

Aus dem Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. J. Pallauf

Ableitung des Selenbedarfs wachsender
Meerschweinchen (*Cavia porcellus*)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. oec. troph.)
am Fachbereich Agrarwissenschaften,
Ökotoxikologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Christine Jensen

Gießen 2008

Dissertation am Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und
Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen

- Dekan: Prof. Dr. Roland Herrmann -

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. A. Evers

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Pallauf

2. Gutachter: Prof. Dr. E. Weigand

Prüfer: Prof. Dr. Dr. W. Optiz von Boberfeld

Prüfer: PD Dr. R. Pätzold

Tag der mündlichen Prüfung: 29. April 2008

Diese Arbeit ist Eddy Motschwiller gewidmet.

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit:

1. JENSEN C., PALLAUF J.: Estimation of the selenium requirement of growing guinea pigs (*Cavia porcellus*). J Anim Physiol Anim Nutr (im Druck), DOI: 10.1111/j.1439-0396.2007.00738.x
2. JENSEN C., PARYS C., BLIND S., PALLAUF J.: Blood parameters in selenium deficient guinea pigs, rabbits and rats. Posterpräsentation: 62. Tagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, 01.-03.04.2008; Göttingen, Proc Soc Nutr Physiol 17, S. 58
3. JENSEN C., PARYS C., PALLAUF J.: Comparison of the influence of selenium deficiency on T₃ and T₄ concentrations in the plasma and type 1 deiodinase activity in the liver of rats and guinea pigs. Posterpräsentation: 15. Symposium der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fachgruppe Physiologie und Biochemie, 19.-21.02.2006, Giessen; Tagungsband, S. 92
4. JENSEN C., PALLAUF J.: Parameters for the selenium requirement of guinea pigs (*Cavia porcellus*). Posterpräsentation: 59. Tagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, 08.-10.03.2005; Stuttgart-Hohenheim; Proc Soc Nutr Physiol 14, S. 119

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abbildungsverzeichnis	IV
III.	Tabellenverzeichnis	V
IV.	Anhangstabellenverzeichnis	VII
V.	Abkürzungsverzeichnis	VIII
1.	Einleitung	1
2.	Literaturübersicht	2
2.1.	Selen	2
2.2.	Selen im tierischen Organismus	3
2.2.1.	Absorption	3
2.2.2.	Verteilung	4
2.2.3.	Stoffwechsel	5
2.2.4.	Bedarf	6
2.2.5.	Bestimmung des Selenstatus	7
2.2.6.	Selenmangel	8
2.2.7.	Toxizität	10
2.3.	Seleneinbau	10
2.4.	Selenoenzyme	12
2.5.	Selenoprotein P	25
2.6.	Genexpression der Selenoproteine	27
2.7.	Glutathion	28
2.8.	Glutathion S-Transferasen und selenunabhängige Glutathionperoxidase	30
2.9.	Glutathionreduktase	35
2.10.	Katalase	36
2.11.	Vitamin E	37
2.12.	Vitamin C	39
3.	Experimenteller Teil	42
3.1.	Zielsetzung und Versuchsplan	42
3.2.	Konzeption des Versuchsfutters	42
3.3.	Versuchstierhaltung	45
3.4.	Probengewinnung	46
3.5.	Material und Methoden	46
3.5.1.	Weender Analyse des Versuchsfutters	46
3.5.2.	Bruttoenergie des Versuchsfutters	47
3.5.3.	Selenkonzentration des Versuchsfutters und ausgewählter Gewebe	47
3.5.4.	Mineralstoffkonzentrationen im Versuchsfutter	48
3.5.5.	Vitamin E-Konzentrationen in Versuchsfutter und Plasma	48
3.5.6.	Vitamin C-Konzentrationen im Versuchsfutter	49
3.5.7.	Hämoglobin-Konzentration und Hämatokritwert	50
3.5.8.	Aufarbeitung der Gewebeproben für die Enzymanalyse	50

3.5.9.	Selenoenzyme	50
3.5.10.	Glutathion S-Transferase	57
3.5.11.	Glutathionreduktase.....	58
3.5.12.	Reduziertes und oxidiertes Glutathion	59
3.5.13.	Katalase	60
3.5.14.	Triiodthyronin- und Thyroxinkonzentrationen im Plasma	62
3.5.15.	Proteinbestimmung in Plasma und Gewebehomogenaten	62
3.5.16.	Vitamin C-Konzentrationen im Plasma.....	62
3.5.17.	Thiobarbitursäurereaktive Substanzen in der Leber	63
3.6.	Statistische Auswertung	64
4.	Ergebnisse.....	66
4.1.	Weender Analyse und Bruttoenergiegehalt des Versuchsfutters.....	66
4.2.	Selen-, Vitamin E- und Vitamin C-Konzentration im Versuchsfutter.....	66
4.3.	Ausgewählte Mineralstoffkonzentrationen im Versuchsfutter	68
4.4.	Gewichtsentwicklung und Futteraufnahme	69
4.5.	Hämoglobin-Konzentration und Hämatokritwert	71
4.6.	Selenkonzentrationen in Plasma, Lysat, Leber und Testes	72
4.7.	Vitamin E-Konzentrationen im Plasma.....	74
4.8.	Selenoenzyme.....	74
4.8.1.	Glutathionperoxidasen.....	74
4.8.2.	Phospholipidhydroperoxid-reduzierende Aktivität	75
4.8.3.	Thioredoxinreduktase	77
4.8.4.	Deiodinasen	78
4.9.	Gesamt-GPx und selenunabhängige GPx.....	78
4.10.	Glutathion S-Transferase	80
4.11.	Glutathionreduktase	81
4.12.	Reduziertes und oxidiertes Glutathion	82
4.13.	Katalase.....	83
4.14.	Triiodthyronin- und Thyroxinkonzentrationen im Plasma	84
4.15.	Vitamin C-Konzentrationen im Plasma	85
4.16.	Thiobarbitursäurereaktive Substanzen (TBA-RS) in der Leber.....	86
4.17.	Broken-Line-Analyse	87
5.	Diskussion.....	89
5.1.	Einfluss unterschiedlicher Selenzulagen auf die zootechnischen Parameter.....	89
5.2.	Hämoglobin-Konzentration und Hämatokritwert	90
5.3.	Selenkonzentrationen in ausgewählten Organen und in Plasma und Lysat	91
5.4.	Selenoenzyme.....	93
5.5.	Glutathion S-Transferase, Gesamt-GPx und selenunabhängige GPx.....	100

5.6.	Glutathionreduktase.....	102
5.7.	Glutathion.....	103
5.8.	Katalase	104
5.9.	Vitamin E und Vitamin C-Konzentrationen im Plasma.....	105
5.10.	Thiobarbitursäurereaktive Substanzen (TBA-RS).....	106
5.11.	Bedarfsableitung.....	106
6.	Schlussfolgerung	109
	Zusammenfassung.....	111
	Literaturverzeichnis	115
	Anhang	143

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Reaktionsschema der Glutathionperoxidasen	12
Abbildung 2:	Die Synthese von T_3 , rT_3 und $3,3'$ - T_2 aus T_4	18
Abbildung 3:	Synthese der Desoxyribonucleotide unter Beteiligung des Trx-TrxR-Systems bei <i>E. coli</i>	22
Abbildung 4:	Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-Cysteinylglycin)	29
Abbildung 5:	Bildung und Abbau der Glutathion-S-Konjugate in der Leber.....	33
Abbildung 6:	Vitamin E-Recycling über die Ascorbinsäure und deren Regeneration über den Glutathionstoffwechsel	38
Abbildung 7:	Umwandlung der Ascorbinsäure in Dehydroascorbinsäure.....	40
Abbildung 8:	L-Ascorbinsäuremonophosphat	44
Abbildung 9:	Recycling des von der GPx oxidierten GSH über die Glutathionreduktase	51
Abbildung 10:	Eichkurve zur Qualitätskontrolle der hergestellten Phosphatidylcholinhydroperoxide.....	53
Abbildung 11:	Irreversible Hemmung des Selenoenzyms durch Carboxymethylierung mit Iodacetat bei $pH \leq 7,0$	54
Abbildung 12:	Die dem TrxR-Assay zugrunde liegende DTNB-Spaltung.....	55
Abbildung 13:	Umsetzung von T_4 zu T_3 durch die D1 im Leberhomogenat.....	57
Abbildung 14:	Die dem GST-Assay zugrunde liegende GSH-Konjugation mit CDNB.....	58
Abbildung 15:	Reaktionsprinzip der peroxidativen Katalaseaktivitätsbestimmung	60
Abbildung 16:	Überprüfung der Methode zur Bestimmung der peroxidativen Katalaseaktivität im Leberhomogenat des Meerschweinchens.....	61
Abbildung 17:	Broken line model als 2-Steigungen-Modell.....	65
Abbildung 18:	Graphische Darstellung der Broken-Line-Analyse bei den Parametern TrxR in der Niere und cGPx-Aktivitäten in Hämolysat und Herz	88
Abbildung 19:	Lebendmasseentwicklung der Meerschweinchen während einer zehn wöchigen Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage	89
Abbildung 20:	Prozentualer Anteil der non-SeGPx an der Gesamt-GPx-Aktivität in Leber und Niere	101
Abbildung 21:	Tägliche Selenaufnahme der Tiere in der zehnten Versuchswoche bezogen auf kg LM	107

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Ernährungsphysiologisch bedeutsame Selenverbindungen und ihre Oxidationsstufen.....	2
Tabelle 2:	Empfehlungen zur Selenzufuhr bei unterschiedlichen Tierarten	7
Tabelle 3:	Selenzulagen zum selenarmen Basismischfuttermittel und Einteilung der Versuchsgruppen	42
Tabelle 4:	Zusammensetzung des selenarmen Basismischfuttermittels.....	43
Tabelle 5:	Assay zur Bestimmung der GPx-Aktivität	52
Tabelle 6:	Assay zur Bestimmung der TrxR-Aktivität.....	55
Tabelle 7:	Assay zur Bestimmung der DI-Aktivität	56
Tabelle 8:	Assay zur Bestimmung der GR-Aktivität	59
Tabelle 9:	Assay zur Bestimmung der Glutathionkonzentration	60
Tabelle 10:	Assay zur Bestimmung der peroxidativen Katalaseaktivität	61
Tabelle 11:	Trockenmasse, Roh Nährstoffgehalt und Bruttoenergiegehalt des Versuchsfutters.....	66
Tabelle 12:	Ergebnisse der Selen-, Vitamin E- und Vitamin C-Analysen des Versuchsfutters.....	67
Tabelle 13:	Selenkonzentrationen im Versuchsfutter des Züchtereunternehmens, sowie im verabreichten Stroh und in Heu	68
Tabelle 14:	Analysierte Mineralstoffkonzentrationen im Versuchsfutter und in Heu bzw. Stroh	68
Tabelle 15:	Durchschnittliche Futteraufnahme pro Tier und Tag während der zehnwöchigen Versuchsperiode	69
Tabelle 16:	Gewichtsentwicklung der Meerschweinchen innerhalb der Versuchsgruppen während der zehnwöchigen Versuchsperiode.....	70
Tabelle 17:	Durchschnittliche Futterverwertung während der zehnwöchigen Versuchsperiode	70
Tabelle 18:	Hämatokritwert und Hämoglobinkonzentration der Meerschweinchen nach zehnwöchigem Fütterungsversuch mit unterschiedlichen Selenzulagen.....	71
Tabelle 19:	Selenkonzentrationen im Blut des Meerschweinchens nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Se-Zulage	72
Tabelle 20:	Selenkonzentrationen in Leber, Testes, Gehirn, Muskel und Milz der Meerschweinchen zu Versuchsbeginn und nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage	73
Tabelle 21:	Vitamin E-Konzentrationen im Plasma der Meerschweinchen zu Versuchsbeginn und nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage	74
Tabelle 22:	SeGpx-Aktivität in den Organen der Meerschweinchen zu Versuchsbeginn und nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage im Futter	75
Tabelle 23:	PCOOH-reduzierende Aktivität in den Organen der Meerschweinchen nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage im Futter	76

Tabelle 24:	TrxR-Aktivität in den Organen der Meerschweinchen nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Se-Zulage im Futter.....	77
Tabelle 25:	D1-Aktivität im Leberhomogenat des Meerschweinchens nach zehnwöchigem Fütterungsversuch mit unterschiedlichen Selenzulagen.....	78
Tabelle 26:	Gesamt- und non-SeGPx-Aktivität in den Organen der Meerschweinchen nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Se-Zulage.....	79
Tabelle 27:	GST-Aktivität in den Organen der Meerschweinchen nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage im Futter	80
Tabelle 28:	Glutathionreduktase-Aktivität in Leber und Niere der Meerschweinchen nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage	81
Tabelle 29:	Gesamt-Glutathion, reduziertes Glutathion, oxidiertes Glutathion und das Verhältnis zwischen GSH und GSSG in der Leber der Meerschweinchen nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage	82
Tabelle 30:	Peroxidative Katalaseaktivität [U/mg] im Leberhomogenat der Meerschweinchen nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage.....	83
Tabelle 31:	Schilddrüsenhormonkonzentrationen und deren Verhältnis zueinander im Plasma der Meerschweinchen nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage.....	84
Tabelle 32:	Vitamin C-Konzentration im Plasma der Meerschweinchen nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage.....	85
Tabelle 33:	TBA-RS-Konzentration in der Leber der Meerschweinchen nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage.....	86
Tabelle 34:	Bedarfsableitung über die Auswertung der Parameter cGPx in Herz und Hämolyolat und TrxR in der Niere mit dem <i>broken line model</i>	87

IV. Anhangstabellenverzeichnis

Anhangstabelle 1: Gewichtsentwicklung der einzelnen Meerschweinchen innerhalb der Versuchsgruppen.....	143
Anhangstabelle 2: Hämoglobinkonzentrationen und Hämatokritwerte im Vollblut.....	144
Anhangstabelle 3: Selenkonzentrationen [$\mu\text{g}/\text{kg}$] in ausgewählten Geweben der Meerschweinchen.....	145
Anhangstabelle 4: cGPx-Aktivität in Niere, Leber, Lysat, Plasma, Herz und Lunge.....	146
Anhangstabelle 5: PCOOH-reduzierende Aktivität in Niere, Leber, Herz, Testes und Gehirn.....	147
Anhangstabelle 6: TrxR-Aktivität in Niere, Leber und Herz der Meerschweinchen.....	148
Anhangstabelle 7: Deiodinaseaktivität [$\text{fmol T}_3/\text{min}/\text{mg Protein}$] in der Leber, T_4 - und T_3 -Konzentrationen [nmol/L] und $\text{T}_4:\text{T}_3$ -Verhältnis im Plasma.....	149
Anhangstabelle 8: GST-, non-SeGPx, Gesamt-GPx-Aktivität und der prozentuale Anteil der non-SeGPx an der Gesamt-GPx-Aktivität in der Leber.....	150
Anhangstabelle 9: GST-, non-SeGPx, Gesamt-GPx-Aktivität und der prozentuale Anteil der non-SeGPx an der Gesamt-GPx-Aktivität in der Niere.....	151
Anhangstabelle 10: GR-Aktivität in Leber und Niere der Meerschweinchen.....	152
Anhangstabelle 11: Gesamt-GSH, oxidiertes und reduziertes GSH und GSH:GSSG-Verhältnis in der Leber der Meerschweinchen.....	153
Anhangstabelle 12: Vitamin E- und Vitamin C-Konzentrationen im Plasma des Meerschweinchens.....	154
Anhangstabelle 13: Thiobarbitursäurereaktive Substanzen und peroxidative Katalaseaktivität im Leberhomogenat der Meerschweinchen.....	155

V. Abkürzungsverzeichnis

AA	Ascorbinsäure
AAS	Atomabsorptionsspektrometer
ANZCCART	Australian & New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching
BSA	bovine serum albumin
BHT	Butylhydroxytoluol
CDNB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzol
CuOOH	Cumolhydroperoxid
D1, D2, D3	Deiodinase Typ I, Typ II, Typ III
DHA	Dehydroascorbinsäure
DTNB	5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FM	Futtermittel
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GST	Glutathion S-Transferase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
ICP-AES	Induktiv gekoppelte Plasma-Atom-Emissionsspektrometrie
LM	Lebendmasse
LOAEL	low adverse effect level
LOOH	Lipidhydroperoxid
mPHGPx	mitochondriale PHGPx
MWCO	molecular weight cut off
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Non-SeGPx	selenunabhängige Glutathionperoxidase
NRC	National Research Council
PBS	Phosphate-buffered saline
PCOOH	Phosphatidylcholinhydroperoxid
PHGPx	Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase

PTU	6-n-Propyl-2-Thiouracil
RDA	Recommended Dietary Allowances
SBP2	SECIS-Bindungsprotein 2
SECIS	selenocysteine insertion sequence
SeCys	Selenocystein
SeIP	Selenoprotein P
SLA/LP	soluble liver antigen/liver protein
SPS1	Selenophosphatsynthetase 1
SPS2	Selenophosphatsynthetase 2
snPHGPx	sperm nuclei PHGPx
TBA-RS	Thiobarbitursäurereaktive Substanzen
TNB	Thionitrobenzoesäure
T ₃	3,5,3'-Triiodthyronin
T ₄	Thyroxin
tAA	Gesamt-Ascorbinsäure
TGR	Thioredoxin/Glutathion Reduktase
TR	Thyroidhormonrezeptor
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktase
UTR	untranslatierte Region
VDLUFA	Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

Die Bedeutung des Selens in der Ernährung hat im letzten Jahrhundert eine enorme Wandlung durchgemacht. Vor der Entdeckung seiner Essentialität galt das Element als hoch toxisch und kanzerogen. Inzwischen sind zahlreiche Funktionen des Selens als Bestandteil von Selenoproteinen im Säugetierorganismus nachgewiesen worden. Bis dato werden weitere Selenoproteine entdeckt, deren Funktion teilweise noch ungeklärt ist. Als integraler Bestandteil von Enzymen spielt Selen vor allem im antioxidativen Stoffwechsel eine Rolle. Das Meerschweinchen ist das Modelltier mit der besten Vergleichbarkeit zum Menschen bzgl. des antioxidativen Stoffwechsels, da es ebenfalls kein Vitamin C synthetisieren kann. Der Selenbedarf dieser Tierart wurde in der Vergangenheit jedoch nie ermittelt. Vielmehr wird er bis heute vom Bedarf der Ratte abgeleitet (NRC 1995) und mit 0,15 mg/kg FM für wachsende und adulte Tiere angegeben. Vergleichbar sind beide Tierarten im Hinblick auf ihren antioxidativen Stoffwechsel jedoch nicht. Zum einen ist hier die bereits erwähnte Unfähigkeit des Meerschweinchens, Vitamin C selbst zu synthetisieren, zu nennen, zum anderen unterscheiden sich aber auch andere Teile des antioxidativen Schutzsystems erheblich voneinander. So hat das Meerschweinchen eine sehr hohe Katalaseaktivität. Das Ferroenzym ist neben den Peroxisomen zusätzlich in Zytoplasma und Zellkern lokalisiert (ROELS 1976a, YAMAMOTO *et al.* 1988). Des Weiteren weist diese Tierart eine sehr viel höhere Glutathion *S*-Transferase-Aktivität als die Ratte auf (OSHINO *et al.* 1990). Dies führt zu einer erheblich höheren selenunabhängigen Glutathionperoxidase-Aktivität. Die selenabhängige Glutathionperoxidase ist dagegen als Protein kaum vorhanden, obwohl das Gen existiert und transkribiert wird (HIMENO *et al.* 1993b). Daher wurde in der Vergangenheit angenommen, dass Katalase und Glutathion *S*-Transferase die natürlicherweise geringe Glutathionperoxidase-Aktivität beim Meerschweinchen kompensieren (HIMENO *et al.* 1993a). Über das Verhalten der Selenoproteine der Ratte während eines Selenmangels ist viel geforscht worden, während Selenmangelstudien zum Meerschweinchen eher überschaubar sind. Dass die Verhältnisse bzgl. Stoffwechsel und somit möglicherweise auch Selenbedarf anders sind, ist zu erwarten. Aus diesem Grund war es das Ziel vorliegender Arbeit, den Selenbedarf des Meerschweinchens zu bestimmen.

2. Literaturübersicht

2.1. Selen

Selen wurde 1817 vom schwedischen Chemiker Jons Jacob Berzelius entdeckt. Da dieses Element ähnliche Eigenschaften wie Tellur aufwies, welches nach dem lateinischen Wort für Mond benannt wurde, wählte Berzelius die Bezeichnung Selen, abgeleitet aus dem Namen der griechischen Göttin des Mondes *Selene*. Selen steht im Periodensystem der Elemente in der Hauptgruppe VI und besitzt folgende weitere Eigenschaften:

Ordnungszahl:	34
Atommasse [u]	78,96*
Schmelztemperatur [°C]	217*
Siedetemperatur [°C]	685*
Dichte [g/cm ³]	4,79
Elektronegativität	2,4
* gerundet	

Tabelle 1: Ernährungsphysiologisch bedeutsame Selenverbindungen und ihre Oxidationsstufen

Oxidationsstufe	Verbindungsname	Molekül
-II	Selenid	Se ²⁻
	Selenocystein	SeCys
	Selenomethionin	SeMet
	Dimethylselenid	(CH ₃) ₂ Se
	Trimethylselenoniumion	(CH ₃) ₃ Se ⁺
0	Selen	Se
	Selenodiglutathion	GSSeSG
+IV	Selenit	SeO ₃ ²⁻
	Selenige Säure	H ₂ SeO ₃
+VI	Selenat	SeO ₄ ²⁻
	Selensäure	H ₂ SeO ₄

Die Essentialität des Selens als integraler Bestandteil des Faktors 3 wurde von SCHWARZ und FOLTZ erst 1957 beschrieben. In pflanzlicher Kost liegt Selen hauptsächlich als Selenomethionin oder Se-Methylselenocystein vor (FINLEY 2005). Selenocystein, das integraler Bestandteil der Selenoenzyme ist, kommt neben

Selenomethionin vorwiegend als Selenverbindung in tierischen Produkten vor (THOMSON 1998).

2.2. Selen im tierischen Organismus

2.2.1. Absorption

Selenat wird bei Ratten hauptsächlich im Ileum absorbiert. Es handelt sich dabei um einen aktiven Transportmechanismus gegen ein Konzentrationsgefälle. Zwei Transportwege scheinen für Selenat, wie auch für Sulfat, durch die Mukosa zu führen: einerseits ein Na⁺-Cotransport, andererseits ein Austausch gegen OH⁻-Ionen. Selenatkonzentrationen von 1 mM haben einen toxischen Effekt auf die intestinale Mukosa (ARDÜSER *et al.* 1985, WOLFFRAM *et al.* 1985, WOLFFRAM *et al.* 1988, VENDELAND *et al.* 1992a).

Die Absorptionsrate und -geschwindigkeit von Selenit im Ileum von Ratten ist signifikant niedriger als die von Selenat. Die Aufnahme erfolgt durch Diffusion (ARDÜSER *et al.* 1985, WOLFFRAM *et al.* 1985, MYKKANEN und WASSERMAN 1989, VENDELAND *et al.* 1992a). Im Darmlumen und auch in den Enterozyten reagiert Selenit mit Glutathion und anderen Thiolen. Diese können dann nach Spaltung zu Dipeptiden oder Aminosäuren aus dem Lumen in die Enterozyten aufgenommen werden (ANUNDI *et al.* 1984, SENN *et al.* 1992). VENDELAND *et al.* (1992b) fanden heraus, dass die Selenitabsorption durch die Bildung von Selenotrisulfiden erheblich begünstigt wird.

Verabreicht man Probanden hohe orale Selenat- bzw. Selenitdosen, lässt sich beobachten, dass Selen aus Selenat schneller und in höherer Menge als Selen aus Selenit über den Urin ausgeschieden wird. Selenit wird wohl auf Grund der unterschiedlichen Absorptionsmechanismen nur unvollständig aufgenommen und zu ca. 40-45 % über den Kot ausgeschieden. Die scheinbare Absorptionsrate von Selenat liegt bei mehr als 90 %, die von Selenit nur bei ca. 60 % (THOMSON und ROBINSON 1986). Es gibt Hinweise darauf, dass eine gleichzeitige Aufnahme von Selenit und 1 mg Vitamin C die Absorption des Selens erheblich reduziert (ROBINSON *et al.* 1985). Dies könnte daran liegen, dass Selenit durch Ascorbinsäure zügig zu elementarem Selen reduziert wird (GANTHER 1979). Elementares Selen ist schlecht löslich und wird nur mäßig absorbiert (WRIGHT und BELL 1966, GANTHER 1984).

Die Aufnahme von Selenat, Selenit und Selenomethionin geschieht unabhängig vom Selenstatus, unterliegt also keiner Homöostase (VENDELAND *et al.* 1992a).

Die Absorption von Selenomethionin geschieht mit hoher Geschwindigkeit zu gleichen Anteilen in allen drei Abschnitten des Dünndarms (VENDELAND *et al.* 1992a). Der Transport durch die Mucosa findet gegen ein Konzentrationsgefälle statt und ist durch Methionin hemmbar (McCONNELL und CHO 1965). Selenomethionin und Methionin nutzen das gleiche Transportsystem (McCONNELL und CHO 1967, WOLFFRAM *et al.* 1989). Es handelt sich dabei um einen Na⁺-abhängigen Transporter für basische Aminosäuren (WOLFFRAM *et al.* 1989).

Selenocystein und Cystein (bzw. Selenocystin und Cystin) konkurrieren ebenfalls um einen gemeinsamen Transportmechanismus. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um den Carrier für basische Aminosäuren. Dieser Transport wird durch Arginin und Lysin kompetitiv gehemmt (WOLFFRAM und SCHARRER 1988, WOLFFRAM 2000).

2.2.2. Verteilung

Nach der Absorption gelangt das Selen, je nach Verbindung, in unterschiedlichen Formen in den Blutkreislauf. Selenomethionin wird nur zu ca. 7 % an Proteine gebunden transportiert. Auch Selenat unterliegt wohl keinen großen Reaktionen in den Mukosazellen. Es werden etwa 89 % intakt als Selenat und nur etwa 9 % an Proteine gebunden im Efflux angetroffen. Vom aufgenommenen Selenit werden nur etwa 14 % als solches durch die Mukosa transportiert. Der Rest findet sich als an Proteine gebundenes Selen (38 %), Cys-Se-Cys (10 %), Cys-Se-SG (14 %), GS-Se-SG (8 %) und in undefinierten Verbindungen (ca. 14 %) wieder (WHANGER *et al.* 1996). Selenit kann durch einen Anionenaustauscher in die Erythrozyten aufgenommen werden (SUZUKI *et al.* 1998), wo es offenbar ebenfalls Selenotrisulfide in der Reaktion mit GSH oder den Thiolgruppen des Globins bildet (JENKINS und HIDIROGLOU 1972). Selenotrisulfide binden sehr spezifisch an die reaktiven Thiolgruppen der β - und β' -Untereinheiten des Hämoglobins des Menschen (HARATAKE *et al.* 2005). Über die weiteren Reaktionen der unterschiedlichen Selenverbindungen in den Enterozyten und ihre Form, in der sie zur Leber transportiert werden, ist wenig bekannt. Im Plasma ist Selen an Albumin, in den Zellen auch an ein Selenbindungsprotein (SeBP) gebunden (SANI *et al.* 1988).

Bei Ratten ist das Gesamtselen im Körper prozentual am meisten auf Leber und Muskel verteilt, gefolgt von Plasma, Erythrozyten, Niere und Skelett. Etwa 80 % der gesamten Glutathionperoxidase-Aktivität (GPx) bei der Ratte ist in den Erythrozyten und der Leber vereint. In den Hoden, die den höchsten Selengehalt in der

Trockenmasse aufweisen, ist nur weniger als ein Prozent dieses Elements mit der cGPx assoziiert (BEHNE und WOLTERS 1983). In der Leber adäquat versorgter Ratten konnten 75 % des Selen der klassischen GPx (cGPx) zugeschrieben werden (WEISS SACHDEV und SUNDE 2001).

Bei Meerschweinchen, die über acht Wochen eine Basisdiät mit 0,7 mg Se/kg FM erhielten, konnte in der Selenoprotein P-Fraktion des Blutes die höchste Selenkonzentration gemessen werden, gefolgt von der Albumin- und der GPx-Fraktion. Bei der prozentualen Verteilung innerhalb der Plasmafraktionen entfiel das meiste Selen ebenfalls auf die Selenoprotein P-Fraktion, gefolgt von Albumin und GPx auf etwa gleicher Höhe. Die Konzentrationen in den untersuchten Organen auf Basis der Trockenmasse waren:

Leber > Niere >> Hoden = Herz > Milz > Gehirn > Muskel (Gu *et al.* 1998)

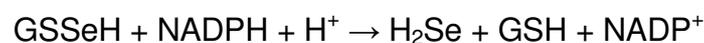
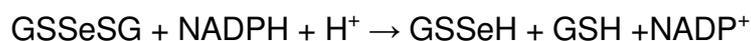
Beim Menschen wurde festgestellt, dass die Verabreichung von Selenomethionin und der daraus resultierende unspezifische Einbau des Selen in Proteine einen Selenpool bildet, der bei knapper Selenversorgung metabolisiert werden kann. Dies ist bei anorganischen Selenverbindungen nicht der Fall, allerdings wird die Aufnahme organischer Selenverbindungen wegen einer möglichen Anreicherung im Organismus diskutiert (LEVANDER *et al.* 1983).

2.2.3. Stoffwechsel

Selenit (+IV) wird in drei Reaktionsschritten zu Selenid (-II) reduziert. Das erste stabile Produkt ist Selenodiglutathion (GSSeSG). Es entsteht aus der Reaktion mit Glutathion; alternativ können auch Cystein, Coenzym A oder 2-Mercaptoethanol reagieren:



Das Selenodiglutathion wird durch die Glutathionreduktase (GR) zum labilen Selenosupersulfid und in einem weiteren Schritt zu H₂Se reduziert.



Die GR-vermittelten Reaktionen finden auch nichtenzymatisch mit einem Überschuss an GSH statt, wenn auch erheblich langsamer (GANTHER 1968, HSIEH und GANTHER

1975). Eine Reaktion zum elementaren Selen und GSH durch die GR ist ebenfalls möglich (GANTHER 1971). Selenocystein wird durch eine spezifische pyridoxalphosphatabhängige Selenocystein- β -Lyase quantitativ in H_2Se (Selenid) und Alanin gespalten (ESAKI *et al.* 1982). Ein zytosolisches, ebenfalls pyridoxalphosphatabhängiges Enzym, das Selenomethionin durch eine α,γ -Eliminierungsreaktion zu CH_3SeH umwandelt, wurde in zahlreichen Geweben der Maus gefunden (OKUNO *et al.* 2005).

Im Bereich nutritiver bis subtoxischer Dosen wird Selenit als Selenozucker ausgeschieden. GSSeH reagiert vermutlich mit *N*-Acetyl-D-Galactosamin. Die reaktive Selenolgruppe wird so durch GSH geschützt. Durch eine Methyltransferasereaktion entsteht 1 β -Methylseleno-*N*-Acetyl-D-Galactosamin, das auf Grund der guten Wasserlöslichkeit über den Urin ausgeschieden werden kann (KOBAYASHI *et al.* 2002). Des Weiteren findet sich im Urin das Trimethylselenoniumion ($(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$) als reguläres Ausscheidungsprodukt organischer und anorganischer Selenquellen (PALMER *et al.* 1969, 1970). Eine Entgiftung größerer Mengen Selens findet durch eine Methylierung zum flüchtigen Dimethylselenid ($(\text{CH}_3)_2\text{Se}$) statt, das im Atem identifiziert werden konnte (MCCONNELL und PORTMAN 1952). Der Methylgruppendonor für diese Methyltransferasereaktion ist offenbar *S*-Adenosylmethionin (GANTHER 1966). Im Bereich toxischer Dosen steigt die Transmethylierungsrate in der Leber an. Es ist nicht bekannt, inwieweit dies auf Kosten anderer Stoffwechselfvorgänge wie z. B. die Protein- oder Phospholipidsynthese geht (STERNBERG *et al.* 1968).

Da auch Selenat zu Dimethylselenid und anderen Selenverbindungen reduziert wird, wird ein Reaktionsweg vermutet, der dem in Pflanzen und Hefen ähnelt. Selenat wird hierbei zunächst mit ATP, Mg^{2+} und einer Sulfurylase aktiviert. Das entstandene Adenosin-5'-Selenophosphat wird durch ein Thiol (z. B. GSH) zur thioselenigen Säure (GSSeO_3^-) und mit einem weiteren Thiol zu Selenit gespalten (GANTHER 1984). Selenat wird im Organismus außerdem durch das Glutaredoxin- und das Thioredoxin/Thioredoxinreduktase-System (Trx/TrxR-System) GSH-abhängig reduziert. Selenit kann direkt durch die TrxR NADPH-abhängig zu Selenid reduziert werden (BJÖRNSTEDT *et al.* 1997).

2.2.4. Bedarf

Der minimale Bedarf des Menschen wird auf 40 μg pro Tag geschätzt. Bei der Aufnahme von nur 11 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ kommt es definitiv zu Mangelerscheinungen (WHANGER

et al. 1996). Der vom NRC regelmäßig veröffentlichte Bedarf für die verschiedenen Tierarten ist relativ unterschiedlich. Dies hängt auch vom Studiendesign und den für die Ableitung ausschlaggebenden Parametern ab.

Tabelle 2: Empfehlungen zur Selenzufuhr bei unterschiedlichen Tierarten

Tierart	Selen [mg/kg FM]			Quelle
	Wachstum	Erhaltung	Reproduktion	
Ratte (NRC)	0,15	0,15	0,40	NRC 1995 ¹
(AIN-93)	0,18	0,17	0,18	Reeves <i>et al.</i> 1993
Hamster	0,10			NRC 1995
Hund	0,21-0,35	0,35	0,35	NRC 2006
Katze	0,12-0,30	0,30	0,30	
Schwein	0,3-0,15	0,15	0,15	NRC 1998
Fleischrind	0,10	0,10	0,10	NRC 2000
Milchrind ²	0,35-0,40	0,35-0,40	0,35-0,40	NRC 2001
Schaf	0,10-0,20 ²	0,10-0,20 ²	0,10-0,20 ²	NRC 1985
Masthähnchen	0,15			NRC 1994
Legehennen	0,14-0,10		0,08-0,05	
Pute	0,20	0,20	0,20	
Ente	0,20			
Wachtel	0,20		0,20	
Affen	0,11-0,3	0,11		NRC 2003
Mensch ³ [µg/Tag]	5-60	30-70	30-70	DGE 2000

¹Vom Bedarf der Ratte abgeleitet: Maus, Meerschweinchen, Gerbil, Wühlmaus

²Auf Trockenmassebasis

³Schätzwerte für eine angemessene Zufuhr

Das Kaninchen hatte in den zuletzt für diese Tierart veröffentlichten Unterlagen keinen Selenbedarf (NRC 1977), was inzwischen widerlegt ist (TURAN *et al.* 1997, MÜLLER und PALLAUF 2002). Die AIN-93 ist eine Empfehlung zur Diätzusammenstellung für Nager, orientiert sich jedoch am Bedarf von Ratten und Mäusen (REEVES *et al.* 1993).

2.2.5. Bestimmung des Selenstatus

Die Bestimmung der Langzeitversorgung mit Selen über nicht invasiv gewonnene Medien wie Haare oder Nägel ist unzureichend. Die Selenkonzentration in diesen Proben wird nicht nur durch die chemische Form des zugeführten Selens bestimmt, sondern auch über andere Faktoren wie beispielsweise die Methioninversorgung (SALBE und LEVANDER 1990). Auch Blut ist als Medium zur Bestimmung des Selenstatus beim Menschen ungeeignet, weil das Gros des Selens eher mit

Hämoglobin assoziiert und nicht in funktionelle Selenoproteine eingebaut ist (BEILSTEIN und WHANGER 1983).

Die World Health Organisation (WHO) geht beim Menschen davon aus, dass eine Maximierung der GPx-Aktivität in den Erythrozyten, wie oftmals angestrebt, gar nicht nötig ist, da die Fähigkeit H_2O_2 zu entgiften erst bei einem Viertel der maximalen Aktivität nachlässt. Vielmehr reichen zwei Drittel der Maximalaktivität aus, um eine ausreichende Entgiftung zu gewährleisten (WHO 1996). Idealerweise sollten drei robuste und gut zugängliche Parameter zur Statusbestimmung erhoben werden, wie beispielsweise Plasmaselenkonzentration, thrombozytäre GPx-Aktivität und die Schilddrüsenhormonkonzentrationen. Dies gewährleistet eine individuellere Statusbestimmung und spiegelt die vielfältigen Funktionen des Selens im Organismus wieder (CREWS *et al.* 2001).

2.2.6. Selenmangel

Die Zahl der meerschweinchenspezifischen Selenmangelstudien ist begrenzt. Ein Interesse entstand erst, als man entdeckte, dass die SeGpx beim Meerschweinchen nicht oder nur in geringem Umfang messbar war (TAPPEL *et al.* 1982). Die erste Studie beschäftigte sich demnach auch mit dem Einfluss des Selens auf die Gpx-Aktivität in Leber und Erythrozyten des Meerschweinchens (BURK *et al.* 1981). CAMMACK *et al.* (1995) untersuchten den Einfluss eines Selenmangels auf die Deiodinasen. Eine weitere Studie zum Selenmangel des Meerschweinchens stammt von HILL *et al.* (2001) und führte zu Myopathien als Folge eines kombinierten Selen- und Vitamin E-Mangels. Der Einfluss unterschiedlicher Selenzulagen auf das antioxidative Schutzsystem des Meerschweinchens wurde bislang nicht erforscht. Der Selenbedarf wurde von dem der Ratte abgeleitet (NRC 1995).

Zusammenfassend dargestellt verursacht ein Selenmangel beim wachsenden Meerschweinchen einen Abfall der SeGpx- und der Deiodinase-Aktivität; die Gewichtsentwicklung war lediglich in der Studie von CAMMACK *et al.* (1995) negativ beeinflusst, andere Autoren (BURK *et al.* 1981, TAPPEL *et al.* 1982) konnten dies nicht beobachten. Weitere Parameteränderungen sind wahrscheinlich, jedoch nicht untersucht.

Beim Menschen kommen zwei Selenmangelerkrankungen vor, Keshan- und Kashin-Beck-Krankheit. Die Keshan-Krankheit bezeichnet eine endemische Kardiomyopathie,

die in Selenmangelregionen Chinas auftritt. Dilatation, Nekrosen und fibrotische Veränderungen des Myokards sind die häufigsten pathologischen Befunde. Die Kashin-Beck-Krankheit ist eine endemische Osteoarthropathie, die sich durch Müdigkeit, Gelenksteifigkeit und -schmerzen auszeichnet. Pathologisch ist die Erkrankung gekennzeichnet durch degenerative und nekrotische Veränderungen der Gelenke und Gelenkknorpel in Armen und Beinen (GE und YANG 1993).

Bei der Ratte konnte beobachtet werden, dass die hepatische cGPx-Aktivität der empfindlichste Parameter für den Selenmangel ist, gefolgt von pGPx, Plasmaglutathionkonzentration und hepatischer GST-Aktivität. Die Autoren nahmen eine Klassifizierung des Selenmangels vor (HILL *et al.* 1987):

- Schwacher Mangel: cGPx in der Leber fällt auf $\geq 5\%$ der Aktivität der Kontrolltiere
- Mittlerer Mangel: cGPx in der Leber fällt auf $\leq 5\%$ der Aktivität der Kontrolltiere bei unveränderter Plasmaglutathionkonzentration und hepatischer GST-Aktivität
- Schwerer Mangel: Plasmaglutathionkonzentration und/oder Leber-GST-Aktivität steigen zusätzlich zum Abfall der cGPx-Aktivität in der Leber an

Symptomatisch wird der Selenmangel meist erst ab der zweiten Generation, bei der verringertes Wachstum, Katarakt, schütteres Fell und eine verringerte Spermienmotilität beobachtet werden können (COMBS und COMBS 1986, S. 265ff.).

