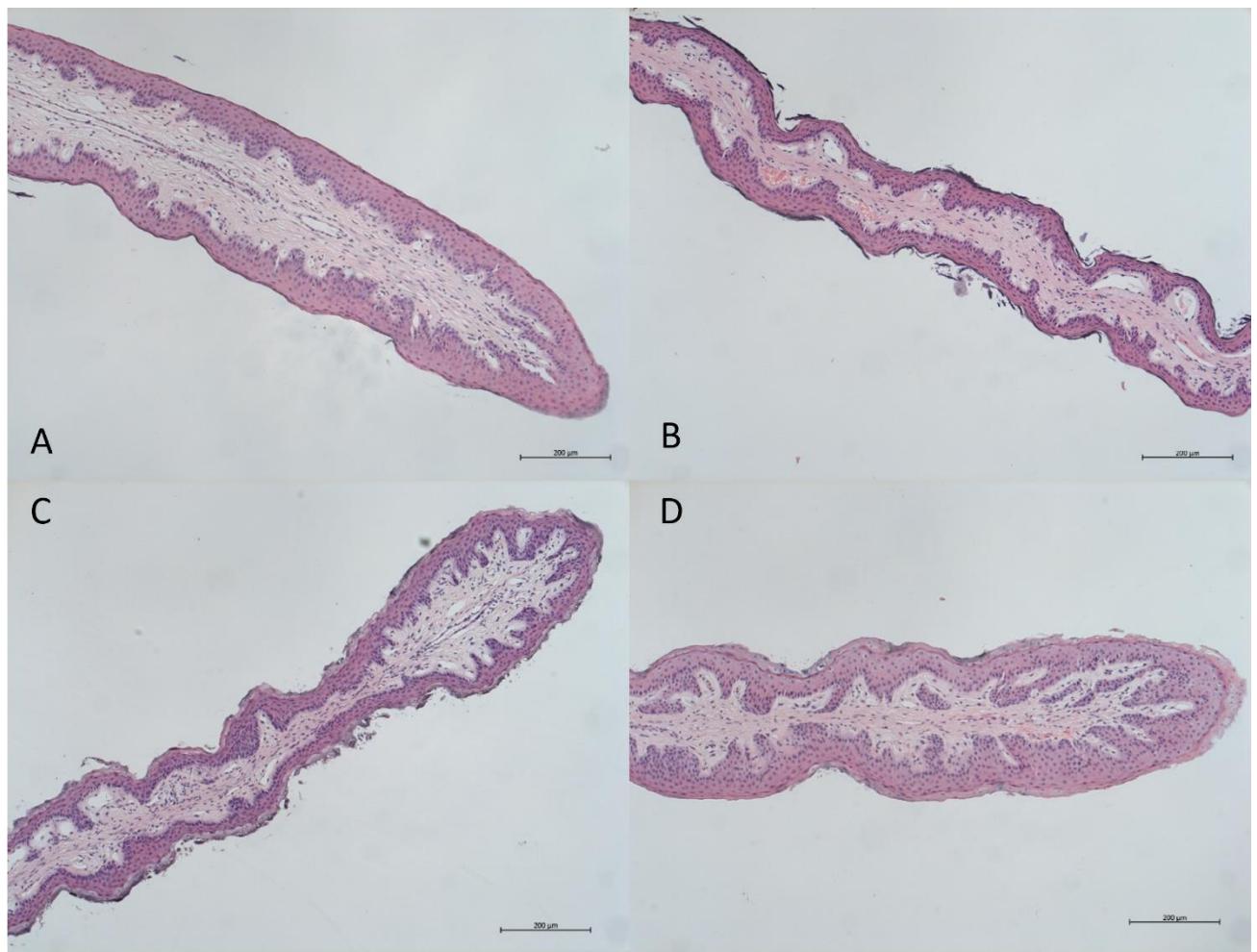


Abbildung 5: Beispielbilder für unterschiedliche Verhorungsstadien des Pansenepithels

Tabelle 3: Scoring der Pigmentierung

Score	Definition	Beispiel
Score 1	Keine Pigmenteinlagerung	Abb. 6A
Score 2	Leichte Pigmenteinlagerung	Abb. 6B
Score 3	Starke Pigmenteinlagerung im <i>Stratum corneum</i>	Abb. 6C

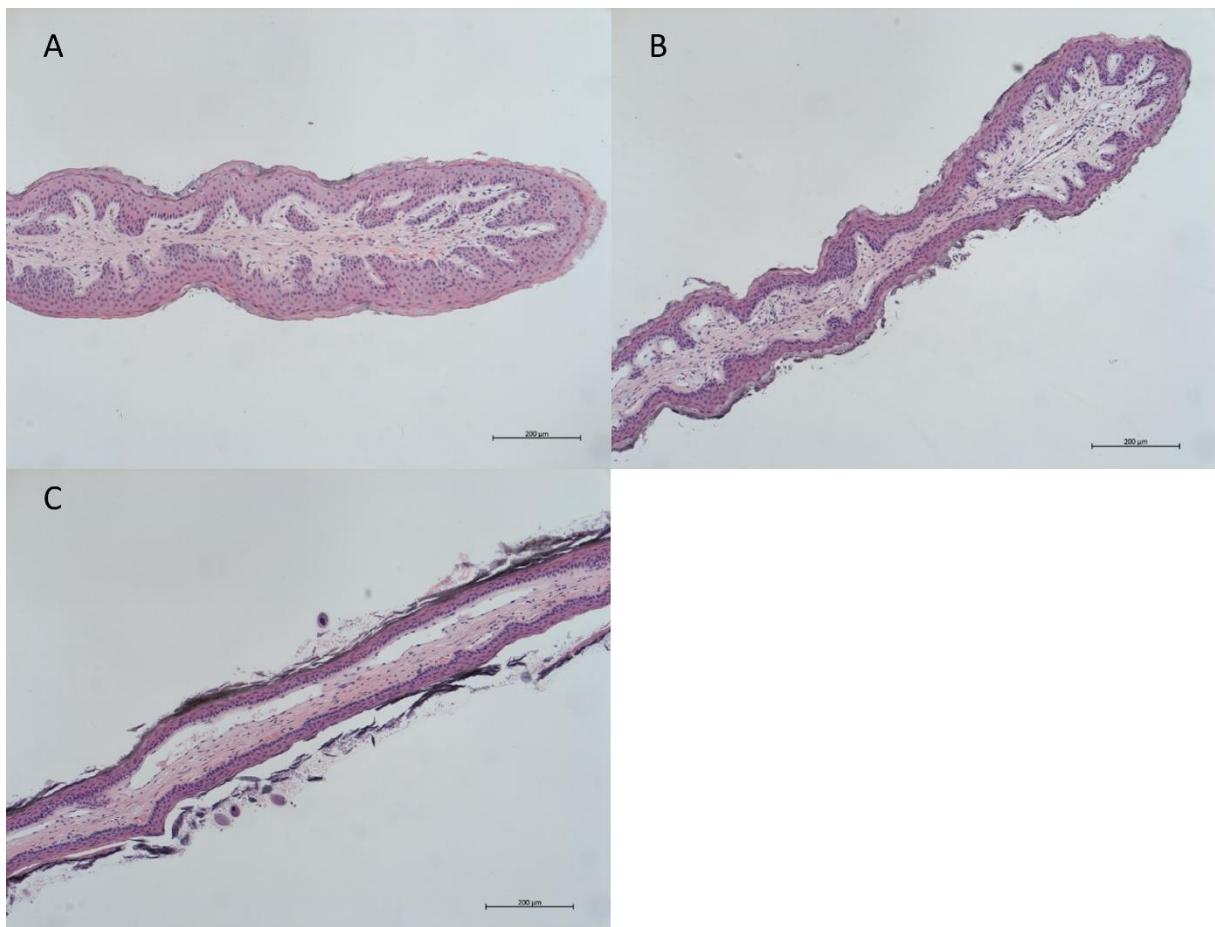


Abbildung 6: Beispielbilder für unterschiedliche Pigmentierungsstufen des Pansenepithels

3.4.3 Entzündungszellen

Bei den Untersuchungen fielen in 400-facher Vergrößerung vereinzelt Neutrophile Granulozyten auf (Abb. 7). Daher wurden auch diese qualitativ erfasst und mit Score 1 (im Präparat vorhanden) und 0 (im Präparat nicht vorhanden) festgehalten.