Bei anderen Tierarten treten Mangelsymptome hauptsächlich während der Wachstumsphase auf und dies meist im Zusammenhang mit einer unzureichenden Vitamin E-Zufuhr. Die Krankheitsbilder heißen beim Schwein Maulbeerherzkrankheit, beim Geflügel exsudative Diathese und führen bei allen Tieren zur nutritiven Muskeldystrophie. Diese Bezeichnungen lassen bereits auf die involvierten Gewebe und deren Veränderungen schließen. Aufgrund der Funktionen des Selen im Organismus lassen sich die Symptome gut ableiten. Dystrophien an Skelett- und Herzmuskulatur, die von einer Myoglobinurie begleitet werden, führen zu Bewegungsunlust und -störungen, Schwäche bis hin zum Festliegen und Herz- und Atembeschwerden, die unbehandelt zum Tod führen. Fruchtbarkeitsstörungen, Aborte und Wachstumsdepressionen sind die vorherrschenden Symptome in der Tierproduktion. Bei Heimtieren tritt ein manifester Selenmangel sehr selten auf, lässt

sich aber unter Laborbedingungen erzeugen (ROSSOW und BOLDUAN 1994, S. 143f.). In Selenmangelgebieten kann eine Prävention durch Futterzusätze und prophylaktische Injektionen erfolgen.

2.2.7. Toxizität

Eine subakute Selenose wird bei landwirtschaftlichen Nutztieren nach der Aufnahme selenakkumulierender Pflanzen oder verunreinigten Trinkwassers beobachtet und ist durch neurologische und respiratorische Symptome gekennzeichnet. Während hier Selenkonzentrationen im Blut von 4 mg/kg beobachtet werden, liegen die Konzentration bei einer chronischen Selenose zwischen 2 und 3 mg/kg. Nach der Aufnahme hoher Selendosen über mehrere Wochen kommt es zur „alkali disease“, gekennzeichnet durch dermatologische Erscheinungen, Alopezie, Hufnekrosen und Kachexie. Die Ferkelsterblichkeit ist hoch und die Schlupfrate bei Eiern sinkt, wobei Embryonen häufig Missbildungen aufweisen. Das durch neurologische Ausfallerscheinungen gekennzeichnete Syndrom „blind staggers“ konnte allein durch orale Selendosen nicht reproduziert werden (RAISBECK *et al.* 1995, O'TOOLE und RAISBECK 1995). Eine Zufuhr von 5 mg/Tag Selen führt beim Menschen sicher zur chronischen Selenvergiftung (Selenose) und ist durch Haarausfall und Nageldeformationen und -verluste gekennzeichnet. Der LOAEL wurde auf 1540 bis 1600 µg/Tag geschätzt. Die sichere maximale tägliche Aufnahme liegt bei 400 µg (YANG *et al.* 1983, WHANGER *et al.* 1996). Eine experimentell induzierte Selenose beim Meerschweinchen führte zu einer mikrozytären hypochromen Anämie (DAS *et al.* 1989).

2.3. Seleneinbau

Selenocystein ist die 21ste Aminosäure und wird über das UGA-Codon, eigentlich bekannt als Stoppcodon, eingebaut (CHAMBERS *et al.* 1986). Spezielle Erkennungselemente in der mRNA sind notwendig, um das Codon so zu interpretieren, dass SeCys eingebaut werden kann. Dies ist zum einen das als Haarnadelstruktur vorliegende SECIS-Element (selenocysteine insertion sequence), welches sich in einiger Entfernung vom UGA-Codon im untranslatierten 3'-Ende der mRNA befindet (BERRY *et al.* 1991b). Die ebenfalls benötigte tRNA (Seryl-tRNA^{[Ser]Sec}) wird durch die Phosphoseryl-tRNA^{[Ser]Sec}-Kinase unter ATP-Verbrauch in Anwesenheit von Mg²⁺ phosphoryliert (CARLSON *et al.* 2004). Zur Selenocysteinsynthese werden als Ausgangssubstanzen Selenid (H₂Se) und ATP benötigt (MIZUTANI *et al.* 1991, 1992).

Die Umwandlung der Phosphoseryl-tRNA^{[Ser]^{Sec}} in die SeCys tragende tRNA geschieht möglicherweise als Komplex mit einer der zwei Selenophosphatsynthetasen (SPS) und ihrem Produkt Selenophosphat und wird letztlich durch die Selenocysteinsynthase (s. u.) katalysiert (SMALL-HOWARD *et al.* 2006). Die SPS 1 wurde beim Menschen als 45 kDa-Protein beschrieben und weist eine ATP/GTP-Bindungsregion auf (LOW *et al.* 1995). Die SPS2 ist selbst ein Selenoenzym. Die Bildung von Selenophosphat als Voraussetzung der Sec-tRNA-Synthese wird wahrscheinlich durch die SPS1 sichergestellt. Die vermutlich aktivere SPS2, die nur bei Vorhandensein von Selen gebildet werden kann, ist ein wichtiger Angriffspunkt in der Regulation der Selenoproteinsynthese (GUIMARÃES *et al.* 1996, STADTMAN 1996). Das 48 kDa-Protein SLA/LP gehört zur Familie der pyridoxalphosphatabhängigen Serinhydroxymethyltransferasen (GELPI *et al.* 1992, KERNEBECK *et al.* 2001). Inzwischen ist nachgewiesen, dass es sich bei diesem Protein um die Selenocysteinsynthase handelt. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von der phosphorylierten, Serin-beladenen tRNA in die Sec-tRNA^{[Ser]^{Sec}} (YUAN *et al.* 2006). SECp43 ist ein Protein mit zwei RNA-Bindungsdomänen, das mit der tRNA^{Sec} und der Selenocysteinsynthase interagiert (DING und GRABOWSKI 1999). Der Komplex aus SECp43, Selenocysteinsynthase und der beladenen tRNA wird in den Zellkern importiert. SECp43 katalysiert vermutlich eine Methylierungsreaktion, die die Effizienz des Seleneinbaus fördert (XU *et al.* 2005, SMALL-HOWARD *et al.* 2006). SBP2 ist ein 120 kDa-Protein, welches eine Kernlokalisierungssequenz aufweist und an das SECIS-Element binden kann. Für den Einbau von Sec in Proteine ist es essentiell (LESOON *et al.* 1997, COPELAND *et al.* 2000). Des Weiteren ist ein spezieller Elongationsfaktor EFsec nötig, um die Sec-tRNA^{[Ser]^{Sec}} mit dem SECIS-SBP2-Komplex zu verbinden (FAGEGALTIER *et al.* 2000, TUJEBAJEVA *et al.* 2000). EFsec und SBP2 lassen sich im Zellkern antreffen, wo Komplexe aus SPS1, SECp43 und Selenocysteinsynthase oder SPS1, SECp43, EFsec und SBP2 gefunden wurden. Daher wird vermutet, dass EFsec die Selenocysteinsynthase aus der Verbindung mit der Sec-tRNA^{[Ser]^{Sec}} verdrängen kann, bevor es sich an das mit dem SECIS-Element assoziierten SBP2 bindet. Es wird weiterhin vermutet, dass das Protein SECp43 den Sec-tRNA^{[Ser]^{Sec}}-EFsec-SBP2-Komplex stabilisiert und eine Ablösung der Sec-tRNA^{[Ser]^{Sec}} von EFsec verhindert.

Dieser Komplex verlässt nun den Zellkern, während die Translation gleichzeitig oder nach dem Export direkt an den ersten Ribosomen auf der zytoplasmatischen Seite

stattfindet. So wird vermutlich vermieden, dass die mRNA dem nonsense-vermittelten Abbau preisgegeben wird (SMALL-HOWARD *et al.* 2006).

Es wird angenommen, dass der Komplex aus mRNA und Sec-tRNA^{[Ser]^{Sec}}-EFsec-SBP2 an den Ribosomen verändert wird. SPB2 wird durch L30 ersetzt, wodurch der Komplex an den Ribosomen verankert wird. Eine Konformationsänderung im SECIS-Element führt vermutlich zur EFsec vermittelten GTP-Hydrolyse und daraus folgend zur Sec-tRNA^{[Ser]^{Sec}}-Bereitstellung für die Translation (CHAVATTE *et al.* 2005). Die zahlreichen Faktoren, die zum Einbau von Sec in Proteine notwendig sind, werden wahrscheinlich in freier oder komplexierter Form recycelt (SMALL-HOWARD *et al.* 2006). Beim Abbau von Selenoproteinen wird das Selen durch eine spezifische pyridoxalphosphatabhängige Selenocystein- β -Lyase quantitativ in H₂Se (Selenid) und Alanin gespalten (ESAKI *et al.* 1982).

2.4. Selenoenzyme

2.4.1. Glutathionperoxidasen

Anhand von Studien an Ratten- und Rindererythrozyten konnte MILLS 1957 ein Enzym nachweisen, das Hämoglobin vor der Oxidation durch H₂O₂ und Ascorbinsäure schützt und dabei 2 GSH als Wasserstoffdonator nutzt. Das Enzym wurde Glutathionperoxidase genannt, und schon damals wurde angenommen, dass es für das Hämoglobin einen besseren Oxidationsschutz als die Katalase darstellt. Cohen und Hochstein konnten dies 1963 für die Erythrozyten des Menschen nachweisen.

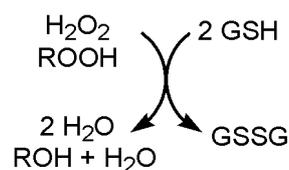


Abbildung 1: Reaktionsschema der Glutathionperoxidasen

ROTRUCK *et al.* (1973) konnten im Hämolysat von selendefizienten Ratten feststellen, dass Selen ein integraler Bestandteil der Glutathionperoxidase ist. Das Enzym weist ein Molekulargewicht von 90 kDa auf. SCHWARZ und FOLTZ vermuteten bereits 1957, dass Selen für die Funktion des zum damaligen Zeitpunkt noch als Faktor 3 bezeichneten Enzyms unentbehrlich sein muss und leiteten daraus die Essentialität dieses Elements ab. FORSTROM *et al.* (1978) konnten für die zelluläre GPx (cGPx, *classical GPx*) in der Leber der Ratte Selenocystein (SeCys) als integralen Bestandteil

des katalytischen Zentrums identifizieren. Die erste vollständige Aufklärung der Primärstruktur einer monomeren Untereinheit des Enzyms fand an Rindererythrozyten statt. Die Untereinheit besteht aus 198 Aminosäuren und weist eine Molmasse von ca. 21 kDa auf. Der Vergleich mit Teilen der N-terminalen Aminosäuresequenz des Enzyms aus Rattenlebern brachte eine Homologie von mehr als 80% zu Tage (GÜNZLER *et al.* 1984). Die Identifizierung weiterer GPx-Enzyme fand erst zu Beginn der 90er Jahre statt.

Allen Glutathionperoxidasen ist die katalytische Triade gleich. Hierbei wird das Selen des SeCys durch die Iminogruppe eines Tryptophanrestes und durch die Aminogruppe eines Glutaminrestes über Wasserstoffbrücken polarisiert. Das dissoziierte Selenol wird durch Hydroperoxide oxidiert. Das Derivat der selenigen Säure wird in zwei Stufen durch ein Thiol reduziert. Dabei bindet im ersten Schritt der Schwefel des GSH kovalent an das Selen des Enzyms. Im zweiten Schritt wird das Enzym durch ein weiteres GSH-Molekül regeneriert, welches die Se-S-Brücke spaltet. Das oxidierte Glutathion (GSSG) wird durch die Glutathionreduktase (GR) NADPH-abhängig reduziert (GÜNZLER *et al.* 1984, MAIORINO *et al.* 1995). Die Funktion der GPx ist also von der Verfügbarkeit des $\text{NADPH} + \text{H}^+$ abhängig, welches aus dem Pentosephosphat-Weg stammt (COHEN und HOCHSTEIN 1963).

2.4.1.1. Zytosolische Glutathionperoxidase (cGPx, GPx1)

Die ursprünglich als *classical* Gpx bezeichnete Form wird auch *cytosolic* oder *cellular* GPx genannt. Sie reduziert zusammen mit GSH eine Vielzahl von organischen Hydroperoxiden (ROOH) und H_2O_2 , weist jedoch nur geringe Aktivität gegenüber ROOR auf (TAPPEL 1978). Das Enzym ist nicht in der Lage, Fettsäureperoxide in Phospholipiden zu reduzieren (GROSSMANN und WENDEL 1983). Die höchste Aktivität wird bei der Ratte in der Leber gemessen, gefolgt von Milz, Herz, Erythrozyten und Niere. Die geringste Aktivität hat das Gewebe des Gehirns (TAPPEL *et al.* 1982, BEHNE und WOLTERS 1983). Beim Meerschweinchen weisen Leber und Erythrozyten die höchste Aktivität auf. Diese ist jedoch in allen Organen bis auf die Erythrozyten erheblich geringer als bei anderen Tierarten (LAWRENCE und BURK 1978, BURK *et al.* 1981, TAPPEL *et al.* 1982, TOYODA *et al.* 1989, HIMENO *et al.* 1993a, b). Nur 20 % der Gesamt-GPx-Aktivität in der Leber entfallen beim Meerschweinchen auf die SeGPx, im Mangel fällt diese auf 20 % der Kontrollwerte ab. Bei der Ratte stellt die SeGPx 65 % der Gesamt-Aktivität bereit. Im Selenmangel fällt diese drastisch auf bis zu 1 % des

Kontrollwertes (LAWRENCE und BURK 1978, BURK *et al.* 1981, HADLEY und SUNDE 2001). Die mRNA Konzentration sank auf 20 % des Gehalts der Se-versorgten Ratten (HADLEY und SUNDE 2001). Die Entgiftung von H₂O₂ in den Erythrozyten wird hauptsächlich von der cGPx und nicht von der Katalase bewerkstelligt (COHEN und HOCHSTEIN 1963).

Aufgrund des geringen Aktivitätsverlustes der SeGPx in den Hepatozyten des Meerschweinchens gehen BURK *et al.* (1981) nicht davon aus, dass dieser Parameter ein sensitiver Marker für den Selenmangel ist.

2.4.1.2. *Gastrointestinale Glutathionperoxidase (GI-GPx, GPx2)*

Die gastrointestinale Glutathionperoxidase (GI-GPx) ist ein zytosolisches Enzym, das als Tetramer vorliegt und ein Molekulargewicht von etwa 75 kDa aufweist. Das Enzym wird bei Mensch, Ratte und Maus vorwiegend im Gastrointestinaltrakt und zum Teil auch in der Leber exprimiert und ähnelt bezüglich der Substratspezifität der cGPx. Die Aktivität gegenüber organischen Hydroperoxiden ist höher als die gegen H₂O₂, der Grund könnte sein, dass die Hydroperoxide, die mit der Nahrung aufgenommen werden, vorwiegend organischer Natur sind und nicht wie in den Erythrozyten hauptsächlich H₂O₂ darstellen (CHU *et al.* 1993). In der Hierarchie steht dieses Enzym sehr weit oben. Während eines Selenmangels sind weder Transkriptionsrate noch mRNA-Stabilität beeinträchtigt. Die Proteinmenge sinkt während eines Mangels aufgrund eines vorzeitigen Kettenabbruchs bei der Translation ab, aber die Repletion erfolgt im Vergleich zur cGPx sehr schnell (WINGLER *et al.* 1999). Die GI-GPx wird im Ileum vorwiegend in den Panethzellen exprimiert. Dieser Zellart wird eine Immunkompetenz zugeschrieben, weshalb sie vermutlich auch ROS produzieren. Da die cGPx in diesen Zellen nicht nachgewiesen wurde, wird vermutet, dass die GI-GPx diese Zellen auch bei geringer Selenversorgung schützt. Somit leistet dieses Enzym auch einen Beitrag zur intestinalen Immunität (FLORIAN *et al.* 2001). Über eine GI-GPx beim Meerschweinchen wird in der Literatur nichts berichtet. Eine gesonderte Bestimmung der Aktivität ist nicht möglich, weil sie aufgrund gemeinsamer biochemischer Eigenschaften mit der cGPx nicht von dieser getrennt werden kann.

2.4.1.3. *Plasmatische Glutathionperoxidase (pGPx, GPx3)*

Die pGPx des Menschen ist ein tetrameres Protein, dessen Untereinheiten eine Molekularmasse von 21,5 kDa aufweisen und in denen jeweils ein Selenatom integriert ist. Sie reduziert Hydroperoxide auch bei geringer Plasma-GSH-Konzentration sehr

effektiv (MADDIPATI und MARNETT 1987). In der Niere des Menschen wird der Hauptteil der pGPx synthetisiert. Dies geschieht in den proximalen Tubuluszellen und den parietalen Epithelzellen der *Capsula glomerularis*. Es wird angenommen, dass das Enzym durch die basolaterale Membran in den interstitiellen Raum sekretiert wird, um die proximalen Tubuluszellen vor oxidativer Schädigung durch Anoxie und/oder Reperfusion zu schützen (AVISSAR *et al.* 1994).

In einer 28-tägigen Se-Mangelstudie sank die Aktivität der pGPx bei Ratten auf 7,6 % der Kontrollwerte. Die Autoren verfütterten Diäten mit steigenden Selenzulagen von 0 (Mangel) bis 0,3 mg/kg Diät. Die Aktivität der pGPx stieg linear mit der steigenden Selenaufnahme an und erreichte ein Plateau zwischen 0,075 und 0,1 mg/kg FM (HADLEY und SUNDE 2001). POOVAIAH *et al.* (1987) konnten beim Meerschweinchen einen direkt proportionalen Zusammenhang zwischen Ascorbinsäureaufnahme und pGPx-Aktivität nachweisen.

2.4.1.4. Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PHGPx, GPx4)

Die PHGPx wurde aus der Leber der Ratte isoliert und charakterisiert. Es handelt sich bei diesem Enzym um ein Monomer mit einem Molekulargewicht von etwa 22 kDa. Das pH-Optimum für die Reaktion mit Phosphatidylcholinhydroperoxid (PCOOH) wurde bei 8,0 unter Verwendung eines Detergens (u. a. Triton X-100) festgestellt. Durch die monomere Form liegt das aktive Zentrum freier als bei den anderen GPx-Proteinen. Hieraus erklärt sich, warum die PHGPx sehr viel komplexer gebaute Substrate wie z. B. PCOOH angreifen kann. Die durch den Vitamin E-vermittelten Kettenabbruch entstandenen Hydroperoxide werden im Zusammenspiel mit GSH durch die PHGPx reduziert (URSINI *et al.* 1995). Das Enzym reduziert auch Cholesterol- und Cholesterolester-OOH (THOMAS *et al.* 1990), Phosphatidylcholinhydroperoxid (PCOOH), Linolsäure-OOH, Cumolhydroperoxid und in geringerem Umfang *tert*-Butylhydroperoxid und H₂O₂ (URSINI *et al.* 1985, ROVERI *et al.* 1994, DUAN *et al.* 1988). Die PHGPx enthält eine Sequenz, die es ihr ermöglicht, in Abhängigkeit vom Membranpotential, in die Mitochondrien zu gelangen. Die reife mitochondriale PHGPx (mPHGPx) verliert diese Sequenz und weist nur noch eine Molekülmasse von 20 kDa auf (ARAI *et al.* 1996). In ihren enzymatischen Eigenschaften unterscheiden sich die lösliche (zytosolische) und die mPHGPx Form aus Rattentestes nicht, wobei die Aktivität in den Mitochondrien um mehr als das 3-fache höher ist (ROVERI *et al.* 1994). Das Mittelstück der Spermien ist sehr reich an

Mitochondrien, welche von einer keratinartigen Kapsel umgeben sind und die Energie zur Geißelbewegung bereitstellen. Die PHGPx macht etwa 50 % des mitochondrialen Kapselmaterials in gereiften Spermien aus und ist dort enzymatisch inaktiv (URSINI *et al.* 1999). Das Strukturprotein entsteht bei niedriger Konzentration niedermolekularer Thiole durch Ausbildung von intramolekularen Se-S-Brücken, was letztlich zur Polymerisierung führt. Diese Umwandlung des Enzyms in ein Strukturprotein ist möglich, da sich der GSH-Gehalt zum Ende der Spermienreifung drastisch verringert (MAURI *et al.* 2003).

PFEIFER *et al.* (2001) identifizierten eine nukleäre PHGPx in Spermienkernen, die in Spermatiden exprimiert wird und nannten das 34 kD-Protein snGPx (sperm nuclei GPx). Das Selenoenzym verwendet offenbar die Cysteinreste der Protamine als Reduktionsmittel und trägt durch die daraus resultierende Protaminquervernetzung maßgeblich zur Chromatinkondensation und somit zur männlichen Fertilität und Reproduktion bei (Protaminthiolperoxidase). GODEAS *et al.* (1996) konnten beobachten, dass die PHGPx in den Zellkernen des Hodengewebes zu 60 % mit Chromatin assoziiert ist. Inzwischen wurde die snGPx auch in anderen Geweben identifiziert (BORCHERT *et al.* 2003, MAIORINO *et al.* 2003). Die drei Isoenzyme entstammen alle dem gleichen Gen, dessen Transkriptionsprodukt unterschiedlich lange mRNAs für die cytosolische, mitochondriale und nukleäre PHGPx hervorbringt. Sie differieren N-terminal oder durch die Translation unterschiedlicher Exons (PUSHPA-REKHA *et al.* 1995, PFEIFER *et al.* 2001, BORCHERT *et al.* 2003, MORENO *et al.* 2003).

Das Enzym ist an der Regulation der 5-Lipoxygenaseaktivität über die intrazelluläre Peroxidkonzentration und somit an der Leukotriensynthese beteiligt. Die PHGPx reduziert die durch die Lipoxygenase nahe der Membran entstandene 5-Hydroperoxyeicosatetraensäure zu 5-Hydroxyeicosapentaensäure. Dies hat zur Folge, dass die Peroxidkonzentration so gering gehalten wird, dass sie die durch einen Feedback-Mechanismus regulierte Lipoxygenase nicht hemmt. Hieraus darf allerdings nicht auf einen proinflammatorischen Stoffwechsel bei adäquater Selenversorgung geschlossen werden. Fällt die PHGPx während eines Selenmangels aus, werden aus der akkumulierenden 5-Hydroperoxyeicosatetraensäure zunächst Leukotrien A₄ und daraus die Leukotriene B₄, C₄, D₄ und E₄ gebildet (WEITZEL und WENDEL 1993). Speziell die mPHGPx kann außerdem die ROS-induzierte Apoptose hemmen, indem sie die mitochondriale Peroxidkonzentration gering hält (NOMURA *et al.* 1999).

WEITZEL *et al.* (1990) zeigten in einem Resupplementierungsversuch an Ratten, dass die PHGPx im Selenmangel erst sehr spät depletiert und sehr schnell wieder repletiert wird. Dieses Enzym spielt offenbar eine wichtige Rolle für den Organismus bei der Entgiftung von Lipidhydroperoxiden. Die Aktivitäten dieses Enzyms und das der cGPx sind im Herz am niedrigsten, woraus sich möglicherweise die Neigung zur Kardiomyopathie bei der Keshan-Krankheit erklären lässt. ZHANG *et al.* (1989) konnte die höchste Aktivität bei ausgewachsenen Ratten in Leber und Niere, gefolgt von Gehirn, Herz, Lunge und Muskel messen. In einem 28-tägigen Experiment an Ratten fiel die Aktivität der hepatischen PHGPx auf 43-53% der Kontrollwerte. Die mRNA-Gehalte verringerten sich jedoch lediglich auf 81%, was statistisch nicht abgesichert werden konnte (HADLEY und SUNDE 2001).

YAGI *et al.* (1996) verwendeten eine Zelllinie von Meerschweinchen als PHGPx-defiziente Mutterzellen und bezogen sich dabei auf Erkenntnisse von SHREVE *et al.* (1979). Bei einem Western Blot mit einem in Kaninchen gewonnenen Antikörper gegen die PHGPx der Ratte konnte in diesen Zellen kein PHGPx-Protein nachgewiesen werden (YAGI *et al.* 1996).

2.4.2. Deiodinasen

BERRY *et al.* (1991a) fanden in der mRNA der Typ I Deiodinase (D1, 5'-Iodothyronin-Deiodinase) das für den Selenocysteineinbau verantwortliche UGA-Codon. Durch die Identifizierung als Selenoenzym konnte der Umstand aufgeklärt werden, warum bei experimentell induziertem Selenmangel die Konversion von T₄ zu T₃ bei Ratten gestört ist (BECKETT *et al.* 1987, BECKETT *et al.* 1989).

Während bei Ratten, Kälbern und Katzen der Plasma-T₄-Spiegel im Selenmangel ansteigt und der T₃-Spiegel sinkt (ARTHUR *et al.* 1988, BECKETT *et al.* 1989, BECKETT *et al.* 1992, YU *et al.* 2002, WEDEKIND *et al.* 2003), verhielt es sich beim Meerschweinchen in der einzigen hierzu veröffentlichten Studie anders. Die T₃- und T₄-Spiegel fielen ab, wobei dieses Phänomen im Falle des Thyroxins statistisch nicht abgesichert werden konnte. CAMMACK *et al.* (1995) schlossen daraus, dass die T₄-Produktion bei Ratten und Meerschweinchen durch einen Selenmangel unterschiedlich beeinträchtigt wird.

Bis heute sind drei Isoenzyme (D1, D2, D3) mit unterschiedlicher Funktion und Lokalisation bekannt.

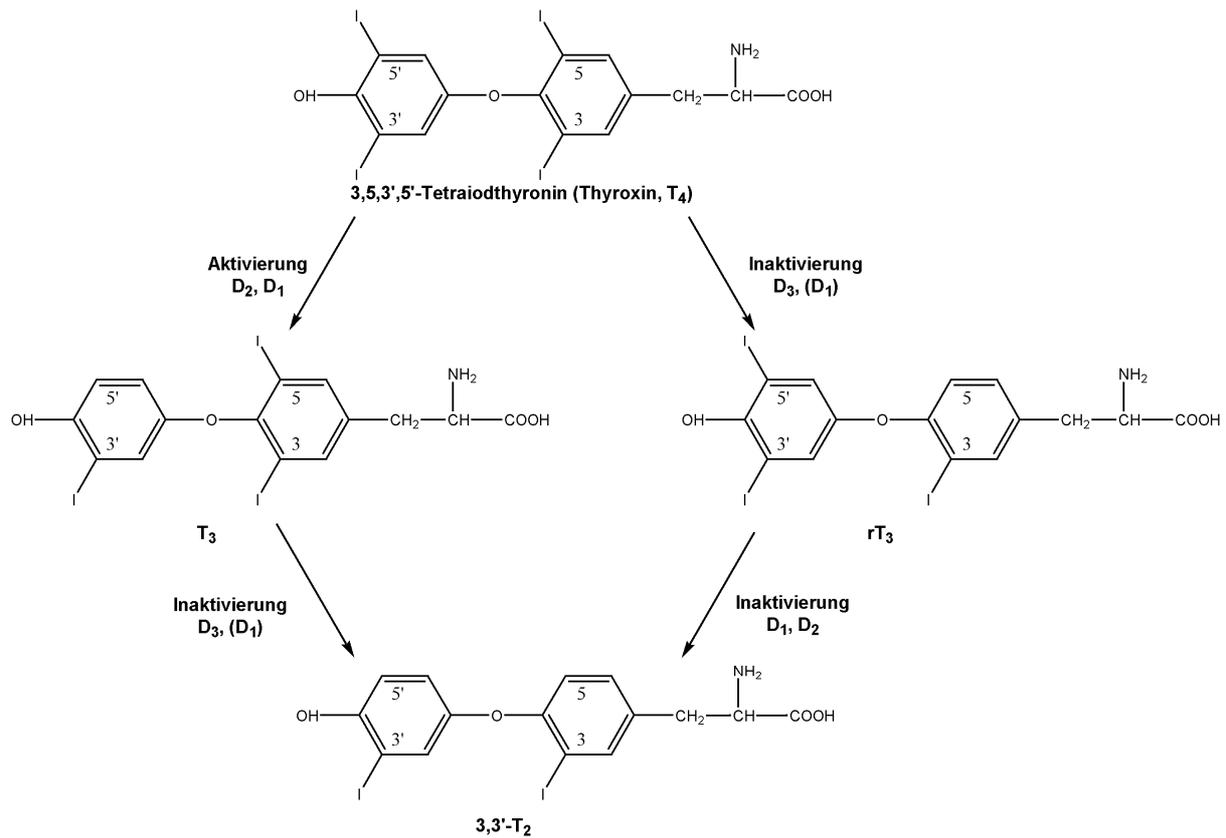


Abbildung 2: Die Synthese von T₃, rT₃ und 3,3'-T₂ aus T₄ (nach BIANCO *et al.* 2002)

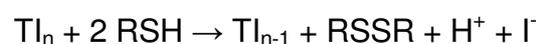
2.4.2.1. Deiodinase Typ I (D1)

Die D1 ist ein 55 kDa großes Homodimer mit Untereinheiten von etwa 27 kDa (SAFRAN und LEONARD 1991, Leonard *et al.* 2001). Das Enzym deiodiert T₄ und rT₃ und wird durch DTT aktiviert und durch PTU (6-n-Propyl-2-Thiouracil), Goldthioglucose und Iodacetat gehemmt. Die enzymatische Deiodierung von rT₃ und T₄ funktioniert nach einem *Ping-Pong*-Mechanismus (VISSER *et al.* 1975, CHOPRA 1977, LEONARD und ROSENBERG 1980, VISSER *et al.* 1982). Im Vergleich zur Ratte und anderen untersuchten Tierarten weist diese Deiodinase des Meerschweinchens die höchste Aktivität auf. Dies resultiert aus einem etwa dreimal höheren V_{max}-Wert. Die substratbindende Untereinheit ist mit 33 kDa größer als die der Ratte, weshalb erhebliche strukturelle Unterschiede des Proteins zwischen den einzelnen Tierarten angenommen werden (SANTINI *et al.* 1992). Bei Ratte, Hund und Mensch wurde das hepatische Enzym als integrales Membranprotein identifiziert, dessen N-Terminus in das ER-Lumen, das Carboxylende in das Zytoplasma ragt (TOYODA *et al.* 1995). In den Epithelzellen der Niere ist die D1 in der basolateralen Zellmembran ansässig. Da das aktive Carboxylende in das Zytosol ragt, wird angenommen, dass Substrat und

Produkt (T_3) die Zellmembran passieren müssen. Mehr als 85 % der Aktivität sind in den äußeren 3 mm der Nierenrinde zu finden (LEONARD *et al.* 1991). *In vitro*-Untersuchungen an Zellkulturen führten zu der möglichen Annahme, dass das Protein im ER synthetisiert wird und zur Zellmembran wechselt (BAQUI *et al.* 2000). Eine Regulation durch die schnelle Proteolyse nach Ubiquitinierung findet nicht statt. Die Halbwertszeit des Proteins ist > 12 h (GEREBEN *et al.* 2000). T_3 hemmt die Aktivität dieses Enzyms nicht (KOENIG *et al.* 1984).

2.4.2.2. *Deiodinase Typ II (D2)*

VISSER *et al.* (1982, 1983) nahmen eine weitere Deiodinase in der Hypophyse auf der Grundlage von Hemmstudien mit 6-n-Propyl-2-Thiouracil (PTU), einem Inhibitor der D1, nicht aber der D2, an. Beide Enzyme unterscheiden sich hinsichtlich Substratspezifität, Reaktionskinetik und Anfälligkeit gegenüber Hemmstoffen (VISSER *et al.* 1982 und 1983). Bei der D2 handelt es sich um ein integrales Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums, wobei das Carboxylende in das Zytosol, der N-Terminus in das ER-Lumen ragt (BAQUI *et al.* 2000). Das Holoenzym weist ein Molekulargewicht von etwa 199 kDa auf und hat zwei oder mehr substratbindende Untereinheiten von 27 kDa (SAFRAN und LEONARD 1991). In einer Modellvorstellung der Katalyse durch die D2 findet ein nukleophiler Angriff des SeCys auf die 2'-Position des Thyroxins statt, woraufhin sich ein Enzym-Substrat-Komplex ausbildet. Ein Thiol als Kofaktor bewerkstelligt die Abstraktion eines I^+ , es kommt zur Bildung eines Sulfenyliodids und eines D2- T_3 -Komplexes. Durch ein weiteres Thiol entstehen ein oxidiertes Thiol und ein I^- ; das Enzym wird regeneriert und T_3 entsteht. Der Kofaktor *in vivo* ist bisher nicht bekannt. GSH war, im Gegensatz zum unphysiologischen DTT, nicht in der Lage das Enzym zu aktivieren (KUIPER *et al.* 2002). Neuere Veröffentlichungen der gleichen Arbeitsgruppe gehen ebenfalls von einer nukleophilen Substitution des I durch ein H aus. Es kommt im Zuge dessen zu einem Se-I-Komplex des Enzyms mit dem Substrat. Dieser Komplex konnte aber noch nicht nachgewiesen werden, was durch seine Instabilität erschwert wird. Es ist möglich, dass vorher eine nukleophile Addition eines Thiolats (S^-) oder Selenolats (Se^-) an Position 2/6 bzw. 2'/6' die Reaktion erleichtert. Die allgemeine Iodothyronin-Deiodierungsreaktion lautet:



Obwohl sich die drei Deiodinasen strukturell sehr ähneln, zeigen sie unterschiedliche Substratspezifitäten, Anfälligkeiten gegenüber Hemmstoffen und kinetische

Mechanismen. Es wird aber als unwahrscheinlich angenommen, dass sich die D1 von den anderen Deiodinasen durch die Ausbildung des Se-I-Komplexes während der Deiodierung unterscheidet. Es ist durchaus möglich, dass die Biochemie der Deiodierung bei allen drei Isoenzymen gleich ist (KUIPER *et al.* 2005). Im Gegensatz zur D1 handelt es sich bei den D2 und D3 um einen sequenziellen Mechanismus (VISSER *et al.* 1982).

Im Knochenextrakt und Knochenmark von erwachsenen Mäusen konnte eine Aktivität der D2 nachgewiesen werden. Die Aktivität in einer Osteoblastenzelllinie aus Mäusen stieg auf das 2-2,5-fache an, wenn die Zellen mit $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ vorbehandelt wurden (GOUVEIA *et al.* 2005). Eine Expression der D2 des Menschen konnte in Gehirn, Hypophyse, Plazenta, Herz, Muskel und braunem Fettgewebe nachgewiesen werden (CROTEAU *et al.* 1996). Während zunächst Zweifel daran bestanden, dass es sich bei diesem Enzym wirklich um ein Selenoprotein handelt (SAFRAN *et al.* 1991), wurde der Beweis letztlich durch CROTEAU *et al.* (1996) und CURCIO *et al.* (2001) erbracht. Sowohl die Aktivität als auch die mRNA-Expression sind selenabhängig. Des Weiteren steht die D2 während eines Selenmangels hoch in der Hierarchie (PALLUD *et al.* 1997). *In vivo* konnte eine substratinduzierte Herunterregulierung der D2-Aktivität beobachtet werden. Die ohnehin geringe Halbwertszeit ($t_{1/2} < 1 \text{ h}$) des Enzyms verringert sich weiter bei Anwesenheit der Substrate T_3 , rT_3 und T_4 (HALPERIN *et al.* 1994, STEINSAPIR *et al.* 1998, 2000). Diese posttranslationale Regulation wird durch Ubiquitinierung am Carboxylende des Enzyms nach $\text{T}_4 \rightarrow \text{T}_3$ -Konversion vermittelt und führt zur selektiven substratinduzierten Proteolyse (STEINSAPIR *et al.* 1998, GEREKEN *et al.* 2000, STEINSAPIR *et al.* 2000). Während sich rT_3 lediglich reduzierend auf die Enzymaktivität auswirkt, verringert T_3 die Transkription des D2-Gens zu 50% *in vitro* in der Hypophyse. Diese Regulation ist vermutlich kernrezeptorvermittelt (KIM *et al.* 1998). Die D2 wird also sowohl auf prä- als auch auf posttranslationaler Ebene reguliert (SILVA und LEONARD 1985, ST. GERMAIN 1988, BURMEISTER *et al.* 1997, KIM *et al.* 1998). T_4 kann die Aktivität auf beiden Wegen sehr effizient in Hypophyse und Großhirnrinde reduzieren. Daher ist Thyroxin anscheinend das wichtigste Signal zur Regulierung der D2 (SILVA und LEONARD 1985, BURMEISTER *et al.* 1997). In der Hypophyse und der Großhirnrinde von Ratten verhält sich die mRNA-Expression antiproportional zur Schilddrüsenfunktion, vermutlich um eine ausreichende T_3 -Bildung bei abfallenden T_4 -Konzentrationen während eines Iodmangels oder einer Hypothyreose zu kompensieren (BURMEISTER *et al.* 1997, TU *et al.* 1997). Der Anteil des aus der D2-

abhängigen, extrathyroidalen $T_4 \rightarrow T_3$ -Konversion stammenden T_3 an der Plasmakonzentration steigt von hyper- über eu- zu hypothyroiden Patienten an (MAIA *et al.* 2005). Warum ausgerechnet die D2 so strikt reguliert wird, ist ungeklärt (GEREBEN *et al.* 2000). Ein Grund könnte die kernnahe Lokalisierung der D2 im ER sein. Diese ist vermutlich für die dreifach höhere T_3 -Wirkung auf die T_3 -abhängige Gentranskription im Vergleich zur D1 verantwortlich (MAIA *et al.* 2005).

2.4.2.3. *Deiodinase Typ III (D3)*

Die D3 (5-Iodothyronindeiodinase, D3) besitzt ein SECIS-Element in der 3' UTR der mRNA. Ihre Aufgabe im Organismus besteht darin, zirkulierendes T_3 und T_4 durch Deiodierung an der Position 5 des inneren Tyrosylrings irreversibel zu inaktivieren (SALVATORE *et al.* 1995). Die D3 besitzt ebenfalls eine Transmembrandomäne im Aminoterminus, ist aber nur teilweise in der Plasmamembran lokalisiert. Ein weiterer Anteil des Proteins ist mit Clathrin co-lokalisiert. Nach seiner Synthese im ER migriert die D3 zur Plasmamembran und wird dort endozytiert. In den Endosomen findet anscheinend ein Recycling statt, wonach das Enzym wieder zur Plasmamembran gelangt. Das aktive Zentrum der D3 liegt extrazellulär und ermöglicht den schnellen Zugriff auf T_4 und T_3 , um diese zu inaktivieren (BAQUI *et al.* 2003). Aufgrund der Lokalisierung in Uterus, Plazenta und Nabelschnur wird vermutet, dass sie einen Schutz gegen den unkontrollierten Eintritt mütterlicher Schilddrüsenhormone bildet. Des Weiteren findet sich die D3 beim Fötus in allen Membranen der Zellen, die Kontakt mit dem Fruchtwasser haben (HUANG *et al.* 2003). Tatsächlich liegt der Transfer mütterlichen T_4 's in den fötalen Kreislauf beim Menschen im femtomolaren Bereich. Eine Deiodierung des T_4 zum aktiven T_3 findet praktisch nicht statt (MORTIMER *et al.* 1996). In der Plazenta tragender Meerschweinchen wird T_4 ebenfalls nicht zu T_3 deiodiert, sondern durch 5-Deiodierung zu rT_3 . Letzteres findet aber in einem sehr viel geringeren Umfang statt als dies beim Menschen der Fall ist. Mütterliches T_4 , das die Plazenta passiert, wird offenbar erst im Fötus in die inaktive rT_3 -Form überführt (COOPER *et al.* 1983). T_3 wird in der Plazenta von Meerschweinchen durch Deiodierung am Tyrosylring ebenfalls schnell inaktiviert (CASTRO *et al.* 1985).