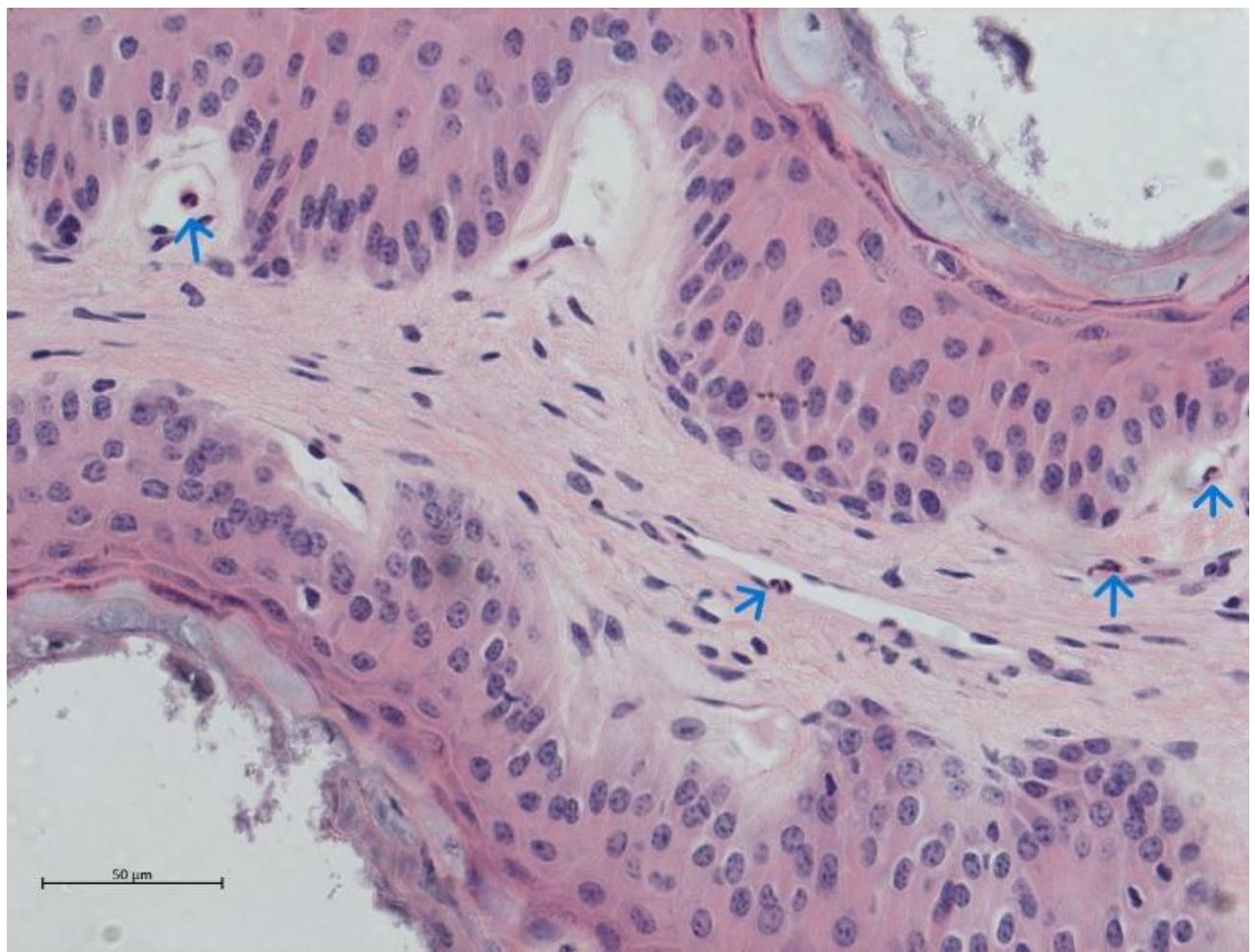


Abbildung 7: Beispielbild – Neutrophile Granulozyten (markiert durch blaue Pfeile) in den Zotten. Zumeist waren diese Zellen in den Zottenkapillaren lokalisiert.

3.4.4 Ballonzellen

Aufgrund kontroverser Aussagen in der Literatur bzgl. des Vorhandenseins bzw. der Kausalitäten, die zur Bildung von Ballonzellenzellen führen (Abb. 8), wurden die Schnitte auf das Vorhandensein dieser überprüft. Es wurde auch hier ein Scoring in 1 (vorhanden) und 0 (nicht vorhanden) vorgenommen.

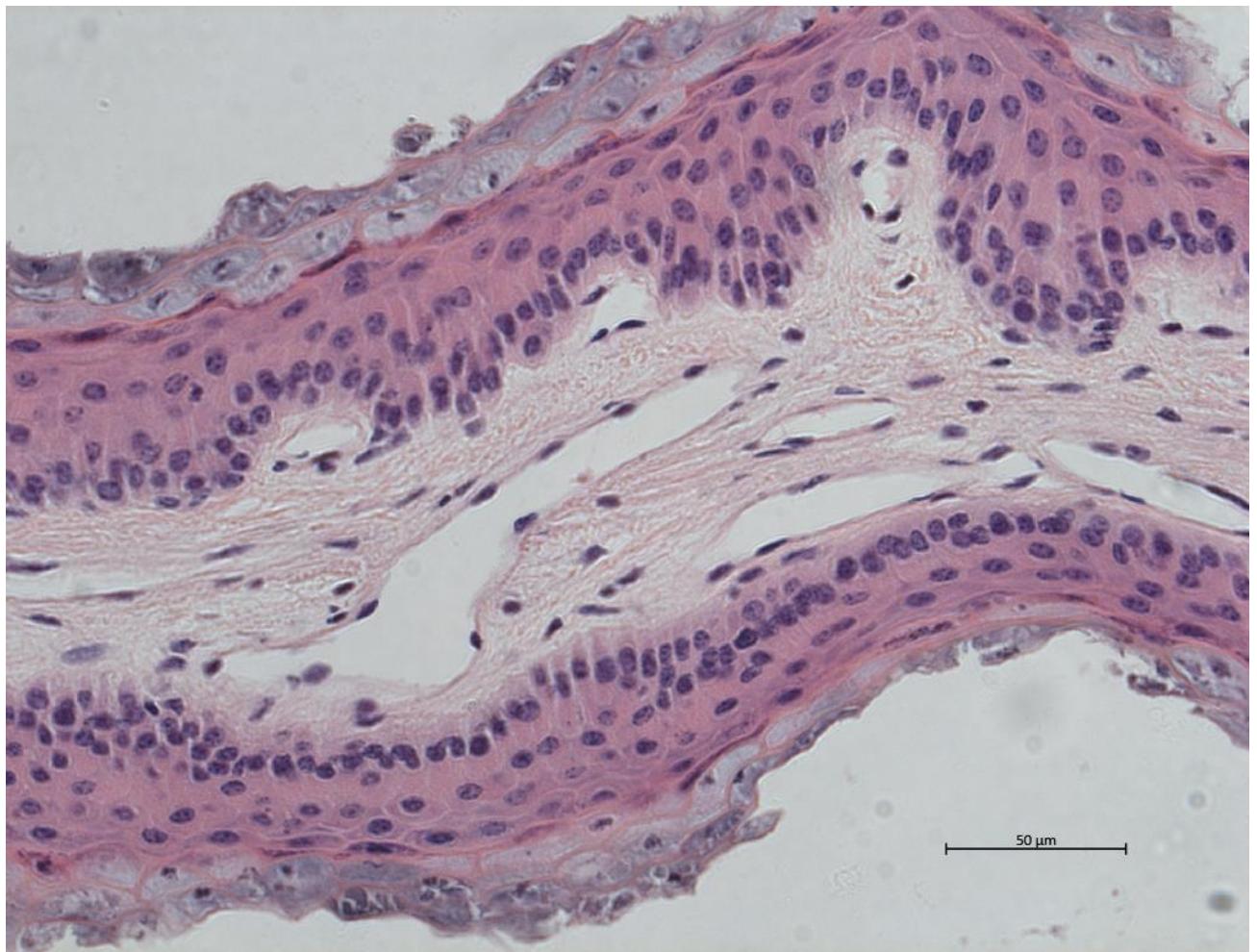


Abbildung 8: Beispielbild - Ballonzellen

3.5 Auswertung und Statistik

Die erhobenen Messungen und Scores wurden in einer Excel-Tabelle (Microsoft Excel, Microsoft Corporation, USA) festgehalten. Es wurden die Mittelwerte der jeweils drei Messungen pro Zotte, Zeitpunkt und Tier berechnet. Darauffolgend wurden für jede Woche der Probennahme die Mittelwerte der elf Rinder ausgerechnet und dafür dann die Standardabweichung ermittelt. Es wurden Diagramme zur grafischen Darstellung erstellt.

Zur statistischen Auswertung wurden die erhobenen Daten mit dem Statistikprogramm Sigma Plot 14.5 (Systat Software GmbH, Frankfurt, Deutschland) verarbeitet. Die Daten wurden auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk) und -varianz (Brown-Forsythe) getestet und die drei Zeitpunkte mittels One Way Repeated Measurements ANOVA (Analysis of Variance) verglichen. Bei $p < 0,05$ wurde von einem statistisch signifikanten Unterschied ausgegangen.

4. Ergebnisse

4.1 Papillenbreite, Papillenlänge und Zottenbreite

Die Papillenbreite, - länge und Zottenbreite zeigten geringfügige Schwankungen über den Versuchszeitraum. Bei keinem der Parameter wurde jedoch eine statistisch signifikante Veränderung über die Zeit festgestellt.

Die Papillenbreite nahm über den Versuchszeitraum schrittweise ab (Abb. 9). Von anfänglich $29,55\mu\text{m}$ im Mittel sank die Breite in Woche 3 um $3,30\mu\text{m}$ auf $26,25\mu\text{m}$ und nochmal um $0,99\mu\text{m}$ bis Woche 6 auf $25,26\mu\text{m}$ ($P=0,185$).

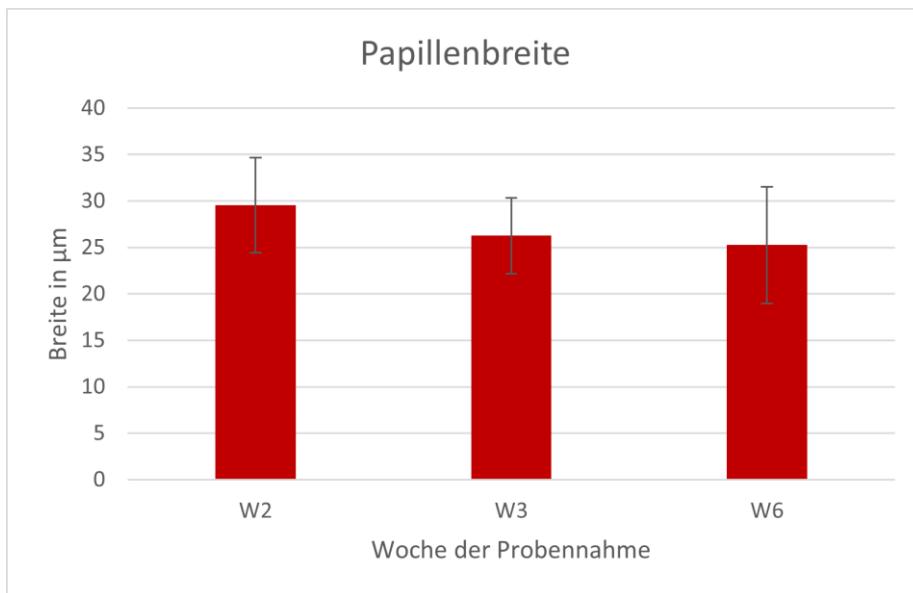


Abbildung 9: Veränderung der Papillenbreite in μm , gegliedert nach den drei Wochen der Probennahmen während des Versuchs. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung; $N = 11$.

Die Papillenlänge zeigt ein anderes Verlaufsbild. Hier nahm die Länge von Woche 2 ($57,94\mu\text{m}$) zu Woche 3 ($53,25\mu\text{m}$) um $4,96\mu\text{m}$ ab. Von Woche 3 zu Woche 6 stieg sie jedoch wieder über den Ausgangswert von Woche 2 auf $59,34\mu\text{m}$ (Abb. 10, $P=0,655$).

Die Zottenbreite veränderte sich entgegengesetzt zur Papillenlänge (Abb. 11). Hier lag der Ausgangsmittelwert in Woche 2 bei $274,28\mu\text{m}$. Die Breite nahm um $38,62\mu\text{m}$ zu auf $312,90\mu\text{m}$ in Woche 3. Anschließend nahm sie jedoch wieder bis Woche 6 auf $297,79\mu\text{m}$ ab ($P=0,182$).

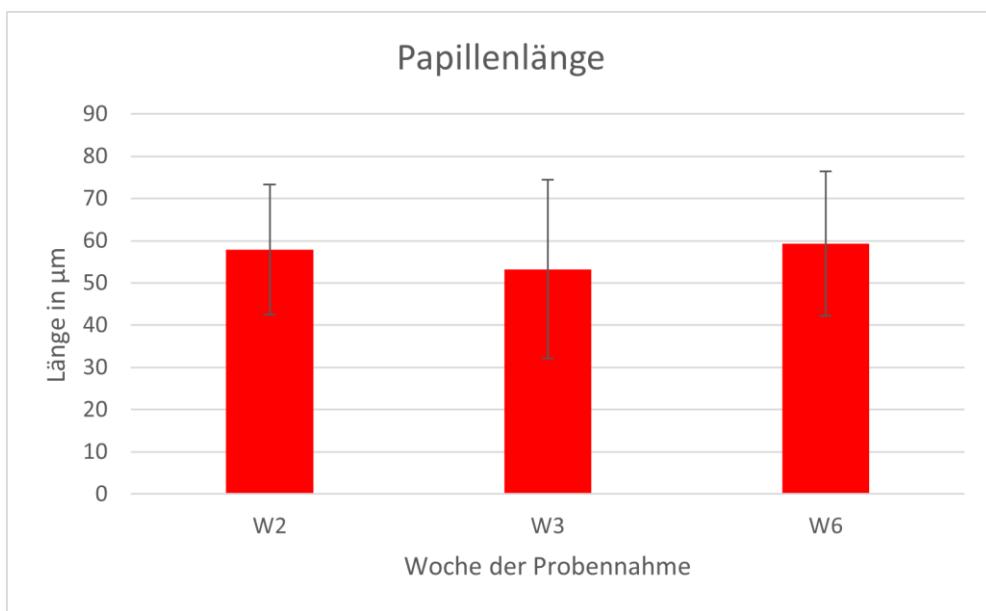


Abbildung 10: Veränderung der Papillenlänge in µm, gegliedert nach den drei Wochen der Probennahmen während des Versuchs. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung. N = 11

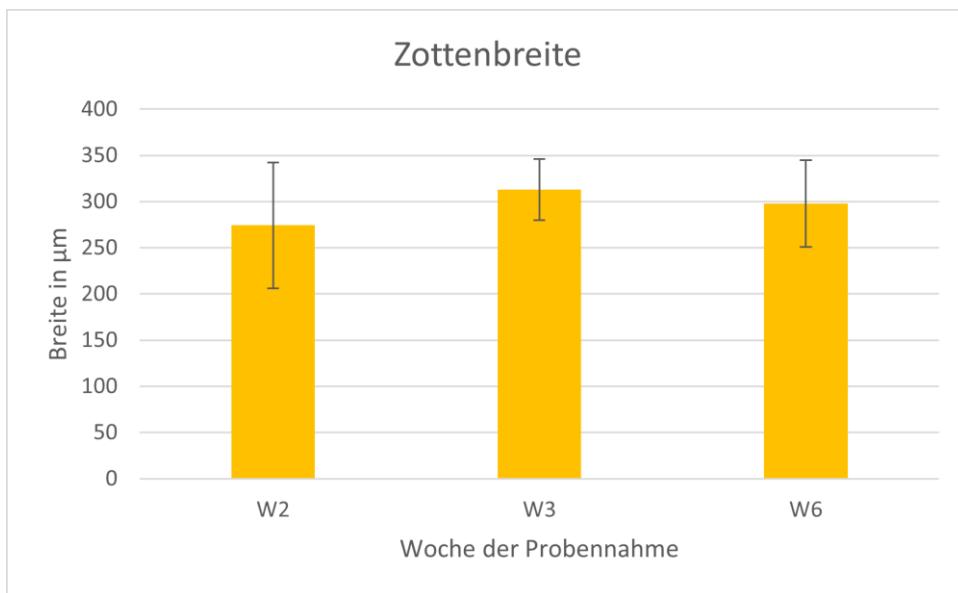


Abbildung 11: Veränderung der Zottenbreite in µm, gegliedert nach den drei Wochen der Probennahmen während des Versuchs. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung. N = 11

4.2 Pansenepithel

Auch die Dicke des Gesamtepithels veränderte sich nicht signifikant ($P=0,137$). Bei den Messungen konnte dennoch eine stetige Zunahme der Epitheldicke festgestellt werden (Abb. 12). Von ursprünglich $59,02\mu\text{m}$ in Woche 2 waren es in Woche 6 mit $75,08\mu\text{m}$ ca. $16,06\mu\text{m}$ mehr.