2.4.3. *Das Thioredoxin/Thioredoxinreduktase-System*

Thioredoxin (Trx) beschreibt eine Gruppe von kleinen, ubiquitär vorkommenden Proteinen mit zwei redoxaktiven Cysteinylresten in einem exponiert liegenden aktiven Zentrum. Trx kommt in reduzierter Form als Dithiol ($\text{Trx}-(\text{SH})_2$) oder in oxidiert Form

als Disulfid (Trx-S₂) vor, wobei die Cysteinyreste bei Letzterem eine intramolekulare Disulfidbrücke bilden. Das Protein in seiner reduzierten Form fungiert in vielen thiolabhängigen Reduktionsreaktionen als starke Protein-Disulfid-Reduktase (HOLMGREN 1985). THELANDER bestätigte 1974 die bis dahin angenommene Funktion des Trx bei der Bildung von Desoxyribonucleotiden in *E. coli*. Die Ribonucleotid-Diphosphat-Reduktase benötigt für die Reduktion von Ribonucleotiden (rNDP) zu Desoxyribonucleotiden (dNDP) Elektronen. Diese werden von NADPH + H⁺ über das Flavoprotein Thioredoxinreduktase (TrxR) auf Trx übertragen, welches letztendlich die Elektronen für die Reduktion der rNDP zur Verfügung stellt (Abb. 3).

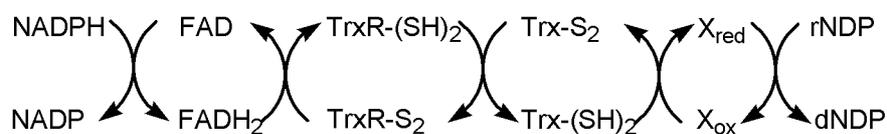


Abbildung 3: Synthese der Desoxyribonucleotide unter Beteiligung des Trx-TrxR-Systems bei *E. coli* (nach THELANDER 1974)

Die Untereinheiten des homodimeren Flavoenzyms TrxR des Säugetiers haben ein Molekulargewicht von 55-58 kDa und bestehen aus dem essentiellen SeCys im C-terminalen Redoxzentrum, einer NADPH-Bindungsdomäne, einem FAD und einem katalytisch aktiven Disulfid im N-Terminus. Diese Untereinheiten liegen spiegelverkehrt aufeinander. Dies ermöglicht eine Interaktion zwischen dem C-terminalen Redoxzentrum der einen Untereinheit mit dem N-terminalen Disulfid der anderen Untereinheit (LUTHMAN und HOLMGREN 1982, GLADYSHEV *et al.* 1996, TAMURA und STADTMAN 1996, GROMER *et al.* 1998a, ZHONG *et al.* 1998). Die für die katalytische Aktivität essentielle carboxyterminale Aminosäuresequenz ist bei Ratte, Kalb und Mensch identisch und lautet -Gly-Cys-SeCys-Gly-COOH (ZHONG *et al.* 1998).

Bei der Reduktion von H₂O₂ beim Säugetier wird das Selenolat aufgrund der nukleophilen Eigenschaften des H₂O₂ oxidiert. Dies führt zur Bildung der selenigen Säure, die mit dem benachbarten Sulfhydryl des Cysteins unter Wasserabspaltung reagiert, wodurch ein Selenylsulfid gebildet wird. Die Regeneration des Selenols erfolgt durch eine Oxidation des gegenüberliegenden Thiols zum Disulfid (ZHONG *et al.* 2000).

Die TrxR weist ein hohes Substratspektrum auf und reagiert neben Trx u. a. auch mit Alloxan, Menadion, DTNB (5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)), oxidiertem Liponamid,

L-Cystin, Lipidhydroperoxiden, Dehydroascorbat, H_2O_2 und S-Nitrosoglutathion (LUTHMAN und HOLMGREN 1982, BJÖRNSTEDT *et al.* 1995, NIKITOVIC und HOLMGREN 1996, TAMURA und STADTMAN 1996, MAY *et al.* 1997, ZHONG und HOLMGREN 2000). Die Entdeckung, dass stabile Selenyliodid-Verbindungen als Substrat der TrxR fungieren können, legt die Vermutung nahe, dass dieses Enzym im katalytischen Kreislauf der Deiodinasen eine Rolle spielen könnte (MUGESH *et al.* 2003).

Thioredoxin aus Säugetierzellen wurde von verschiedenen Forschergruppen als relativ hitzestabil und mit einem Molekulargewicht von 12 kDa beschrieben. Der entscheidende Unterschied zum Trx aus *E. coli* besteht in der doppelten bis dreifachen Anzahl an Cysteinresten und einer breiteren Substratspezifität. Die Oxidation dieser Cysteinyreste führt zu einer intramolekularen Disulfidbindung (HERRMANN und MOORE 1973, ENGSTRÖM *et al.* 1974, HOLMGREN 1977, LUTHMAN und HOLMGREN 1982, GROMER *et al.* 1998a). Ein zweites Säugetier-Trx wurde in den Mitochondrien von Ratten entdeckt. Dieses Trx2 besitzt ein mitochondrienspezifisches Translokationssignal im N-Terminus (SPYROU *et al.* 1997). Aufgrund der Tatsache, dass das Erzeugen überlebensfähiger, homozygoter Mäuse mit einem Trx-Gendefekt misslang, folgern die Autoren, dass Trx für die frühe Differenzierung und Morphogenese beim Mausembryo essentiell ist (MATSUI *et al.* 1996, NONN *et al.* 2003). Die Funktionen des Trx im Säugerstoffwechsel sind sehr vielfältig und werden bis dato weitreichend erforscht. ARNÉR und HOLMGREN stellten diese 2000 zusammenfassend wie folgt dar: Redoxregulation von Transkriptionsfaktoren, Regulation der Apoptose, Modulation des Immunsystems, Einnisten und Erhalten der Schwangerschaft, Schutz vor Hyperoxie bei der Geburt und Unterstützung des Überlebens von Neuronen bei Schlaganfall und Reperfusion.

SUN *et al.* (1999) entdeckten neben der bis dato bekannten TrxR1 zwei weitere Isoenzyme der TrxR (TrxR2 und TGR) bei Mäusen und Menschen, die die gleichen funktionellen Eigenschaften teilen. Während die TrxR1 und die Thioredoxin/Glutathion Reduktase (TGR) ubiquitär mit besonders reichlichem Vorkommen im Cytosol der Leber ansässig sind, findet man die TrxR2 hauptsächlich in den Mitochondrien von Testes, Prostata und Leber. In geringerer Expressionsrate ist die mRNA auch ubiquitär anzutreffen (MIRANDA-VIZUETTE *et al.* 1999).

Der Aktivitätsverlust der TrxR im Selenmangel wurde bereits an Ratten untersucht. Die Aktivitätsabnahme ist deutlich messbar, im Vergleich unter den einzelnen Organen

jedoch unterschiedlich markant. Im Gegensatz zu anderen Selenoenzymen konnte die Aktivität der TrxR durch Selenzulagen oberhalb des Bedarfs nur in einer Studie von BEGGREN *et al.* (1999) weiter gesteigert werden. Die Aktivität im Gehirn konnte im Mangel nach 14-wöchigem Fütterungsversuch aufrechterhalten werden (HILL *et al.* 1997a, BEGGREN *et al.* 1999). Im Mangel reduziert sich die TrxR-Aktivität in der Leber erheblich (auf 14% der Kontrollwerte), wohingegen die mRNA-Konzentration nur moderat gesenkt wird. Hierin unterscheidet sich die TrxR deutlich von der cGPx, bei der im Mangel sowohl Aktivität als auch mRNA-Konzentrationen deutlich reduziert sind. Zur Sättigung der hepatischen TrxR-Aktivität bei der Ratte ist eine Selenzulage von 0,07 mg/kg Futtermittel ausreichend. Um die maximale TrxR-mRNA-Konzentration zu erhalten, werden nur 0,05 mg/kg Selenzulage benötigt. Der Abfall des mRNA-Gehalts während eines Mangels im Vergleich zur Kontrollgruppe beträgt nur 30-35%. Bezüglich des Selenbedarfs für mRNA-Gehalt und TrxR-Aktivität rangiert dieses Selenoenzym hinter der cGPx. Es wird daher vermutet, dass die TrxR im Organismus eine tragende Rolle spielt und dass der Verlust der TrxR-Aktivität an den Symptomen im Selenmangel ursächlich beteiligt ist (HADLEY und SUNDE 2001). In der Arterienwand von Ratten wurde ebenfalls der nutritive Einfluss von Selen auf die Genexpressionsrate und Aktivität der TrxR und der cGPx untersucht. Im Langzeitmangel waren im Falle der TrxR beide Parameter erheblich erhöht. Vermutlich wird die Genexpression bei der TrxR über die Menge an ROS und bei der GPx über Selen reguliert (WU *et al.* 2003). An knock-out-Mausmodellen wurde weiterhin herausgefunden, dass ein Fehlen der TrxR1 und/oder TrxR2 zur pränatalen Letalität führt (CONRAD *et al.* 2004, JAKUPOGLU *et al.* 2005). Bezüglich der Wiedererlangung der Aktivität nach einer Repletion rangiert die TrxR zwischen SeIP und cGPx in der Leber der Ratte (HILL *et al.* 1997a).

Die bekannteste Funktion des Trx/TrxR-Systems ist die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für die Ribonukleotidreduktase, es gibt jedoch mindestens ein weiteres Wasserstoff-Donorsystem für dieses Enzym (THELANDER 1974, SPYROU und HOLMGREN 1996). Der ROS-Stoffwechselweg führt offenbar über die TrxR. So konnte für die TrxR1 festgestellt werden, dass ROS zur Oxidation der Selenolgruppe im SeCys und damit zur Inaktivierung des Enzyms führt. Die daraus resultierende Oxidation des Trx hat Einfluss auf Trx-abhängige zelluläre Komponenten wie Transkriptionsfaktoren, Proteintyrosinphosphatasen und antioxidative Enzyme. Ein direkter Einfluss der ROS auf diese Proteine ist zusätzlich möglich. Das System

recycelt sich selbst durch einen Anstieg der TrxR-Expression und möglicherweise durch eine NADPH-abhängige Reduktion nach der ROS-Entgiftung durch andere antioxidative Enzyme (SUN *et al.* 1999).

In menschlichen Tumorzellen konnte die Hemmung sowohl der spontanen als auch der dexamethasoninduzierten Apoptose durch Trx sowie eine Förderung des Tumorwachstums durch Trx als Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden (BAKER *et al.* 1997). Die medizinische Implikation des TrxR-Systems wurde von BECKER *et al.* (2000) zusammenfassend betrachtet. Das Thioredoxin-Reduktase-System befindet sich seit Jahren im Fokus der pathobiochemischen und pharmakologischen Forschung. Es ist bei der Prävention von Tumorerkrankungen essentiell, weil es die Fähigkeit besitzt, H_2O_2 zu entgiften. Die für die hohe Proliferationsrate der Tumorzellen benötigten DNA-Bausteine werden jedoch ebenso wie das Trx vom TrxR-System bereitgestellt. Dieser Sachverhalt wurde deshalb zum Gegenstand therapeutischer Überlegungen. Auch Infektionserreger haben ein TrxR-System zur Verteidigung gegen Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus wie auch zur Bereitstellung von Desoxyribonukleotiden für die DNA-Synthese, die eine Vermehrung der Erreger erst ermöglicht. Strukturunterschiede zu den Säugerenzymen lassen dieses Protein in das Zentrum der Antibiotikaentwicklung rücken.

2.5. Selenoprotein P

Im Plasma von Ratten wurde ein Protein identifiziert, das injiziertes, radioaktiv markiertes Selen rasch inkorporiert (HERRMAN 1977). Selenoprotein P (SeIP) wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert (MOTSENBOCKER und TAPPEL 1982) und unterscheidet sich von der SeGPx hinsichtlich Molekulargewicht, chromatographischem Verhalten und Substratspezifität. Gegenüber einem Selenmangel ist SeIP resistenter als die cGPx. Die biochemische Funktion dieses Selenoproteins ist nicht bekannt, neben einer Transportfunktion für Selen über das Plasma zu den Geweben werden weitere Funktionen vermutet (BURK und GREGORY 1982). SeIP wird u. a. in Leber, Nieren, Herz, Lunge und Testes exprimiert und in den interstitiellen Raum sekretiert (BURK und HILL 1994). In der Leber von Ratten ist SeIP zentrilobular lokalisiert. Dies ist der Ort mit der höchsten oxidativen Belastung. Daher wird eine antioxidative Wirkung des Proteins nicht ausgeschlossen. In der Niere fand sich SeIP hauptsächlich in den Glomeruli wieder. Der Erhalt des Proteins in den Glomeruli während eines Selenmangels ist besser als im Plasma. Dies könnte die

Erklärung dafür sein, dass die Nierenfunktion im Selenmangel meist nicht beeinträchtigt ist. Im Gehirn war das SeIP mit dem vaskulären Endothel assoziiert. Ein Schutz der Endothelzellmembranen vor oxidativ wirksamen Molekülen, die aus inflammatorischen Vorgängen im Gewebe herrühren, wird für dieses Protein angenommen (BURK *et al.* 1997).

Das Protein weist 7,5 SeCys-Reste auf, obwohl die cDNA 10 TGA-Codons enthält (READ *et al.* 1990, BURK und HILL 1994), des Weiteren besitzt sie zwei SECIS-Elemente (HILL *et al.* 1991, BURK und HILL 1994). SeIP wurde in vier verschiedenen Isoformen gefunden, die in unterschiedlichen Längen des C-Terminus differieren. Jede Isoform endet an einem bestimmten SeCys-Rest und kommt somit auf eine Masse zwischen 50 kDa für die *full-length*-Variante und 36 kDa für die kurze Isoform. Die unterschiedlichen Ergebnisse zum Selengehalt dieses Proteins werden möglicherweise durch diese unterschiedlichen Isoformen mit kürzerem C-Terminus verursacht (MA *et al.* 2002). Im N-Terminus liegt neben den zwei histidinreichen Regionen ein SeCys, das ein redoxsensitives Zentrum bildet. Die restlichen SeCys befinden sich alle C-terminal. Der N-terminale SeCys-Rest liegt in oxidiert Form vor und bildet ähnlich wie bei der TrxR eine Se-S-Brücke mit einem benachbarten Cys (MA *et al.* 2003). Die Halbwertszeit beträgt nur etwa drei bis vier Stunden (BURK *et al.* 1991). Etwa 60 % des Selens im Rattenserum sind an SeIP gebunden, das entspricht 8 % des gesamten Se-Pools. Die SeIP-Konzentration sinkt während eines Selenmangels auf etwa 10 % der Kontrollwerte ab (READ *et al.* 1990). Bei SeIP-knockout-Mäusen konnte ein vermehrter renaler Selenverlust beobachtet werden. Man nimmt an, dass sich durch das Fehlen des Proteins der metabolisch aktive Selenpool in der Leber vergrößert. Über diese Stellgröße wird die Synthese renaler Ausscheidungsprodukte bestimmt, welche nicht mehr als Selenquelle im Organismus genutzt werden (BURK *et al.* 2006a). Bei der Repletion ist SeIP im Vergleich zur hepatischen cGPx und der pGPx im Plasma höher gestellt (BURK *et al.* 1991). Während eines über 28 Tage induzierten Selenmangels bei Ratten konnte kein Einfluss auf die mRNA-Konzentrationen in der Leber festgestellt werden (HADLEY und SUNDE 2001).

Bei der Charakterisierung des SeIP aus Humanplasma konnte keine Aktivität gegenüber *t*-Butylhydroperoxid und H₂O₂ festgestellt werden. Gegenüber PCOOH jedoch konnte ein ähnliches Verhalten wie das der PHGPx beobachtet werden, wenn

auch mit erheblich niedrigerer Aktivität. Diese ließ sich ebenfalls durch die Zugabe des Detergens Triton-X 100 steigern. Dies lässt darauf schließen, dass SelP, genau wie die PHGPx, Reaktionen an der Lipid-Wasser-Grenze katalysiert. Als Reduktionsmittel dienen neben GSH auch L-Cystein, DL-Homocystein, Mercaptoethanol und Dithiothreitol (SAITO *et al.* 1999). Es wird ein rezeptorvermittelter Selentransport zum Gehirn durch SelP angenommen, der eine ausreichende Selenversorgung dieses Gewebes auch im Se-Mangel gewährleistet (BURK *et al.* 1991). Während der N-Terminus vermutlich für die Enzymaktivität verantwortlich ist, liefert der C-Terminus offenbar Selen an die Gewebe (SAITO *et al.* 2004), für die Testes und das Gehirn wurde dies bereits bestätigt (HILL *et al.* 2007). Für die Selenaufnahme in Maustestes wurde inzwischen der Apolipoprotein E-Rezeptor 2 (ApoER2) als essentiell identifiziert. Er ist *in vivo* mit SelP assoziiert, und ein Fehlen führt zu Spermiendefekten, wie sie von selendefizienten Tieren bekannt sind (OLSON *et al.* 2007).

2.6. Genexpression der Selenoproteine

An Ratten wurde nachgewiesen, dass ein Selenmangel die Transkription der Gene für die cGPx, die Typ I Deiodinase und SelP nicht beeinflusst, wohl aber die mRNA-Menge (CHRISTENSEN *et al.* 1995). Die mRNA der cGPx ist die mengenmäßig häufigste mRNA eines Selenoenzyms in der Leber von adäquat versorgten Ratten. Dies führt dazu, dass 75 % des Selens in der Rattenleber an dieses Enzym gebunden sind. Während eines Selenmangels reduziert sich diese Menge (nicht die Transkription an sich) aufgrund der mRNA-Instabilität auf das vergleichbare Niveau anderer Selenoenzyme, deren Transkriptmenge vom Mangel nicht beeinflusst wird (PHGPx, SelP). Der cGPx wird aus diesem Grund die Rolle eines Selenspeichers zugeschrieben: Bei adäquater Selenversorgung steigt die Translationsrate an (WEISS SACHDEV und SUNDE 2001). Die Stabilität der mRNA wird im Selenmangel durch Interpretation des UGA-Codons als eigentliches Stoppcodon beeinflusst. Die mRNA wird markiert und dem Abbau preisgegeben (MORIARTY *et al.* 1998). Die Hierarchie der Selenoproteine im Selenmangel wird auf eine unterschiedliche Effizienz des Seleneinbaus zurückgeführt, der über die 3'UTR reguliert wird (BERMANO *et al.* 1996). Für die selensensitive Downregulation der cGPx-mRNA sind SECIS-Element und UGA-Codon, gefolgt von einem Intron, essentiell (WEISS und SUNDE 1998).

TOYODA *et al.* (1989) untersuchten den Einfluss der Selenzufuhr auf die Genexpression der cGPx in Leber, Niere und Herz bei Ratten, Mäusen und Meerschweinchen. Sie

fanden heraus, dass die vergleichsweise niedrige Enzymaktivität beim Meerschweinchen nicht durch geringere Selenkonzentrationen in den einzelnen Geweben begründet ist. Des Weiteren wird im Hepatozytenzytosol das vorhandene Selen anscheinend nicht für die Synthese von Gpx-Molekülen genutzt. Weitere Analysen zeigten, dass die extrem niedrige GPx-Aktivität das Ergebnis eines Defektes bei oder nach der Transkription sein muss, da das Gen zwar vorhanden ist, die mRNA jedoch nicht nachgewiesen werden kann. HIMENO *et al.* (1993b) bestätigten, dass eine geringe cGPx-mRNA-Konzentration in der Hauptsache auf eine verringerte Transkriptionsrate zurückzuführen ist, obwohl andere Faktoren wie die Stabilität der mRNA nicht ganz ausgeschlossen werden konnten. Es wird vermutet, dass ein oder mehrere Faktoren, die zur Transkription nötig sind, gehemmt werden oder ganz fehlen. Lediglich in den Erythrozyten und deren Vorläuferzellen im Knochenmark sind sowohl Expression als auch Aktivität des Enzyms mit Mäusen vergleichbar. Eine Kompensation der geringen GPx-Aktivität in anderen Geweben durch die GST und Katalase wurde angenommen. Da die Erythrozyten keine GST-Aktivität aufweisen, fehlt ein Enzym, das Lipidhydroperoxide reduzieren kann (HIMENO *et al.* 1993a). Dies könnte der Grund für die höhere Expression der cGPx in den Erythrozyten sein (HIMENO *et al.* 1993b).

2.7. Glutathion

Glutathion (γ -Glu-Cys-Gly) übernimmt im Stoffwechsel zahlreiche Aufgaben, wobei im Zusammenhang dieser Arbeit lediglich auf die Entgiftung von Peroxiden, Radikalen und Xenobiotika und seine Rolle als Coenzym eingegangen werden kann. Es ist mit einer Konzentration von 0,5-10 mM das häufigste intrazelluläre Thiol (MEISTER und TATE 1976). Glutathion wird intrazellulär in einem ersten Schritt aus L-Glutamat und L-Cystein durch die γ -Glutamylcysteinsynthetase unter Verbrauch eines Mol ATP gebildet, wodurch γ -Glutamylcystein entsteht. Die GSH-Synthetase katalysiert die ATP/Mg²⁺-abhängige Bildung von GSH aus γ -Glutamylcystein und Glycin (SNOKE und BLOCH 1952, SNOKE *et al.* 1953, MEISTER 1988). Der erste Syntheseschritt unterliegt einer durch die Thiolgruppe des Glutathions verursachten Feedbackhemmung (RICHMAN und MEISTER 1975).

Der Abbau des Glutathions wird durch die γ -Glutamyltransferase katalysiert. Ein γ -Glutamylrest wird auf einen Akzeptor übertragen. Als Akzeptoren fungieren Aminosäuren, Dipeptide und GSH, in aller Regel ist dies aber Cystein. Die in der

γ -Glutamyltransferasereaktion entstandene γ -Glutamylaminosäure wird durch die γ -Glutamylcyclotransferase in 5-Oxoprolin und die korrespondierende Aminosäure gespalten. Die 5-Oxoprolinase katalysiert dann die Reaktion von 5-Oxoprolin zu Glutamat. Das verbleibende Cysteinylglycin wird durch Dipeptidasen in seine Aminosäurebestandteile überführt (MEISTER 1988).

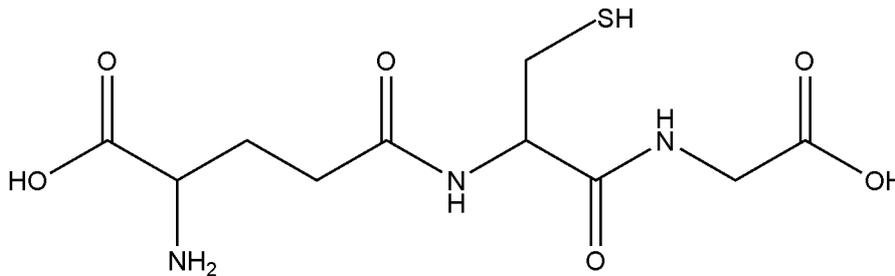


Abbildung 4: Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-Cysteinylglycin)

Der GSH-Transport durch die basolaterale Membran des proximalen Tubulus in der Niere erfolgt als Kotransport in Form des Anions zusammen mit zwei Na^+ -Ionen. Die Transportrate für GSSG beträgt lediglich 20 % von der Transportrate für GSH. Da im Gegensatz zu Cysteinylglycin auch γ -Glutamyl-Verbindungen transportiert werden, wird angenommen, dass der γ -Glutamylrest für diesen Transport wichtig ist (LASH und JONES 1984).

Im Vergleich zu anderen Nagern weist die Leber des Meerschweinchens geringe Glutathionkonzentrationen auf. Ursache dafür ist eine geringe Aktivität der γ -Glutamylcysteinsynthetase und die gleichzeitig hohe Aktivität der γ -Glutamyltransferase (IGARASHI *et al.* 1983). Die γ -Glutamyltransferase ist mit der Plasmamembran der Parenchymzellen der Meerschweinchenleber assoziiert (HUSEBY 1979). Durch histochemische Methoden konnte sowohl bei Ratten als auch bei Meerschweinchen eine kanalikuläre und eine sinusoidale Aktivität nachgewiesen werden (LANÇA und ISRAEL 1991). Das aktive Zentrum des Enzyms ist lumenwärts orientiert (INOUE *et al.* 1983). Die Aktivität des Enzyms beim Meerschweinchen ist etwa um das fünffache höher als bei der Ratte (JÖSCH *et al.* 1998a). Ratte und Maus nehmen unter den Labornagern eine Sonderstellung bezüglich des Leber/Niere-Verhältnisses der γ -Glutamyltransferase-Aktivität ein. Die höchste Aktivität der γ -Glutamyltransferase in der Niere findet sich bei der Ratte, wohingegen das

Meerschweinchen in diesem Organ eine vergleichsweise geringe Aktivität aufweist (STEIN *et al.* 1988). Bei Ratten und Mäusen ist also hauptsächlich die Niere für den Glutathionabbau verantwortlich. Es wird vermutet, dass die Verhältnisse bezüglich der Verteilung des Enzyms beim Menschen eher denen des Meerschweinchens und der Makaken (Javaneraffe) ähneln als denen der Ratten oder der Mäuse (HINCHMAN und BALLATORI 1990, HINCHMAN *et al.* 1991). In der Galle des Meerschweinchens können unter den Thiolen eher GSH-Hydrolyseprodukte, hauptsächlich Cys-Gly und Cys-Gly-Disulfide, als Glutathion selbst in oxidiert oder reduzierter Form nachgewiesen werden (STEIN *et al.* 1988). Es wird ein Recycling der Aminosäurebestandteile angenommen (BALLATORI *et al.* 1988). Als GSH-Konjugat gebundenes Methylquecksilber wird beispielsweise in den Gallengängen des Meerschweinchens zu einem CH₃-Hg-Cystein-Komplex abgebaut und im Gallenwegssystem reabsorbiert. Dieses Recycling trägt maßgeblich zur langen biologischen Halbwertszeit des CH₃-Hg⁺ bei (DUTCZAK und BALLATORI 1992).

2.8. Glutathion S-Transferasen und selenunabhängige Glutathionperoxidase

Die Glutathion S-Transferasen (GST) katalysieren den nukleophilen Angriff des Glutathions auf elektrophile Substrate und sind dadurch ein wichtiger Bestandteil der zellulären Abwehr gegenüber reaktiven Molekülen. Die allgemeine nukleophile Substitutionsreaktion, in der die GST xenobiotische und endogene Nukleophile durch Konjugation mit GSH entgiften, lautet: $\text{GSH} + \text{R-X} \rightarrow \text{GSR} + \text{HX}$ (ARMSTRONG 1997). Bei der Konjugation des CDNB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzol) handelt es sich um eine nukleophile Substitutionsreaktion am aromatischen Ring. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist dabei der Angriff des nukleophilen Glutathions und nicht der des Chloridions als Abgangsgruppe (MORGENSTERN und DEPIERRE 1988). Die zytosolischen GST sind außerdem an der Bildung von Leukotrien C₄ durch Konjugation von Leukotrien A₄ mit Glutathion beteiligt (MANNERVIK *et al.* 1984).

Es handelt sich bei diesen Enzymen um Dimere von 23,5-25 kDa je Untereinheit, welche jeweils eine hydrophile Bindungsstelle für Glutathion und eine hydrophobe für das elektrophile Substrat tragen (OSHINO *et al.* 1990, KAMEI-HAYASHI *et al.* 1993). Die GST sind lösliche Proteine und machen beim Menschen ca. 4% der löslichen Proteinfraction in der Leber aus (VAN BLADEREN 2000).

MANNERVIK *et al.* (1985) nahmen eine Klassifizierung der GST-Isoenzyme nach N-terminaler Aminosäuresequenz und enzymatischen Eigenschaften oder immunochemischen Reaktionen vor. Sie teilten die zytosolischen Isoenzyme in die Klassen alpha-, mu und pi ein. Dimere werden nur von Untereinheiten der gleichen Klasse gebildet. Es gibt zahlreiche Einteilungen, auf die jedoch nicht weiter eingegangen werden soll. Die Literaturstellen, die sich mit der Charakterisierung der Meerschweinchenproteine auseinandersetzen, beziehen sich auf die o. g. Klassifizierung.

Bei der Entgiftung von Xenobiotika wird in Phase I und II unterschieden. In Phase I findet eine Oxidation über das Cytochrom P450-System statt. Das hydrophobe Produkt dieser Reaktion wird in Phase II durch GST-vermittelte Konjugation mit GSH in eine hydrophile Form überführt. Durch enzymatische oder spontane Reaktionen mit GSH können in der Phase II aus Halogenalkanen und -alkenen auch genotoxische oder nephrotoxische S-Konjugate entstehen (OZAWA und GUENGERICH 1983, KOGA *et al.* 1986, ANDERS 2004). *In vitro* durchgeführte Studien zeigten, dass einige Glutathion S-Konjugate die Glutathionreduktase (GR) hemmen können (BILZER 1984). Der Export dieser Substanzen aus der Zelle wird daher ATP/Mg²⁺-abhängig über eine GS-X-Pumpe realisiert (Abb. 5). Dieses Transportsystem weist ein breites Substratspektrum unter den verschiedenen Glutathion S-Konjugaten auf und transportiert daher auch Leukotrien C₄ mit hoher Affinität (ISHIKAWA 1989a, b, KOBAYASHI *et al.* 1990). Über den weiteren Abbau der Konjugate herrscht keine Einigkeit. Es wird ein Interorganprozess angenommen, in dem die S-Konjugate und deren Abbauprodukte durch den sinusoidalen Blutfluss, einen enterohepatischen Kreislauf und aus der Niere in die Zirkulation gelangen. Die Enzyme zum Abbau der S-Konjugate sind in jedem dieser Organe vorhanden. Die Kapazität weist gewisse tierartliche Unterschiede auf (IGARASHI *et al.* 1983, HINCHMAN und BALLATORI 1994, JÖSCH *et al.* 1998a).

Die höchste Aktivität der γ -Glutamyltransferase findet man beim Meerschweinchen auf der kanalikulären Seite, wobei auch die basolaterale Aktivität die der Ratte bei weitem übertrifft. In der Bürstensaummembran des Jejunums, des proximalen Tubulus und in der Leber (sinusoidal und kanalikulär) der Ratte konnte eine membrangebundene Dipeptidase identifiziert werden. Letztere findet sich mit gleicher zellulärer Verteilung auch beim Meerschweinchen. Ihr aktives Zentrum zeigt zum Lumen hin (KOZAK und TATE 1982, MCINTYRE und CURTHOYS 1982, JÖSCH *et al.* 1998a). Diese Dipeptidase

spielt in der Leber offenbar nur eine untergeordnete Rolle. Bei Ratten und Meerschweinchen stellte man fest, dass etwa 95% eines artifiziellen Cysteinylglycin S-Konjugates aus dem Sinus durch eine zytosolische Cysteinylglycin S-Konjugat-Dipeptidase gespalten wird. Dies ist insbesondere beim Meerschweinchen von Bedeutung, da es eine im Vergleich zur Ratte hohe sinusoidale γ -Glutamyltransferaseaktivität hat (JÖSCH *et al.* 1998a). Welcher Transporter dies ermöglicht, ist nicht endgültig erforscht; PepT2 kommt möglicherweise in Betracht (DRINGEN *et al.* 1998, JÖSCH *et al.* 1998b). Das korrespondierende Cystein S-Konjugat wird von der mikrosomalen N-Acetyltransferase in Leber oder Niere zum Mercapturat umgewandelt und aufgrund der resultierenden höheren Polarität und Wasserlöslichkeit (im Vergleich zur Ausgangssubstanz) durch die Zellmembran transportiert und ausgeschieden (Abb. 5) (GREEN und ELCE 1975, HINCHMAN und BALLATORI 1994).

Aus dem Leberzytosol des Meerschweinchens konnten vier Isoenzyme (GST *a*, *b*, *c*, *d*) der Glutathion S-Transferase (GST) isoliert werden. Das beste Substrat für alle Isoenzyme ist CDNB. In der Leber des Meerschweinchens besitzt die GST eine hohe selenunabhängige GPx-Aktivität. Etwa 75% der Gesamt-GPx-Aktivität in der Leber wird vom Isoenzym *a* der GST gestellt. Diese Isoform reagiert nicht mit H_2O_2 , jedoch mit Linolsäurehydroperoxiden, Cumolhydroperoxid (CuOOH), CDNB und im geringen Maße mit *tert*-Butylhydroperoxid. Unter den untersuchten Tierarten (Ratte, Meerschweinchen, Huhn und Kaninchen) hat das Meerschweinchen die höchste GST-Aktivität, wofür eine höhere Substratspezifität gegenüber CDNB ursächlich sein kann. In der Gruppe der Säugetiere ist jedoch die geringe Aktivität der Ratte anscheinend die eigentliche Ausnahme (OSHINO *et al.* 1990). In der Meerschweinchenleber wird das Potential des Selens nicht zur Reduktion organischer Hydroperoxide genutzt, wie dies bei der Ratte der Fall ist, vielmehr übernimmt diese Funktion die der Klasse alpha zugehörige GST *a* (KAMEI-HAYASHI *et al.* 1993).

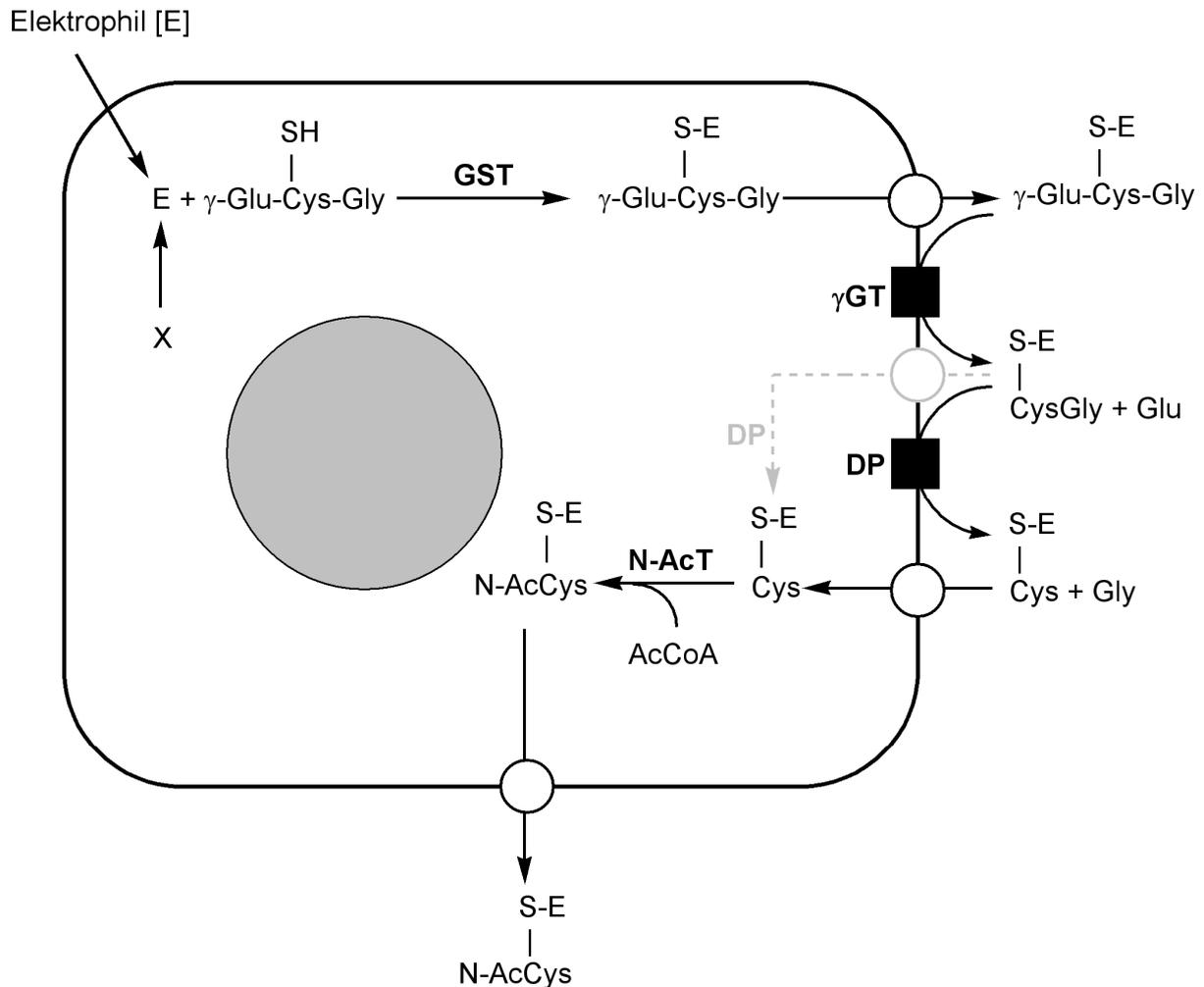


Abbildung 5: Bildung und Abbau der Glutathion-S-Konjugate in der Leber: Elektrophile (E) bzw. reaktive Verbindungen aus dem Stoffwechsel (X) reagieren spontan oder enzymatisch, letzteres katalysiert durch die Glutathion S-Transferase (GST), mit Glutathion (γ -Glu-Cys-Gly). Die resultierenden S-Konjugate werden durch die GS-X-Pumpe aus der Zelle in die Gallenkanälchen oder den sinusoidalen Raum transportiert, wo die γ -Glutamyltransferase (γ GT) und eine Dipeptidase die schrittweise Hydrolyse katalysieren. Das Cystein S-Konjugat wird zurück in die Zelle transportiert und durch die N-Acetyltransferase (N-AcT) aktiviert. Die daraus resultierende Erhöhung der Polarität und Wasserlöslichkeit ermöglicht eine renale Ausscheidung des N-Acetylcystein S-Konjugats (nach HINCHMAN und BALLATORI 1994). Die gestrichelte Linie weist einen alternativen Weg für Cysteinylglycin S-Konjugate über eine zytosolische Dipeptidase in der Leber auf (nach JÖSCH et al. 1998a).

Die GST α der Ratte weist ebenfalls eine GPx-Aktivität auf, welche etwa 50% zur GPx-Aktivität gegen PCOOH beisteuert. Die Reihenfolge, in der die GST α der Ratte zur GPx-Aktivität gegen PCOOH innerhalb der unterschiedlichen Gewebe beiträgt, ist

Leber > Niere > Testes > Pankreas, Gehirn, Lunge > Herz. Eine ähnliche Reihenfolge lässt sich mit Cumolhydroperoxid als Substrat feststellen. Da die GST-Proteine 3-5% der Gesamtmenge an löslichem Protein in Säugetierlebern ausmachen und ein Großteil davon der GST α zugeschrieben werden kann, kompensiert diese Menge die verhältnismäßig geringe katalytische Aktivität gegen Phospholipidhydroperoxide. Der GST wird eine Schutzfunktion bei oxidativem Stress zugesprochen, weil sie durch Reduktion der Phospholipidhydroperoxide die autokatalytische Kettenreaktion bei der Lipidoxidation unterbricht (YANG *et al.* 2002).

SHREVE *et al.* (1979) versuchten, ein Enzym, das mit Lipidhydroperoxiden (LOOH) reagiert, nach einer ^{75}Se -Injektion aus dem Leberzytosol eines Meerschweinchens zu isolieren. Das Enzym mit der Aktivität gegen Linolsäurehydroperoxide wies hierbei ein Molekulargewicht von 45 kDa auf. Eine Reaktion fand mit Progesteron-17-Hydroperoxid, Cumolhydroperoxid und *tert*-Butylhydroperoxid als Substrat statt und überschneidet sich mit der Glutathion *S*-Transferase-Aktivität. Die Rangordnung der Aktivitäten gegen die einzelnen Substrate war CuOOH, LOOH und *tert*-Butylhydroperoxid. Nur ein geringer Anteil des ^{75}Se wurde in die Linolsäurehydroperoxid-reduzierende Peroxidase eingebaut. Hieraus schließen die Autoren, dass es sich nicht um ein Selenoenzym handelt und dass Meerschweinchen, anders als Ratten, keinen alimentären Selenbedarf haben. Es wird nicht ausgeschlossen, dass es sich bei dem isolierten Enzym um eine Eigenschaft der Glutathion *S*-Transferase handelt. IRWIN *et al.* (1980) vermuten, dass es sich bei der selenunabhängigen GPx-Aktivität und der GST-Aktivität im Cytosol der Leber des Meerschweinchens um eine Eigenschaft desselben Proteins handelt.

Die mikrosomale GST I ist ein membrangebundenes Homotrimer und weist keine Sequenzhomologie zum zytosolischen Enzym auf. Vielmehr ähnelt diese GST der Leukotrien-C₄-Synthetase und der mikrosomalen GST II (WEINANDER *et al.* 1996). Letztere zeigt, zusammen mit der Leukotrien-C₄-Synthetase, deutliche Sequenzhomologien zur 5-Lipoxygenase (ARMSTRONG 1997). Die mikrosomale GST I weist neben einer ähnlichen Größe die gleiche Anzahl an hydrophoben Regionen und die Fähigkeit, Fettsäuren zu binden, auf (WEINANDER *et al.* 1996). Durch Untersuchungen gereinigter mikrosomaler GST I aus der Leber der Ratte konnte eine hohe Aktivität gegenüber CDNB und eine vergleichsweise niedrige Aktivität gegenüber CuOOH nachgewiesen werden. Sie ist bei der Entgiftung polyhalogener

Kohlenwasserstoffe anscheinend effizienter als das zytosolische Isoenzym. Lokalisiert ist das Enzym in der äußeren Mitochondrienmembran und der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Diese Lokalisierung ermöglicht den Schutz der Membranen vor Lipidperoxidation und deren toxischen Zwischenprodukten sowie vor der Anreicherung lipophiler Xenobiotika (MORGENSTERN und DEPIERRE 1988, MOSIALOU und MORGENSTERN 1989).

Im Selenmangel konnte eine Steigerung der Glutathion S-Transferase-Aktivität in Leber, Niere und Duodenum der Ratte gezeigt werden. Eine Kompensation des mangelbedingten Abfalls der SeGPx-Aktivität durch die GST wurde angenommen (LAWRENCE *et al.* 1978, MASUKAWA *et al.* 1984, CHRISTENSEN *et al.* 1994, MATSUDA *et al.* 1998). In der Niere von Ratten konnte ein Anstieg der GST-Aktivität während eines Selenmangels beobachtet werden, der jedoch statistisch nicht signifikant war (MCCOY *et al.* 1988). Bei Ratten führt ein Selenmangel zum Anstieg der GST-Aktivität und der mRNA-Menge der alpha- und mu-Klasse. Anhand von weiteren Studien mit PTU konnte abgeleitet werden, dass die Expression der GST scheinbar zumindest teilweise der Kontrolle der Schilddrüsenhormone unterliegt (BECKETT *et al.* 1992).

Durch Eisenüberladung bei gleichzeitigem Se/Vitamin E-Mangel konnte ein Anstieg der selenunabhängigen GPx-Aktivität bei Ratten beobachtet werden (REFFETT *et al.* 1986). Bei Lämmern löste eine Eisenüberladung bei adäquater Selen und Vitamin E-Versorgung ebenfalls einen Anstieg der non-SeGPx-Aktivität neben einem Abfall der SeGPx-Aktivität aus (LEE *et al.* 1981). Die Arbeitsgruppen vermuten eine kompensatorische Aufgabe der non-SeGPx beim Abfall der SeGPx, wenn ein Gewebe oxidativem Stress unterliegt (LEE *et al.* 1981, MASUKAWA *et al.* 1984, REFFETT *et al.* 1986).

2.9. Glutathionreduktase

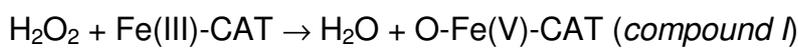
Die Glutathionreduktase (GR) katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von oxidiertem Glutathion (GSSG) und ist somit für die Funktion der GPx und der GST essentiell. Das homodimere Flavoenzym hat ein Molekulargewicht von 125 kDa und weist ein pH-Optimum von etwa 7,0 mit dem Substrat NADPH auf (CARLBERG und MANNERVIK 1975). Eine fünfminütige Erhitzung auf 56 °C führt zu einer Aktivitätsminderung von 50%. Unter den Labornagern weist das Meerschweinchen nach Hamster und Kaninchen eine mittlere, im Vergleich zur Ratte erheblich höhere GR-Aktivität im Plasma auf. Die Aktivität in den Erythrozyten ist etwa vergleichbar mit

der Ratte, jedoch erheblich niedriger als beim Kaninchen (MANSO und WRÓBLEWSKI 1958). Andere Studien zeigen eine hohe GR-Aktivität in den Erythrozyten des Meerschweinchens, insbesondere im Vergleich zur Ratte (LANKISCH *et al.* 1973).

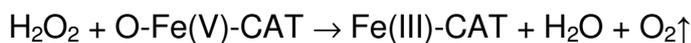
2.10. Katalase

Die Katalase hat ein Molekulargewicht von 240 kDa und besteht aus vier Untereinheiten (Homotetramer), die jeweils als aktives Zentrum eine Fe³⁺-Protoporphyrinringgruppe aufweisen. Das Enzym besitzt zwei Aktivitäten, die katalytische und die peroxidative, mit unterschiedlichen kinetischen Charakteristika (DEISSEROTH und DOUNCE 1970, CHANCE *et al.* 1979). Während die kritische H₂O₂-Konzentration für die Funktion der cGPx in Erythrozyten aus dem Humanblut bei 3 x 10⁻⁶ M liegt (COHEN und HOCHSTEIN 1963), setzt die katalytische Reaktion der Katalase H₂O₂-Konzentrationen ≥10⁻⁴ M voraus. Die peroxidative Aktivität kommt hauptsächlich bei niedrigen H₂O₂- oder bei hohen Ethanol-Konzentrationen zum Tragen (DEISSEROTH und DOUNCE 1970, CHANCE *et al.* 1979).

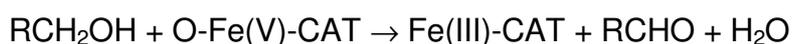
1) Oxidation des Enzyms durch H₂O₂:



2a) katalytische Aktivität:



2b) peroxidative Aktivität:



R = Alkyl-, Arylrest

Die Katalase wird durch Superoxidradikale (O₂⁻) aus der Xanthinoxidasereaktion gehemmt. Diese Hemmung erfolgt auf zwei möglichen Wegen. Eine schnelle Inaktivierung erfolgt durch die Reaktion des O₂⁻ mit der nativen Katalase. Diese Reduktion des Eisens im aktiven Zentrum führt zur inaktiven Form (*Compound III*, Fe(II)). Die zweite, weitaus langsamere Hemmung erfolgt durch eine Reaktion des O₂⁻ mit *Compound I*. Dies führt zur inaktiven *Compound II* (Fe(IV)---O₂). Möglicherweise findet eine weitere Reduktion mit O₂⁻ statt, die wiederum zum trivalenten nativen Enzym führt. Beide Inaktivierungen können durch die Superoxiddismutase verhindert werden (KONO und FRIDOVICH 1982). Die hauptsächliche Quelle des H₂O₂ in den kernlosen Erythrozyten ist die Autoxidation des Hämoglobins zu Methämoglobin und

dem Superoxidanion. In den Erythrozyten ist die cGPx für die quantitativ bedeutsame H_2O_2 -Entgiftung zuständig (COHEN und HOCHSTEIN 1963, GIULIVI *et al.* 1994).

Die Katalase ist die Hauptkomponente in den Peroxisomen von Rattenhepatozyten, daneben finden sich die Uricase und die D-Aminooxidasen in diesen Organellen (BAUDHUIN *et al.* 1965). Während die Katalase in den Hepatozyten der Ratte ausschließlich peroxisomal lokalisiert ist, findet sich dieses Enzym in den Leberzellen des Meerschweinchens zusätzlich in Zytoplasma und Zellkern (ROELS 1976a, YAMAMOTO *et al.* 1988). Die Aktivität der in den Peroxisomen ansässigen Katalase ist bei beiden Tierarten vergleichbar. Die zytoplasmatische Aktivität des Meerschweinchens ist so hoch (80%), dass die Gesamtaktivität im Homogenat des Meerschweinchens etwa dreimal so hoch ist wie die der Ratte. Immunozytochemische Anfärbungen bestätigten diese Ergebnisse, wobei sich diese extraperoxisomale Lokalisierung nur in den Parenchymzellen der Leber finden ließ (YAMAMOTO *et al.* 1988). In einer nachfolgenden Studie dieser Arbeitsgruppe konnten 50-60% der Aktivität im Homogenat der zytoplasmatischen Aktivität zugeschrieben werden. Es wurde des Weiteren festgestellt, dass es sich bei der peroxisomalen und der zytoplasmatischen Katalase um zwei unterschiedliche Proteine handelt (BULITTA *et al.* 1996). Neben dem Meerschweinchen weist auch das Schaf eine etwa vergleichbar hohe Katalaseaktivität auf (AEBI *et al.* 1957, HOLMES und MASTERS 1972). Cytochemische Methoden machten auch beim Schaf eine extraperoxisomale Katalase in den Hepatozyten sichtbar (ROELS 1976b).

Während eines Selenmangels soll die Katalase eine kompensatorische Rolle übernehmen. Bei Ratten wurde ein Anstieg der Katalaseaktivität jedoch nur in Verbindung mit Eisenüberladung und gleichzeitig kombiniertem Selen- und Vitamin E-Mangel beobachtet. Ein alleiniger Einfluss eines Selenmangels bei hoher Eisenzufuhr konnte nicht beobachtet werden (LEE *et al.* 1981). In einer anderen Selenmangelstudie bei Ratten konnte jedoch nach dreimonatiger Versuchsperiode ein Anstieg des Katalasegehalts im Leberhomogenat verzeichnet werden (BURK *et al.* 1978).

2.11. Vitamin E

Natürliche Verbindungen, die eine Vitamin E-Aktivität aufweisen, sind Derivate des 6-Chromanols mit einer gesättigten bzw. dreifach ungesättigten (Trienole) Seitenkette am C2-Atom. Die verschiedenen Verbindungen werden durch Anzahl und Position der Methylgruppen am Chromanolringsystem in α , β , γ und δ unterteilt. Vitamin E ist

Bestandteil der Membranen und wirkt dort als antioxidativer Schutz der Membranlipide. Dabei kann die phenolische Hydroxylgruppe des Vitamin E ein H abgeben und so die Radikalkette unterbrechen. Das entstandene Vitamin E-Radikal ist weniger reaktiv und kann durch Ascorbinsäure in den Ursprungszustand überführt werden (PACKER *et al.* 1979) (Abb. 6). Des Weiteren beeinflusst Vitamin E die Expression apoptotischer, inflammatorischer und proliferativer Gene (RIMBACH *et al.* 2002). Neben seiner antioxidativen Eigenschaft wirkt es beispielsweise hemmend auf die Proteinkinase C α -vermittelte Collagenaseaktivität und reduziert so den Collagenabbau während der Hautalterung (RICCIARELLI *et al.* 1999).

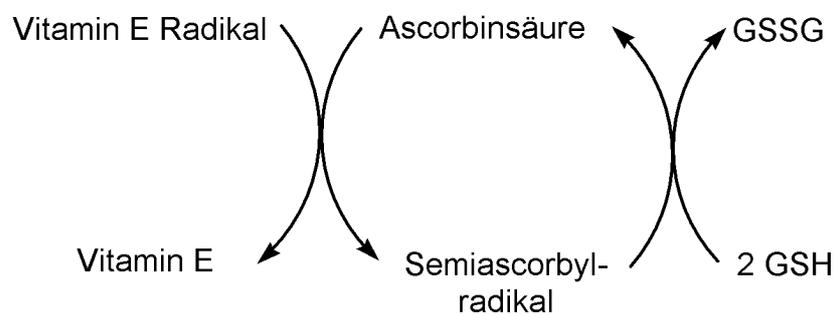


Abbildung 6: Vitamin E-Recycling über die Ascorbinsäure und deren Regeneration über den Glutathionstoffwechsel

Das NRC (1995) leitete den Vitamin E-Bedarf des Meerschweinchens aus einer Studie zum Einfluss des Zinkmangels auf die Knochenbildung in Alveolarimplantaten (HSIEH und NAVIA 1980) ab. Die dort verwendeten 40 IE/kg FM führten in der Vergangenheit nicht zum Vitamin E-Mangel beim Meerschweinchen. Gleichzeitig werden vom NRC 1,33-4,0 g essentielle Fettsäuren, 200 mg Vitamin C und 150 μ g Selen/kg FM, letzteres vom Bedarf der Ratte abgeleitet, empfohlen.

Während eines Vitamin E-Mangels konnten beim Meerschweinchen Myopathien bei 67 % nach zwei und bei 100 % der Tiere nach drei Monaten beobachtet werden. Des Weiteren traten nach 3 Monaten Hodendegenerationen auf. Die Autoren konnten auch beim Meerschweinchen einen labilen und einen fixen Vitamin E-Pool aufzeigen. Die Konzentration des α -Tocopherols im Fettgewebe war nahezu unverändert und spiegelt den fixen Pool wider, wohingegen die Halbwertszeit in Plasma und Leber weniger als eine Woche betrug (labiler Pool). Die Depletion kam dann in eine zweite Phase, in der die Halbwertszeit mehr als 7 Wochen betrug (MACHLIN *et al.* 1979).

Bei entwöhnten Meerschweinchen konnten durch das Verabreichen eines Vitamin E-defizienten Futters über 135 Tagen kaum Mangelsymptome festgestellt werden. Erst in Kombination mit einem Vitamin C- oder Selenmangel traten sehr schwere Erkrankungsbilder zu Tage. In der Studie zum kombinierten Vitamin E/Selen-Mangel verstarb das letzte Tier an Tag 55 der ursprünglich auf 135 Tage angelegten Studie. Kennzeichnend waren Myopathien des *M. quadriceps* und der gestreiften Muskulatur von Ösophagus und Bauchdecke (HILL *et al.* 2001). In der darauf folgenden Studie zum kombinierten Vitamin C/E-Mangel erhielten die Meerschweinchen zunächst eine Vitamin E-Mangeldiät für 14 Tage, bevor zum Versuchsstart auch Vitamin C aus den Diäten eliminiert wurde. Von den 21 Tieren der Vitamin C/E-Mangelgruppe starben acht Tiere nach 9 (\pm 2) Tagen, und 8 Tiere bekamen Paralysen und wurden nach 11 (\pm 3) Tagen getötet. Nur ein Tier mit Paralysen, das am 13ten Tag getötet wurde, zeigte Anzeichen von Skorbut. Die verbliebenen Tiere wurden nach drei Wochen getötet und hatten alle Skorbutsymptome. Der Zeitraum zwischen den ersten Lähmungen der Hintergliedmaßen bis zum Tod betrug lediglich 12 Stunden. Da diese Paralysen im Vitamin E- oder C-Mangel alleine nicht auftreten, handelt es sich um ein Krankheitsbild des kombinierten Mangels. Dies zeigt deutlich, dass beide Vitamine *in vivo* miteinander interagieren (HILL *et al.* 2003). Der in beiden Studien hervorgerufene alleinige Vitamin E-Mangel führte lediglich zu einer geringgradigen Muskelschädigung. Eine erhöhte Lipidperoxidation konnte nach 37 Tagen nur im Muskel festgestellt werden (HILL *et al.* 2001, 2003). Deutliche degenerative Veränderungen nekrotischen und apoptotischen Ursprungs im ZNS konnten als Ursache der Paralysen bei allen bis auf ein Tier nachgewiesen werden. Diese Läsionen werden vermutlich durch Schädigungen der Blutgefäße initiiert (BURK *et al.* 2006b).

An Hepatozyten, die aus Vitamin E-defizienten Ratten isoliert wurden, konnte eine geringe Widerstandskraft gegenüber oxidativem Stress festgestellt werden. Die resultierende Lipidperoxidation konnte durch andere antioxidative Schutzmechanismen nicht verhindert werden (HILL und BURK 1982).

Eine chronisch erhöhte Dosis von >150 IU Vitamin E pro Tag erhöht die Mortalität, wie in einer Metastudie abgeleitet werden konnte (MILLER *et al.* 2005).

2.12. Vitamin C

Meerschweinchen zeigen aufgrund mehrerer Mutationen im L-Gulonolactonoxidase-Gen keine Expression des Schlüsselenzyms der Ascorbinsäuresynthese

Vitamin C ist Cofaktor zahlreicher Enzyme, die hauptsächlich Hydroxylierungsreaktionen katalysieren. Dadurch ist es an Synthese oder Stoffwechsel von Kollagen, Hormonen (Noradrenalinsynthese, Amidierungsreaktionen), Carnitin (Biosynthese) und Aminosäuren (Tyrosinkatabolismus, Amidierungsreaktionen) beteiligt. Die meisten dieser Enzyme besitzen ein Eisenatom, welches durch Ascorbat in seiner aktiven Fe^{2+} -Form gehalten wird. Vitamin C hat also die Rolle eines reduzierenden Cofaktors inne (ENGLARD und SEIFTER 1986) und einen stimulierenden Effekt auf das Ferroenzym Glycerol-3-Phosphatdehydrogenase (JUNG und WELLS 1997). Da die Insulinsekretion durch die ATP-Bildung in Glykolyse und Citratzyklus vermittelt wird, führt ein Vitamin C-Mangel beim Meerschweinchen in den β -Zellen des Pankreas zur verminderten Antwort auf eine Glucoseaufnahme (WELLS *et al.* 1995, JUNG und WELLS 1997). Ein negativer Einfluss einer inadäquaten Vitamin C-Versorgung auf die pGPx-Aktivität (POOVAIAH *et al.* 1987) und den Cytochrom P450-Gehalt in den Mikrosomen der Leber konnte ebenfalls nachgewiesen werden (HOLLOWAY und RIVERS 1984). Ascorbinsäure im Futter hat zwar keinen Einfluss auf die Seleneinlagerung in Erythrozyten und Lebergewebe des Meerschweinchens, jedoch stieg die pGPx-Aktivität proportional zur Ascorbinsäurezufuhr an (POOVAIAH *et al.* 1987). Ascorbinsäure ist in der Lage, Selenit sehr schnell zu elementarem Selen zu reduzieren. Diese Reaktion findet mit Selenat weitaus langsamer statt (GANTHER 1979).

Die Mangelsymptome beim Menschen sind folliculäre Keratosen, Blutungen, Müdigkeit, Muskelschmerzen, Gelenkschwellungen, Schwellungen und Blutungen des Zahnfleisches und periphere Ödeme (HODGES *et al.* 1971).

Zu Vitamin C-Megadosen und deren möglichen prooxidativen Wirkungen im Zusammenspiel mit Eisen gibt es widersprüchliche Studien. Bei einer täglichen Eisen- und Vitamin C-Aufnahme, die in den Bereichen der RDA liegen, konnte beim Menschen im Vollblut keine Beeinflussung der oxidativen DNA-Schädigungsparameter festgestellt werden (PROTEGGENTE *et al.* 2001).

3. Experimenteller Teil

3.1. Zielsetzung und Versuchsplan

Zielsetzung dieser Studie war es, den Selenbedarf des Meerschweinchens zu ermitteln. Hierzu wurden 42 männliche Dunkin Hartley Meerschweinchen mit einem selenarmen Mischfutter mit reduziertem, aber für das Wachstum ausreichendem Vitamin C-Gehalt gefüttert, das ansonsten den Anforderungen des NRC (1995) für wachsende Tiere entsprach. Während des 10-wöchigen Versuchs wurden Futteraufnahme, Wachstum und Futterverwertung dokumentiert. Zur Ableitung des Selenbedarfs wurden die Aktivitäten ausgewählter Selenoenzyme, Parameter des antioxidativen Stoffwechsels und der Selengehalt in ausgewählten Organen bestimmt.

3.2. Konzeption des Versuchsfutters

Das Versuchsfutter wurde als Mischfuttermittel auf der Basis selenarmen Weizens und Torulahefe konzipiert (Tabelle 4). Die 42 Meerschweinchen wurden in sechs Versuchsgruppen à sieben Tiere eingeteilt und erhielten das selenarme Basisfutter oder dieses mit Selenzulagen von 0,05 bis 0,25 mg/kg FM (Tabelle 3). Mineralstoffe, Vitamine und Selen (als Na_2SeO_4 , wasserfrei) wurden in Form von Vormischungen auf Maisstärkebasis eingemischt. Selenat wurde gewählt, weil es anders als Selenit kein freies Elektronenpaar besitzt, welches zur Oxidation anderer Futterbestandteile beitragen könnte (SUNDE 1997). Eine zusätzliche Ausgangsgruppe à 7 Tiere wurde vor Versuchsbeginn getötet.

Tabelle 3: Selenzulagen zum selenarmen Basismischfuttermittel und Einteilung der Versuchsgruppen

Gruppe	mg Se-Zulage/kg FM
I	0,00
II	0,05
III	0,10
IV	0,15
V	0,20
VI	0,25

Tabelle 4: Zusammensetzung des selenarmen Basismischfuttermittels

Komponente	g/kg FM
Weizen	550,0
Torulahefe ^a	200,0
Cellulose ^b	140,0
Sojaöl ^c	20,0
Kokosfett	20,0
Maisstärke	39,7
Mineralstoffe ^d	15,8
Vitamine ^e	0,4
Aminosäuren ^f	10,5
Cholinchlorid 50%	3,6
Summe	1000

^aAttisholz *Torula utilis* Hefe, Cellulose Attisholz, Luterbach, Schweiz

^bARBOCEL[®] BWW 40, Rettenmaier & Söhne, Rosenberg, Deutschland

^cAnalysierter nativer Vitamin E-Gehalt pro kg FM: 122 mg α -Tocopherol, 340 mg γ -Tocopherol¹

^dMineralstoffe pro kg FM: 14,5 g CaCO₃, 1,15 g NaCl, 16,5 mg CuSO₄·5 H₂O, 123,0 mg MnSO₄·xH₂O, 0,196 mg KI, 0,276 mg H₂₄Mo₇N₆O₂₄·4H₂O

^eVitamine pro kg FM: 1,60 mg Thiamin (als Thiaminmononitrat (min. 98 %)), 2,02 mg Pyridoxin (als Pyridoxinhydrochlorid (min. 99 %)), 6,00 mg Folsäure (80 %), 0,20 mg Biotin (als D-(+)-Biotin (min. 2 %)), 20 mg Pantothenensäure (als Calcium-D-Pantothenat (min. 98 %)), 0,025 mg Cholecalciferol (min. 500.000 IU/g), 3 mg Vitamin K (als Menadionnatriumbisulfid (min. 51,5 %)), 7,55 mg Retinol (als *all-trans*-Retinylacetat (min. 500.000 IU/g)), 20,0 mg α -Tocopherol (als *all-rac*- α -Tocopherylacetat (min. 50 %)), 100 mg Ascorbinsäure (als Na,Ca-Ascorbyl-2-Phosphat (min. 35 %))

^fAminosäuren pro kg FM: 3,5 g Arginin, 3,0 g Phenylalanin, 3,0 g Methionin, 0,5 g Histidin, 0,5 g Tryptophan

Der Vitamin C-Gehalt von 100 mg/kg FM wurde auf Grundlage der Ergebnisse von BERGER *et al.* (1989) entgegen den Empfehlungen des National Research Council (NRC 1995) von 200 mg/kg FM festgelegt. Dabei wurden zu den dort verwendeten 90 mg/kg FM 10 mg als kalkulierter wärmebedingter Pelletierungsverlust addiert. Bei dieser Menge traten keine Fälle von Skorbut auf, und die Tiere wiesen, im Vergleich zu höher supplementierten Gruppen, gleiche Gewichtsentwicklungen auf. Eine Gewebssättigung in den untersuchten Organen konnte bei dieser Konzentration in keinem der untersuchten Organe festgestellt werden. Eine Sättigung wäre im Hinblick

¹ 1 mg RRR- α -Tocopherol = 4 mg RRR- γ -Tocopherol = 1,49 mg *all-rac*- α -Tocopherylacetat

auf die synergistischen Effekte von Vitamin C und E ein eventueller Störfaktor bei der Ableitung des Selenbedarfs gewesen und war daher nicht erwünscht. In der Studie von BERGER *et al.* (1989) konnten bei 50 % der Versuchstiere, die eine Diät mit nur 27 mg Ascorbinsäure/kg Futtermittel erhielten, Anzeichen von Skorbut wahrgenommen werden. KINOSHITA *et al.* (1996) konnten bei einer Zulage von 50 mg/L zum Trinkwasser keine Veränderungen innerhalb zootechnischer Parameter gegenüber einer Versuchsgruppe feststellen, die mit 500 mg/L versorgt wurde.

Als Vitamin-C-Quelle wurde ROVIMIX® STAY-C® 35 der Firma F. Hoffmann-La Roche Ltd. verwendet. Es handelt sich dabei vorwiegend um L-Ascorbinsäuremonophosphat, das gegenüber oxidativen Einflüssen verhältnismäßig inert ist. Bei Pelletierungstemperaturen von 85 °C sollen Verluste von maximal 10 % auftreten, diese Temperaturen wurden nicht erreicht. Das Futter wurde im Großraummischer gemischt, anschließend pelletiert und bei 4 °C flach ausgestrichen, um eine schnellstmögliche Abkühlung zu gewährleisten und so temperaturbedingten Vitaminverlusten vorzubeugen. Das Futter wurde unter Stickstoffatmosphäre bei -20 °C gelagert und nach portionsweiser Entnahme erneut begast.

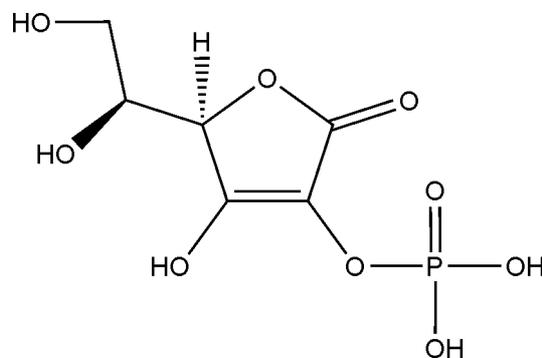


Abbildung 8: L-Ascorbinsäuremonophosphat

Die Empfehlungen des NRC (1995) betragen für Vitamin E 26,7 mg/kg FM für Meerschweinchen. ROJAS *et al.* (1996) konnten in einer Studie über den Einfluss unterschiedlicher Vitamin E-Zulagen auf die Glutathion-Redox-Rate, gesamte antioxidative Kapazität und Lipidperoxidation im Herzgewebe keine Veränderungen bezüglich Wachstumsrate, Futteraufnahme und Aktivität antioxidativer Enzyme bei einer Vitamin E-Zulage von nur 15 mg/kg Futter feststellen. Die Veränderungen bei der GSH:GSSG-Rate und das Ausmaß der Lipidperoxidation jedoch waren signifikant. Der

Vitamin C-Gehalt des Futtermittels betrug 660 mg/kg FM und lag somit um mehr als das Dreifache über den Empfehlungen des NRC. Die Empfehlungen des NRC für Vitamin E entstammen einer Zinkmangelstudie, in der keine Untersuchungen auf einen Vitamin E-Mangel vorgenommen wurden (HSIEH und NAVIA 1980). Die Angaben über den Vitamin C-Gehalt in deren Versuchsfutter beziehen sich lediglich auf zugesetzte Mengen, nicht auf Futtermittelanalysen. Zusätzlich zu den 2 g Vitamin C/kg FM wurde dem Trinkwasser 0,5 g Vitamin C/L zugefügt.

Eine untere Grenze für die Vitamin E-Zufuhr aus Literaturquellen zu entnehmen, bei der ein großer Einfluss auf das antioxidative Schutzsystem nicht zu erwarten wäre, erwies sich aus o. g. exemplarisch aufgeführten Gründen als äußerst schwierig. Die zum nativen Gehalt von etwa 6 mg α -Tocopherol/kg zugesetzten 20 mg α -Tocopherol/kg FM sollten den NRC-Empfehlungen (1995) entsprechen und v. a. einen kombinierten Selen- und Vitamin E-Mangel verhindern. Dieser von HILL *et al.* (2001) untersuchte kombinierte Mangelzustand wirkte beim Meerschweinchen ab dem dreißigsten Tag letal. Der Zusatz zu den in vorliegender Arbeit verwendeten Versuchsfuttern erfolgte als *all-rac- α -Tocopherylacetat* (ROVIMIX E50, Firma F. Hoffmann-La Roche Ltd).

3.3. Versuchstierhaltung

Die Meerschweinchen wurden je Gruppe jeweils 3-mal paarweise bzw. ein Tier in Einzelhaltung in Kaninchenkäfigen aus Edelstahl bei 22-23,4 °C und 50-60 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Das jeweilige Versuchsfutter wurde ab dem ersten Tag *ad libitum* gereicht und ohne Umstellungsprobleme sofort gefressen. Dennoch war nach wenigen Tagen eine teilweise Futter- und Wasserverweigerung zu verzeichnen, die zu Gewichtsverlusten führte. Ab Tag zehn des Versuchsplanes wurden daher 3 g Heu/Tier/Tag zugefüttert. Die Futteraufnahme stieg daraufhin erheblich an. Ab Tag 27 begann eine siebentägige Umstellung auf Stroh (ebenfalls 3 g/Tier/Tag). Das Futter wurde dreimal pro Woche frisch eingewogen und Reste aus den Futterspendern zurückgewogen. Destilliertes Wasser wurde in Nippeltränken täglich frisch angeboten.

Die Tiere wurden wöchentlich morgens ohne Nüchterung gewogen. Dies führt zu ungenaueren Ergebnissen in der Gewichtszunahme, verhindert aber Verdauungsprobleme aufgrund des Futterentzugs.

3.4. Probengewinnung

Die Tiere wurden nach der zehnwöchigen Versuchsperiode in zufälliger Reihenfolge durch Dekapitation nach vorheriger CO₂-Betäubung getötet. Das Blut wurde heparinisiert und zur Hämatokrit- und Hämoglobinbestimmung sofort weiterverarbeitet. Das Plasma wurde abzentrifugiert (15 Minuten bei 2540 x g) und bei -80 °C eingefroren. Der verbleibende Anteil wurde mit einem Teil H₂O versetzt und nach Zentrifugation (15 Minuten bei 4300 x g) als Hämolysat eingefroren. Als Muskelgewebe wurde grobsichtig das Muskelpaket der rechten Hinterlaufrückseite entnommen. Die Organe und Gewebe wurden ebenfalls bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

3.5. Material und Methoden

3.5.1. Weender Analyse des Versuchsfutters

Die Bestimmung von Trockenmasse, Rohasche, Rohprotein, Rohfett und Rohfaser wurde nach dem Methodenhandbuch des Verbands deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA) (1997) durchgeführt. Die Angabe der jeweiligen Parameter erfolgt in Prozent.

3.5.1.1. Trockenmasse

Zur Bestimmung der Trockenmasse wurden die Proben in vorgetrockneten Gefäßen eingewogen, bei 130 °C im Trockenschrank für 4 Stunden getrocknet, verschlossen im Exsikkator abgekühlt und zurückgewogen (VDLUFA 3.1).

3.5.1.2. Rohasche

Die Futterproben wurden in vorgeglühten Tiegel eingewogen und im Muffelofen bei 550 °C über Nacht verascht. Die Tiegel wurden im Exsikkator abgekühlt und zurückgewogen (VDLUFA 8.1).

3.5.1.3. Rohprotein

Die Bestimmung des Rohproteingehalts erfolgte über den nach Dumas ermittelten Stickstoffgehalt der Futterproben (VDLUFA 4.1.2). Die Probe (0,25 g) wurde in einem Tiegel eingewogen und unter O₂-Zufuhr bei 900 °C verbrannt (Vario MAX CN, Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Deutschland). Bei dieser Technik werden die Verbrennungsgase mittels Helium als Trägergas zum Reduktionsofen transportiert und mit Wolfram zu N₂ reduziert. Die quantitative N-Bestimmung findet mittels Wärmeleitfähigkeitsdetektor statt, nachdem andere Gase als Störquelle beseitigt

wurden. Aus dem prozentualen N-Gehalt wird mit dem Faktor 6,25 der Rohproteingehalt [%] der Proben berechnet.

3.5.1.4. Rohfett

Die eingewogene Futtermittelprobe wurde mit Salzsäure gekocht und abfiltriert. Zur Fettextraktion wurde der Rückstand in einen Überlaufkolben nach dem Prinzip einer Soxhlet-Henkel-Apparatur eingewogen und mit *n*-Hexan gekocht. Die Hexan-Fettlösung läuft vollständig in einen zweiten Kolben über. Das Hexan tritt in die gasförmige Phase über und kondensiert über einen Rücklaufkühler in den Kolben 1. Dieser Vorgang wiederholt sich so oft, bis das Fett vollständig aus dem Kolben 1 extrahiert ist. Nach dem Abdampfen des Hexans wird der Fettrückstand in Kolben 2 zurückgewogen (BASSLER und PUTZKA 1984, VDLUFA 5.1.1b).

3.5.1.5. Rohfaser

Die Rohfaser wurde nach VDLUFA 6.1.3 bestimmt. Die Probe wurde zunächst mit Schwefelsäure gekocht und über Aluminiumoxidwatte abfiltriert. Dieser Vorgang wurde mit Kalilauge wiederholt. Der Rückstand wurde jeweils einige Male mit heißem Wasser nachgewaschen. Der im Aluminiumoxid befindliche Rückstand wurde mit Aceton nachgewaschen, bei 140 °C getrocknet, im Exsikkator abgekühlt und gewogen, bevor er für zwei Stunden bei 700 °C verascht wurde. Der Masseverlust ist durch die veraschte Rohfaser bedingt.

3.5.2. Bruttoenergie des Versuchsfutters

Die Bruttoenergie des Versuchsfutters wurde mit einem nach dem adiabatischen Prinzip funktionierenden Bombenkalorimeter (IKA®-Kalorimeter C400 adiabatisch) bestimmt.

3.5.3. Selenkonzentration des Versuchsfutters und ausgewählter Gewebe

Die Selenkonzentration in Versuchsfutter, Leber, Testes, Gehirn, Muskel, Milz, Plasma und Hämolysat wurde mittels Atomabsorptionsspektrometrie (Flammen-AAS) (Thermo S2 AA Systems) bestimmt. 0,6 g des Futters und 0,6-1,8 g von Plasma, Hämolysat und den unterschiedlichen Geweben wurden in einem säureresistenten Teflongefäß in einem Mikrowellengerät (MLS 1200 mega) verdaut, nachdem 3 mL 65 %ige HNO₃ und 1 mL 30 %iges H₂O₂ hinzugegeben wurden. In diesem Schritt wird das Selen der jeweiligen Proben vollständig zu Se^{+VI} oxidiert. Die aufgeschlossene Probe wurde in 20 mL H₂O gelöst, und ein Aliquot von 5 mL wurde einer Reduktion zu Se^{+IV} mit 4 mL

37 %iger HCl im Wasserbad bei 80 °C für 20 Minuten unterzogen. Nach dem Abkühlen wird das verdunstete Volumen mit 0,5 mL 1,4 M Amidosulfonsäure und anschließend mit 37 %iger HCl auf 10 mL aufgefüllt. Die Absorption bei 196 nm wird nach vorangegangener Reduktion zu Se^{II} durch den kontinuierlichen 0,2 %igen NaBH_4 - und 0,05 %igen NaOH-Strom des Hydridsystems (Philips PU9360 vapour system) gemessen.

Die Berechnung der Selenkonzentrationen erfolgte mittels linearer Regression. Eine Eichkurve wurde mit Se^{IV} -Standards (Merck KGaA) erstellt. Zur Qualitätskontrolle wurden NIST-Standards oder institutseigene Referenzproben, die an NIST-Standards abgeglichen wurden, mitgemessen.

3.5.4. Mineralstoffkonzentrationen im Versuchsfutter

Die Mineralstoffkonzentrationen wurden mittels ICP-AES bestimmt. Hierzu wurden die Proben über Nacht bei 450 °C verascht, filtriert, in 0,3 N HCl gelöst und mit H_2O auf 100 mL aufgefüllt. Aus dieser Aschelösung wurden mittels ICP-AES-System (Unicam 701) die Konzentrationen an Calcium, Phosphor, Magnesium, Eisen, Zink, Kupfer und Mangan bestimmt.

3.5.5. Vitamin E-Konzentrationen in Versuchsfutter und Plasma

Die Vitamin E-Analysen wurden mit Modifikationen basierend auf der Methode von VATASSERY und SMITH (1987) durchgeführt. Alle Proben wurden in abgedunkelten Räumen bearbeitet. Die eingesetzten Lösungsmittel waren von hohem Reinheitsgrad und zur HPLC-Analyse geeignet. Die Leberhomogenate wurden im Verhältnis 1:40 (w/w) mit Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,2) hergestellt, mit N_2 begast und bei -80 °C bis zur Analyse gelagert. 100 μL Plasma wurden mit 100 μL Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,2) versetzt und gut durchmischt. Zu diesem Gemisch wurden 40 μL Tocol (5 μg Tocol/mL Ethanol) hinzupipettiert. Über die Wiederfindung von Tocol wurde die Qualität der Analyse kontrolliert. Nach gründlicher Durchmischung wurden 360 μL Ethanol zur Eiweißfällung eingesetzt und nach weiterem Whirlen 400 μL Hexan zur Extraktion hinzugegeben. Die gut gemischten Lösungen wurden bei 13.000 x g für 10 Minuten zentrifugiert und auf Eis abgekühlt. Aus der Hexanphase wurden 200 μL Extrakt entnommen und unter N_2 eingedampft. Die Resuspendierung erfolgte mit 1 mL Methanol (versetzt mit 0,05% Butylhydroxytoluen (BHT)). Der Extrakt wurde zur HPLC-Analyse eingesetzt.

Aus dem Versuchsfutter musste vor der Analyse α -Tocopherol aus dem zugesetzten *all-rac*- α -Tocopherylacetat durch Verseifung freigesetzt werden. Hierzu wurden 0,5 g Futterprobe mit 3 mL Kalilauge (1 M KOH, 2 % L-Ascorbinsäure, 90 % Methanol) gewirkt und bei 100 °C für 30 Minuten im Wasserbad verseift. Nach dem Abkühlen wurden die Lösungen mit wässriger Ethanollösung (29 %) auf 25 mL aufgefüllt und filtriert. Von dem Filtrat wurden 3 mL mit dem gleichen Volumen Hexan-Toluol-Gemisch (1:2) versetzt und während fünfminütigem Whirlen extrahiert. Die Proben wurden 5 Minuten bei 5 °C und 4000 x g zentrifugiert. Die weitere Behandlung des Überstands (Hexan-Toluol-Phase) erfolgte wie bei den Plasmaproben beschrieben.

Das HPLC-System bestand aus der Vorsäule Merck LiChroCART® 4-4 LiChrospher® 100 RP-18 endcapped (5 μ m) und der Säule Merck LiChroCART® 250-4 Purospher® RP-18 endcapped (5 μ m). Die technische Einheit bestand aus Autosampler (Merck-Hitachi Intelligent Autosampler AS4000, Injektionsvolumen 100 μ L), Pumpe (Merck-Hitachi L-6200A Intelligent Pump), Säulenofen (Merck-Hitachi T-6300 Column Thermostat) und UV-Detektor (Merck-Hitachi L-7480 UV-VIS-Detector, Extinktion 290 nm, Emission 325 nm). Als Fließmittel diente 98 %iges Methanol (980 mL Methanol gradient grade, 20 mL nanopure bidest, Membranfilter 0,2 μ m), die Fließgeschwindigkeit betrug 1,7 mL/Minute bei einer Säulentemperatur von 40 °C. Die Retentionszeiten betragen für Tocol 4,4 Minuten, für γ -Tocopherol 5,9 Minuten und für α -Tocopherol 6,9 Minuten. Die Gehalte an γ -Tocopherol und α -Tocopherol wurden über eine externe Standardkurve ermittelt.

3.5.6. Vitamin C-Konzentrationen im Versuchsfutter

Aus der phosphorylierten Vitamin C-Quelle musste die Ascorbinsäure zunächst durch saure Phosphatase freigesetzt werden. Diese Vorbehandlung der Futterproben wurde nach Vorschrift des Herstellers (F. Hoffmann-La Roche Ltd.) basierend auf WANG *et al.* (1988) und SCHÜEP und KECK (1990) durchgeführt.