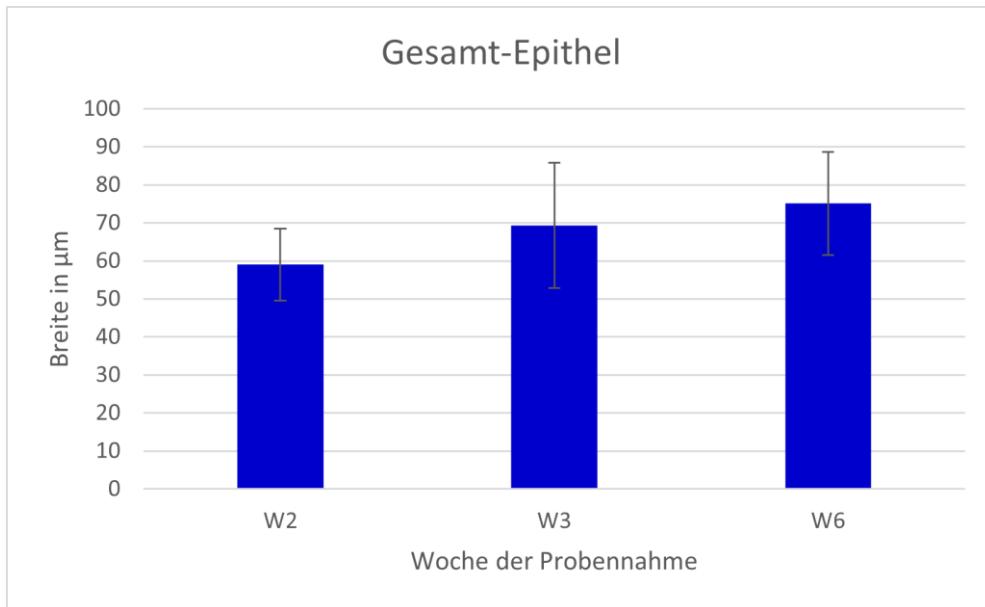


Abbildung 12: Veränderung der Dicke des Gesamtepithels, gegliedert nach den drei Wochen der Probennahmen während des Versuchs. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung. $N = 11$

Beim *Stratum basale* zeigte sich über den Testzeitraum ebenfalls eine leichte Zunahme der Dicke (Abb. 13). Hier stieg die Schichtdicke von $13,92\mu\text{m}$ (Woche 1) auf $15,15\mu\text{m}$ (Woche 6), allerdings ohne statistische Signifikanz zu erreichen ($P=0,476$).

Das *Stratum spinosum* zusammen mit dem *Stratum granulosum* zeigte die gleiche Tendenz (Abb. 14). Hier nahm die Breite von Woche 2 ($27,33\mu\text{m}$) bis Woche 6 ($32,54\mu\text{m}$) um $5,21\mu\text{m}$ zu ($P=0,430$).

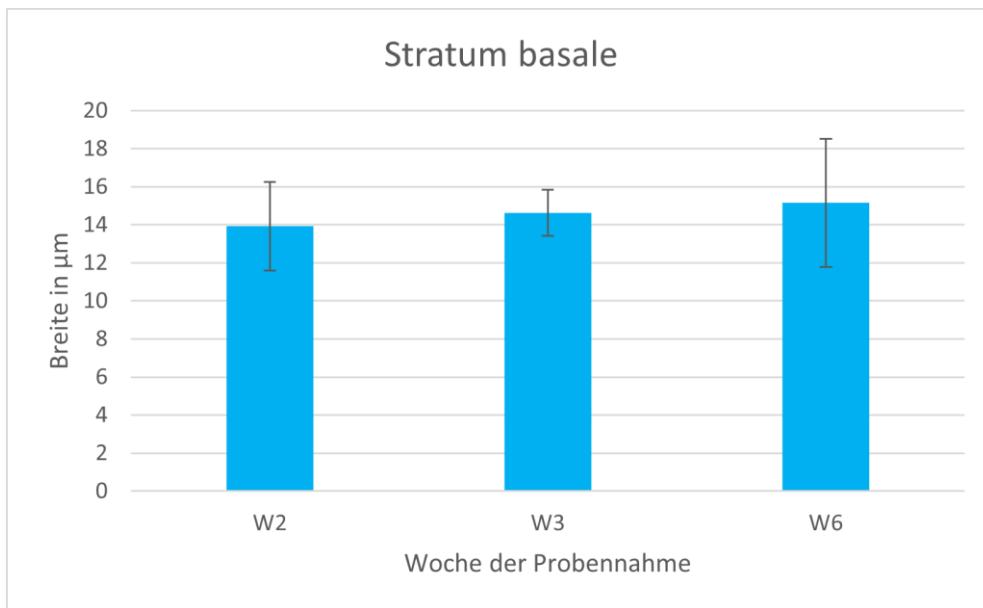


Abbildung 13: Veränderung der Dicke des *Stratum basale*, gegliedert nach den drei Wochen der Probennahmen während des Versuchs. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung. N = 11

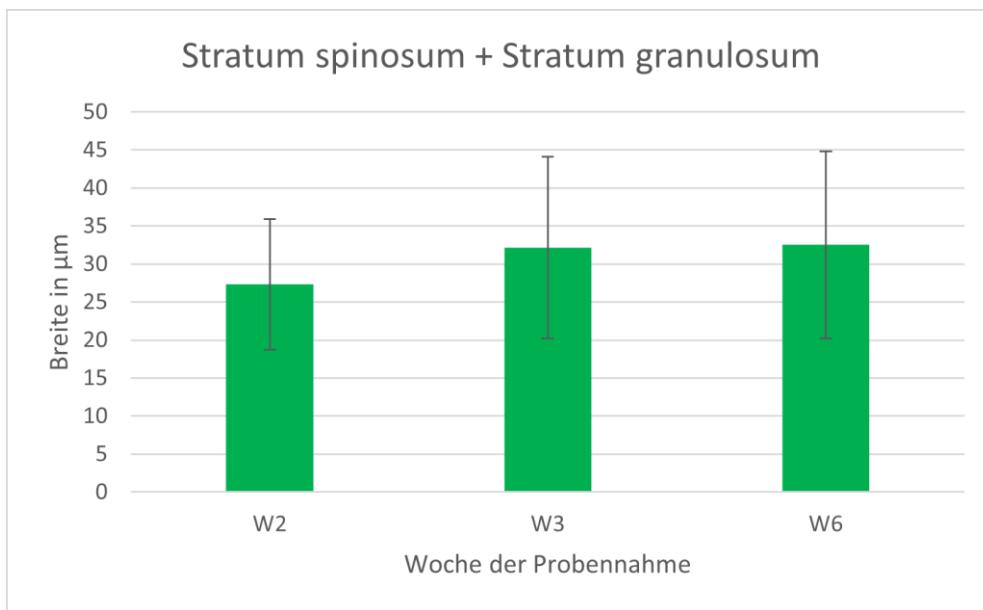


Abbildung 14: Veränderung der Dicke von *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum*, gegliedert nach den drei Wochen der Probennahmen während des Versuchs. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung. N = 11

Im *Stratum corneum* ließ sich zwischen Woche 2 und Woche 6 ($P=0,065$) bzw. zwischen Woche 3 und Woche 6 ($P=0,064$) ein starker Trend in Richtung einer Zunahme der Verhornungsschicht erkennen (Abb. 15). Die anfängliche Breite des *Stratum corneum* lag im Mittel bei $17,74\mu\text{m}$ (Woche 2) und stieg über $18,10\mu\text{m}$ (Woche 3) auf $22,84\mu\text{m}$ (Woche 6) an. Das macht ein Plus von $5,1\mu\text{m}$ über den Testzeitraum.

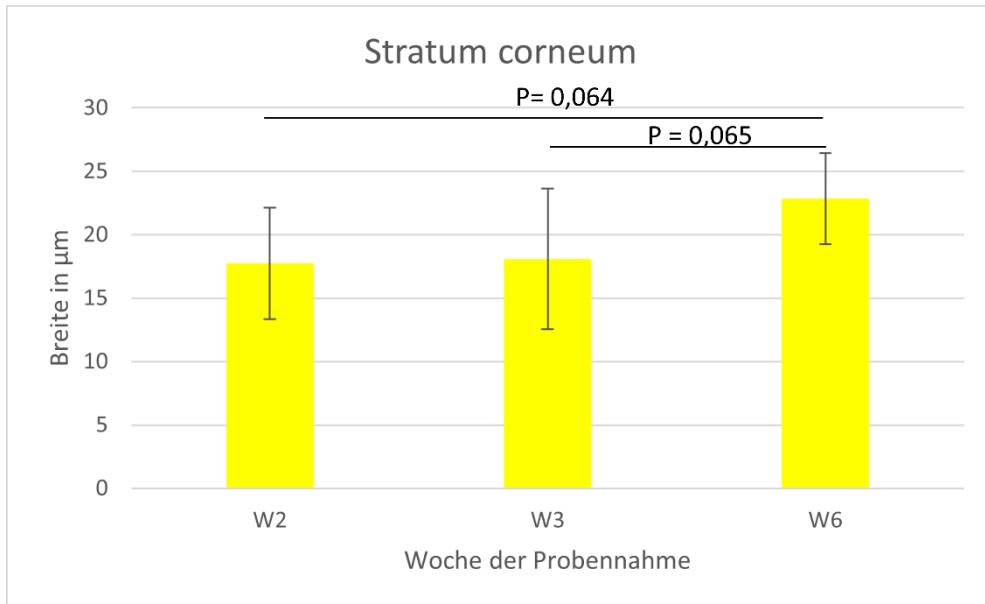


Abbildung 15: Veränderung der Dicke des *Stratum corneum*, gegliedert nach den drei Wochen der Probennahmen während des Versuchs. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung. Es war ein starker Trend hin zu einer Verdickung des *Stratum corneum* zwischen Woche 2 und 6 ($P=0,064$) bzw. Woche 3 und 6 ($P=0,065$) erkennbar. One Way RM ANOVA, $N = 11$.