5 g gemahlene Futterprobe wurde in 50 mL 1 %iger *m*-Phosphorsäure, 0,2 % Dithiothreitol (DTT) für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer gelöst. 2 mL des klaren Überstands (10 Min., 39.000 x g, 5°C) wurden mit 1 mL 130 mM Natriumacetatpuffer, 13 mM DTT, pH 4,8 und 1 mL saurer Phosphatase (40 mg saure Phosphatase aus der Kartoffel, Grad II in 10 mL Na-Acetatpuffer, 0,2 % DTT, pH 4,8) versetzt. Nach sechsständiger Dephosphorylierung

bei Raumtemperatur wurde die Lösung zur Vitamin C-Bestimmung mittels HPLC eingesetzt.

Das HPLC-System bestand aus der Vorsäule *phenomenex*[®] *SecurityGuard*[™] C18 (ODS, Octadecyl), der Säule *phenomenex*[®] *LUNA*[™] 3 μ C18(2) (150 mm x 4,60 mm) und einem *MERCK Hitachi* L-4250 UV-VIS-Detektor. Als mobile Phase diente ein Natriumacetatpuffer (130 mM, 13 mM DTT, pH 3,8), Fließgeschwindigkeit 0,8 mL/Minute. Die Säulentemperatur betrug 25 °C, die Detektion erfolgte bei 254 nm. Die Werte wurden aus einer Eichkurve mit Ascorbinsäure abgeleitet.

3.5.7. Hämoglobin-Konzentration und Hämatokritwert

Die Hämoglobin-Konzentration wurde durch die Hämiglobincyanid-Methode mittels eines Testsatzes (MPR 3 Hämoglobin, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bestimmt.

Zur Bestimmung des Hämatokritwertes wurden die Proben in heparinisierten Hämatokritkapillaren für 15 Min bei 16.060 x *g* zentrifugiert. Der Wert wurde mit Hilfe einer Ableseschablone ermittelt.

3.5.8. Aufarbeitung der Gewebeproben für die Enzymanalyse

Zur Analyse der Enzymaktivitäten wurde bei der Leber der *Lobus sinister lateralis*, bei paarig angelegten Organen jeweils der rechte Teil verwendet.

Die Proben wurden eingewogen, entsprechend der gewünschten Verdünnungsstufe mit eiskaltem 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer versetzt und mit einem Dispergiergerät (Micra RT) homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 4 °C mit 11.950 x *g* (Sorvall[®] RC5C) abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und bis zur Analyse bei –80 °C gelagert. Diese Proben wurden für die Enzymanalytik verwendet, wenn dort nicht anders beschrieben.

3.5.9. Selenoenzyme

3.5.9.1. Glutathionperoxidasen

Die GPx-Aktivität wurde basierend auf PAGLIA UND VALENTINE (1967), modifiziert nach LAWRENCE UND BURK (1976), bestimmt.

Die Zugabe von H_2O_2 bewirkt die GPx-katalysierte Oxidation von GSH zu GSSG, welches NADPH-abhängig durch die Glutathionreduktase reduziert wird. Die Extinktionsabnahme des NADPH ist proportional zur GPx-Aktivität und kann bei 340 nm am Photometer (Beckman DU[®]-64 Spectrophotometer) bei Raumtemperatur über eine Minute verfolgt werden. Der Blindwert wurde mit 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer gemessen.

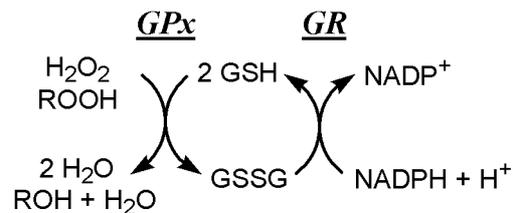


Abbildung 9: Recycling des von der GPx oxidierten GSH über die Glutathionreduktase

Durch eine Natriumazid-Zugabe (NaN_3) wird ein Aufzehren des Substrats durch die Katalase vermieden.

Für die SeGPx wurde H_2O_2 , für die Gesamt-GPx Cumolhydroperoxid (α,α -Dimethylbenzylhydroperoxid, $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OOH}$, kurz: CuOOH) verwendet. Die Lösungen wurden täglich frisch angesetzt und auf Eis gestellt. Die Aktivität der selenunabhängigen GPx wird rechnerisch aus der Differenz zwischen Gesamt- und SeGPx ermittelt.

Das Hämoglobin von Mensch und Meerschweinchen weist eine hohe Peroxidaseaktivität auf (BURK *et al.* 1981). Die GPx-Aktivität im Hämolyat wurde nach Verdünnung (1:10) mit Drabkin's Reagenz (0,4 mM KCN, 0,3 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 6 mM NaHCO_3) gemessen. Hierdurch wird Hämoglobin in das stabile Hämoglobincyanid überführt. Ohne diese Maßnahme kann Hämoglobin durch H_2O_2 zu Methämoglobin ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$) oxidiert werden, welches nichtenzymatisch oder enzymatisch (durch die Methämoglobin-Reduktase) NADPH oxidieren kann. Diese unerwünschte Interferenz bei der GPx-Aktivitätsbestimmung wurde durch diese Maßnahme ausgeschlossen.

Tabelle 5: Assay zur Bestimmung der GPx-Aktivität

Lösung	Konzentration in der Küvette	Pipettierte Menge
Assay-Mix		900 µL
50 mM Kalium-Phosphatpuffer, pH 7,0	45 mM	
1,5 mM EDTA	1,35 mM	
1,1 mM NaN ₃	0,99 mM	
0,1 mM NADPH	0,09 mM	
1 mM GSH	0,9 mM	
GR 1 U/mL	0,9 U	
Homogenat/Plasma	---	50 µL
5,57 mM H ₂ O ₂	0,278mM	50 µL
bzw.		
31,8 mM CuOOH	1,59 mM	

$U = (\Delta E \cdot V \cdot VF) / (\epsilon \cdot d \cdot v)$; $\epsilon_{\text{NADPH}, 340 \text{ nm}} = 6,22 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $V = \text{Gesamtvolumen}$; $VF = \text{Verdünnungsfaktor}$; $d = \text{Schichtdicke (1 cm)}$; $v = \text{Probenvolumen}$

3.5.9.2. Phospholipidhydroperoxid-reduzierende Aktivität

Die PCOOH-reduzierende-Aktivität wurde mit einer modifizierten Methode zur Bestimmung der PHGPx-Aktivität nach WEITZEL *et al.* (1990) und LEI *et al.* (1995) bestimmt.

Zur Substratherstellung wurden 10 mg L- α -Phosphatidylcholin (Typ III, Sojabohne) in 4 mL 3 %iger Desoxycholsäure und 21 mL 0,2 mM Natriumboratpuffer gelöst und bei 37 °C für 75 Minuten inkubiert. 540 kU Lipoxygenase (Typ IV) wurden in fünf Portionen alle 15 Minuten zugegeben. Zur Aufreinigung wurde eine Sep-Pak C18-Säule mit 2 mL Methanol (96 %) konditioniert und mit 4 mL H₂O equilibriert, bevor der Ansatz auf die Säule gegeben wurde. Danach wurde mit 10 mL H₂O nachgewaschen und das Substrat mit 2 mL Methanol eluiert. Um die Konzentration der Peroxidgruppen im hergestellten Phosphatidylcholinhydroperoxid (PCOOH) zu bestimmen, wurde eine Eichkurve mit Cumolhydroperoxid mittels iodometrischem Assay hergestellt (DARROW und ORGANISCIK 1994). Die Standards wurden im Bereich von 50-600 µM in H₂O angesetzt. Je 200 µL Standardlösung, H₂O und Methanol wurden mit 500 µL Färbereagenz (0,4 mM Kalium-Phosphat-Puffer, 0,3 mM NaN₃, 0,56 mM Benzalkoniumchlorid, 0,4 % Triton[®] X-100 peroxid- und carbonylfrei, 0,02 mM Ammoniummolybdat-Tetrahydrat ((NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4 H₂O, 0,24 M KI) versetzt, eine

Minute geschüttelt, für 30 Minuten im Wasserbad bei 50 °C inkubiert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Extinktion wurde bei 365 nm (VARIAN Cary50) gegen einen Blindwert mit H₂O gemessen. Zur Bestimmung der PCOOH-Konzentration wurden 10 µL Substrat, 400 µL H₂O und 190 µL Methanol mit 500 µL Färbereagenz verwendet.

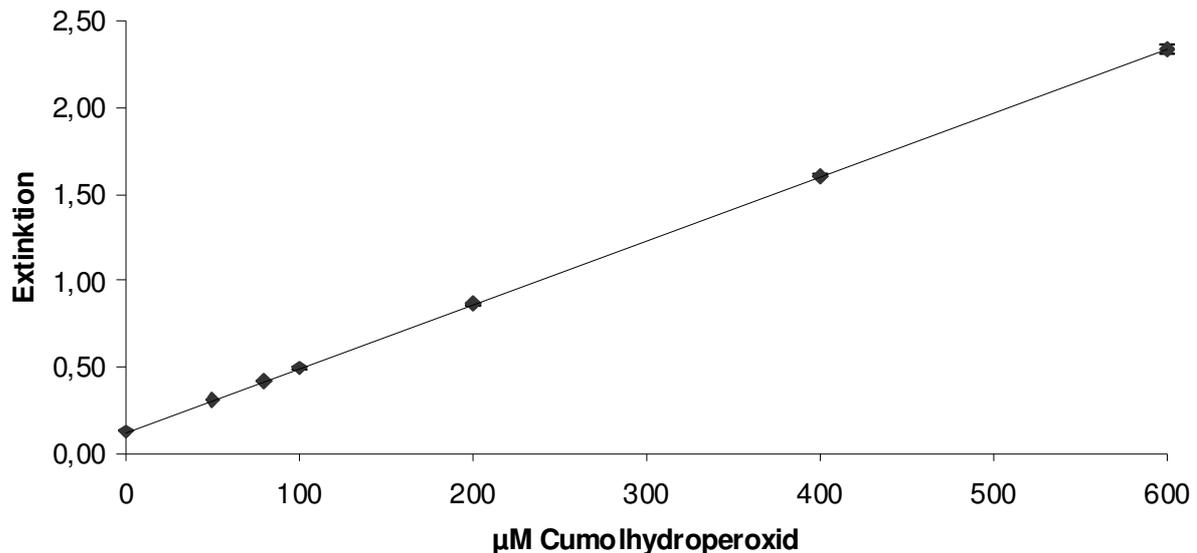


Abbildung 10: Eichkurve mittels iodometrischen Assays zur Qualitätskontrolle der hergestellten Phosphatidylcholinhydroperoxide. Die Fehlerbalken zu den jeweiligen Messpunkten sind kleiner als die Datenpunkte ($y = 0,0037x + 0,12534$; $R^2 = 0,99998$).

Die Gewebeproben wurden im Verhältnis 1:6 in Saccharosepuffer (0,25 M Saccharose, 20 mM Tris-HCl, 0,1 % Triton[®] X-100 peroxid- und carbonylfrei, pH 7,4) dispergiert, bei 10.000 x g bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert (Haereus[®] Instruments Labofuge[®] 400R) und der Überstand zur Enzymaktivitätsbestimmung abgenommen.

Die Aktivitätsbestimmung folgt dem gleichen Prinzip der Extinktionsabnahme des NADPH wie bei der cGPx-Bestimmung. Die Konzentrationen in der Küvette betragen 1 mM NaN₃, 5 mM EDTA, 0,1 M Tris-HCl, 0,1 mM NADPH, 3 mM GSH, 1,2 U GR, 0,2 % Triton[®] X-100 peroxid- und carbonylfrei, 54,5 bzw. 47,1 nmol PCOOH und 10 µL Gewebehomogenat bei einem Gesamtvolumen von 1 mL. Vor der Substratzugabe wurden die Proben drei Minuten bei 25 °C inkubiert. Die Messung am Photometer (VARIAN Cary50) fand ebenfalls über drei Minuten bei 25 °C statt. Ein Blindwert mit

Methanol statt PCOOH wurde zu jeder Probe hergestellt, um die Rate der unspezifischen NADPH-Abnahme zu bestimmen.

Vor der Probenanalyse wurde mit unterschiedlichen Homogenatmengen und Proben aus anderen Messungen ausprobiert, ob die gemessenen Extinktionen zuverlässige Ergebnisse boten. Der Verdünnungsfaktor und die Menge des eingesetzten Homogenats hatten nach rechnerischer Einbeziehung keinen Einfluss auf das Ergebnis. Proben aus einer anderen Messreihe (Kaninchen) mit leicht abweichenden Reaktionsbedingungen ergaben mit dem hier beschriebenen Assay vergleichbare Ergebnisse. Des Weiteren konnte ein linearer Verlauf der Reaktion über zehn Minuten beobachtet werden.

Eine Hemmung der an der Reaktion beteiligten Selenoenzyme wurde mit Na-Iodacetat durchgeführt. Die Konzentration in der Küvette betrug 3 mM und wurde dem Reaktionsansatz vor der dreiminütigen Inkubationszeit hinzugegeben. Durch eine längere Inkubationszeit über zehn anstelle von drei Minuten konnte keine höhere Hemmung der Aktivität erzielt werden. Bei neutralem pH-Wert liegt die Selenolgruppe vollständig dissoziiert vor, während Thiolgruppen weitestgehend protoniert sind. Diese Messung wurde daher bei pH 7,0 vorgenommen. Bei dieser nukleophilen Substitutionsreaktion wirkt das Selenolat des Enzyms als starkes Nukleophil, welches mit dem elektrophilen Iodacetat reagiert. Das Enzym wird in der Folge durch eine Carboxymethylierung inaktiviert (CHAUDIÈRE und TAPPEL 1983).

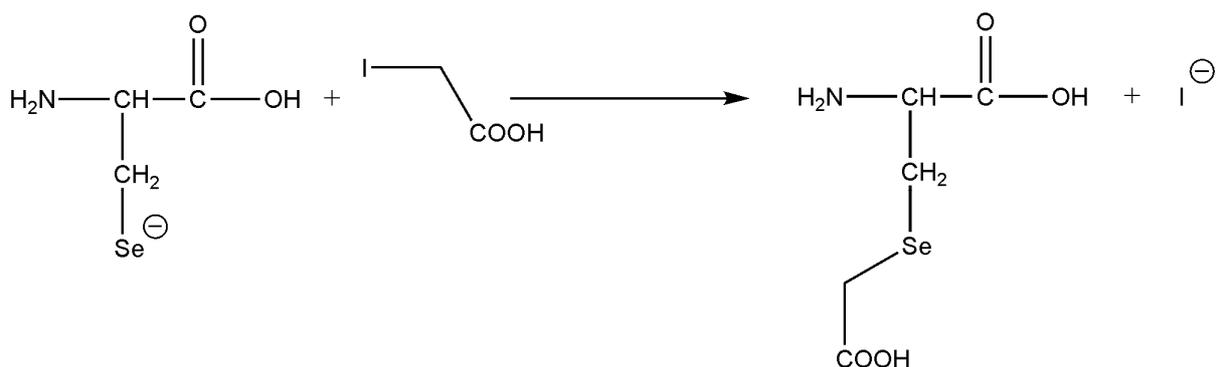


Abbildung 11: Irreversible Hemmung des Selenoenzyms durch Carboxymethylierung mit Iodacetat bei $\text{pH} \leq 7,0$

3.5.9.3. Thioredoxinreduktase

Die Gewebeproben wurden in PBS (1 mM EDTA) im Verhältnis 1:10 homogenisiert und bei 13.700 x g bei 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert (Sorvall® RC5C). 1,3 mL Homogenat wurden in Dialyseschläuche (Spectra/Por Biotech® Cellulose Ester, MWCO 3500) pipettiert und über Nacht gegen PBS dialysiert. Das Dialysat wurde zur Proteinfällung für 10 Minuten bei 55 °C inkubiert und anschließend bei 13.000 x g in 20 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80 °C zur späteren Aktivitätsmessung eingefroren.

Die Messung der TrxR-Aktivität erfolgte nach HILL *et al.* (1997a,b) mit Modifikationen. DTNB wird hierbei durch die TrxR NADPH-abhängig in zwei Moleküle TNB (Thionitrobenzoesäure) gespalten, was photometrisch bei 412 nm verfolgt werden kann.

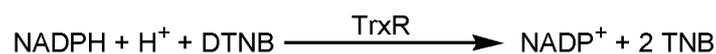


Abbildung 12: Die dem TrxR-Assay zugrunde liegende DTNB-Spaltung (nach HOLMGREN 1977)

Die Reaktion wurde durch Zugabe von NADPH gestartet. Zur Bestimmung der unspezifischen DTNB-Reduktion wurde NADPH durch Assaypuffer ersetzt. Eine Unit entspricht 1 µmol gebildetem TNB/(Minute • mL).

Tabelle 6: Assay zur Bestimmung der TrxR-Aktivität

Lösung	Konzentration in der Küvette	Pipettierte Menge
100 mM Kalium-Phosphatpuffer, pH 7,4 2,0 mM EDTA	84,5 mM 1,7 mM	845 µL
Homogenat	---	100 µL
100 mM DTNB	3,0 mM	30 µL
4,0 mM NADPH	0,1 mM	25 µL

$U = (\Delta E \cdot V \cdot VF) / (\epsilon \cdot d \cdot v)$; $\epsilon_{\text{TNB}, 412 \text{ nm}} = 2 \cdot 13,6 \text{ L} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; V = Gesamtvolumen; VF = Verdünnungsfaktor; d = Schichtdicke (1 cm); v = Probenvolumen

3.5.9.4. *Deiodinase (D1)*

Die Aktivität der Deiodinase wurde nach einer modifizierten Methode von BECKETT *et al.* (1989, 1992) bestimmt. Die dort verwendeten T₄-Konzentrationen wurden erheblich reduziert, da die Verunreinigung mit T₃ so hoch lag, dass die gemessenen T₃-Konzentrationen schon zum Zeitpunkt Null außerhalb der Eichkurve lagen. Die Reaktionszeit der Deiodinase wurde so gewählt, dass die zugegebene T₄-Menge einen linearen Anstieg der T₃-Produktion gewährleistet.

Es wurden Gewebehomogenat im Verhältnis 1:5 (w/w) in 125 mM Kalium-Phosphat-Puffer (1mM EDTA, 20 mM Dithiothreitol, pH 7,4) mit einem Dispergiergerät hergestellt. Direkt vor der Bestimmung wurden größere Zellfragmente für 10 Minuten bei 12.000 x g abzentrifugiert, was den Variationskoeffizienten innerhalb einer Doppelbestimmung erheblich reduzierte. Dieses Homogenat wurde 10 Minuten bei 37 °C im Wasserbad vorinkubiert und mit T₄-Lösung versetzt. Die Probe wurde zum Zeitpunkt 0 bzw. nach 10minütiger Inkubationszeit mit Ethanol gefällt. Ausgefallenes Protein wurde bei 12.000 x g für 10 Minuten abzentrifugiert. Das ethanolische Extrakt wurde zur T₃-Bestimmung mittels Radioimmunoassay (Coat-A-Count[®] Canine T₃, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA) verwendet. Hierbei konkurriert radioaktiv (¹²⁵I) markiertes T₃ mit dem Gesamt-T₃ der Probe um Antikörper. Die T₃-Konzentration wurde für eine Minute im Gammacounter (PerkinElmer[®] Wallac WIZARD 3) gemessen und über eine Eichkurve mit T₃-Standards abgeleitet.

Die Aktivität der D1 wird in fmol T₃ produziert aus T₄/(Minute • mg Protein) angegeben. Jede Probe wurde zweifach angesetzt und aus dem resultierenden ethanolischen Extrakt jeweils zwei Parallelen gemessen.

Tabelle 7: Assay zur Bestimmung der D1-Aktivität

Lösung	Konzentration in der Küvette	Pipettierte Menge
Homogenat	---	150 µL
11,6 µM L-Thyroxinlösung	1,3 µM	16,7 µL
96 % Ethanol	67,8 %	400 µL

Zur Evaluierung der Methode wurde die Umsetzung von T_4 zu T_3 in dreiminütigen Abschnitten gestoppt, um einen linearen Verlauf der Reaktion über 12 Minuten zu zeigen. Ein Blindwert mit Puffer und T_4 -Lösung wurde zunächst über die Inkubationszeit mitgeführt. Da sich wiederholt keine Änderung der T_3 -Konzentration in dieser Bestimmung zeigte, wurde nachfolgend auf den Blindwert verzichtet.

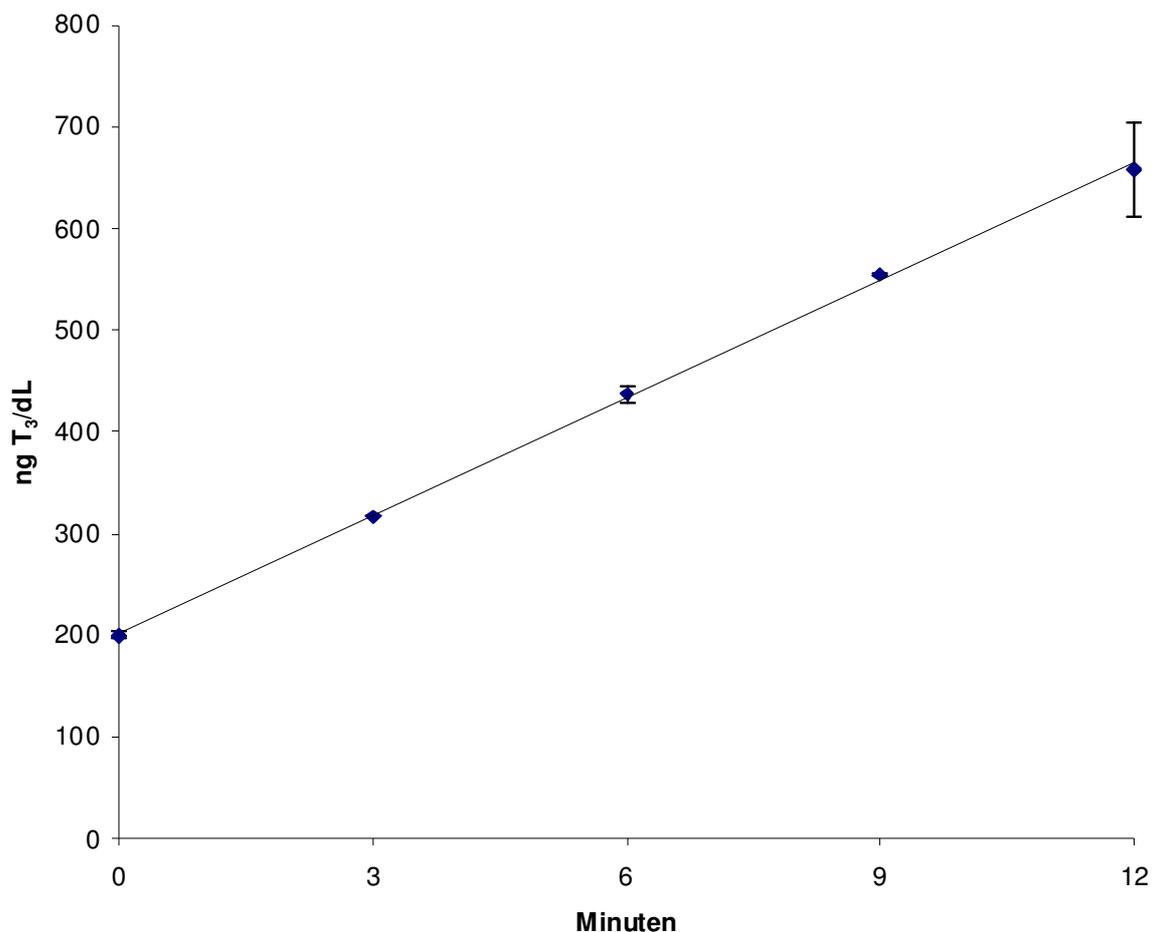


Abbildung 13: Umsetzung von T_4 zu T_3 durch die D1 im Leberhomogenat (1:5 (w/w)) eines mit 0,25 mg Selen/kg FM versorgten Meerschweinchens ($y = 38,5x + 202,3$; $R^2 = 0,999$). Eine Korrektur um das originär vorhandene und durch die zugegebene T_4 -Lösung eingeschleppte T_3 wurde in diesem Beispiel nicht vorgenommen.

3.5.10. Glutathion S-Transferase

Die Aktivität der Glutathion S-Transferase (GST) wurde nach der Methode von HABIG *et al.* (1974) bestimmt. Die homogenisierten Gewebeproben wurden mit 0,1 M Kalium-Phosphatpuffer, 1 mM EDTA, pH 6,5 auf eine Endverdünnung von 1:500

(Niere) bzw. 1:3000 (Leber) gebracht. Die photometrische Messung erfolgte über eine Minute bei 25 °C, als Substrat diente 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB) in Ethanol (99%). Die Konjugation des Substrats mit Glutathion wurde spektralphotometrisch (VARIAN Cary 50) bei 340 nm verfolgt. Die Konzentrationen im Reaktionsansatz betragen für GSH und CDNB jeweils 1,0 mM mit 100 µL Gewebehomogenat.

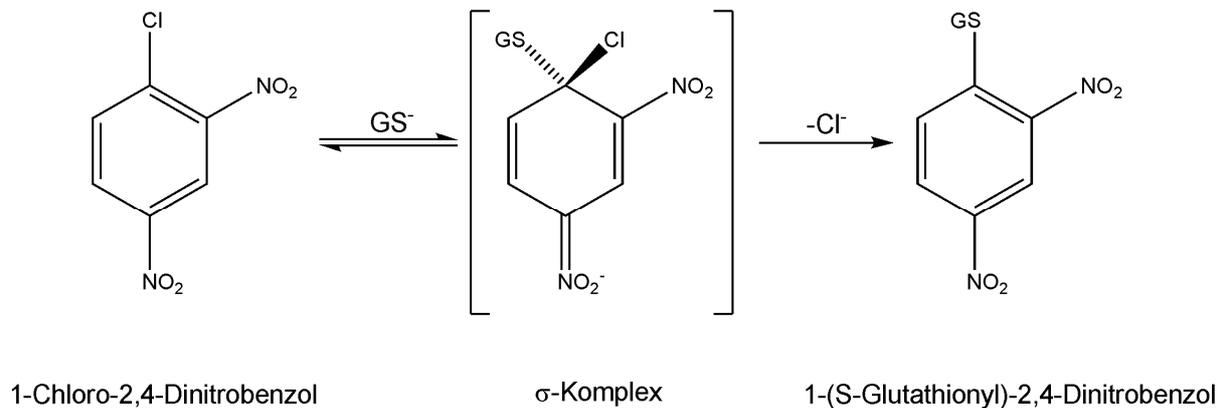


Abbildung 14: Die dem GST-Assay zugrunde liegende GSH-Konjugation mit CDNB (nach ARMSTRONG 1997)

Eine Unit GST ist definiert als Konjugation von 1 µmol CDNB mit GSH pro Minute bei pH 6,5 und 25 °C ($\epsilon_{\text{GS-DNB}, 340 \text{ nm}} = 9,6 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Die Berechnung erfolgte über eine mit GST-Standard (Ratte) erstellte Eichkurve, die täglich neu angesetzt wurde. Die Enzymaktivität wurde auf den Proteingehalt bezogen (U/mg Protein).

3.5.11. Glutathionreduktase

Die Glutathionreduktase wurde modifiziert nach COHEN und DUVEL (1988) bestimmt. Oxidiertes Glutathion (GSSG) wird NADPH-abhängig durch die Glutathionreduktase reduziert. Die Extinktionsabnahme des NADPH kann bei 340 nm am Photometer gemessen werden.

Tabelle 8: Assay zur Bestimmung der GR-Aktivität

Lösung	Konzentration in der Küvette	Pipettierte Menge
100 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,0	85 mM	850 µL
1,5 mM EDTA	0,78 mM	
1,18 mM GSSG	1,0 mM	
Homogenat	---	50 µL
1,0 mM NADPH	0,1 mM	100 µL

$U = (\Delta E \cdot V \cdot VF) / (\epsilon \cdot d \cdot v)$; $\epsilon_{\text{NADPH}, 340 \text{ nm}} = 6,22 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; V = Gesamtvolumen; VF = Verdünnungsfaktor; d = Schichtdicke (1 cm); v = Probenvolumen

3.5.12. Reduziertes und oxidiertes Glutathion

Die Analyse des Glutathiongehalts in der Leber wurde nach der Methode von TIETZE (1969), modifiziert nach GRIFFITH (1980), durchgeführt. Dabei wird zur Bestimmung die Glutathionreduktase-Reaktion ausgenutzt.

Gesamtglutathion: Das in der Probe enthaltene GSH (originäres GSH und durch GR-Reaktion reduziertes GSH aus originärem GSSG) überträgt seinen Sulfhydryl-Wasserstoff auf DTNB. Das oxidierte Glutathion wird durch die GR zu 2 GSH reduziert, welches zur weiteren DTNB-Spaltung zur Verfügung steht.

Oxidiertes Glutathion: Um die Konzentration des oxidierten Glutathions zu bestimmen, wird GSH durch Derivatisierung mit 2-Vinylpyridin der Reaktion entzogen.

Reduziertes Glutathion: Die GSH-Konzentration wird rechnerisch aus Gesamt-GSH und GSSG-Konzentration ermittelt.

Vor der Bestimmung wurden die Gewebehomogenate mit 150 mM Phosphatpuffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$, 1% BSA, pH 7,5) verdünnt und mit gleichem Volumen 10 %iger Sulfosalicylsäure gefällt. Der Überstand wurde bei 12.000 x g gekühlt (4 °C) über 10 Minuten abzentrifugiert (Haereus[®] Instruments Labofuge[®] 400R). Die so vorbereitete Probe wurde mit Triethanolamin und Puffer bzw. 2-Vinylpyridin versetzt; Letzteres wurde bei Raumtemperatur für mind. 30 Minuten inkubiert. Zur enzymatischen Bestimmung wurde ein Teil der so vorbereiteten Probe mit DTNB und NADPH versetzt (Tabelle 10) und die Reaktion durch Zugabe der GR (10 U/mL in 125 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, 6,3 mM EDTA) gestartet. Die Reaktion wurde 3 Minuten bei 412 nm am Spektralphotometer verfolgt und die Konzentrationen mittels linearer Regression aus einer Standardkurve mit GSSG abgeleitet.

Tabelle 9: Assay zur Bestimmung der Glutathionkonzentration

Lösung	Konzentration in der Küvette	Pipettierte Menge
Vorbereitete Probe oder Standard	---	75 μL
0,28 mM NADPH	196 μM	350 μL
6 mM DTNB	600 μM	50 μL
10 U/mL GR	250 mU	25 μL

$U = (\Delta E \cdot V \cdot VF) / (\epsilon \cdot d \cdot v)$; $\epsilon_{\text{TNB}, 412 \text{ nm}} = 2 \cdot 13,6 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $V = \text{Gesamtvolumen}$; $VF = \text{Verdünnungsfaktor}$; $d = \text{Schichtdicke (1 cm)}$; $v = \text{Probenvolumen}$
 1 GSSG ausgedrückt als 2 GSH; tGSH ausgedrückt als GSH

3.5.13. Katalase

Durch die Katalase wird Methanol zu Formaldehyd umgesetzt. Aldehyde reagieren spezifisch mit Purpald[®] (4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol) zu einem heterozyklischen Zweiring, der nach Oxidation mit KIO_4 violett gefärbt ist. Bei 550 nm kann somit die Formaldehydkonzentration spektralphotometrisch bestimmt werden.

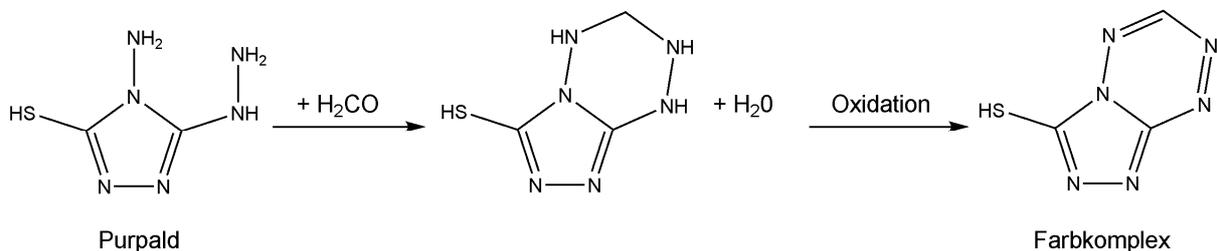


Abbildung 15: Reaktionsprinzip der peroxidativen Katalaseaktivitätsbestimmung (nach QUESENBERRY und LEE 1996)

Die Katalaseaktivität wurde als peroxidative Aktivität nach JOHANSSON und BORK (1988) bestimmt. Hierzu wurden stark verdünnte Homogenate (1:4500) verwendet, die mit einer Reaktionslösung aus H_2O_2 und Methanol versetzt wurden. Die enzymatische Reaktion wurde nach 10 Minuten mit KOH beendet. Gleichzeitig wurde das Chromogen Purpald[®] hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 20 Minuten wurde KIO_4 hinzugefügt. Die Formaldehydkonzentration wurde nach 5 Minuten am Photometer bei 550 nm bestimmt. Der Reaktionsverlauf war über 18 Minuten linear (Abbildung 16). Eine Eichkurve wurde vorher mit Formaldehydstandards erstellt.

Tabelle 10: Assay zur Bestimmung der peroxidativen Katalaseaktivität

Lösung	Konzentration in der Küvette	Pipettierte Menge
Assay-Mix: 134 mM Kaliumphosphatpuffer 45 % Methanol 0,238 % H ₂ O ₂ Verdünntes Homogenat	80,4 µM 27,0 % 0,143 % ---	150 µL 100 µL
2 M KOH 25,3 mM Purpald®	0,75 mM 9,49 µM	150 µL
65,2 mM KIO ₄ 470 mM KOH	7,24 µM 52,2 µM	50 µL

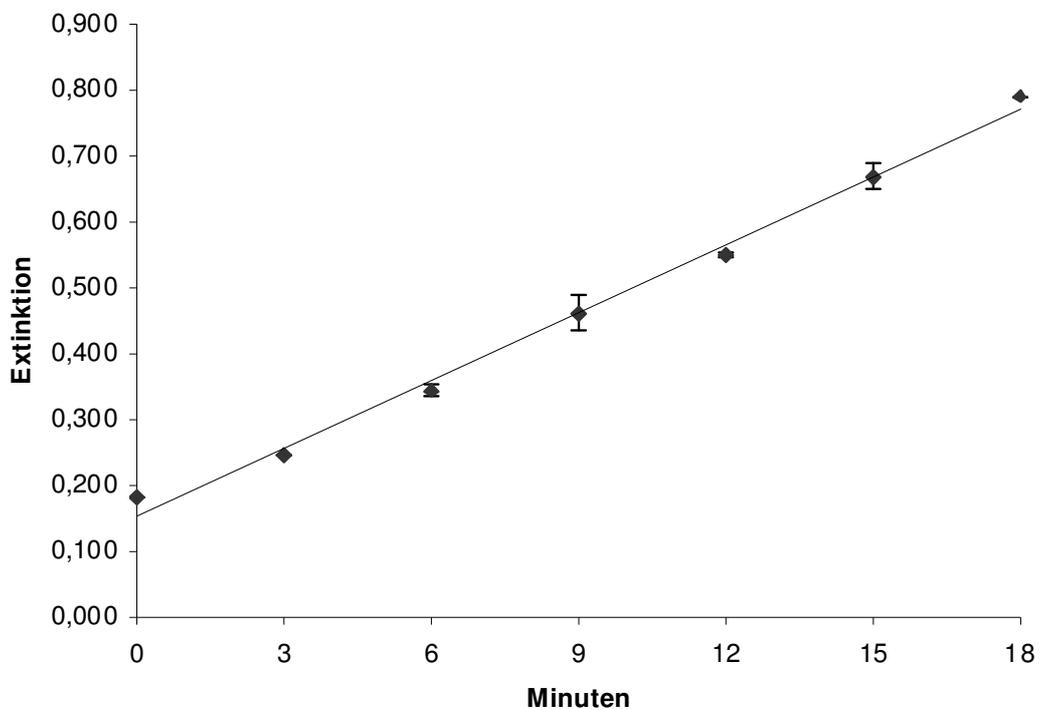


Abbildung 16: Überprüfung der Methode zur Bestimmung der peroxidativen Katalaseaktivität im Leberhomogenat des Meerschweinchens (Verdünnung 1:4500; $y = 0,0343x + 0,1537$; $R^2 = 0,994$)

3.5.14. *Triiodthyronin- und Thyroxinkonzentrationen im Plasma*

Die Gesamtkonzentrationen der Schilddrüsenhormone T₃ und T₄ im Plasma wurden mittels Radioimmunoassay (Coat-A-Count Canine T₃ und Canine T₄, DPC Biermann, Bad Nauheim) gemessen (vgl. 3.5.9.4 Deiodinaseaktivität). Die Proben wurden jeweils doppelt bestimmt. Die Auswertung des RIA erfolgte für eine Minute im Gammacounter (PerkinElmer® Wallac WIZARD 3).

3.5.15. *Proteinbestimmung in Plasma und Gewebehomogenaten*

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte nach BRADFORD 1976. Das Reagenz wurde wie folgt hergestellt:

0,1 g Coomassie brilliant blue G-250 wurde in 47,6 mL Ethanol (96 %) durch 2-3-stündiges Rühren auf dem Magnetrührer gelöst, mit 100 mL *ortho*-Phosphorsäure versetzt und auf einen Liter mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Die Lösung wurde durch 595 ½ und 602 H ½ Papierfilter filtriert und in braunen Glasflaschen bei 4 °C maximal sechs Monate gelagert.

Zur Analyse wurden in 2,5 mL Bradford-Reagenz 50 µL verdünntes Plasma oder Homogenat pipettiert und sofort gerührt. Nach 15-minütiger Inkubationszeit wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Der Blindwert wurde mit dem beim Homogenisieren verwendeten Puffer anstelle der Probe angesetzt. Die Proteingehalte lassen sich aus der Eichkurve mit BSA errechnen.

3.5.16. *Vitamin C-Konzentrationen im Plasma*

Die Vitamin C-Konzentration im Plasma wurde mittels HPLC nach der Methode von STEFFAN (1999) gemessen. Bei diesem Verfahren werden der Ascorbinsäuregehalt (AA) und der Gesamt-Ascorbinsäuregehalt (tAA) nach Reduktion mit Dithiothreitol (DTT) bestimmt. Durch Subtraktion kann auf den Dehydroascorbinsäuregehalt (DHA) geschlossen werden.

Das Blut wurde nach Dekapitierung entnommen und in Vakuumröhrchen (Sarstedt S-Monovette® Li-Heparin LH/1,2 mL) aufgezogen. Anschließend wurden die Proben fünf Minuten bei 4 °C und 1.700 x g zentrifugiert. Das Plasma wurde in Eppendorfcups überführt, mit N₂ begast und zur anschließenden Lagerung bei -80 °C mit Trockeneis schockgefroren.

Zur Aufarbeitung der tAA-Proben wurde das Plasma auf Eis aufgetaut. 500 µL Plasma wurden mit 100 µL DTT-Lösung (44,1 mM: 170 mg DTT ad 25 mL 9 %ige NaCl-Lösung, pH 7,0-7,5 mit 1M K₂HPO₄-Lösung) versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Proteinfällung mit 600 µL Perchlorsäure/Metaphosphorsäure-Gemisch (6 % HClO₄/2 % HPO₃ (w/w)) wurde bei 3000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Für die AA-Proben wurden 500 µL Plasma mit 500 µL Perchlorsäure/Metaphosphorsäure-Gemisch versetzt und ebenfalls abzentrifugiert. Die aufgearbeiteten Proben wurden bis zur HPLC-Analyse bei -80 °C eingefroren.

Das HPLC-System bestand aus der Säule *phenomenex*[®] *synergi*[™] 4µ Hydro-RP 80Å (250 mm x 4,60 mm) und einem Merck Hitachi L-4250 UV-VIS-Detektor. Als mobile Phase diente gefilterter Phosphatpuffer (45 mM NaH₂PO₄, pH 2,0 mit Orthophosphorsäure, Membranfilter 0,2 µm), Fließgeschwindigkeit 1 mL/Minute. Die Säulentemperatur betrug 25 °C, die Detektion erfolgte bei 243 nm. Die Vitamin C-Konzentration wurde über eine externe Standardkurve ermittelt.