4.3 Neutrophile, Verhornung, Pigmentierung, Ballonzellen

Neutrophile Granulozyten waren in verschiedenen Präparaten aller Beprobungszeitpunkte aufzufinden. Erkennbar ist, dass in Woche 3, also direkt nach Steigerung der Kraftfuttermenge, die meisten zu finden waren (Abb. 16). Der Anteil der Präparate in denen Neutrophile Granulozyten zu finden waren, stieg von Woche 2 mit 45% auf 91% in Woche 3, danach sank der Anteil wieder auf nur noch 55% in Woche 6. Ein statistisch signifikanter Unterschied ist hier nicht gegeben, jedoch lässt sich ein Trend erkennen ($P=0,092$).

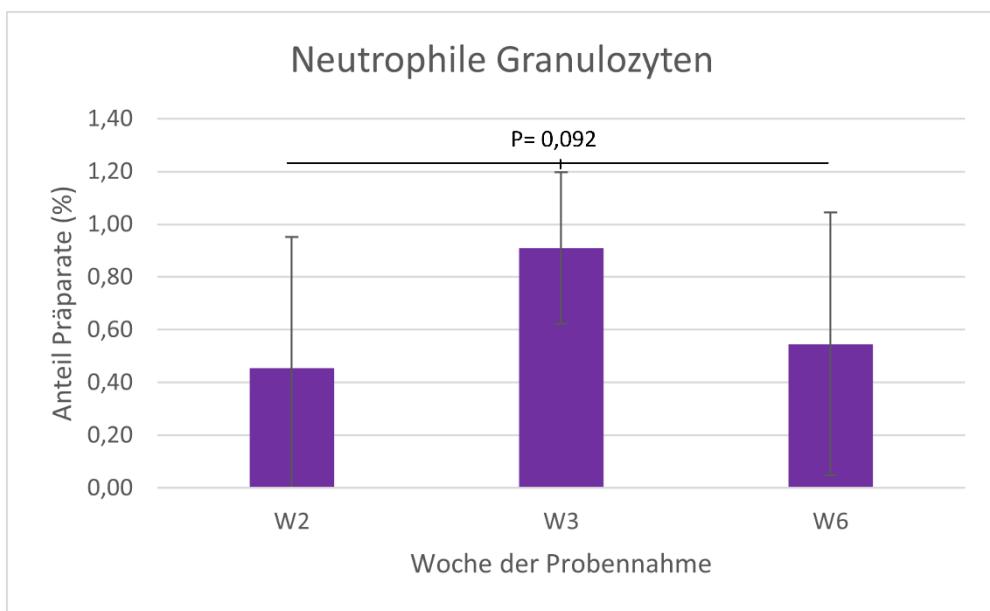


Abbildung 16: Anteil der Präparate, in denen Neutrophile Granulozyten vorhanden waren, gegliedert nach Wochen im Versuch. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung. One Way RM ANOVA, N = 11

Bei der Verhornung des Pansenepithels lag der Score in Woche 2 bei 1,45 und sank in Woche 3 auf 1,00 ab ($P=0,212$). Von Woche 3 bis Woche 6 stieg der Wert auf 2,16 an. Hier ließ sich ein signifikanter Unterschied feststellen ($P=0,011$, Abb. 17).

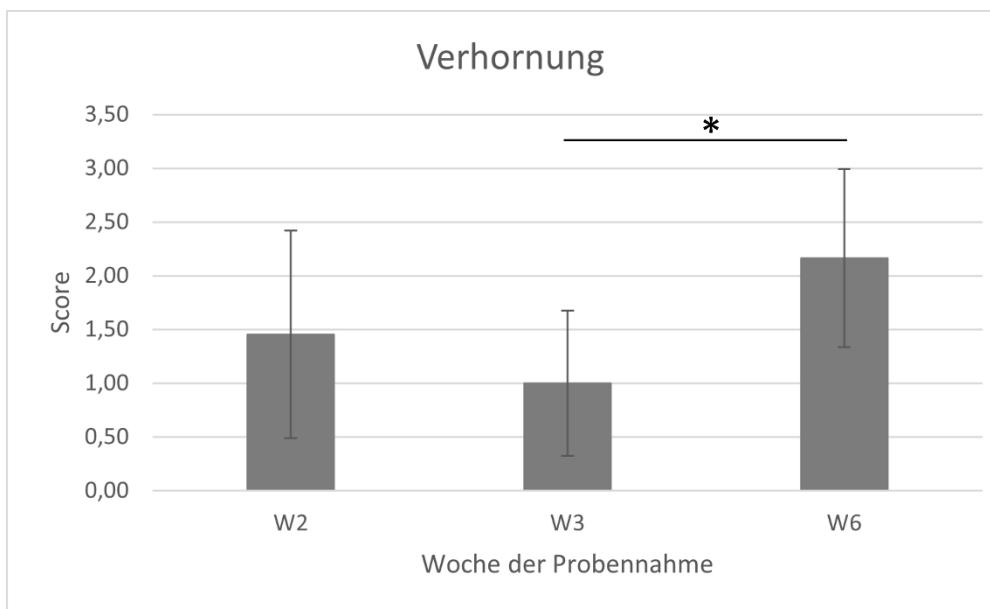


Abbildung 17: Scoring der Verhornung gegliedert nach Wochen der einzelnen Probennahmen. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung. One Way RM ANOVA, * $p<0,05$, N = 11

Im Gegensatz zur Verhornung lag der Score für die Pigmentierung der Zotten mit 2,36 in Woche 3 am höchsten, während Woche 2 einen Score von 2,27 aufwies und in Woche 6 lag er bei 1,91 (Abb. 18). Es zeigte sich somit eine Tendenz zu einer geringeren Pigmentierung der Epithelien in Woche 6 ($P=0,065$).

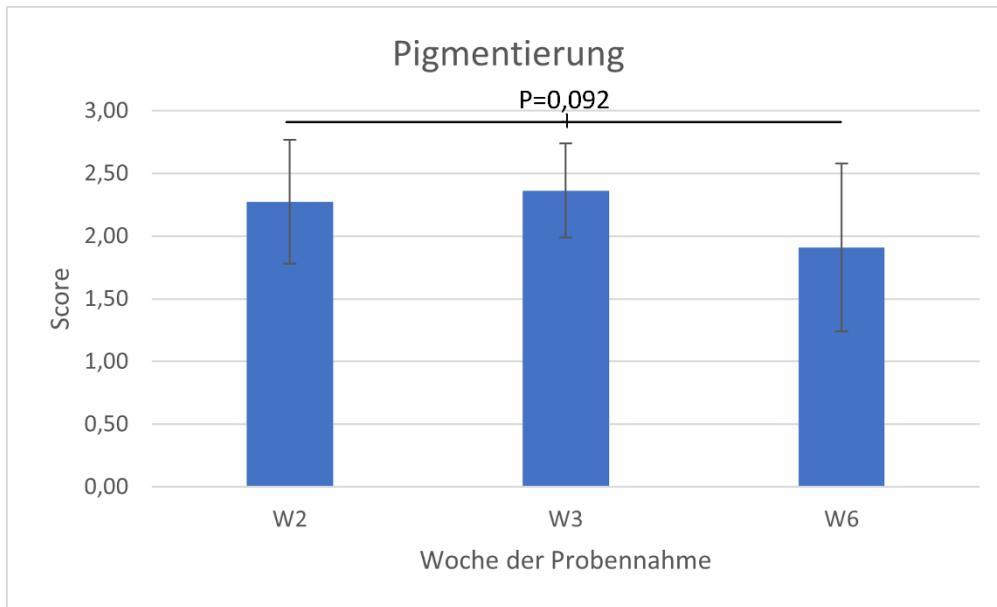


Abbildung 18: Scoring der Pigmentierung gegliedert nach Wochen der einzelnen Probennahmen. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung. One Way RM ANOVA, $N = 11$

Die Ballonzellen zeigten ebenfalls signifikante Veränderungen. Der Anteil der Präparate mit Ballonzellen sank von Woche 2 mit 91% auf 55% in Woche 3 ($P=0,030$). In Woche 6 waren in allen Präparaten Ballonzellen zu finden (Abb. 19). Mit einem P-Wert von 0,01 zeigte sich auch zwischen Woche 3 und Woche 6 ein signifikanter Unterschied. Die Veränderung zwischen Woche 2 und Woche 6 betrug nur ~10% ($P=0,514$).