3.5.17. Thiobarbitursäurereaktive Substanzen in der Leber

Die thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (TBA-RS) im Leberhomogenat des Meerschweinchens wurden fluorometrisch bestimmt. Hierbei reagieren sekundäre Abbauprodukte mehrfach ungesättigter Fettsäuren zu Malondialdehyd, welches mit 2 mol TBA zu einem fluoreszierenden Komplex reagiert, der mittels Butanol extrahiert werden kann (PRYOR *et al.* 1976, GUTTERIDGE und TICKNER 1978, GÜNTHER *et al.* 1994).

Für die Eichkurve wurden Standards aus TEP (1,1,3,3-Tetraethoxypropan, Synonym: Malonaldehyd-bis(diethylacetal)) hergestellt. Das Protein im Homogenat wurde mit 5 %iger Trichloressigsäure im Verhältnis 1:2 ausgefällt und für 5 Minuten bei 4 °C mit 13.000 x g abzentrifugiert. 500 µL Probenüberstand bzw. H₂O für den Blindwert und Standardlösungen für die Eichkurve wurden mit 500 µL 1 %iger TBA-Lösung und 50 µL 0,5 %iger BHT-SDS-Lösung (50 mg Natriumdodecylsulfat und 50 mg Butylhydroxytoluol in 10 mL 98 %igem Ethanol) versetzt. Diese Lösung wurde in ausgekochten (0,22 M o-Phosphorsäure, 0,17 %ige TBA-Lösung, 100 °C, 60 Minuten) Rundbodenreagenzgläsern angesetzt. Die Gläser wurden nach gründlichem Durchmischen der Reagenzien fest verschlossen, bei 100 °C für 15 Minuten im Wasserbad gekocht und danach auf Eis abgekühlt. Zu jeder Probe wurden 3 mL

n-Butanol zur Extraktion pipettiert und für 30 Sekunden gut geschüttelt. Das Gemisch wurde für 15 Minuten bei $3.112 \times g$ zentrifugiert und der Überstand zur fluorometrischen Messung (Perkin Elmer LS5, Extinktion 532 nm, Emission 553 nm, Spalt 5 nm) in speziellen Fluorimeterküvetten bei 25 °C eingesetzt.

3.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS 11.5 für MS Windows durchgeführt. Bei gegebener Varianzhomogenität (Levene-Test) wurde unter der Voraussetzung der Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) zum Gruppenvergleich der Tukey-HSD Test verwendet. Lag keine Homogenität der Varianzen vor, wurde der Games-Howell-Test benutzt. In den Tabellen sind jeweils die Mittelwerte (M) und deren Standardabweichungen (SD) angegeben.

Zur Bedarfsableitung wurde das *Broken Line Model* (Broken-Line-Analyse), ebenfalls unter Verwendung des Programms SPSS 11.5 für MS Windows, angewendet. Bei der Broken-Line-Analyse werden durch die Datenpunkte zwei Regressionsgeraden nach der Methode der kleinsten Quadrate gelegt. Der Schnittpunkt beider Geraden bezeichnet den „Breakpoint“ (R, L), aus dem der Nährstoffbedarf abgeleitet werden kann. Das Modell kann entweder mit zwei Geraden mit den Steigungen U und V verwendet werden oder mit einer Geraden mit der Steigung U; die Steigung der zweiten Geraden ist 0.

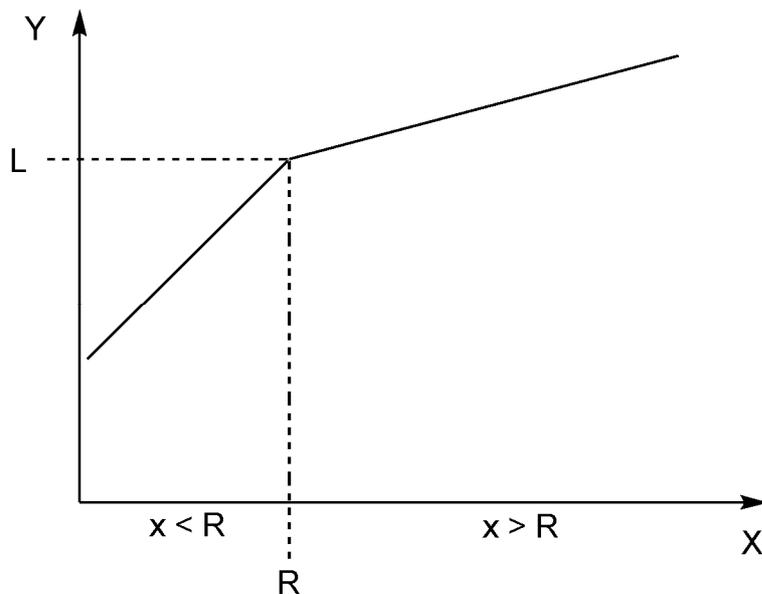


Abbildung 17: Broken line model als 2-Steigungen-Modell.

Der gängige SAS Code nach ROBBINS *et al.* (2006) wurde für SPSS wie folgt angepasst:

```
* NonLinear Regression.
MODEL PROGRAM U=Anfangswert V=Anfangswert R=Anfangswert L=Anfangswert.
COMPUTE PRED_ = (x<=R)*(U*(x-R)+L) + (x>R)*(V*(x-R)+L).
*Ableitungen.
compute d.U = (x<R)*(x-R).
compute d.V = (x>R)*(x-R).
if(R ne x) d.R = (x<R)*(-U) + (x>R)*(-V).
compute d.L = 1.
NLR dataset name /OUTFILE='Pfadname'
/PRED PRED_
/SAVE PRED RESID
/CRITERIA SCONVERGENCE 1E-8 PCON 1E-8.
```

4. Ergebnisse

4.1. Weender Analyse und Bruttoenergiegehalt des Versuchsfutters

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse der Rohnährstoff- und der kalorimetrischen Analyse des Versuchsfutters dargestellt. Die mittels Weender Futtermittelanalyse bestimmten Rohnährstoffgehalte (XP, XL, XF, XA) der sechs Versuchsfutter stimmen weitgehend mit den angestrebten Werten überein. Die 15 % Rohfasergehalt, die im Wesentlichen mit Pulvercellulose angestrebt wurden, werden bei der Rohfaseranalyse jedoch nicht vollständig wiedergefunden. Die Differenzen zwischen den einzelnen Futtern sind minimal, so dass von einem einheitlichen Futter für alle Versuchsgruppen ausgegangen werden kann. Die Anforderungen des NRC (1995) an die Mindestgehalte der Rohnährstoffe für Meerschweinchenfutter wurden in diesem Mischfutter bis auf die Rohfaser erfüllt.

Tabelle 11: Trockenmasse [% der Frischmasse], Rohnährstoffgehalt [% der Frischmasse] und Bruttoenergiegehalt [MJ/kg Frischmasse] des Versuchsfutters

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM		TM	XP	XL	XF	XA	MJ/kg
I	M	89,6	18,7	5,92	12,5	2,65	18,1
0 µg	SD	0,03	0,25	0,10	0,35	0,02	0,016
II	M	89,9	18,7	6,03	13,6	2,66	18,3
50 µg	SD	0,10	0,04	0,35	0,11	0,04	0,073
III	M	89,3	18,8	6,01	12,6	2,66	18,2
100 µg	SD	0,08	0,03	0,23	0,30	0,01	0,024
IV	M	89,3	18,4	6,11	12,0	2,65	18,0
150 µg	SD	0,01	0,04	0,01	0,33	0,02	0,001
V	M	89,6	18,6	6,16	11,6	2,66	18,2
200 µg	SD	0,05	0,07	0,05	0,06	0,02	0,034
VI	M	89,3	18,5	6,40	12,8	2,71	18,0
250 µg	SD	0,03	0,07	0,16	0,44	0,02	0,004

4.2. Selen-, Vitamin E- und Vitamin C-Konzentration im Versuchsfutter

Zur Ermittlung des Selenbedarfs wurde dem Basisfutter Selen als wasserfreies Natriumselenat (Na_2SeO_4) zugesetzt. Der Vitamin E-Gehalt wurde durch Zulage von 29,8 mg *all-rac*- α -Tocopherylacetat unter Berücksichtigung des nativen Gehalts der Einzelfuttermittel auf 26 mg α -Tocopherol/kg FM eingestellt. Ein Vitamin C-Gehalt von 100 mg/kg FM wurde durch die Zugabe von ROVIMIX[®] STAY-C[®] 35 angestrebt.

Der analysierte Selengehalt der Futter in Tabelle 12 zeigt die gewünschten Abstufungen. Das Futter mit 0,05 mg/kg wies eine Wiederfindung von 110% auf. Da die Messwerte im Bereich von $\mu\text{g}/\text{kg}$ lagen, machen zwei Absorptionseinheiten bereits $10 \mu\text{g Se}/\text{kg}$ aus. Aus diesem Grund sind diese relativ hohen Wiederfindungen nicht überzubewerten.

Die Analyse der Vitamin C- und Vitamin E-Konzentration erbrachten eine gute Wiederfindung. Pelletierungsverluste traten offenbar nicht auf. Die hohe Standardabweichung beim Vitamin C in Futter VI rührt vom Ende der Lebensdauer der Säule her. Da es sich um ein Basismischfutter handelte, zu dem Selen entsprechend zugelegt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass der Vitamin C-Gehalt dieses Futters mit dem der anderen fünf Futter übereinstimmt.

Tabelle 12: Ergebnisse der Selen-, Vitamin E- und Vitamin C-Analysen des Versuchsfutters

Gruppe $\mu\text{g Se-Zulage}/\text{kg FM}$		Selen $\mu\text{g}/\text{kg FM}$	α -Tocopherol (gesamt) $\text{mg}/\text{kg FM}$	davon α -Tocopheryl- acetat** $\text{mg}/\text{kg FM}$	Vitamin C $\text{mg}/\text{kg FM}$
I 0 μg	M SD	---*	25,8 0,88	20,1	115 0,02
II 50 μg	M SD	55,8 8,5	23,4 1,4	17,4	115 0,86
III 100 μg	M SD	101 13,2	26,9 1,6	20,7	107 8,9
IV 150 μg	M SD	150 19,5	26,4 0,74	20,3	107 1,7
V 200 μg	M SD	202 16,1	27,1 0,47	21,1	102 0,28
VI 250 μg	M SD	240 26,0	25,2 1,6	19,6	101 11,4

* unterhalb der Nachweisgrenze von $16 \mu\text{g}/\text{kg}$;

** durch Subtraktion des nativen Gehaltes vom Gesamt- α -Tocopherolgehalt nach Verseifung

Der Selengehalt des Meerschweinchenfutters des Zuchtunternehmens (Harlan Teklad Guinea pig 2040) weist laut Analyseprotokoll $260 \mu\text{g Se}/\text{kg FM}$ auf. Die eigenen Analysen zeigten mit $228 \mu\text{g}/\text{kg}$ einen etwas geringeren Gehalt, wie der Tabelle 13 zu entnehmen ist. Des Weiteren befinden sich in dieser Tabelle die in Heu und Stroh gemessenen Selengehalte. Die Nachweisgrenze des Selens in diesem voluminösen Medium liegt aufgrund der geringen möglichen Einwaage bei ca. $40 \mu\text{g}/\text{kg}$. Die Messwerte lagen für Heu (2. Aufwuchs) und Stroh an der Nachweisgrenze, das Heu des ersten Aufwuchses lag etwas darüber.

Tabelle 13: Selenkonzentrationen im Versuchsfutter des Zuchtunternehmens, sowie im verabreichten Stroh und Heu [$\mu\text{g}/\text{kg FM}$]*

Selen	Harlan Teklad 2040 Global Guinea Pig*	Heu 1. Aufwuchs**	Heu 2. Aufwuchs**	Stroh**
M	228	62,5	41,1	42,5
SD	1,9	1,9	3,9	13,9

*Harlan Winkelmann GmbH, Borchen, Deutschland

**Nachweisgrenze ca. 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$

4.3. Ausgewählte Mineralstoffkonzentrationen im Versuchsfutter

In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der Mineralstoffbestimmung dargestellt. Die angestrebten Mineralstoffkonzentrationen konnten erreicht werden. Der Gehalt an Magnesium lag etwas niedriger, während die Konzentrationen an Kupfer, Zink und Mangan höher lagen als angestrebt worden war.

Tabelle 14: Analytierte Mineralstoffkonzentrationen im Versuchsfutter und in Heu bzw. Stroh [g/kg bzw. mg/kg FM]

Gruppe		Ca g/kg	P g/kg	Mg g/kg	Fe mg/kg	Cu mg/kg	Zn mg/kg	Mn mg/kg
	<i>Soll</i>	8,00	4,00	1,00	50,00	6,00	22,00	40,00
I	M	8,07	4,54	0,83	47,1	8,25	37,2	64,8
0 μg	SD	0,09	0,10	0,03	1,75	0,32	1,85	1,37
II	M	8,14	4,71	0,88	53,4	8,60	36,9	65,6
50 μg	SD	0,28	0,21	0,03	0,93	0,36	0,29	0,24
III	M	8,04	4,70	0,89	47,9	8,56	36,7	66,0
100 μg	SD	0,09	0,04	0,01	0,32	0,22	0,38	1,07
IV	M	7,93	4,47	0,81	45,3	7,53	37,9	62,8
150 μg	SD	0,23	0,09	0,03	0,69	0,32	4,02	0,92
V	M	7,98	4,59	0,87	48,3	8,56	38,0	67,0
200 μg	SD	0,17	0,12	0,02	1,89	0,03	1,58	4,34
VI	M	8,13	4,71	0,89	48,5	8,18	36,9	65,1
250 μg	SD	0,11	0,16	0,01	1,04	0,33	1,76	2,04
Stroh	M	3,34	0,45	0,28	52,9	2,25	6,87	29,4
	SD	0,05	0,02	0,01	12,1	0,02	0,45	0,13
Heu	M	7,28	3,68	1,33	184	5,19	34,2	48,5
1. Aufwuchs	SD	0,02	0,05	0,02	7,81	0,08	0,44	0,76
Heu	M	2,65	2,24	1,09	286	4,78	27,2	104
2. Aufwuchs	SD	0,06	0,03	0,01	24,5	0,20	0,55	3,04

4.4. Gewichtsentwicklung und Futteraufnahme

Gewichtsentwicklung und Futteraufnahme sind beim Meerschweinchen schwer zu ermitteln. Eine Nüchternung ist nicht empfehlenswert, weil sie zur Unterbrechung der kontinuierlichen Darmpassage und als Folge dessen zu Verdauungsstörungen führen kann. Daher sind die Werte der Gewichtsentwicklung auch von der Füllung des Gastrointestinaltraktes abhängig. Da die Tiere paarweise (3 x 2 und 1 x 1) gehalten wurden, ist eine individuelle Futteraufnahme nicht protokollierbar. Des Weiteren haben Meerschweinchen ein komplexes Sozialgefüge, so dass möglicherweise Hierarchien für Schwankungen in der Futteraufnahme verantwortlich sein können. Daher sind in Tabelle 15 und 17 lediglich Durchschnittswerte ohne Standardabweichung angegeben. Die Gewichtsentwicklung innerhalb der zehnwöchigen Versuchsperiode ist in Tabelle 16 dargestellt. Die durchschnittliche tägliche Zunahme betrug 6,3 g und deckt sich mit den Angaben des NRC (1995) (5-7 g/Tag) für die Hauptwachstumsphase und denen von ca. 300 g schweren Tieren der gleichen Rasse bei LIU (1988). Die Gewichtsentwicklung lag geringfügig unterhalb der Erwartungswerte des Züchters (Harlan Winkelmann, Borchon, Deutschland).

Tabelle 15: Durchschnittliche Futteraufnahme [g] pro Tier und Tag während der zehnwöchigen Versuchsperiode

		Tägliche Futteraufnahme [g]/Tier									
	Woche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I	M	5,4	10,4	15,2	20,2	23,3	26,8	26,2	33,0	33,9	35,6
0 µg											
II	M	7,4	10,6	15,4	20,6	22,6	26,4	25,5	33,5	35,5	36,1
50 µg											
III	M	4,7	8,4	15,3	20,8	24,3	27,1	27,4	35,2	36,8	36,2
100 µg											
IV	M	6,1	10,5	14,3	20,1	22,5	26,0	26,4	34,4	36,3	36,9
150 µg											
V	M	5,0	9,8	15,5	21,2	23,4	26,3	26,1	32,4	33,4	33,6
200 µg											
VI	M	4,9	9,1	15,3	20,4	22,6	26,2	26,2	32,5	32,6	34,5
250 µg											

In der 10. Versuchswoche nahmen die Tiere durchschnittlich 35,5 g Futter/Tag auf. Das Durchschnittsgewicht aller Tiere betrug nach der 10. Versuchswoche 646 g/Tier. Die tägliche Selenaufnahme (y , [$\mu\text{g Se/kg LM}$]) entspricht $y = 52,4x + 0,296$ ($R^2 = 0,999$) (x = Selenzulage in mg/kg FM).

Tabelle 16: Gewichtsentwicklung [g] der Meerschweinchen innerhalb der Versuchsgruppen während der zehnwöchigen Versuchsperiode

		Tiergewicht [g]										
Woche		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I 0 µg	M	205	207	231	270	325	377	429	465	524	571	616
	SD	10,8	19,0	24,3	26,8	34,0	41,3	51,1	58,4	65,2	66,2	61,0
II 50 µg	M	213	207	221	274	329	379	440	465	535	592	645
	SD	10,7	32,1	41,2	33,5	35,0	38,6	37,3	34,2	43,2	47,5	57,3
III 100 µg	M	212	197	214	257	320	383	446	484	557	617	670
	SD	10,0	9,42	20,9	18,1	17,5	16,9	24,6	29,0	35,4	42,0	44,8
IV 150 µg	M	209	198	215	261	319	375	432	473	544	599	657
	SD	7,62	17,8	23,4	17,5	18,3	18,4	15,6	17,5	22,3	22,6	26,8
V 200 µg	M	205	187	214	261	321	377	429	467	535	572	642
	SD	7,93	19,7	22,5	18,5	22,0	34,3	40,3	40,7	51,4	58,9	58,4
VI 250 µg	M	208	191	213	260	323	375	431	482	542	587	647
	SD	5,04	10,1	17,1	11,4	19,0	24,3	25,1	35,8	41,6	49,4	54,7

Tukey-HSD: keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede

Die Lebendmassezunahme und die durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme (Anhangstabelle 1) der sechs Versuchsgruppen unterschieden sich über die gesamte Versuchsperiode nicht signifikant voneinander.

Tabelle 17: Durchschnittliche Futterverwertung [g Zunahme/g Futteraufnahme] während der zehnwöchigen Versuchsperiode

		Futterverwertung [g Zunahme/g Futter]									
Woche		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I 0 µg	M	0,06	0,32	0,37	0,39	0,32	0,28	0,19	0,26	0,20	0,18
	M	(-0,10)	0,19	0,49	0,39	0,32	0,33	0,14	0,30	0,23	0,21
III 100 µg	M	(-0,40)	0,28	0,41	0,43	0,37	0,33	0,20	0,29	0,23	0,21
	M	(-0,21)	0,23	0,45	0,42	0,36	0,31	0,22	0,30	0,22	0,23
V 200 µg	M	(-0,44)	0,40	0,43	0,41	0,34	0,28	0,21	0,30	0,22	0,21
	M	(-0,43)	0,34	0,44	0,44	0,33	0,30	0,28	0,26	0,20	0,25

4.5. Hämoglobin-Konzentration und Hämatokritwert

In Tabelle 18 sind die Hämatokritwerte und die Hämoglobin-Konzentrationen im Blut der Meerschweinchen dargestellt. Bezüglich des Hämatokritwertes konnte im Blut der Meerschweinchen keine signifikante Veränderung beobachtet werden. Auch die Hämoglobin-Konzentrationen zeigen keine Veränderungen durch die unterschiedlichen Selenzulagen über 10 Wochen.

Tabelle 18: Hämatokritwert [%] und Hämoglobin-Konzentration [mmol/L] der Meerschweinchen nach zehnwöchigem Fütterungsversuch mit unterschiedlichen Selenzulagen

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM		Hämatokrit [%]	Hämoglobin [mmol/L]
A <i>Ausgangsgruppe</i>	M <i>SD</i>	41,0 2,4	7,28 0,31
I 0 µg	M <i>SD</i>	42,8 2,6	6,59 0,49
II 50 µg	M <i>SD</i>	43,2 3,9	6,96 0,30
III 100 µg	M <i>SD</i>	42,1 4,7	6,81 0,55
IV 150 µg	M <i>SD</i>	42,6 2,0	6,53 0,36
V 200 µg	M <i>SD</i>	43,5 1,9	6,63 0,77
VI 250 µg	M <i>SD</i>	44,1 2,6	7,27 0,49

Tukey-HSD: keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede

4.6. Selenkonzentrationen in Plasma, Lysat, Leber, Testes, Gehirn, Muskel und Milz

Die Selenkonzentrationen im Blut und den unterschiedlichen Geweben der Meerschweinchen sind in den Tabellen 19 und 20 dargestellt. Die Konzentrationen in den Geweben der Ausgangsgruppe repräsentieren die Selenversorgung durch das Futter (Teklad 2040 Global Guinea Pig, Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland) beim Züchter (Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland). Nach dem zehnwöchigen Fütterungsversuch konnte insbesondere in der Leber, aber auch in Plasma, Lysat, Gehirn, Muskel und Milz eine deutliche Abstufung der Selenkonzentrationen zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden. Bei der Mangelgruppe wurde das Ziel einer Depletion in Plasma ($p < 0,001$), Lysat ($p < 0,001$), Leber ($p < 0,001$), Muskel ($p < 0,001$), Milz ($p < 0,001$) und Gehirn ($p < 0,001$) erreicht.

Tabelle 19: Selenkonzentrationen [$\mu\text{g}/\text{kg}$] im Blut der Meerschweinchen zu Versuchsbeginn und nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Se-Zulage

Gruppe $\mu\text{g Se-Zulage}/\text{kg FM}$		Plasma	Lysat
A <i>Ausgangsgruppe</i>	<i>M</i> <i>SD</i>	111 10,7	153 3,8
I 0 μg	<i>M</i> <i>SD</i>	17,2^a 2,45	31,9^a 18,2
II 50 μg	<i>M</i> <i>SD</i>	95,3^b 6,8	119^b 21,9
III 100 μg	<i>M</i> <i>SD</i>	101^b 6,7	135^{bc} 15,4
IV 150 μg	<i>M</i> <i>SD</i>	99,8^b 6,5	148^c 6,4
V 200 μg	<i>M</i> <i>SD</i>	115^c 6,60	152^c 12,5
VI 250 μg	<i>M</i> <i>SD</i>	123^c 10,1	168^c 23,3

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte. Plasma: Games-Howell, $p < 0,001$; Lysat: Tukey-HSD, $p < 0,001$

In den Testes unterschied sich nur die Gruppe V (trotz Wiederholungsmessungen) signifikant ($p < 0,01$) von der Mangelgruppe. Alle anderen Gruppen lagen etwa im gleichen Bereich. Die unterschiedlichen Selenzulagen hatten somit bei einer Ausnahme keinen signifikanten Einfluss auf die Selenkonzentration in diesem Organ.

Im Muskel zeigt sich neben einer hohen Konzentration bei der Ausgangsgruppe, dass sich lediglich die Mangelgruppe signifikant von den supplementierten Tieren unterscheidet. Eine weitere Steigerung der Selenkonzentration des Muskels mit einer von 50 µg auf 100 µg und darüber erhöhten Selenzufuhr je kg Futter hat nicht stattgefunden. In der Milz kann ein signifikanter Anstieg der Selenkonzentration mit der Selenzulage verzeichnet werden. Weitaus geringer ist der Anstieg der Selenkonzentration mit der Zulage im Gewebe des Gehirns.

Tabelle 20: Selenkonzentrationen [µg/kg] in Leber, Testes, Gehirn, Muskel und Milz der Meerschweinchen zu Versuchsbeginn und nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM		Leber	Testes	Gehirn	Muskel	Milz
A Ausgangsgruppe	M SD	857 115	243 34,4	159 10,9	146 4,6	261 18,9
I 0 µg	M SD	48,3^a 7,3	209^a 24,8	103^a 8,8	29,0^a 4,8	98,5^a 5,5
II 50 µg	M SD	273^b 11,8	234^{ab} 14,6	133^b 10,3	72,7^b 6,6	221^b 9,4
III 100 µg	M SD	359^c 35,1	229^{ab} 29,4	141^{bc} 10,9	76,2^b 5,9	236^{bc} 15,5
IV 150 µg	M SD	454^d 50,5	228^{ab} 32,0	149^{bc} 8,2	79,5^b 5,3	254^c 12,7
V 200 µg	M SD	605^e 58,5	262^b 23,4	149^{bc} 11,8	78,8^b 9,5	283^d 14,6
VI 250 µg	M SD	651^e 72,3	232^{ab} 17,2	153^c 13,1	77,8^b 4,3	286^d 11,9

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte. Leber: Games-Howell; Testes, Gehirn, Muskel, Milz: Tukey-HSD; $p < 0,05$

4.7. Vitamin E-Konzentrationen im Plasma

In Tabelle 21 sind die Vitamin E-Konzentrationen im Plasma dargestellt, die eine erhebliche Streubreite aufweisen. Ein signifikanter Einfluss unterschiedlicher Selenzulagen konnte nicht beobachtet werden.

Tabelle 21: Vitamin E-Konzentrationen im Plasma [$\mu\text{mol/L}$] der Meerschweinchen zu Versuchsbeginn und nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage

Gruppe $\mu\text{g Se-Zulage/kg FM}$		Plasma [$\mu\text{mol/L}$]		
		α -Tocopherol	γ -Tocopherol	Gesamt-Tocopherol
A <i>Ausgangsgruppe</i>	M <i>SD</i>	4,90 1,24	0,24 0,09	4,96 1,25
I 0 μg	M <i>SD</i>	7,64 2,68	0,28 0,11	7,71 2,71
II 50 μg	M <i>SD</i>	4,82 1,22	0,16 0,07	4,86 1,23
III 100 μg	M <i>SD</i>	8,38 5,04	0,59 0,61	8,53 5,18
IV 150 μg	M <i>SD</i>	6,96 2,21	0,31 0,18	7,03 2,24
V 200 μg	M <i>SD</i>	5,77 3,46	0,27 0,14	5,83 3,49
VI 250 μg	M <i>SD</i>	7,18 2,31	0,35 0,13	7,27 2,34

Tukey-HSD: keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede

4.8. Selenoenzyme

4.8.1. Glutathionperoxidasen

Aus Tabelle 22 wird ersichtlich, dass eine Fütterung mit selenarmem Futter zu einem signifikanten Aktivitätsverlust der selenabhängigen Glutathionperoxidase in Plasma ($p\text{GPx}$, $p < 0,01$), Hämolyt ($p < 0,001$), Leber ($p < 0,001$), Niere ($p < 0,001$), Herz ($p < 0,001$) und Lunge ($p < 0,001$) führte. Eine Selenzulage von 250 $\mu\text{g/kg FM}$ führte nicht zwangsläufig zur höchsten Aktivität; eine Ausnahme stellt das Herz dar. Erwartungsgemäß wies das Hämolyt die höchste Aktivität auf. Die absteigende Reihenfolge der maximalen GPx-Aktivität in den Untersuchungsmedien bei den untersuchten Meerschweinchen ist:

Hämolyt > Niere > Lunge > Herz > Leber (> Plasma)

Der Aktivitätsverlust der pGPx gegenüber den versorgten Gruppen betrug 63,2 %. In der Leber und in der Niere sank die Aktivität auf 17,4 % bzw. 46,9 %. In Hämolysat, Herz und Lunge betrug der Unterschied zwischen Mangelgruppe und den höchsten gemessenen Aktivitäten 74,4 %, 52,8 % und 53,8 %.

Tabelle 22: SeGpx-Aktivität [mU/mg Protein] in den Organen der Meerschweinchen nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage im Futter

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM		SeGPx [mU/mg Protein]					
		Plasma	Hämolysat	Leber	Niere	Herz	Lunge
I 0 µg	M	1,98 ^a	11,9 ^a	2,98 ^a	15,2 ^a	9,23 ^a	13,2 ^a
	SD	0,18	4,75	0,39	2,54	0,55	1,26
II 50 µg	M	5,37 ^b	34,1 ^b	19,1 ^b	31,2 ^b	17,7 ^b	25,9 ^b
	SD	0,69	7,16	3,31	3,15	2,22	1,82
III 100 µg	M	5,62 ^b	38,3 ^b	16,4 ^b	32,9 ^b	20,1 ^{bc}	28,5 ^{bc}
	SD	1,15	10,0	2,71	4,97	1,97	1,72
IV 150 µg	M	5,48 ^b	43,3 ^{bc}	14,8 ^b	32,1 ^b	20,8 ^{bc}	30,3 ^c
	SD	1,22	5,43	1,55	1,55	1,57	3,07
V 200 µg	M	5,47 ^b	50,9 ^c	16,7 ^b	32,7 ^b	23,3 ^c	27,5 ^{bc}
	SD	0,60	8,70	2,79	2,79	2,60	1,78
VI 250 µg	M	4,97 ^b	45,2 ^{bc}	18,8 ^b	33,1 ^b	22,3 ^c	28,0 ^{bc}
	SD	0,96	8,68	2,42	7,25	2,80	3,20

1 U = 1 µmol NADPH-Oxidation • Minute⁻¹ • mL⁻¹ bei 340 nm

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte: Plasma (II: n = 6), Lysat, Niere, Herz und Lunge: Tukey-HSD, $p < 0,05$; Leber: Games-Howell, $p < 0,05$

4.8.2. Phospholipidhydroperoxid-reduzierende Aktivität

Die PCOOH-reduzierende Aktivität in Leber, Niere und Herz (Tabelle 23) der selendefizienten Meerschweinchen unterschied sich signifikant von der Aktivität selensupplementierter Tiere. Die absteigende Reihenfolge der PCOOH-reduzierenden Aktivität in den Organen ist:

Leber > Testes > Niere > Gehirn > Herz.

In der Niere setzt sich die Mangelgruppe signifikant von den Gruppen II, III, V ($p < 0,01$) und VI ($p < 0,05$) ab, wohingegen es Überschneidungen mit der Gruppe IV gibt. In Leber und Herz unterscheidet sich die Gruppe I signifikant von allen supplementierten Gruppen ($p < 0,01$). Kein signifikanter Unterschied bezüglich der PCOOH-reduzierenden Aktivität konnte in Gehirn und Testes gemessen werden.

Tabelle 23: PCOOH-reduzierende Aktivität [mU/mg Protein] in den Organen der Meerschweinchen nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage im Futter

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM		PCOOH-reduzierende Aktivität [mU/mg Protein]				
		Niere	Leber	Herz	Gehirn	Testes
I	M	0,79 ^a	2,32 ^a	0,33 ^a	0,93	2,05
0 µg	SD	0,18	0,51	0,10	0,17	0,24
II	M	1,48 ^b	3,77 ^b	0,63 ^b	1,10	2,38
50 µg	SD	0,43	0,33	0,06	0,21	0,34
III	M	1,36 ^b	3,61 ^b	0,80 ^b	0,94	2,22
100 µg	SD	0,29	0,71	0,09	0,08	0,57
IV	M	1,21 ^{ab}	3,39 ^b	0,64 ^b	1,09	1,73
150 µg	SD	0,22	0,38	0,09	0,18	0,55
V	M	1,37 ^b	3,75 ^b	0,72 ^b	1,05	2,00
200 µg	SD	0,32	0,36	0,15	0,17	0,49
VI	M	1,30 ^b	3,74 ^b	0,75 ^b	1,11	2,31
250 µg	SD	0,24	0,40	0,12	0,12	0,33

1 U = 1 µmol NADPH-Oxidation • Minute⁻¹ • mL⁻¹ bei 340 nm

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte. Leber, Niere, Gehirn und Testes: Tukey-HSD, $p < 0,05$; Herz (I und V: n=6): Games-Howell, $p < 0,01$

4.8.3. Thioredoxinreduktase

Die Aktivitäten der TrxR (Tabelle 24) in Leber ($p < 0,05$), Niere ($p < 0,001$) und Herz ($p < 0,001$) der Mangelgruppe unterscheiden sich signifikant von den supplementierten Tieren. Im Leberhomogenat ließ sich die TrxR-Aktivität der Gruppen III und IV statistisch nur tendenziell von der Mangelgruppe trennen.

Tabelle 24: TrxR-Aktivität [mU/mg Protein] in den Organen der Meerschweinchen nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Se-Zulage im Futter

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM		TrxR-Aktivität [mU/mg Protein]		
		Leber	Niere	Herz
I	M	3,73 ^a	3,27 ^a	2,49 ^a
0 µg	SD	1,07	0,28	0,86
II	M	5,44 ^b	4,17 ^b	5,14 ^b
50 µg	SD	0,76	0,16	0,85
III	M	4,97 ^{ab}	4,39 ^b	4,74 ^b
100 µg	SD	0,74	0,22	0,60
IV	M	5,17 ^{ab}	4,56 ^b	5,01 ^b
150 µg	SD	1,24	0,42	1,00
V	M	5,63 ^b	4,62 ^b	4,84 ^b
200 µg	SD	0,62	0,51	1,08
VI	M	5,46 ^b	4,65 ^b	4,76 ^b
250 µg	SD	1,13	0,34	0,57

1 U = Bildung von 2 mmol TNB • Minute⁻¹ • mL⁻¹ bei 412 nm

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte (Tukey-HSD, $p < 0,05$)

4.8.4. Deiodinasen

Die D1-Aktivität im Leberhomogenat (Tabelle 25) der Mangelgruppe unterscheidet sich signifikant ($p < 0,001$) von der der supplementierten Gruppen. Der Abfall im Selenmangel betrug 75,6 %. Die höhere Aktivität in den Gruppen V und VI unterscheidet sich nicht mehr signifikant von den mit weniger Selen versorgten Gruppen II, III und IV.

Tabelle 25: D1-Aktivität [fmol T_3 /(min • mg Protein)] im Leberhomogenat der Meerschweinchen nach zehnwöchigem Fütterungsversuch mit unterschiedlichen Selenzulagen

Gruppe $\mu\text{g Se-Zulage/kg FM}$		D1-Aktivität [fmol T_3 /(min • mg Protein)]	
		Leber	
I	M	15,9 ^a	
0 μg	SD	9,08	
II	M	64,7 ^b	
50 μg	SD	10,9	
III	M	63,1 ^b	
100 μg	SD	11,7	
IV	M	60,2 ^b	
150 μg	SD	11,5	
V	M	67,4 ^b	
200 μg	SD	9,85	
VI	M	70,4 ^b	
250 μg	SD	11,8	

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte. Tukey-HSD, $p < 0,001$

4.9. Gesamt-GPx und selenunabhängige GPx

In Tabelle 26 sind die Werte für die Gesamt- und die selenunabhängige GPx sowie der prozentuale Anteil der selenunabhängigen GPx an der Gesamt-GPx in Leber und Niere dargestellt. In der Leber konnte kein signifikanter Einfluss der Selenversorgung auf die Aktivitäten der Gesamt- und selenunabhängigen GPx festgestellt werden. In der Niere zeigt sich kein einheitliches Bild: Die Aktivität der Gesamt-GPx ist in Gruppe VI am höchsten. Die der selenunabhängigen GPx weist sowohl in der Mangel- als auch in der am höchsten versorgten Gruppe VI die höchsten Werte auf. Statistisch ist lediglich die Mangelgruppe eindeutig von den Gruppen II-V trennbar, bei allen anderen Gruppen zeigen sich Überschneidungen. Stellt man den prozentualen Anteil der selenunabhängigen GPx-Aktivität an der Gesamt-GPx dar, lassen sich in beiden

Organen signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) zwischen Mangelgruppe und supplementierten Tieren feststellen.

Tabelle 26: Gesamt- und non-SeGPx-Aktivität [mU/mg Protein] in den Organen der Meerschweinchen nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Se-Zulage

Gruppe $\mu\text{g Se-Zulage/kg FM}$		Leber			Niere		
		Gesamt-GPx	Non-SeGPx	Non-SeGPx an Gesamt-GPx	Gesamt-GPx	Non-SeGPx	Non-SeGPx an Gesamt-GPx
		[mU/mg]		%-Anteil	[mU/mg]		%-Anteil
I	M	178	175	98,3 ^a	95,8 ^a	80,6 ^a	84,1 ^a
0 μg	SD	18,6	18,7	0,34	6,57	6,41	2,6
II	M	195	176	90,2 ^b	97,9 ^a	66,7 ^{bc}	67,7 ^b
50 μg	SD	16,5	14,4	1,26	11,7	12,6	4,9
III	M	179	162	90,7 ^b	98,9 ^{ab}	66,0 ^{bc}	66,5 ^b
100 μg	SD	18,5	18,5	1,80	5,56	8,50	5,8
IV	M	199	184	92,4 ^b	98,8 ^{ab}	66,7 ^{bc}	67,5 ^b
150 μg	SD	30,3	30,9	1,62	5,27	6,28	5,2
V	M	182	166	90,8 ^b	96,6 ^a	63,9 ^c	66,1 ^b
200 μg	SD	27,4	26,0	1,38	9,19	7,08	2,6
VI	M	190	172	90,2 ^b	111 ^b	78,2 ^{ab}	70,4 ^b
250 μg	SD	38,5	38,1	1,96	7,71	4,66	5,0

1 U = 1 $\mu\text{mol NADPH-Oxidation} \cdot \text{Minute}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ bei 340 nm

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte. Tukey-HSD, $p < 0,05$; %-Anteil $p < 0,001$

4.10. Glutathion S-Transferase

Die GST-Aktivität wurde gemessen, um eine etwaige Kompensation des mangelbedingten cGPx-Aktivitätsverlusts nachzuweisen. Die GST-Aktivität (Tabelle 27) in der Leber wurde durch unterschiedliche Selenzulagen nicht beeinflusst. Die signifikanten Unterschiede in der Niere sind anscheinend ungerichteter Natur. Die in der Leber gemessene Aktivität ist erheblich höher als die in der Niere.

Tabelle 27: GST-Aktivität [U/mg Protein] in den Organen der Meerschweinchen nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage im Futter

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM		GST-Aktivität [U/mg Protein]	
		Leber	Niere
I	M	12,6	1,82 ^{abc}
0 µg	SD	1,87	0,14
II	M	13,6	1,78 ^b
50 µg	SD	1,86	0,17
III	M	12,9	1,92 ^{abc}
100 µg	SD	1,35	0,14
IV	M	13,3	1,85 ^{abc}
150 µg	SD	1,85	0,13
V	M	13,1	1,99 ^{abc}
200 µg	SD	1,41	0,25
VI	M	13,3	2,11 ^c
250 µg	SD	1,70	0,21

1 U = Konjugation von 1 µmol CDNB mit GSH • Minute⁻¹ • mL⁻¹ bei 340 nm, pH 6,5 und 25 °C

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte. Tukey-HSD, $p < 0,05$

4.11. Glutathionreduktase

Bezüglich der Glutathionreduktaseaktivität (Tabelle 28) in der Leber konnte kein signifikanter Einfluss der Selenzulagen beobachtet werden. Trotz errechneter statistischer Unterschiede ist ein gerichteter Einfluss in der Niere nicht zu erkennen. Die Aktivität in diesem Organ war erheblich höher als in der Leber.

Tabelle 28: Glutathionreduktase-Aktivität [mU/mg Protein] in Leber und Niere der Meerschweinchen nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM		GR-Aktivität [mU/mg Protein]	
		Leber	Niere
I	M	52,6	248 ^{ac}
0 µg	SD	4,2	14,4
II	M	52,0	254 ^{ac}
50 µg	SD	3,7	20,4
III	M	52,2	334 ^b
100 µg	SD	5,1	11,1
IV	M	54,5	346 ^b
150 µg	SD	4,4	12,8
V	M	55,7	240 ^c
200 µg	SD	4,6	21,7
VI	M	56,4	273 ^a
250 µg	SD	7,0	17,9

1 U = 1 µmol NADPH-Oxidation • Minute⁻¹ • mL⁻¹ bei 340 nm

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte. Tukey-HSD, $p < 0,05$

4.12. Reduziertes und oxidiertes Glutathion

Die Glutathionkonzentrationen im Leberhomogenat des Meerschweinchens zeigen keinen gerichteten Seleneinfluss. Auffällig sind allerdings die niedrigen Werte für tGSH, GSH und GSSG in der Mangelgruppe. Aufgrund der hohen Standardabweichungen konnten diese Werte jedoch nicht von den Werten der supplementierten Gruppen getrennt werden. Das Verhältnis von reduziertem zum oxidierten Glutathion lag in etwa im erwarteten Bereich von 10:1 und wies ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf.