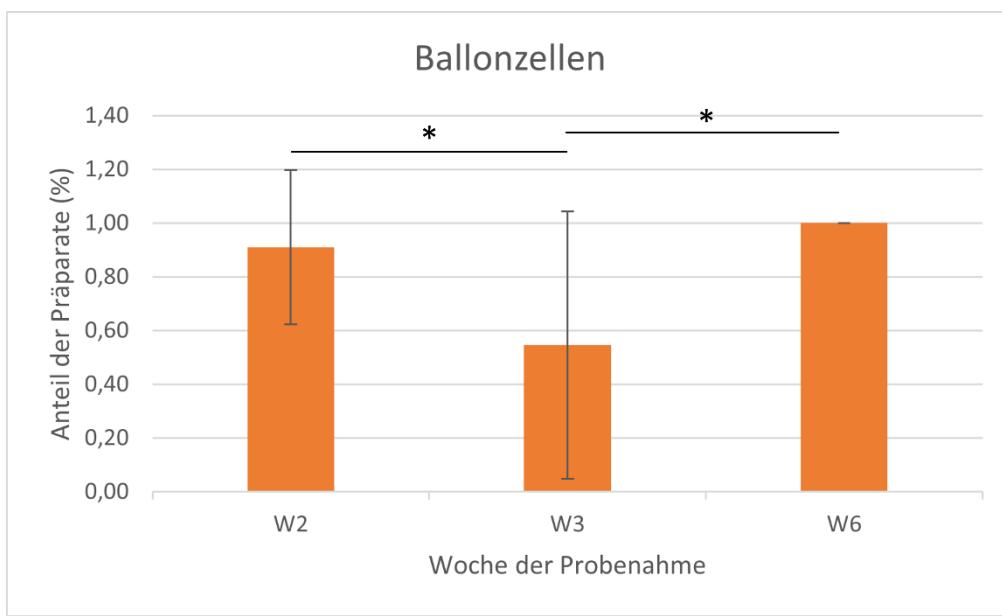


Abbildung 19: Anteil der Präparate, in welchen Ballonzellen zu finden waren, gegliedert nach Wochen der einzelnen Probennahmen. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung. One Way RM ANOVA, * $p<0,05$, N = 11

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die histologisch erkennbaren Veränderungen am Pansenepithel während einer SARA darzustellen.

Insgesamt konnten bei allen Parametern geringfügige, aber nicht signifikante Veränderungen über den Versuchszeitraum beobachtet werden. Ein signifikanter Unterschied war nur in Bezug auf das Vorhandensein von Ballonzellen und Veränderungen der Verhornung zu erkennen.

Bei den Ballonzellen sank der Anteil der Präparate, in denen diese Zellen aufgefunden wurden, von Woche 2 auf 3 ab, wohingegen in Woche 6 in allen Präparaten welche zu finden waren. Diese Erkenntnis spricht dafür, dass Ballonzellen vermehrt bei der Aufnahme leicht verdaulicher Kohlenhydrate auftreten, jedoch auch bei der Fütterung von Raufutter vorkommen. Dieser Befund ergänzt die vorliegenden Berichte, denen zufolge ebenfalls Ballonzellen bei Raufuttergabe auffindbar waren (14), wohingegen andere Untersuchungen diese vermehrt bei Fütterung leicht verdaulicher Kohlenhydrate beschrieben (15–17). Um die Kausalitäten noch besser zu verstehen ist zu überlegen, weitere Studien anzustreben, welche andere Faktoren für das Auftreten bzw. Fehlen von Ballonzellen untersuchen, möglicherweise auch unabhängig von den unterschiedlichen Fütterungsarten, wie z.B. Alter und Genetik der Tiere oder auch Entzündungsreaktionen.

Der Verhornungsgrad des Pansenepithels sank zunächst bei Erhöhung des Kraftfutteranteils in der Ration zwischen Woche 2 und 3 ab, bis zur Woche 6 kam es zu einer Zunahme der Verhornung. Die Hornschicht dient als Barriere gegenüber dem Panseninhalt, um die darunterliegenden lebenden Zellschichten zu schützen (9). Durch die vermehrt auftretenden Säuren bei einer SARA kann das Wachstum der Hornschicht helfen, eine stärkere Barriere zwischen dem Panseninhalt und den vitalen Zellen des Epithels aufzubauen.

Zumindest als Trend erkennbar war in diesem Zusammenhang auch eine Zunahme der Dicke des *Stratum corneum*. Dies zeigt auch eine objektive Zunahme der Verhornung. Auch Baldwin und Connor beschreiben das Vorhandensein von mehr Zellschichten bei einer Fütterung mit hohem Kraftfutteranteil im Vergleich zu hohem Raufutteranteil (10), was mit unseren Ergebnissen korreliert. Jedoch wurden in der vorliegenden Arbeit nicht die einzelnen Schichten gezählt, sondern die Zunahme der Dicke gemessen. Außerdem konnte hier nur eine Verbreiterung des *Stratum corneum* nachgewiesen werden, *Stratum basale* sowie *Stratum spinosum* und *granulosum* zeigten keine signifikanten Veränderungen. Somit kann man den anderen Autoren nicht zustimmen, dass sich je nach Futterangebot die einzelnen Schichten in

ihrer Ausprägung verändern (9, 10). Die leichte, nicht signifikante Zunahme der Dicke des Gesamtepithels lässt sich deshalb am besten mit der Zunahme der Verhornungsschicht und dem Vorhandensein der Ballonzellen erklären.

Auch Steele *et al.* beschreiben eine Reduktion der drei unteren Schichten *Stratum basale*, *spinosum* und *granulosum*, sowie der gesamten Epitheldicke (24). Dies trifft wie zuvor beschrieben in der vorliegenden Arbeit nicht zu, da hier die Schichtdicken eher konstant bleiben. Ihre Aussage deckt jedoch mit dem Ergebnis, dass sich auch in der von Steele *et al.* durchgeführten Studie die Gesamtbreite der Zotte nicht ändert, obwohl es zu einer Vergrößerung der Verhornungsschicht kommt. Außerdem beschreiben sie eine Para- bzw. Hyperkeratose durch beschleunigte Differenzierung und Zellmigration (4, 24). Eine Parakeratose erkennt man an einer Ansammlung von keratinisierten, kernhaltigen Plattenepithelzellen und starker Abschilferung des Epithels und einer erhöhten Anzahl der Schichten des *Stratum corneum* (32). Eine Abschilferung der äußersten Zellschicht konnte auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden, diese wurde als sehr hoher Grad der Verhornung interpretiert. Eine Parakeratose konnte hier nicht beschrieben werden. Laut Steele *et al.* ist eine Abschilferung der erste Schritt der Anpassung und es kommt erst nachfolgend zu Hyper- bzw. Parakeratose (32). Daher kann man schlussfolgern, dass der Versuchszeitraum in der vorliegenden Arbeit mit insgesamt sieben Wochen möglicherweise zu kurz war und das Pansenepithel sich noch in der Phase der Abschilferung befand.

Es muss auch beachtet werden, dass die meisten ähnlichen Studien an (männlichen) Mastrindern oder trockenstehenden Kühen durchgeführt wurden (8, 24, 30). In der vorliegenden Arbeit wurden hingegen laktierende Kühe untersucht, deren Energiebedarf und -stoffwechsel anspruchsvoller sind. Zu Beginn des Versuchs waren die Rinder durchschnittlich 105 Tage in Milch, somit nicht mehr in der Hochlaktation und im Bereich der negativen Energiebilanz. Inwiefern sich die Energiebilanz bzw. Stoffwechselsituation auf Anpassungsreaktionen des Pansenepithels auswirkt, ist spekulativ und kann anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig beantwortet werden.