Tabelle 29: Gesamt-Glutathion (tGSH), reduziertes Glutathion (GSH), oxidiertes Glutathion (GSSG) [$\mu\text{mol/g}$ Frischmasse] und das Verhältnis zwischen GSH und GSSG in der Leber der Meerschweinchen nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage

Gruppe $\mu\text{g Se-Zulage/kg FM}$		Glutathionkonzentrationen [$\mu\text{mol/g}$ Frischmasse]			Verhältnis
		tGSH	GSH	GSSG	GSH:GSSG
I 0 μg	M	2,69 ^a	2,44 ^a	0,25 ^a	9,94
	SD	1,24	1,18	0,10	3,89
II 50 μg	M	5,27 ^{ab}	4,67 ^{ab}	0,60 ^b	7,94
	SD	1,66	1,54	0,17	2,57
III 100 μg	M	3,67 ^{ab}	3,23 ^{ab}	0,44 ^{ab}	7,08
	SD	1,84	1,77	0,12	3,27
IV 150 μg	M	3,99 ^{ab}	3,64 ^{ab}	0,35 ^{ac}	9,42
	SD	1,43	1,34	0,14	2,27
V 200 μg	M	5,80 ^b	5,33 ^b	0,47 ^{ab}	10,2
	SD	1,32	1,33	0,13	1,60
VI 250 μg	M	4,66 ^{ab}	4,12 ^{ab}	0,55 ^{bc}	6,78
	SD	2,05	2,01	0,26	1,93

1 GSSG ausgedrückt als 2 GSH; tGSH ausgedrückt als GSH;
 Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte. Tukey-HSD, $p < 0,05$; tGSH, GSSG, GSH: I (n = 6), GSH:GSSG: I, IV, V, VI (n = 6)

4.13. Katalase

In Tabelle 30 ist die peroxidative Katalaseaktivität im Leberhomogenat der Meerschweinchen dargestellt. Bei diesem Parameter konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden. Die absoluten Werte liegen etwa um den Faktor 4 höher als die von WHEELER *et al.* (1990) für Ratten veröffentlichten Werte. Dies deckt sich mit der erheblich höher gemessenen katalytischen Katalaseaktivität des Meerschweinchens (HOLMES und MASTERS 1972).

Tabelle 30: Peroxidative Katalaseaktivität [U/mg] im Leberhomogenat der Meerschweinchen nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM		Peroxidative Katalaseaktivität [U/mg]	
		Leber	
I	M	1,58	
0 µg	SD	0,40	
II	M	1,60	
50 µg	SD	0,35	
III	M	1,41	
100 µg	SD	0,32	
IV	M	1,76	
150 µg	SD	0,31	
V	M	1,60	
200 µg	SD	0,24	
VI	M	1,36	
250 µg	SD	0,37	

1 U = 1 µmol gebildetes Formaldehyd • Minute⁻¹ • mL⁻¹ bei 550 nm
 Tukey-HSD: keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede

4.14. Triiodthyronin- und Thyroxinkonzentrationen im Plasma

Die T₃-Konzentration im Plasma der Mangelgruppe unterschied sich signifikant ($p < 0,001$) von jener der Gruppe VI. Die Gruppen III und V unterschieden sich zwar signifikant von Gruppe VI, jedoch nicht von den Gruppen I, II und IV. Bei der T₄-Konzentration im Plasma unterschieden sich die Gruppen II, III, V ($p < 0,01$) und IV ($p < 0,001$) signifikant von Gruppe VI. Ein signifikanter Unterschied der Mangelgruppe konnte zu keiner der Versuchsgruppen festgestellt werden. Anhand der Bildung des T₄:T₃-Verhältnisses, zeigt sich eine signifikante Verschiebung ($p < 0,001$) zum T₄ in der Mangelgruppe.

Tabelle 31: Schilddrüsenhormonkonzentrationen [nmol/L] und deren Verhältnis zueinander im Plasma der Meerschweinchen nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM		Schilddrüsenhormonkonzentrationen		Verhältnis
		T ₄ [nmol/L]	T ₃ [nmol/L]	T ₄ :T ₃
I	M	34,1 ^{ab}	0,725 ^a	47,2 ^a
0 µg	SD	6,0	0,11	6,1
II	M	29,0 ^a	0,957 ^{ab}	30,6 ^b
50 µg	SD	2,7	0,13	3,2
III	M	29,1 ^a	0,913 ^a	32,7 ^b
100 µg	SD	3,4	0,20	5,3
IV	M	28,6 ^a	0,923 ^{ab}	31,0 ^b
150 µg	SD	4,7	0,11	3,7
V	M	29,8 ^a	0,909 ^a	33,3 ^b
200 µg	SD	2,0	0,13	4,3
VI	M	39,1 ^b	1,16 ^b	33,9 ^b
250 µg	SD	5,9	0,19	2,4

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte. T₄: Tukey-HSD ($p < 0,01$); T₃: Tukey-HSD ($p < 0,05$); T₄:T₃: Tukey-HSD ($p < 0,001$)

4.15. Vitamin C-Konzentrationen im Plasma

Die Vitamin C-Konzentrationen im Plasma der Meerschweinchen (Tabelle 32) wiesen innerhalb der Versuchsgruppen eine große Streubreite auf. Ein statistisch signifikanter Einfluss der Selenversorgung konnte nicht festgestellt werden, auch wenn die Werte der Gruppen V und VI niedriger sind. Ähnlich hohe Standardabweichungen fanden sich auch in anderen Arbeiten zum Selenmangel des Meerschweinchens (HILL *et al.* 2003). Die Werte liegen jedoch über denen von Meerschweinchen, die eine vergleichbare Vitamin C-Zulage erhielten (HALLOWAY und RIVERS 1984, POOVAIAH *et al.* 1987, BERGER *et al.* 1989, PATE *et al.* 1996).

Tabelle 32: Vitamin C-Konzentration [$\mu\text{mol/L}$] im Plasma der Meerschweinchen nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage

Gruppe $\mu\text{g Se-Zulage/kg FM}$		Vitamin C [$\mu\text{mol/L}$]	
		Plasma	
I 0 μg	M	17,2	
	SD	3,08	
II 50 μg	M	16,6	
	SD	4,42	
III 100 μg	M	18,6	
	SD	4,66	
IV 150 μg	M	18,1	
	SD	7,32	
V 200 μg	M	13,5	
	SD	3,17	
VI 250 μg	M	13,4	
	SD	2,66	

Tukey-HSD: VI (n=6), keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede

4.16. Thiobarbitursäurereaktive Substanzen (TBA-RS) in der Leber

Bei den thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (Tabelle 33) unterschied sich die mit 0,15 mg/kg FM supplementierte Gruppe signifikant ($p < 0,05$) von allen anderen Versuchsgruppen. Wiederholungsmessungen bestätigten diese relativ hohen Werte in Gruppe IV.

Tabelle 33: TBA-RS-Konzentration in der Leber der Meerschweinchen vor Versuchsbeginn und nach zehnwöchiger Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM		TBA-RS [nmol/g Frischmasse]	
		Leber	
A <i>Ausgangsgruppe</i>	M SD	0,51 ^a	0,05
I 0 µg	M SD	0,54 ^a	0,05
II 50 µg	M SD	0,50 ^a	0,06
III 100 µg	M SD	0,51 ^a	0,08
IV 150 µg	M SD	0,70 ^b	0,13
V 200 µg	M SD	0,62 ^{ab}	0,08
VI 250 µg	M SD	0,56 ^a	0,10

Tukey-HSD, $p < 0,05$

4.17. Broken-Line-Analyse

Die Broken-Line-Analyse ist eine in der Tierernährung häufig angewendete Methode, um nach Fütterungsversuchen den Nährstoffbedarf genauer abzuleiten, als es nach der bloßen Einteilung der Versuchsgruppen möglich wäre. Das Modell erwies sich für die meisten in dieser Arbeit erhobenen Parameter als ungeeignet, da sich nur statistisch signifikante Unterschiede zwischen Mangel- und versorgten Gruppen zeigten. Für die Parameter cGPx in Herz und Lysat und TrxR in der Niere konnte jedoch eine Steigerung der Enzymaktivität über die zweite Versuchsgruppe hinaus beobachtet werden. Für diese Werte wurde eine Broken-Line-Analyse vorgenommen (Tabelle 34). Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 graphisch dargestellt.

Tabelle 34: Bedarfsableitung über die Auswertung der Parameter cGPx in Herz und Hämolyat und TrxR in der Niere mit dem broken line model

Parameter	R	L	U	V	95 %-Konfidenzgrenzen R	
					untere	obere
cGPx Herz SD	0,062 0,009	19,6 1,03	168 22,8	17,8 7,2	0,043	0,080
cGPx Lysat SD	0,058 0,013	37,8 4,03	444 85,3	56,5 27,0	0,032	0,084
TrxR Niere SD	0,061 0,013	4,37 0,16	18,1 3,58	1,66 1,13	0,034	0,087

R = x-Wert des Breakpoints, L = y-Wert des Breakpoints, U = Steigung der Geraden links des Breakpoints, V = Steigung der Geraden rechts des Breakpoints

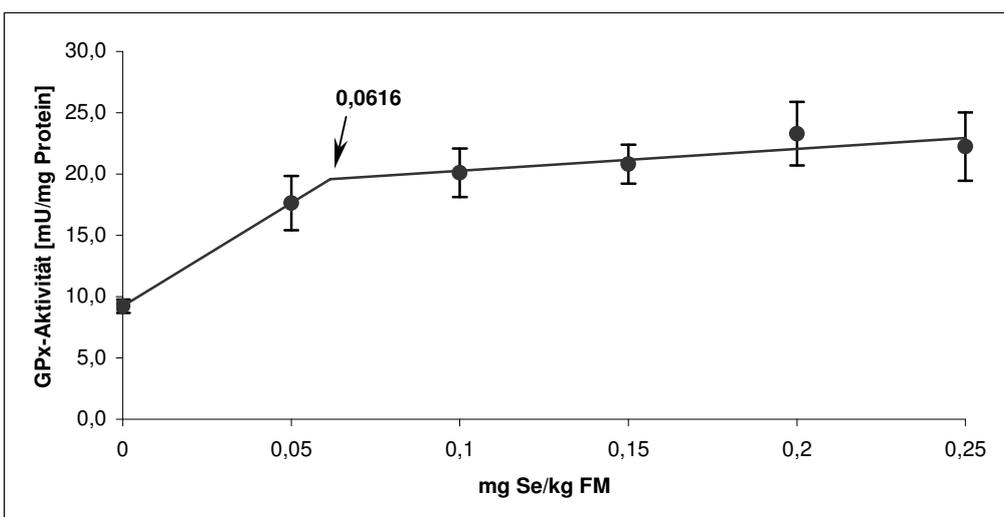
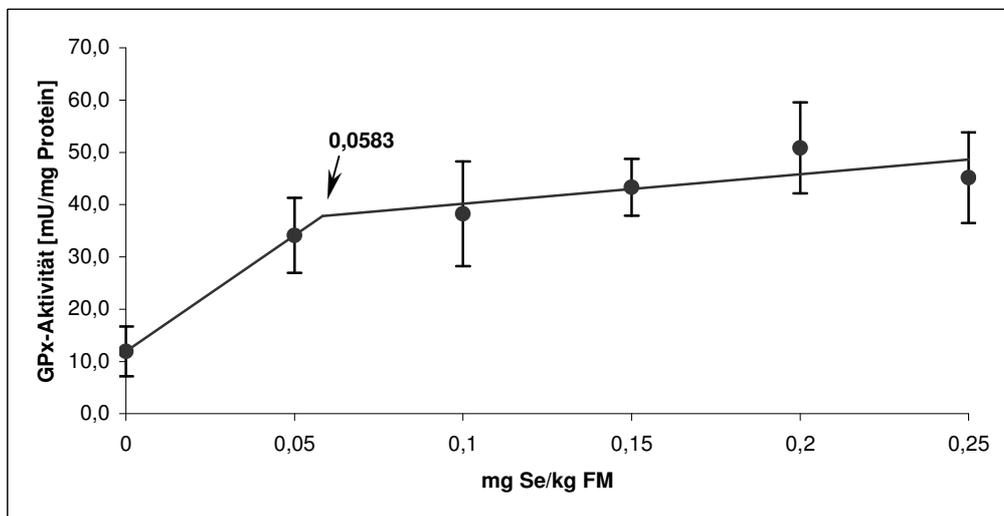
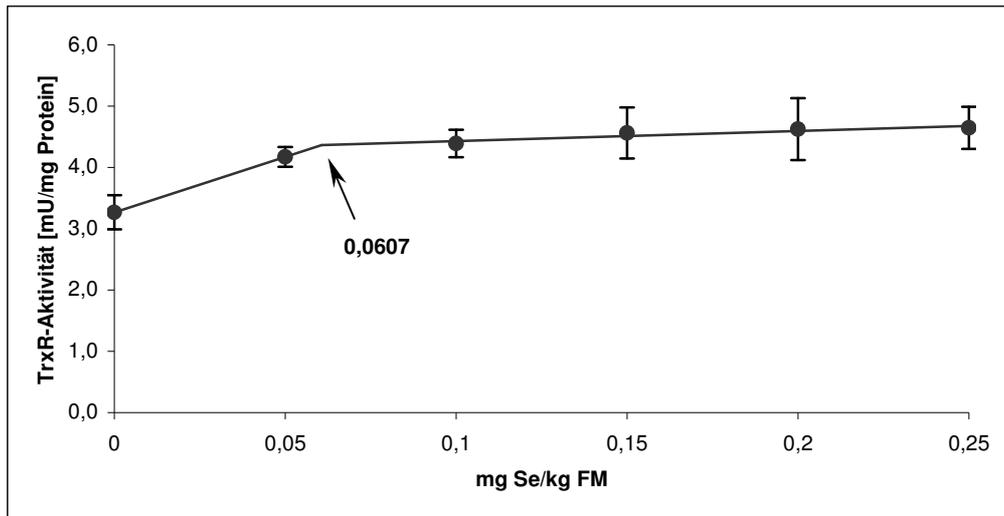


Abbildung 18: Graphische Darstellung der Broken-Line-Analyse bei den Parametern TrxR in der Niere (oben), cGPx-Aktivitäten in Hämolystat (Mitte) und Herz (unten)

5. Diskussion

5.1. Einfluss unterschiedlicher Selenzulagen auf die zotechnischen Parameter

Die 10-wöchige Selendepletion hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum. In der 10. Versuchswoche lag der Gruppenmittelwert der Mangelgruppe allerdings tendenziell am niedrigsten. Nur eine längere Versuchsperiode hätte mehr Aufschluss über den Einfluss eines Selenmangels auf das Wachstum geben können. Der Selenspeicher der vom Zuchtunternehmen bezogenen Tiere reichte möglicherweise aus, um eine Wachstumsretardation zunächst zu verhindern.

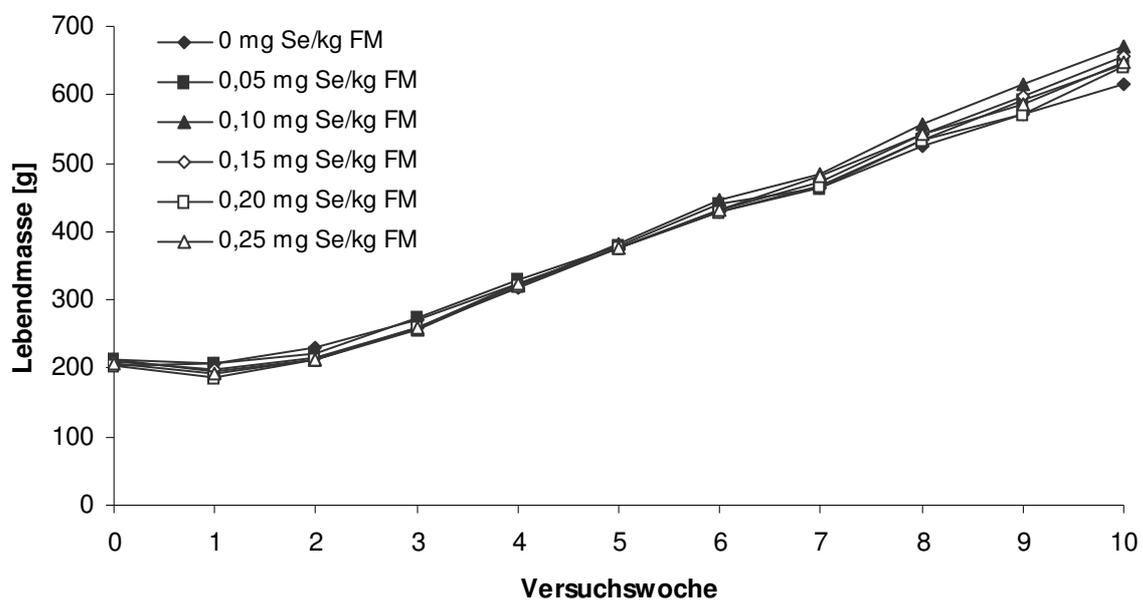


Abbildung 19: Lebendmasseentwicklung der Meerschweinchen während einer 10-wöchigen Versuchsperiode mit unterschiedlicher Selenzulage

Die schlechte Gewichtsentwicklung in der ersten Versuchswoche resultiert aus einer umstellungsbedingten Futtermittelverweigerung. Da Cellulose bei der Rohfaserbestimmung nur unvollständig erfasst wird, wurden im Nachhinein ADF, NDF und ADL bestimmt, um Fehler bei der Futtermischung auszuschließen. Das Basisfutter enthielt $21,7 \pm 0,08$ % NDF, $13,7 \pm 0,34$ % ADF, und $0,594 \pm 0,08$ % ADL. Rechnerisch ergeben sich hieraus 8,00 % Hemicellulose und 13,1 % Cellulose (Soll 14 % Cellulose). Die verwendete Cellulose hatte als mittellange Faser (200 μ m) vermutlich nicht die gewünschte Strukturwirksamkeit, weshalb es zu Verdauungsstörungen bei

den Tieren kam. Nach der Fütterung von zusätzlichem Heu bzw. Stroh stieg die Futteraufnahme sprunghaft an und die Tiere legten an Gewicht zu.

Ein Einfluss des Selenmangels auf das Körpergewicht wachsender Meerschweinchen ist nur in wenigen Studien dokumentiert. Ein über 72 Tage erzeugter Selenmangel führte in der Studie von CAMMACK *et al.* (1995) zu einem um 27% verringerten Wachstum. Leider finden sich hier keine Angaben zur Fütterung der Zuchttiere. HILL *et al.* (2001) konnten keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung bei einem über 135 Tage induzierten Selenmangel beobachten. Bei einer Versuchsperiode von 70 Tagen konnten BURK *et al.* (1981) ebenfalls keine Veränderungen im Wachstum feststellen. POOVAIAH *et al.* (1987) zitieren E. L. MCGOWN (Letterman Army Institute of Research, San Francisco, Kalifornien, USA), wonach Meerschweinchen über zwei Generationen mit einer Selenmangeldiät gefüttert wurden, ohne dass große pathologische Veränderungen festzustellen waren; weitere Informationen sind hierzu leider nicht verfügbar. Bei Kaninchen konnten nach einer Versuchsperiode von 12-15 Wochen mit einem Vitamin E- und selenarmen Futter ebenfalls keine Unterschiede in der Gewichtsentwicklung beobachtet werden (TURAN *et al.* 1997). Da die Gewichtsentwicklung mit dem Schilddrüsenhormonstoffwechsel zusammenhängt, sind weitere Diskussionspunkte zu diesem Parameter dort zu finden (Kap. 5.4.4.).

5.2. Hämoglobin-Konzentration und Hämatokritwert

Die Hämoglobin-Konzentration des erwachsenen Meerschweinchens liegt bei 6,83 bis 9,31 mmol/L, der Hämatokritwert zwischen 37 und 48 % (NOONAN 1994). Sowohl die Hämoglobin-Konzentration als auch der Hämatokritwert der Meerschweinchen blieben durch die unterschiedlichen Selenzulagen unverändert und lagen in diesem Bereich. Bei Ratten konnten während einer 20-wöchigen Selenmangelstudie ebenfalls keine Veränderungen bei der Hämoglobin-Konzentration und dem Hämatokritwert festgestellt werden (MATSUDA *et al.* 1998). SUZUKI *et al.* (1988) konnten bei Ratten eine erhöhte Hämolyse neigung selendefizienter Erythrozyten nach Zugabe von *tert*-BuOOH zum Inkubationsmedium beobachten. Bei der Abwesenheit von GSH im Medium waren auch die Zellen adäquat versorgter Tiere betroffen. Auch im Schweineblut konnte kein Einfluss eines Selen- und/oder Vitamin E-Mangels auf die hämatologischen Parameter beobachtet werden (FONTAINE *et al.* 1977).

5.3. Selenkonzentrationen in ausgewählten Organen und in Plasma und Lysat

In der Meerschweinchenleber lagen die Selenkonzentrationen der Tiere, die eine Selenzulage von 200 µg/kg FM erhielten, etwa bei 605 µg/kg. Im Vergleich dazu betrug die Selenkonzentration bei Ratten, die unter ähnlichen Bedingungen (7 Wochen, 200 µg Se/kg FM) gehalten wurden, ca. 880 µg/kg FM (FISCHER *et al.* 2001). Bei der Ratte sind 75 % des Selens in der Leber an die cGPx gebunden (WEISS SACHDEV und SUNDE 2001). Vergleicht man die cGPx-Aktivitäten beider Tierarten, weist das Meerschweinchen nur 9,2 % der cGPx-Aktivität der Ratte auf. CHENG *et al.* (1997) wiesen einen deutlichen Abfall der Selenkonzentration in der Leber von cGPx-Knock-out-Mäusen nach. Es muss also davon ausgegangen werden, dass Ratten und Mäuse Selen aus dem Futter zügig in die cGPx einbauen, das Meerschweinchen aber Selen in der Leber anflutet, das nicht in funktionelle Selenoproteine eingebaut werden kann. Das Meerschweinchen retiniert anscheinend weniger Nahrungsselen und wäre daher zwar auf eine geringere aber kontinuierliche Selenzufuhr angewiesen.

Bei der Ratte sind nach Verfütterung einer anorganischen Selenquelle die Selenkonzentrationen im Muskel im Vergleich zur Leber relativ gering (WHANGER und BUTLER 1988, BEHNE *et al.* 1991). Auch die GPx weist unabhängig von der Selenquelle nur eine geringe Aktivität im Muskel auf (BEHNE und WOLTERS 1983, WHANGER und BUTLER 1988). Beim Meerschweinchen fand keine Akkumulation proportional zur Selenzulage statt. Dennoch waren bei der Ausgangsgruppe zu Versuchsbeginn gewisse Selenkonzentrationen in diesem Gewebe vorhanden, die vom Futter des Züchters herrühren müssen. Über die chemische Form des Selens in diesem Futter ist im Analyseprotokoll nichts vermerkt. Es ist wahrscheinlich, dass ein Teil des analysierten Selens im Futter des Züchters als Selenomethionin vorlag und unspezifisch in den Muskel eingebaut wurde. Aus dem Vergleich versorgter Gruppen mit der Ausgangsgruppe lässt sich ein gewisser Proteinumsatz und ein Verwachsen dieses SelenSpeichers ableiten. Das durch BEILSTEIN und WHANGER (1988) als „SelenSpeicher“ bezeichnete Reservoir entfällt allgemein beim Verfüttern anorganischer Selenquellen, beim Meerschweinchen besteht jedoch kein zusätzlicher SelenSpeicher wie die von SUNDE (SUNDE 1994, WEISS SACHDEV und SUNDE 2001) erwogene Speicherkapazität durch die cGPx bei der Ratte. Dies könnte der Grund dafür sein, dass die Mortalitätsrate bei einem kombinierten Vitamin E/Selenmangel beim Meerschweinchen ab dem 35. Tag sprunghaft ansteigt. Daraus lässt sich ableiten, dass beim Meerschweinchen eine kontinuierliche Selenzufuhr gewährleistet

sein muss. Das mögliche Risiko einer chronischen Vergiftung durch SeMet, gerade auch bei unzureichender Methioninversorgung, wird diskutiert (BEHNE *et al.* 1991). Da in einem kommerziellen Alleinfuttermittel Methionin und Selen bedarfsdeckend enthalten sind, kann von einem relativ geringen unspezifischen SeMet-Einbau in Proteine ausgegangen werden. Des Weiteren wird eine Akkumulation genauso wenig wie eine schnelle Mobilisierung bei einer bedarfsdeckenden Selensupplementation bzgl. chronischer Toxizität problematisch sein. Es sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, einen Teil der Selenzufuhr in einem Alleinfuttermittel für Meerschweinchen über SeMet zu gewährleisten. So kann auch bei dieser Tierart ein gewisser Selenspeicher für Phasen knapper Versorgung erreicht werden.

In den Testes sind bei Ratten, bezogen auf die Trockenmasse, nur 1 % des Selens an die cGPx gebunden, dennoch weist dieses Gewebe die höchste Konzentration dieses Elements auf (BEHNE und WOLTERS 1983). Die Konzentrationen bei Mangel- und adäquat versorgten Ratten betragen 590 bzw. 1030 µg Se/kg Gewebe (Frischmasse) (WHANGER und BUTLER 1988). Dies ist das 2- bis 4-fache der bei den Meerschweinchen in vorliegender Arbeit gemessenen Konzentrationen. Es lässt sich lediglich die Mangelgruppe von der Gruppe V unterscheiden. Es kann also höchstens von einem geringen Einfluss der Selenzufuhr auf die Selenkonzentration in den Testes des Meerschweinchens ausgegangen werden. Dies kann einerseits heißen, dass die betroffene cGPx-Aktivität mit ihrem 1 %-Anteil am Selengehalt beim Meerschweinchen ohnehin nicht ins Gewicht fällt, oder dass es keine PHGPx gibt. Letztere Möglichkeit ist in Anbetracht der Selenkonzentration von über 200 µg/kg Gewebe eher unwahrscheinlich, wird aber im Kapitel 5.4.2. gesondert diskutiert. Testes, endokrine Organe und das Gehirn verfügen über Regulationsmechanismen, die die Aufrechterhaltung der Selenkonzentrationen in Zeiten geringer Selenzufuhr gewährleisten (BEHNE *et al.* 1988). Auch im Gehirn des Meerschweinchens wird Selen unter Mangelbedingungen konserviert. Ein starker Abfall der Konzentration wie im Lebergewebe konnte nicht beobachtet werden. Die Selenkonzentrationen im Gehirn selenversorgter Meerschweinchen aus vorliegender Arbeit decken sich mit denen von Ratten (BEHNE und WOLTERS 1983).

Die Selenkonzentration in der Milz und in den Erythrozyten stieg mit der Selenzulage an. Die Erythrozyten des Meerschweinchens sind die Zellen mit der höchsten cGPx-Aktivität. Die Selenkonzentration in der Milz war in vorliegender Arbeit nahezu doppelt

so hoch wie im Lysat. Bei Ratten sind Selenkonzentration und GPx-Aktivität in beiden Geweben erheblich höher als beim Meerschweinchen. Die Selenkonzentrationen in Milz und Erythrozyten liegen aber bei der Ratte etwa im gleichen Bereich (BEHNE und WOLTERS 1983). Da die stark durchblutete Milz im jungen Organismus zunächst für die Erythropoese zuständig ist, später überalterte Erythrozyten aus dem Blutkreislauf entfernt, aber auch gleichzeitig ein Reservoir darstellt, ist anzunehmen, dass die verhältnismäßig hohe Selenkonzentration in der Milz des Meerschweinchens mit der vergleichsweise hohen cGPx-Aktivität in den Erythrozyten zusammenhängt.

5.4. Selenoenzyme

In der Leber der Meerschweinchen wurden die Aktivitäten von vier Selenoenzymen gemessen. Die Hierarchie während eines Selenmangels lautet (angegeben ist der Aktivitätsverlust der Mangelgruppe gegenüber den statistisch nicht voneinander zu trennenden Gruppen mit den höchsten Aktivitäten (100%)):

TrxR 13,3 %	>	PCOOH reduzierende Aktivität 36,5 %	>	DI 75,6 %	>	cGPx 82,6 %
----------------	---	--	---	--------------	---	----------------

5.4.1. Glutathionperoxidasen

Wie auch bei der Ratte ist die GPx-Aktivität beim Meerschweinchen der am deutlichsten auf einen Selenmangel reagierende Parameter. Die in Leber, Plasma und Lysat gemessenen Aktivitäten decken sich in etwa mit Werten aus anderen Studien (BURK *et al.* 1981, HILL *et al.* 2001). Vergleichswerte zur cGPx-Aktivität in der Lunge des Meerschweinchens liegen nicht vor. Die relativ hohen Werte können möglicherweise durch Restblut im Gewebe verursacht worden sein. Zur Maximierung der pGPx und cGPx mit Ausnahme der Aktivitäten in Lysat und Herz reichten 0,05 mg Se/kg FM aus. Der GPx-Aktivitätsverlust beim Meerschweinchen während eines über 70 Tage induzierten Selenmangels fand in folgender Reihenfolge statt (angegeben ist der Aktivitätsverlust der Mangelgruppe gegenüber den statistisch nicht voneinander zu trennenden Gruppen mit den höchsten Aktivitäten (100%)):

Leber 82,6 %	>	Hämolyt 74,4 %	>	Plasma 63,2 %	>	Niere 53,1 %	=	Herz 52,8 %	=	Lunge 53,8 %
-----------------	---	-------------------	---	------------------	---	-----------------	---	----------------	---	-----------------

Die hepatische cGPx-Aktivität stellt also den sensitivsten Parameter zur Bestimmung des Selenstatus beim Meerschweinchen dar. Hämolyt und Plasma folgen in der

Sensitivität direkt dahinter und sind zusätzlich leicht zugängliche Untersuchungsmedien.

Bei der Ratte stieg die hepatische cGPx-Aktivität sigmoidal bis zu einem Plateau-Breakpoint (Polynom-Regressionsanalyse) bei 0,1 mg Se/kg FM an (HADLEY und SUNDE 2001). Werte für Meerschweinchen im Bereich zwischen 0 und 0,05 mg Se/kg FM wären nötig um zu überprüfen, ob es diesen sigmoidalen Verlauf auch bei dieser Tierart gibt. Der hepatische cGPx-Aktivitätsverlust beim Meerschweinchen ist niedriger als der von HADLEY und SUNDE (2001) beobachtete Abfall bei der Ratte (82,7 % vs. 98 %). Beim Vergleich beider Studien wird deutlich, dass das Meerschweinchen weniger als die Hälfte der Selenzulage zum Erreichen der maximalen Aktivität benötigt. Der Anstieg der pGPx-Aktivität mit steigender Selenaufnahme erreichte bei der Ratte sein Plateau erst zwischen 0,075 und 0,1 mg/kg FM (HADLEY und SUNDE 2001). In vorliegender Arbeit konnte kein signifikanter Anstieg der Aktivität über eine Se-Zulage von 0,05 mg/kg FM hinaus beobachtet werden. Deutlich sichtbar wird im Vergleich beider Studien die unterschiedliche Reaktion der pGPx im Selenmangel bei Ratte und Meerschweinchen. Während die Aktivität bei der Ratte auf 7,6 % der Kontrollwerte sank (4 Wochen), konnte beim Meerschweinchen eine Restaktivität von 36,8 % beobachtet werden, obwohl letzterer Versuch 10 Wochen betrug. Die maximale Aktivität der pGPx beim Meerschweinchen wurde mit nur 0,05 mg Se/kg FM vs. 0,08 mg/kg bei der Ratte erreicht. Die Mangelgruppe wies eine pGPx-Aktivität von < 3 mU/mg Protein auf, was gut mit HILL *et al.* (2001) übereinstimmt. Dieser Wert geht mit einer Selenkonzentration von < 95 µg/kg Plasma einher und bietet sich als Statusparameter an.

5.4.2. Phospholipidhydroperoxidreduzierende Aktivität

Die Ergebnisse der PCOOH-reduzierenden Aktivität zeigen in Leber, Niere und Herz einen eindeutigen Seleneinfluss. Die Mangelgruppe unterschied sich bei diesen Organen signifikant von den supplementierten Gruppen. Der mangelbedingte Abfall im Herz (53,4 %) deckte sich weitestgehend mit den Ergebnissen bei Ratten (28 Tage Depletion) und Mäusen (114 Tage Depletion) (WEITZEL *et al.* 1990, LEI *et al.* 1995), der prozentuale Aktivitätsverlust fiel beim Meerschweinchen in Niere (25,6 % (I und IV vs. II bis VI)) und Leber (36,5 %) jedoch geringer aus. HADLEY und SUNDE (2001) konnten nach einem 28-tägigen Experiment an Ratten einen Aktivitätsverlust in der Leber von 57 % beobachten. In der Leber des Meerschweinchens konnten die höchsten

Aktivitäten gemessen werden, was sich nicht mit dem Verteilungsmuster bei WEITZEL *et al.* (1990) deckt.

Die PHGPx-Aktivität in den Testes von Ratten lag etwa 15fach höher als in der Leber, wobei ein Abfall während des Selenmangels nicht beobachtet werden konnte (LEI *et al.* 1995). Ein Aktivitätsverlust während des Mangels konnte beim Meerschweinchen ebenfalls nicht beobachtet werden. Die PCOOH-reduzierende Aktivität war insgesamt jedoch erheblich niedriger als bei Mäusen (WEITZEL *et al.* 1990).

Der Nachweis einer PHGPx beim Meerschweinchen steht noch aus. In Gehirn und Testes wurde die PCOOH-reduzierende Aktivität weder durch einen Selenmangel noch durch unterschiedliche Selenzulagen beeinflusst. Aufgrund der wichtigen Funktion der PHGPx während Spermienreifung und Reproduktion ist es jedoch unwahrscheinlich, dass dieses Protein beim Meerschweinchen nicht existiert. Der Versuch, die Transkription des Enzyms mit PHGPx-Primern der Ratte nachzuweisen, schlug leider fehl. Der Seleneinfluss auf die PCOOH-reduzierende Aktivität in Leber, Niere und Herz deuten auf die Existenz des Enzyms hin. Des Weiteren konnte eine Hemmung der Aktivität mit Iodacetat bei pH 7,0 um 62,3 % bei einem selensupplementierten Tier und nur um 27,5 % bei einem defizienten Tier gezeigt werden. Dies lässt auf die Beteiligung eines Selenoenzyms bei der Reduktion der PCOOH schließen. Es muss jedoch beachtet werden, dass die PHGPx-Aktivität in den Testes der Ratte etwa 15fach höher ist als in der Leber (ROVERI *et al.* 1992, LEI *et al.* 1995). In vorliegender Arbeit ist die PCOOH-reduzierende Aktivität in den Testes sogar niedriger als die in der Leber. Glutathion, SeIP und die GST sind ebenfalls in der Lage, PCOOH zu reduzieren (SAITO *et al.* 1999, YANG *et al.* 2002). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die GST im PHGPx-Assay nicht reagiert (WEITZEL *et al.* 1990). Die Konzentration reduzierten GSHs als auch die Aktivität der GST steigen oder bleiben während eines Selenmangels unverändert. Würden die hier dargestellten Ergebnisse der PCOOH-reduzierenden Aktivität von GSH oder der GST herrühren, würde die PCOOH-reduzierende Aktivität im Mangel nicht abfallen, sondern steigen bzw. unbeeinflusst bleiben. Die Höhe der PCOOH-reduzierenden Aktivität in den verschiedenen Organen des Meerschweinchens deckt sich aber dennoch weitestgehend mit dem Beitrag der GST zur PCOOH-Reduktion *in situ* (YANG *et al.* 2002).

Abschließend kann kein Beweis für die Existenz der PHGPx erbracht werden, weshalb lediglich von der PCOOH-reduzierenden Aktivität gesprochen wird. Die von YAGI *et al.* (1998) herangezogene Studie von SHREVE *et al.* (1979) kann nicht als Ausschluss für die PHGPx beim Meerschweinchen verwendet werden. Zum damaligen Zeitpunkt war die PHGPx noch nicht entdeckt. Es wurde also weder im kDa-Bereich der PHGPx nach lipidhydroperoxid-reduzierenden selenhaltigen Proteinen gesucht, noch wurde ein Phospholipidhydroperoxid als spezifisches Substrat zur Differenzierung der Aktivität verwendet.

5.4.3. Thioredoxinreduktase

Vor der Aktivitätsmessung wurde das Gewebehomogenat einer Dialyse unterzogen und anschließend erhitzt. Endogenes GSH und hitzeempfindliche Proteine wurden dadurch der Bestimmung entzogen. Der Erhitzungsschritt wurde von HILL *et al.* (1997b) jedoch nicht durchgeführt. HILL *et al.* (1997b) korrigierten ein Hintergrundrauschen in der Reaktion durch Zugabe von Goldthioglukose, welches die TrxR-Aktivität hemmt. In vorliegender Arbeit wurde keine Korrektur des Hintergrundes durch Goldthioglukose vorgenommen. Die im Hintergrund ablaufende Reaktion wurde jedoch als Blindwert (ohne NADPH-Zugabe) erfasst und abgezogen. Der Aktivitätsverlust des Enzyms während eines Selenmangels betrug im Leberhomogenat von Ratten bis zu 90%. Ohne Korrektur war lediglich ein Aktivitätsverlust von ca. 40% zu verzeichnen. Der Unterschied zwischen den höchsten und niedrigsten Enzymaktivitäten betrug in Leber (I, III und IV vs. II-VI), Niere und Herz 13,3 %, 27 % und 50,8 %. Lässt man die Blindwerte unberücksichtigt, ist ein erheblicher Abfall der Enzymaktivität nur in der Niere zu beobachten. Dieser liegt deutlich unterhalb des von HILL *et al.* (1997b) beobachteten Aktivitätsverlusts. Den Diagrammen bei HILL *et al.* (1997b) nach zu urteilen, unterschied sich die Absorptionsänderung ohne NADPH und mit NADPH sowie Goldthioglukose nicht wesentlich. Der in vorliegender Arbeit erhobene Blindwert entspricht also in etwa der Korrektur von HILL *et al.* (1997b). Da bei diesen Autoren keine Erhitzung des Dialysats auf 55 °C stattfand, wurden weitere Störquellen nicht entfernt. Besonders diese Werte wären als Vergleich zu vorherigen Methoden jedoch interessant gewesen. Es ist also nicht zu erwarten, dass die in vorliegender Arbeit erhaltenen Werte unpräziser sind als Werte, die durch Goldthioglukosezusatz korrigiert wurden. Die von HILL *et al.* (1997b) vorgenommenen Modifikationen dienten ursprünglich dazu, die Werte um die Aktivität anderer Enzyme und endogener Thiole zu korrigieren. Die Goldkonzentrationen wurden so gewählt,

dass sie zwar die TrxR nicht aber die GPx hemmen. Man ging außerdem von der Essentialität des SeCys für die TrxR-Aktivität aus (HILL *et al.* 1997a). ARNÉR *et al.* (1999) verweisen auf unveröffentlichte Daten, wonach das N-terminale Motiv unabhängig vom carboxyterminalen Redoxzentrum DTNB NADPH-abhängig reduzieren kann. Über den Umfang dieser Reaktion ist wenig veröffentlicht. Auch ZHONG und HOLMGREN (2000) konnten 4,7 % der Aktivität verglichen mit der TrxR-Aktivität aus Kalbsleber bei mutierter TrxR (SeCys → Cys) beobachten. Die gemessenen Werte im erhitzten Dialysat sollten aber im Wesentlichen der TrxR-Aktivität und damit auch der Aktivität des SeCys im C-Terminus entsprechen.