Ebenfalls als Trend erkennbar war ein vermehrtes Vorhandensein von Neutrophilen Granulozyten in Woche 3, also direkt nach Steigerung der Kraftfuttermenge. Neutrophile Granulozyten als Entzündungszellen, die jedoch nur in Gefäßen und der *Lamina propria* zu finden waren, sprechen hier für eine „Überforderung“ des Pansens in Form einer leichten lokalen Entzündung bei plötzlicher Steigerung der Kraftfuttermenge. Da jedoch die Zahl bis zu Woche 6 wieder sank, kann man vermuten, dass das Pansenepithel sich langsam an die

Kraftfuttermengen anpasst und somit die lokale Entzündungsreaktion abebbt. Das Vorhandensein von Neutrophilen deckt sich mit der Aussage von Kleen *et al.*, dass es bei SARA zu Rumenitis und Mikroabszessen in der Pansenmukosa kommen kann (25). Černík *et al.* beschreiben auch eine Dilatation und Hyperämie der Kapillaren in der *Lamina propria mucosa* und Submukosa sowie ein Ödem dieser (8). In diesem Zusammenhang ist möglicherweise auch das in der vorliegenden Arbeit beobachtete vermehrte Auftreten Neutrophiler Granulozyten in der *Lamina propria* zu sehen.

Im Gegensatz zu Černík *et al.*, welche z.T. eine Hyperpigmentation des Epithels beschreiben (8), zeigt sich in unseren Untersuchungen eher eine Tendenz zur geringeren Pigmentierung der Zotten von Woche 2 bis in Woche 6. Diese Erkenntnis passt zu den Untersuchungen von Jonsson *et al.*, die in ihrer Arbeit ebenfalls Zotten von Rindern mit hoher Kraftfutteraufnahme als grau bis rosagrau beschrieben (28). Jedoch betrifft die Beschreibung von Jonsson *et al.* die makroskopische Farbveränderung der Papille, wohingegen in der vorliegenden Arbeit nur die mikroskopischen Veränderungen betrachtet wurden. Somit sollte man beachten, dass die Einschätzung der Pigmentierung auf subjektiver Ebene stattgefunden hat und sich nicht eindeutig sagen lässt, ob die auf den Bildern erkennbare Pigmentierung ggf. auch Färbeartefakte der HE-Färbung sein könnten.

Papillenbreite, Papillenlänge und die Gesamtbreite der Zotten zeigten nur leichte Schwankungen, wobei weder signifikante noch tendenzielle Unterschiede zu erkennen waren. Hier hätte man eine Vergrößerung der Papille erwarten können, um durch eine größere Resorptionsfläche das vermehrte Auftreten von Säuren zu kompensieren, jedoch lässt sich die fehlende Veränderungen ggf. so erklären, dass die gesamte Zotte in ihrer Länge zunimmt und somit eine vergrößerte Resorptionsfläche gewährleistet wird (30, 33).

In der Literatur sind weitere mikroskopische Veränderungen bei SARA beschrieben, welche in dieser Studie nicht näher untersucht wurden. Diese umfassen z.B. sichtbare „Formveränderungen von Basalzellen und Parabasalzellen“ (13). Zellen des *Stratum granulosum* nahmen dabei eine eher abgeflachte Form an, Basalzellen wurden eher pyramidenförmig (24). Die Abgrenzung der einzelnen Zellschichten ist undeutlich, da aus dem *Stratum basale* undifferenzierte Zellen nach oben wandern (32). Diese Veränderungen wurden in der vorliegenden Studie nicht genauer untersucht. Es kann jedoch der subjektive Eindruck bestätigt werden, dass die einzelnen Zellschichten in Woche 6 schwerer zu differenzieren waren.

Weiterhin beschreiben Steele *et al.* sowie Hu *et al.* (nicht signifikante) Läsionen der Zotten, einen Rückgang der Zellverbindungen und dadurch große Lücken zwischen den Zellen des *Stratum corneum* und *granulosum*, sowie undifferenzierte und lymphozytenähnliche Zellen in der Nähe der Epithelabschilferung (24, 27).

Läsionen in der Pansenmukosa können ebenso auftreten (4). Dadurch kommt es zu Störungen im Energiehaushalt der Tiere durch mangelhaften Transport und Metabolismus von freien Fettsäuren und der normalerweise schützenden Barriere zum portalen Kreislauf (32).

Bei der vorliegenden Studie ist zu beachten, dass es sich um einen recht kleinen Versuch mit nur elf Rindern gehandelt hat, ebenso wurde pro Probennahme nur je eine Pansenzotte untersucht. Um repräsentativere Ergebnisse zu erhalten, wäre es besser gewesen mehrere Zotten aus verschiedenen Bereichen des Pansens zu entnehmen. Ebenso sagen Kleen *et al.*, dass der Pansen 4-6 Wochen braucht, um sich an neue Verhältnisse anzupassen (25). Da hier die letzte Probennahme in Woche 6 stattgefunden hat, besteht die Möglichkeit, dass die Veränderungen ausgeprägter auftreten, wenn man eine Studie über einen längeren Zeitraum durchführt. Die geringen Unterschiede in dieser Arbeit könnten daran liegen, dass die Rinder möglicherweise schon vorher phasenweise SARA hatten; da keine pH Messungen vor Beginn des Versuchs stattgefunden haben ist dieser Faktor unbekannt. Ebenfalls ist der Unterschied von 25% Kraftfutter in der Ration recht gering. In vergleichbaren Studien, welche eindeutigere Ergebnisse erzielten, wurde das Kraftfutter in der Ration von 0% auf 65% erhöht (24).

6. Schlussfolgerung

SARA ist eine wichtige Erkrankung bei Rindern, die zu Schädigung und damit Funktionsverlusten des Pansenepithels führt. In der vorliegenden Studie wurden nur wenige histologische Veränderungen im Pansenepithel gefunden, sodass es scheint, als würde das Epithel kaum fütterungsbedingten Veränderungen zeigen. Die wenigen beobachteten Veränderungen sind vor allem in der Hornschicht des Epithels vorhanden. Da das *Stratum corneum* als Barriere dient, welche zumindest in der ersten Zeit, in der Abschilferungen des Epithels auftreten, geschwächt wird, müssen auch die weiteren systemischen Konsequenzen, welche in der Literatur beschrieben sind, bedacht werden. SARA stellt eine enorme Belastung für das Tierwohl dar und sollte nicht hingenommen, sondern mittels Herden- und Fütterungsmanagement verhindert werden.

Literaturverzeichnis

1. Bauer A, Martens H, Thöne-Reineke C. Tierschutzrelevante Zuchtprobleme beim Milchvieh – Interaktion zwischen dem Zuchtziel „Milchleistung“ und dem vermehrten Auftreten von Produktionskrankheiten. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 2021;1–9. doi: 10.2376/1439-0299-2021-5.
2. Fu Y, He Y, Xiang K, Zhao C, He Z, Qiu M et al. The Role of Rumen Microbiota and Its Metabolites in Subacute Ruminal Acidosis (SARA)-Induced Inflammatory Diseases of Ruminants. Microorganisms 2022; 10(8). doi: 10.3390/microorganisms10081495.
3. Snyder E, Credille B. Diagnosis and Treatment of Clinical Rumen Acidosis. Vet Clin North Am Food Anim Pract 2017; 33(3):451–61. doi: 10.1016/j.cvfa.2017.06.003.
4. Enemark JMD. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): a review. Vet J 2008; 176(1):32–43. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.12.021.
5. Dahme E, Weiss E, Hafner-Marx A, Hrsg. Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. 6., völlig neu bearb. Aufl. Stuttgart: Enke; 2007.
6. Salomon F-V, Geyer H, Gille U. Anatomie für die Tiermedizin. 4. aktualisierte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2020.
7. Breves G, Diener M, Gäbel G, Bruckmaier RM, Gerstberger R, Fromm M et al. Physiologie der Haustiere. 6., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2022.
8. Černík J, Štercová E, Šterc J, Fictum P, Luňáček J, Halouzka R. The effect of intensive fattening of bulls with a high-concentrate diet on ruminal mucosa – a morphometric study. Acta Vet. Brno 2011; 80(3):275–9. doi: 10.2754/avb201180030275.
9. Steele MA, Penner GB, Chaucheyras-Durand F, Le Guan L. Development and physiology of the rumen and the lower gut: Targets for improving gut health. J Dairy Sci 2016; 99(6):4955–66. doi: 10.3168/jds.2015-10351.
10. Baldwin RL, Connor EE. Rumen Function and Development. Vet Clin North Am Food Anim Pract 2017; 33(3):427–39. doi: 10.1016/j.cvfa.2017.06.001.
11. Liebich H-G. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis; mit 11 Tabellen. 4., völlig überarb. und erw. Aufl. Stuttgart, New York: Schattauer; 2004.
12. Graham C, Simmons NL. Functional organization of the bovine rumen epithelium. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2005; 288(1):R173-81. doi: 10.1152/ajpregu.00425.2004.
13. Engelage Ol. Osmotisch bedingter Wassertransport durch das isolierte Pansenepithel des Schafes [Dissertation]. Berlin: FU Berlin; 1999.
14. Tahas SA, Hetzel U, Altenbrunner-Martinek B, Martin Jurado O, Hammer S, Arif A et al. Microanatomy of the digestive tract, hooves and some visceral organs of addax antelope (*Addax nasomaculatus*) following a concentrate or forage feeding regime. Anat Histol Embryol 2018; 47(3):254–67. doi: 10.1111/ahe.12351.

15. Meissner S, Hagen F, Deiner C, Günzel D, Greco G, Shen Z et al. Key role of short-chain fatty acids in epithelial barrier failure during ruminal acidosis. *J Dairy Sci* 2017; 100(8):6662–75. doi: 10.3168/jds.2016-12262.
16. Perrin MR, Faurie AS. Rumen morphology and volatile fatty acid production in the Blue duiker (*Cephalophus monticola*) and the Red duiker (*Cephalophus natalensis*) 1995; 60:73–84 [Stand: 10.07.2024]. Verfügbar unter: <https://www.biodiversitylibrary.org/part/192193>.
17. Schilcher B. Untersuchungen zur Pansen- und Kluengesundheit verschiedener Wildwiederkäuerarten des Tiergarten Nürnberg im Zusammenhang mit dem Fütterungsmanagement [Dissertation]: University of Zurich; 2010.
18. Hoover WH, Miller TK. Rumen digestive physiology and microbial ecology. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1991; 7(2):311–25. doi: 10.1016/s0749-0720(15)30801-x.
19. Eisenreich R. Einfluss exogener Enzymzulagen bei Milchkühen auf die ruminale Abbaubarkeit verschiedener Futtermittel, pansenphysiologische Parameter und die Gesamtverdaulichkeit [Dissertation]: Technische Universität München; 2008.
20. Gasteiner J. Grundlagen der Verdauungsvorgänge beim Rind—Pansenphysiologie, Pansenazidose. 28. Viehwirtschaftliche Fachtagung, BAL Gumpenstein 2001.
21. Pierre BS. Rumen anaerobic fungi. *JBMOA* 2018; 6(2). doi: 10.15406/jbmoa.2018.06.00179.
22. Monteiro HF, Faciola AP. Ruminal acidosis, bacterial changes, and lipopolysaccharides. *J Anim Sci* 2020; 98(8). doi: 10.1093/jas/skaa248.
23. Hernández J, Benedito JL, Abuelo A, Castillo C. Ruminal acidosis in feedlot: from aetiology to prevention. *ScientificWorldJournal* 2014; 2014:702572. doi: 10.1155/2014/702572.
24. Steele MA, Croom J, Kahler M, AlZahal O, Hook SE, Plaizier K et al. Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during grain-induced subacute ruminal acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011; 300(6):R1515-23. doi: 10.1152/ajpregu.00120.2010.
25. Kleen JL, Hooijer GA, Rehage J, Noordhuizen, J P T M. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2003; 50(8):406–14. doi: 10.1046/j.1439-0442.2003.00569.x.
26. Garcia Diaz T, Ferriani Branco A, Jacovaci FA, Cabreira Jobim C, Bolson DC, Pratti Daniel JL. Inclusion of live yeast and mannan-oligosaccharides in high grain-based diets for sheep: Ruminal parameters, inflammatory response and rumen morphology. *PLoS One* 2018; 13(2):e0193313. doi: 10.1371/journal.pone.0193313.
27. Hu X, Li S, Mu R, Guo J, Zhao C, Cao Y et al. The Rumen Microbiota Contributes to the Development of Mastitis in Dairy Cows. *Microbiol Spectr* 2022; 10(1):e0251221. doi: 10.1128/spectrum.02512-21.
28. Jonsson NN, Ferguson HJ, Koh-Tan HHC, McCartney CA, Cernat RC, Strachan EM et al. Postmortem observations on rumen wall histology and gene expression and ruminal and caecal

- content of beef cattle fattened on barley-based rations. *Animal* 2020; 14(7):1447–60. doi: 10.1017/S1751731119002878.
29. Neubauer V, Humer E, Kröger I, Meißen A, Reisinger N, Zebeli Q. Technical note: Changes in rumen mucosa thickness measured by transabdominal ultrasound as a noninvasive method to diagnose subacute rumen acidosis in dairy cows. *J Dairy Sci* 2018; 101(3):2650–4. doi: 10.3168/jds.2017-13682.
30. Zitnan R, Kuhla S, Nürnberg K, Schönhusen U, Ceresnakova Z, Sommer A et al. Influence of the diet on the morphology of ruminal and intestinal mucosa and on intestinal carbohydrazase levels in cattle. *Vet. Med.* 2003; 48(7):177–82. doi: 10.17221/5767-VETMED.
31. Baumgärtner, W., Wohlsein P. Färbetechniken und Nachweisverfahren. In: Baumgärtner, W., Hrsg. Pathohistologie für die Tiermedizin. 1. Aufl. Stuttgart: Enke; 2007. Seite 7-12.
32. Steele MA, AlZahal O, Hook SE, Croom J, McBride BW. Ruminal acidosis and the rapid onset of ruminal parakeratosis in a mature dairy cow: a case report. *Acta Vet Scand* 2009; 51(1):39. doi: 10.1186/1751-0147-51-39.
33. Upgang L. Die subakute Pansenazidose (SARA) bei Milchkühen in Westdeutschland [Dissertation]. Hannover: TiHo Hannover; 2015.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des Schichtaufbaus der <i>Lamina epithelialis mucosae</i> des Pansens	4
Abb. 2: Darstellung des Schichtaufbaus des <i>Lamina epithelialis mucosae</i> des Pansens anhand eines histologischen Präparats einer Pansenztote	5
Abb. 3: Biopsie der Pansenztoten bei vorgelagertem Pansenepithel durch die geöffnete Pansenfistel (Foto: S. Kreuzer-Redmer)	13
Abb. 4: Beispielhafte Darstellung der Vermessung von Papillen und Epithel	15
Abb. 5: Beispielbilder für unterschiedliche Verhorngungsstadien des Pansenepithels	16
Abb. 6: Beispielbilder für unterschiedliche Pigmentierungsstufen des Pansenepithels	17
Abb. 7: Beispielbild – Neutrophile Granulozyten in den Zotten. Zumeist waren diese Zellen in den Zottenkapillaren lokalisiert	18
Abb. 8: Beispielbild – Ballonzellen	19
Abb. 9: Veränderung der Papillenbreite in µm, gegliedert nach den drei Wochen der Probennahmen während des Versuchs. Die Balken zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung; N = 11	20
Abb. 10: Veränderung der Papillenlänge in µm, gegliedert nach den drei Wochen der Probennahmen während des Versuchs. Die Balken zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung. N = 11	21
Abb. 11: Veränderung der Zottenbreite in µm, gegliedert nach den drei Wochen der Probennahmen während des Versuchs. Die Balken zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung. N = 11	21
Abb. 12: Veränderung der Dicke des Gesamtepithels, gegliedert nach den drei Wochen der Probennahmen während des Versuchs. Die Balken zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung. N = 11	22
Abb. 13: Veränderung der Dicke des <i>Stratum basale</i> , gegliedert nach den drei Wochen der Probennahmen während des Versuchs. Die Balken zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung. N = 11	23
Abb. 14: Veränderung der Dicke von <i>Stratum spinosum</i> und <i>Stratum granulosum</i> , gegliedert nach den drei Wochen der Probennahmen während des Versuchs. Die Balken zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung. N = 11	23
Abb. 15: Veränderung der Dicke des <i>Stratum corneum</i> , gegliedert nach den drei Wochen der Probennahmen während des Versuchs. Die Balken zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung. Es war ein starker Trend hin zu einer Verdickung des <i>Stratum corneum</i> zwischen Woche 2 und 6 ($P=0,064$) bzw. Woche 3 und 6 ($P=0,065$) erkennbar. One Way RM ANOVA, N = 11	24
Abb. 16: Anteil der Präparate, in denen Neutrophile Granulozyten vorhanden waren, gegliedert nach Wochen im Versuch. Die Balken zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung. One Way RM ANOVA, N = 11	25

Abb. 17: Scoring der Verhornung gegliedert nach Wochen der einzelnen Probennahmen. Die Balken zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung. One Way RM ANOVA, *p<0,05, N = 11	25
Abb. 18: Scoring der Pigmentierung gegliedert nach Wochen der einzelnen Probennahmen. Die Balken zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung. One Way RM ANOVA, N = 11	26
Abb. 19: Anteil der Präparate, in welchen Ballonzellen zu finden waren, gegliedert nach Wochen der einzelnen Probennahmen. Die Balken zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung. One Way RM ANOVA, *p<0,05, N = 11	27
Tabelle 1: Parameter zur Analyse der epithelialen Schichten	14
Tabelle 2: Scoring der Verhornung	15
Tabelle 3: Scoring der Pigmentierung	16