Bei Mäusen führte das Ausschalten des TrxR1- und TrxR2-Gens zum Tod im Embryonalstadium (CONRAD *et al.* 2004, JAKUPOGLU *et al.* 2005). Dies macht es schwer, den Ausfall der TrxR während eines Selenmangels und die damit verbundenen Konsequenzen für den Organismus abzuschätzen. In der Rattenleber rangiert die TrxR-Aktivität bezüglich der Selenzufuhr zwischen cGPx und PHGPx (HADLEY und SUNDE 2001). Die TrxR-Aktivität betrug in der Leber von Ratten nach einem 28-tägigen Selenmangelversuch 14-16% der Kontrollwerte. 0,07 mg Se/kg FM reichten aus, um eine Sättigung der TrxR-Aktivität zu erreichen (HADLEY und SUNDE 2001). In vorliegender Studie lassen sich die einzelnen Versuchsgruppen nicht so deutlich voneinander abgrenzen. Es zeigt sich, dass beim Meerschweinchen ein weitestgehender Erhalt der Aktivität in der Leber während eines Selenmangels am 70. Tag möglich ist. Sehr viel deutlicher sind die Abstufungen in Herz und Niere ($p < 0,001$). Leider gibt es hierzu in der Literatur keine Vergleichswerte mit unterschiedlichen Selenzulagen bei anderen Tierarten. Für die Werte in der Niere kam das *Broken Line Model* zur Anwendung. Der Breakpoint wurde bei $0,061 \pm 0,013$ mg Se/kg FM ermittelt. HADLEY und SUNDE (2001) ermittelten zur Erreichung von Plateauwerten in der Leber der Ratte unter Verwendung einer Polynom-Regressionsanalyse für die TrxR-Aktivität 0,07 mg Se/kg FM, für die mRNA Konzentration 0,05 mg Se/kg FM. Dies liegt etwa im mit dem *Broken Line Model* ermittelten Bereich in vorliegender Arbeit. Ein von WU *et al.* (2003) in der Aorta von Ratten während eines Langzeitmangels (12 Monate) beobachteter Anstieg der TrxR-Aktivität im Mangel konnte bei den Meerschweinchen nicht verzeichnet werden. Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie über den Einfluss von Selen auf die TrxR-Aktivität des Meerschweinchens. Aufgrund der geringen Vergleichsmöglichkeiten mit Literaturwerten ist eine Interpretation dieser Werte schwierig.

Da die TrxR auch DHA reduzieren kann, wäre ein Einfluss eines Selenmangels auf die Vitamin C-Versorgung des Meerschweinchens denkbar. Die ausreichende Vitamin C-Aufnahme sollte neben der Vitamin E-Supplementation im Zusammenhang mit der Ableitung des Selenbedarfs beachtet werden.

5.4.4. D1-Aktivität, Triiodthyronin- und Thyroxinkonzentrationen

Die absoluten Werte der D1-Aktivität in verschiedenen Studien variieren sehr stark. Dies kann mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen zusammenhängen. Die hier gemessenen Werte liegen im Bereich derer von BECKETT *et al.* (1992). Der Testsatz zur Bestimmung der caninen T₃-Konzentration war beim Meerschweinchen wesentlich sensitiver als jener für humanes Probenmaterial. Im Vergleich zur Deiodinaseaktivität der Ratte lagen die Werte des Meerschweinchens erwartungsgemäß höher.

Ein signifikanter Aktivitätsverlust der D1 in Leber und Niere bei Ratte (BECKETT *et al.* 1987, BECKETT *et al.* 1989, ARTHUR *et al.* 1990, ARTHUR *et al.* 1991, BECKETT *et al.* 1992, CHANOINE *et al.* 1993, VADHANAVIKIT und GANTHER 1993, CHRISTENSEN *et al.* 1995, EDER *et al.* 1995) oder Meerschweinchen (CAMMACK *et al.* 1995) konnte in verschiedenen Selenmangelstudien festgestellt werden. Die Deiodinaseaktivität in der Leber des Meerschweinchens fiel im Selenmangel über 10 Wochen auf 24,4 % ($p < 0,001$) der Aktivität der mit Selen versorgten Gruppen ab. In einer 20-wöchigen Selenmangelstudie an Ratten mit unterschiedlicher Selenzufuhr sank die Aktivität dieses Enzyms auf 9,6 % ab, während 0,05 mg Se/kg FM ausreichten, um diese auf ein vergleichbares Niveau mit höher versorgten Tieren (0,5 mg Se/kg FM) anzuheben (VADHANAVIKIT und GANTHER 1993). In vorliegender Arbeit erreichten die Meerschweinchen der Gruppe II (0,05 mg Se/kg FM) ebenfalls eine mit den höher versorgten Gruppen vergleichbare D1-Aktivität in der Leber.

Die in vorliegender Arbeit gemessenen niedrigen T₃-Plasmakonzentrationen und die gleichzeitig hohen T₄-Werte in der Mangelgruppe lassen auf das Unvermögen der durch den Selenmangel hervorgerufenen niedrigen D1-Aktivität schließen, aus Thyroxin T₃ zu bilden. Die Unterschiede zwischen den Gruppen II-V und der Gruppe VI sind schwer erklärlich. Die Vermutung von CAMMACK *et al.* (1995), dass sich ein Selenmangel beim Meerschweinchen negativ auf die T₄-Bildung auswirkt, ist in Anbetracht dieser Werte jedoch widerlegt. Während die Schilddrüsenhormonkonzentrationen kein eindeutiges Bild abgeben, ist die Verschiebung im T₄:T₃-Verhältnis deutlich ausgeprägt. Das T₄:T₃-Verhältnis im Plasma ist im Mangel (47:1)

deutlich zum Thyroxin verschoben und spiegelt die geringe Deiodinaseaktivität dieser Versuchsgruppe wider. Dieser deutliche Unterschied konnte bei CAMMACK *et al.* (1995) zwischen Mangel- und Kontrollgruppe nicht beobachtet werden. Während sich die dortigen Plasma-T₃-Werte signifikant von der Kontrollgruppe unterscheiden, war der Abfall der T₄-Werte im Mangel nicht signifikant. Das ungefähre, aus den Diagrammen abgeleitete, T₄:T₃-Verhältnis liegt in beiden Versuchsgruppen bei ca. 27:1. Die Einzelwerte aus vorliegender Arbeit (Anhangstabelle 7) lagen bei den Gruppen II-VI zwischen 25:1 und 41:1, bei der Mangelgruppe zwischen 37:1 und 56:1. Eine eindeutige Grenze zwischen Mangel und versorgt ist bei der Betrachtung eines Einzeltieres in der Praxis also schwer zu ziehen. Dieser Parameter in einem leicht zugänglichen Medium eignet sich also nur ergänzend zur Statusbestimmung beim Meerschweinchen.

Die mangelbedingte Reduktion der D1-Aktivität hatte keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der Meerschweinchen über einen Zeitraum von 10 Wochen. Auch bei Kälbern (ARTHUR *et al.* 1988), Hunde- und Katzenwelpen (YU *et al.* 2002, WEDEKIND *et al.* 2003, WEDEKIND *et al.* 2004), Schweinen (FONTAINE *et al.* 1977) und Ratten (BECKETT *et al.* 1987, 1989, CHANOINE *et al.* 1993, CHRISTENSEN *et al.* 1994, 1995, EDER *et al.* 1995, MOAK und CHRISTENSEN 2001) beeinflusste ein Selenmangel das Körpergewicht nicht. Bei einigen Selenmangelstudien an Ratten konnte jedoch eine Wachstumsretardierung beobachtet werden (MORENO-REYES *et al.* 2001, VADHANAVIKIT und GANTHER 1993). Beim Meerschweinchen gibt es hierzu widersprüchliche Angaben (CAMMACK *et al.* 1995, HILL *et al.* 2001). Bei depletierten Ratten der zweiten Generation betrug die Gewichtsdiﬀerenz am Ende der 74-tägigen Versuchsperiode 31% (MORENO-REYES *et al.* 2001). VADHANAVIKIT und GANTHER (1993) konnten einen signifikanten Gewichtsverlust bei Ratten in einem über 20 Wochen induzierten Selenmangel verzeichnen.

Die alternativen Stoffwechselwege der Schilddrüsenhormone sind bis dato weitgehend unerforscht. So können Sulfatierung, Glucuronidierung, Esterbrückenspaltung, oxidative Desaminierung und Decarboxylierungen die Verfügbarkeit regulieren (WU *et al.* 2005). Inwieweit diese Reaktionswege im Selenmangel bei niedrigen Deiodinaseaktivitäten eine Rolle spielen, ist bisher nicht bekannt.

5.5. Glutathion S-Transferase, Gesamt-GPx und selenunabhängige GPx

Die hier ermittelten Werte der Leber-GST liegen etwa um den Faktor 2-3 höher als in anderen Studien beobachtet (IGARASHI *et al.* 1983, OSHINO *et al.* 1990, HIMENO *et al.* 1993a). Die von IRWIN *et al.* (1980) gemessenen Werte lagen hingegen etwa um den Faktor 6,5 höher als die in vorliegender Arbeit. Ursächlich für diese unterschiedlichen Werte sind vermutlich verschiedene Methoden der Probenaufarbeitung. Zum gleichen Zeitpunkt wurden Leberhomogenate von Ratten gemessen, deren Werte im üblichen Bereich lagen. Ein Fehler im Assay ist daher unwahrscheinlich. Eine vollständige Wiederholungsmessung hat die Werte in der Leber des Meerschweinchens bestätigt. Die GST-Aktivität in der Niere der Meerschweinchen deckt sich mit den bei HIMENO *et al.* (1993a) dargestellten Werten. Ein Seleneinfluss auf die GST-Aktivität konnte weder in der Leber noch in der Niere beobachtet werden.

Die niedrigste Gesamt-GPx-Aktivität wurde in der Niere der Mangelgruppe und die höchste -Aktivität bei der Gruppe VI (250 µg/kg FM) gemessen. Die selenunabhängige GPx zeigte in der Mangelgruppe die höchste Aktivität. Dieses Ergebnis ist zwar signifikant, ein gerichteter Einfluss ist jedoch nicht abzuleiten. Errechnet man in beiden Organen den prozentualen Anteil der selenunabhängigen GPx an der Gesamt-GPx-Aktivität, so zeigen sich dennoch signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) (Abbildung 20).

Bei Betrachtung der Gruppenmittelwerte für Gesamt-GPx und selenunabhängige GPx zeigen sich relativ hohe Streuungen. Beim prozentualen Anteil der non-SeGPx an der Gesamt-GPx sind dagegen nur geringe Variationskoeffizienten erkennbar. Dies spricht dafür, dass, auf das Einzeltier bezogen, dieser prozentuale Anteil in der Leber mit etwa 90 % und in der Niere mit etwa 68 % bei adäquater Selenversorgung ungefähr gleich ist, während die absoluten Werte dieser beiden Parameter stark schwanken.

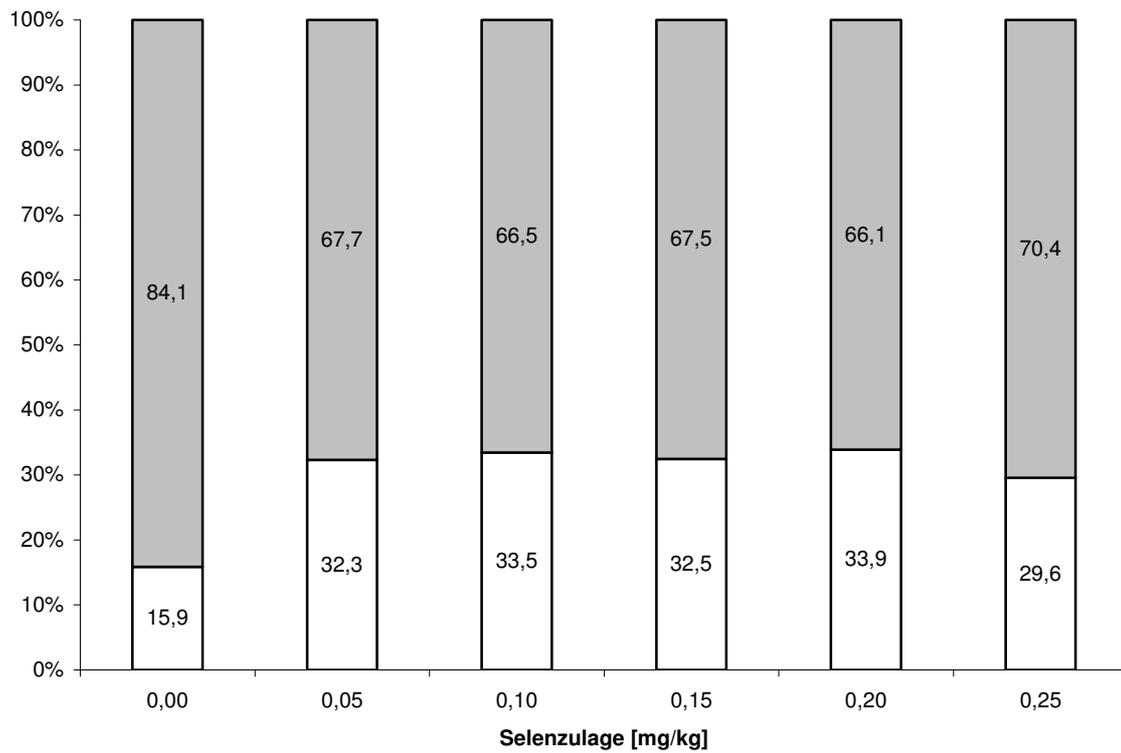
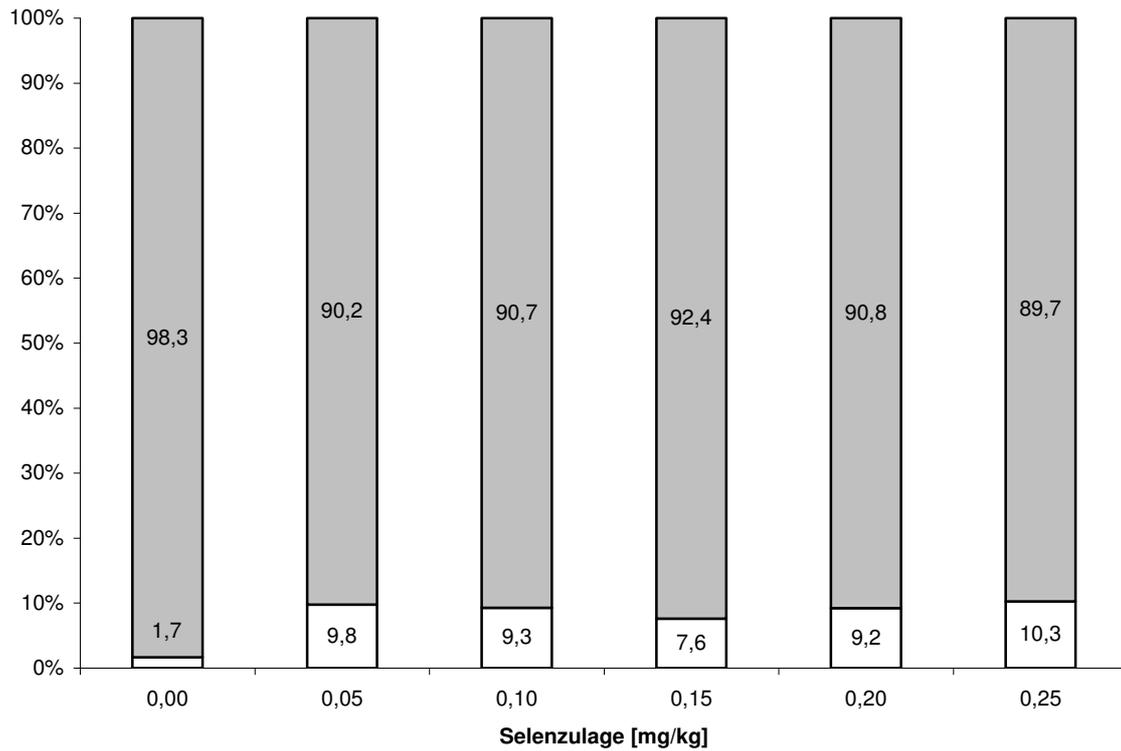


Abbildung 20: Prozentualer Anteil der SeGPx (weiße Balken) und der non-SeGPx (graue Balken) an der Gesamt-GPx-Aktivität in Leber (oben) und Niere (unten), $p < 0,001$

Beim Meerschweinchen wird angenommen, dass die vergleichsweise hohe GST-Aktivität die von Natur aus niedrige cGPx-Aktivität kompensiert (HIMENO *et al.* 1993a). Während bei anderen Nagerarten eine kompensatorische Rolle der GST und der non-SeGPx nur im Selenmangel vermutet wird (LEE *et al.* 1981, MASUKAWA 1984, REFFETT *et al.* 1986), stellt sich die Frage, ob dies beim Meerschweinchen vonnöten ist. Der mangelbedingte Abfall der cGPx beim Meerschweinchen ist im Vergleich zur Ratte gering und die natürlicherweise niedrige cGPx-Aktivität wird auch in Zeiten adäquater Selenversorgung durch die Katalase und die GST kompensiert. SUNDE *et al.* (1994) merkten an, dass die GST-Aktivität bei der Ratte auch nur ansteigt, wenn die SeGPx-Aktivität aufgrund des Selenmangels nicht mehr messbar ist. Da die Auswirkungen eines Selenmangels auf die GPx-Aktivität beim Meerschweinchen nicht so drastisch wie bei der Ratte sind, stellt dieser Sachverhalt eine Kompensation durch die GST in Frage. Die Ergebnisse zum prozentualen Anteil der non-SeGPx an der Gesamt-GPx lassen dennoch auf eine Kompensation schließen. Eine mögliche Erklärung für diesen Umstand lässt sich aber finden: Die Isoenzyme der GST des Meerschweinchens weisen alle eine hohe Aktivität gegenüber dem verwendeten Substrat CDNB auf. Jedoch hat nur die GST *a* auch eine hohe Substratspezifität gegenüber CuOOH und macht 75 % der selenunabhängigen GPx-Aktivität aus, während die GST *b* mengenmäßig etwa 70 % der Gesamt-GST-Aktivität ausmacht (OSHINO *et al.* 1990). Hieraus wird deutlich, dass eine partielle Erhöhung der GST *a*-Aktivität während eines Selenmangels beim Meerschweinchen nicht unbedingt zu steigenden GST-Werten führen muss. Eine Kompensation der SeGPx- durch die non-SeGPx-Aktivität der GST während eines Se-Mangels, wie sie in der Vergangenheit bei der Ratte beobachtet werden konnte (MCLEOD *et al.* 1997), ist offenbar auch beim Meerschweinchen gegeben.

5.6. Glutathionreduktase

Die Glutathionreduktase reagiert nicht im Selenmangel. Dennoch wurde sie in vorliegender Arbeit erfasst, weil sie gewährleistet, dass das Substrat GSH für die GPx-Funktion zur Verfügung steht. Erwartungsgemäß konnte kein Seleneinfluss auf dieses Enzym gemessen werden. Diese Beobachtung konnten auch BURK *et al.* (1978) in der Leber von selendefizienten Ratten machen. Die Aktivität ist in der Niere des Meerschweinchens erheblich höher als in der Leber. In sehr viel geringerem Ausmaß konnten dies auch SUZUKI *et al.* (1999) beobachten. Insgesamt sind Vergleichswerte

für diese Organe in der Literatur kaum vorhanden und zudem sehr variabel (IGARASHI *et al.* 1983, LANGLEY und KELLY 1992, SUZUKI *et al.* 1999, SIVARAM *et al.* 2003).

5.7. Glutathion

Problematisch bei der Bestimmung des Glutathiongehalts nach TIETZE *et al.* (1969) ist, dass N-Ethylmaleimid zur GSH-Derivatisierung verwendet wird, da es die GR hemmt. Bei der hier vorgenommenen Modifikation nach GRIFFITH (1980) wird 2-Vinylpyridin verwendet, wodurch die Hemmung der GR und dadurch eine Unterschätzung des GSSG-Gehalts vermieden wird. Die in vorliegender Arbeit dargestellten Werte liegen etwa in dem Bereich anderer Studien am Meerschweinchen (IGARASHI *et al.* 1983, KELLER *et al.* 2004). Aufgrund der hohen Standardabweichungen ließen sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zeigen. Der Einfluss unterschiedlicher Selenzulagen auf die Glutathionkonzentration im Plasma des Meerschweinchens wurde bisher in nur einer Studie untersucht, bei der sich kein signifikanter Unterschied zeigte (BERTINATO *et al.* 2007). Auch für die Ratte finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben. In einer Leberperfusionsstudie an Ratten konnte während eines Selenmangels keine Veränderung bzgl. des Glutathiongehalts beobachtet werden. Die Ergebnisse ließen darauf schließen, dass das gesamte Glutathion in seiner reduzierten Form vorlag (BURK *et al.* 1978). MAY *et al.* (1997) konnten ebenfalls keine Veränderung der hepatischen GSH-Konzentration während eines Selenmangels feststellen. Ein Selenmangel führte bei Ratten *in vitro* und *in vivo* zu einem zweifachen Konzentrationsanstieg reduzierten Glutathions im Plasma. Da auch die Aktivität der γ -Glutamylcysteinsynthetase in den Hepatozyten doppelt so hoch war wie bei den Kontrolltieren, ist eine mangelbedingte Erhöhung der Syntheserate offensichtlich. Die Autoren vermuten, dass die Syntheserate in den Hepatozyten erhöht wurde, um den Plasma-GSH-Spiegel zu erhöhen, ohne die intrazelluläre Konzentration zu verändern (HILL und BURK 1982, 1985). Des Weiteren hängt das Glutathionverhältnis von der H_2O_2 -Entgiftung durch die cGPx ab. Während GSSG durch die GR recycelt werden kann, bedarf es nach einer S-Konjugation einer Resynthese (DICKINSON *et al.* 2003). In vorliegender Arbeit fallen die niedrigen Werte für GSH und GSSG in der Mangelgruppe auf, die sich jedoch nicht signifikant von den versorgten Gruppen unterscheiden. Aufgrund der geringen cGPx-Aktivität des Meerschweinchens muss davon ausgegangen werden, dass bei dieser Tierart die intrazelluläre Glutathionkonzentration von anderen Parametern abhängt. Dies könnte z. B. eine vermehrte S-Konjugation durch die GST sein. Inwieweit die Diskrepanz der hier dargestellten Werte zu denen

der Ratten auf Unterschiede im Glutathionstoffwechsel zurückzuführen sind, kann nicht abgeleitet werden. Da der Glutathiongehalt im Plasma nicht bestimmt wurde, kann zu den von HILL und BURK (1982, 1985) gemachten Beobachtungen keine Stellung genommen werden. Das Meerschweinchen hat aber eine geringe Syntheseleistung und einen hohen Glutathionkatabolismus (IGARASHI *et al.* 1983). Ob die Erhöhung der Syntheserate beim Meerschweinchen möglich wäre und inwieweit das neu gebildete Glutathion der hohen γ -Glutamyltransferase-Aktivität zum Opfer fallen würde, ist nicht bekannt. Diese Ergebnisse können allerdings von einer bedarfsanalytischen Studie nicht erbracht werden und bedürften eines gesonderten Studiendesigns.

5.8. Katalase

Die Katalaseaktivitäten in den Leberhomogenaten der Versuchsgruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Ob für die relativ hohen Variationskoeffizienten innerhalb der Versuchsgruppen (15-27,5 %) die hohe Verdünnungsstufe (1:4500) oder individuelle Unterschiede ursächlich waren, konnte nicht geklärt werden. Die Werte der TBA-RS in der Leber weisen nicht auf eine erhöhte Lipidperoxidation in diesem Organ hin. Der Aktivitätsverlust der SeGPx im Selenmangel beim Meerschweinchen führte nicht zur Kompensation durch die Katalase, wie es REFFETT *et al.* (1986) in einer Studie zur Eisenüberladung bei Lämmern in gestressten Geweben und BURK *et al.* (1978) bei Ratten in Betracht zogen. Die tierartspezifisch hohe Katalaseaktivität beim Meerschweinchen und die zusätzlich im Zytoplasma lokalisierte Isoform machen eine feine Abstufung bei einer etwaigen Kompensation der beim Meerschweinchen ohnehin niedrigen cGPx aber nahezu unmöglich. Eine generelle Kompensation der geringen cGPx-Aktivität im Zytosol von Meerschweinchenzellen bei der H_2O_2 -Entgiftung durch die Katalase wurde in der Vergangenheit bereits angenommen (HIMENO *et al.* 1993a). Vergleicht man die Auswirkungen eines Selenmangels auf die cGPx-Aktivität mit der Ratte, erscheint der mangelbedingte partielle Ausfall der cGPx-Aktivität beim Meerschweinchen geringfügig. Eine zusätzliche Kompensation bei der H_2O_2 -Entgiftung durch die Katalase während eines Selenmangels kann zwar nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber vor diesem Hintergrund unbedeutend. Genau wie bei der GST-Aktivität muss die Auswirkung eines länger anhaltenden Selenmangels auf die Katalaseaktivität weiter erforscht werden.

5.9. Vitamin E und Vitamin C-Konzentrationen im Plasma

In einer kombinierten Selen/Vitamin E-Mangelstudie konnte wie in vorliegender Studie kein einheitliches Ergebnis der Vitamin E-Konzentrationen im Plasma erzielt werden. Bei HILL *et al.* (2001) wiesen lediglich die Vitamin E-Mangelgruppen eine deutlich verringerte Konzentration auf. In der Kombination mit einem Vitamin C- oder Selenmangel ist Vitamin E anscheinend von sehr hoher Bedeutung, da die Tiere in beiden Studien während des Versuchs starben (HILL *et al.* 2001, 2003). Um einen tödlichen, kombinierten Mangel zu vermeiden, wurde in vorliegender Arbeit dem Futter Vitamin E bedarfsdeckend zugesetzt. Dass Vitamin E die Symptome eines Selenmangels kaschieren kann, musste in Kauf genommen werden. Der Vitamin C-Gehalt des Futters wurde niedrig gehalten, um ein Recycling großer Mengen Vitamin E im Gewebe zu verhindern (PACKER *et al.* 1979). Die Vitamin C-Zulage wurde jedoch so hoch gewählt, dass keinerlei Anzeichen von Skorbut auftreten (BERGER *et al.* 1989). Bei der Vitamin C-Konzentration im Plasma konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Die Trennleistung der HPLC-Säule ließ auf Grund der verwendeten aggressiven Chemikalien (pH 2,0) im Laufe des Analysezeitraums nach. Eine hohe Standardabweichung innerhalb der Gruppen fand sich jedoch auch bei anderen Autoren (HILL *et al.* 2003). Die Werte zeigen trotz hoher Streuung und technischer Schwierigkeiten, dass die Vitamin C-Zulage ausreichte, um einen mit anderen Studien vergleichbaren (POOVAIAH *et al.* 1987, BERGER *et al.* 1989, PATE *et al.* 1996) bzw. höheren Vitamin C-Plasmaspiegel (HILL *et al.* 2003) zu erreichen. Da der Plasmaspiegel mit der zugelegten Vitamin C-Menge ansteigt, ist ein Vergleich nur mit ausgewählten Studien möglich. In allen Studien zum Vitamin C-Mangel beim Meerschweinchen war die Plasmakonzentration ≥ 0 (POOVAIAH *et al.* 1987, BERGER *et al.* 1989, HILL *et al.* 2003). Der negative Einfluss eines Vitamin C-Mangels auf die pGPx-Aktivität konnte bei einer Zulage von 200 mg/kg FM aufgehoben werden (POOVAIAH *et al.* 1987). Von einem Vitamin C-Einfluss auf die Enzymparameter in vorliegender Arbeit ist nicht auszugehen, darüber hinaus würde ein solcher jede Versuchsgruppe in gleichem Maße betreffen. Das NRC (1995) leitete den Vitamin C-Bedarf des Meerschweinchens aus Studien ab, zu deren Zeiten es noch keine geschützte Ascorbinsäure als Futterzusatz gab. Bei der in vorliegender Arbeit verwendeten Vitaminquelle handelt es sich um einen Phosphatester. Der Pelletierungsverlust wird vom Hersteller mit etwa 10 % angegeben, was bei der Futterkonzeption berücksichtigt wurde. Es kann also davon ausgegangen werden, dass nahezu das gesamte Vitamin C im Darm der Meerschweinchen verfügbar war.

Bei selendefizienten Ratten konnten bei etwa 1/10 der normalen TrxR-Aktivität nur noch 2/3 der hepatischen Ascorbinsäurekonzentration bei unveränderter GSH-Konzentration gefunden werden. Dies war auf eine um mehr als die Hälfte verminderte NADPH-abhängige DHA-Reduktion zurückzuführen. Allerdings überwiegt die GSH-abhängige DHA-Reduktase-Aktivität gegenüber der NADPH-abhängigen um das 2-3fache (MAY *et al.* 1997). Ob verringerte Vitamin C-Konzentrationen auch in der Leber selendefizienter Meerschweinchen vorkommen, wurde angesichts der technischen Schwierigkeiten bei der Vitamin C-Analyse nicht untersucht.

5.10. Thiobarbitursäurereaktive Substanzen (TBA-RS)

Mit den thiobarbitursäurereaktiven Substanzen können Abbauprodukte von Lipidhydroperoxiden nachgewiesen werden. In vorliegender Arbeit wurde kein gerichteter Einfluss der steigenden Selenzulagen beobachtet. Die hohen Werte in den Gruppen IV und V traten auch bei Wiederholungsmessungen auf. Insgesamt ist nicht von erhöhter Lipidperoxidation auszugehen, da die Tiere ausreichend Vitamin E erhielten und die GST ebenfalls sehr effizient LOOH reduzieren kann. Die Methoden, die oxidativen Stress nachweisen sollen, sind umstritten. Trotz der Tatsache, dass sie relativ häufig angewendet werden, sollte den TBA-RS im vorliegenden Zusammenhang nicht allzu viel Bedeutung beigemessen werden. DOTAN *et al.* (2004) verweisen im Zusammenhang mit den Methoden zur Bestimmung der Lipidperoxidation auf die Komplexität des biologischen Systems, kurze Halbwertszeiten der Verbindungen und auf potentielle Einflüsse durch Probenaufarbeitung und Lagerung. Ein alleiniger Selenmangel führt nicht unbedingt zu signifikanten Veränderungen in diesem Parameter. So konnten McCoy *et al.* (1988) in einer Reperfusionstudie in der Niere von Ratten im Selenmangel nur erhöhte Werte nach einer Reperusionszeit von 15 Minuten nachweisen. Der reine Selenmangel führte im Vergleich zur selenadäquaten Kontrollgruppe nicht zu vermehrten Abbauprodukten der Lipidperoxidation.

5.11. Bedarfsableitung

Die Broken-Line-Analyse zur Ermittlung des Selenbedarfs wachsender Meerschweinchen über einen Breakpoint erbrachte drei nahe beieinander liegende Werte: für die TrxR-Aktivität in der Niere einen Breakpoint bei $0,061 \pm 0,013$, für die cGPx im Hämolsat bei $0,058 \pm 0,013$ und im Herzen bei $0,062 \pm 0,009$ mg Se/kg FM. Bei den anderen Selenoenzymen unterschied sich lediglich die Mangelgruppe

signifikant von den versorgten Versuchsgruppen, so dass der Breakpoint zwischen 0 und 0,05 mg Selenzulage/kg FM liegen würde. Die ermittelten Konfidenzintervalle waren bei diesen Parametern sehr groß und die Korrelationen zwischen den Variablen R, L, V und U sehr gering. Dies lässt den Schluss zu, dass die Fehlerquadrate unabhängig von der Steigung U nicht weiter minimierbar waren, so dass R mehr oder weniger weit nach links von $x = 0,05$ abwich. Für diese Parameter wären Datenpunkte zwischen 0 und 0,05 mg Selenzulage/kg FM nötig gewesen, um eine Broken-Line-Analyse durchzuführen. Mithilfe des ermittelten Breakpoints für die TrxR-Aktivität in der Niere und der cGPx-Aktivität in Hämolytat und Herz kann der Bedarf präzisiert werden.

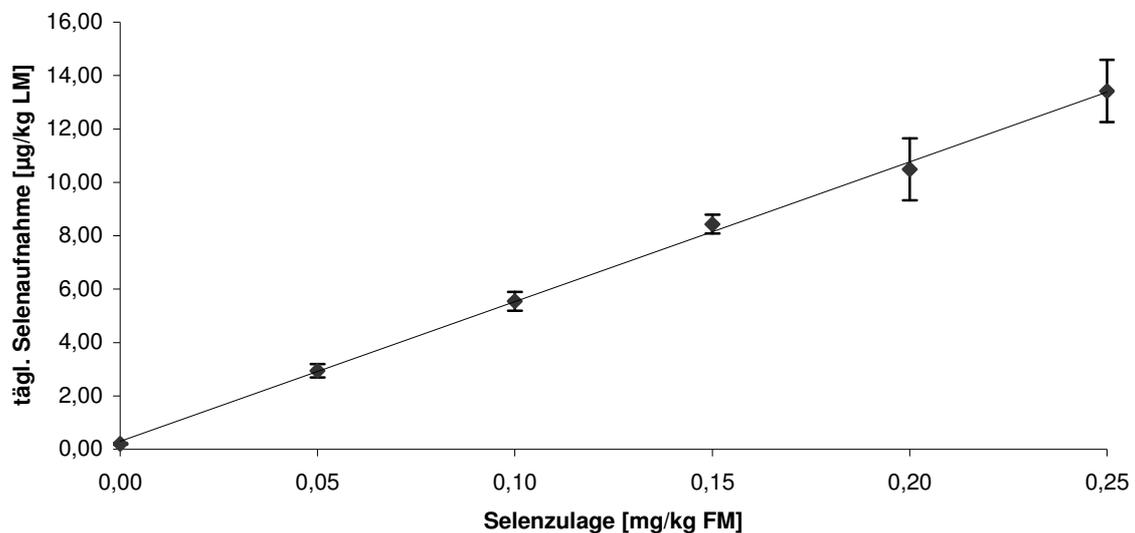


Abbildung 21: Tägliche Selenaufnahme der Tiere in der zehnten Versuchswoche bezogen auf kg LM ($y = 52,4x + 0,296$; $R^2 = 0,999$) unter Berücksichtigung der zusätzlichen Selenaufnahme aus dem verfütterten Stroh

Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen und der zusätzlichen Heu- bzw. Strohfütterung sollte eine Selenzulage von 0,08 mg/kg FM bei adäquater Vitamin E-Versorgung für wachsende Meerschweinchen ausreichend sein, um einen mangelbedingten Abfall der Selenoenzymaktivitäten und daraus resultierende etwaige biochemische Veränderungen zu vermeiden. Mit Rücksicht auf die schweren Symptome eines kombinierten Vitamin E-/Selen-Mangels beim Meerschweinchen und die Tatsache, dass Meerschweinchen über keinen größeren Selenspeicher in Form

der GPx verfügen, wurde bewusst eine Maximierung der Selenoenzymaktivitäten angestrebt. Eine Selenkonzentration von 0,08 mg/kg FM entspräche in vorliegender Arbeit in der 10. Versuchswoche laut linearer Funktion in Abbildung 21 einer täglichen Selenaufnahme von 4,49 µg/kg LM.

6. Schlussfolgerung

Bei einer Selenkonzentration von 0,05 mg/kg FM konnten die meisten in dieser Studie gemessenen Selenoenzyme bereits ihre maximale Aktivität erreichen. Lediglich die drei Parameter cGPx in Herz und Lysat und TrxR-Aktivität in der Niere zeigten eine Zunahme der Enzymaktivität über diese Supplementationsstufe hinaus. Das *Broken Line Model* wurde angewendet, um den Selenbedarf des Meerschweinchens zu spezifizieren. Da die ermittelten Breakpoints relativ nahe beieinander lagen, konnte der Selenbedarf wachsender Meerschweinchen unter Berücksichtigung der Standardabweichung und der zusätzlichen Heu- bzw. Strohütterung auf 0,08 mg/kg FM festgelegt werden. Die Notwendigkeit, mit der täglichen Selenzufuhr eine Maximierung der Enzymaktivität zu erreichen, wird zwar im Rahmen von Zufuhrempfehlungen diskutiert, scheint aber beim Meerschweinchen vor dem Hintergrund der geringen GPx-Aktivität und den schweren Symptomen eines kombinierten Selen-/Vitamin E-Mangels geboten zu sein. Der Selengehalt im Plasma, die Aktivitäten der cGPx in den Erythrozyten und die pGPx sind gute Statusparameter beim Meerschweinchen. Ergänzend kann das Verhältnis von T₄ zu T₃ bestimmt werden. Der abgeleitete Selenbedarf von 0,08 mg/kg FM sollte immer vor dem Hintergrund einer bedarfsdeckenden Vitamin E- und Vitamin C-Zufuhr betrachtet werden. Aufgrund der geringen GPx-Aktivität in den Geweben des Meerschweinchens kann davon ausgegangen werden, dass mit dem Futter aufgenommenes Selen für andere funktionelle Selenoproteine zur Verfügung steht. Allerdings führt die geringe GPx-Proteinkonzentration zu einem reduzierten Selenspeicher bei dieser Tierart. Eine Phase geringer Selenaufnahme kann somit möglicherweise nicht kompensiert werden. Im Hinblick auf die hohe Mortalitätsrate bei einem kombinierten Selen-/Vitamin E-Mangel sollten Meerschweinchen daher kontinuierlich mit Selen versorgt werden. Des Weiteren sollte die Tatsache genutzt werden, dass SeMet unspezifisch in Proteine eingebaut wird und eine Art Selenspeicher bilden kann. Daher ist zu überlegen, ob beim Meerschweinchen ein Teil des Selenbedarfs durch SeMet gedeckt werden sollte.

Ein Seleneinfluss auf selenunabhängige Parameter des antioxidativen Stoffwechsels konnte nur im Falle der selenunabhängigen GPx-Aktivität beobachtet werden. Eine Kompensation des mangelbedingten cGPx-Aktivitätsverlustes in Leber und Niere konnte auch bei dieser Tierart aufgezeigt werden, obwohl von Natur aus eine hohe GST- und Katalaseaktivität die ohnehin geringe cGPx-Aktivität kompensiert.

Wahrscheinlich führte eine Steigerung der GST *a*-Aktivität zu diesem Ergebnis, wobei die Gesamt-GST-Aktivität unverändert blieb. Dies sollte in der Zukunft durch Genexpressionsanalysen näher untersucht werden. Des Weiteren wäre in der Zukunft interessant, inwieweit eine mangelbedingte Wachstumsretardation bei einer längeren Versuchsdauer zu beobachten wäre. Der Nachweis der PHGPx und deren Verhalten im Selenmangel beim Meerschweinchen stehen noch aus. Eine Bedarfsanalyse für tragende und laktierende Tiere ist ebenfalls ein Forschungsfeld für zukünftige Untersuchungen. Insgesamt bietet der antioxidative Stoffwechsel des Modelltiers Meerschweinchen erheblich mehr Parallelen zum Menschen als die intensiv studierte Ratte. Von letzterer Tierart wurde in der Vergangenheit der Selenbedarf des Meerschweinchens abgeleitet (vgl. NRC (1995) 0,15 mg/kg FM). Aus vorliegender Studie geht hervor, dass die GPx-Aktivität im Hämolysat im Gegensatz zur Ratte nicht erst bei 0,11 mg Se/kg FM (HADLEY und SUNDE 2001), sondern bereits bei 0,058 mg Se/kg FM (58 µg Se aus Broken-Line-Analyse zzgl. 0,1275 µg Se aus 3 g Stroh) gesättigt ist. In der Leber war die cGPx-Aktivität bereits bei einer Selenzulage von 0,05 mg/kg FM gesättigt, während Ratten hierfür 0,1 mg Se/kg FM benötigen. Auch im Plasma benötigt die Ratte mehr Selen, um eine Sättigung der pGPx zu erreichen (0,08 vs. 0,05 mg Se/kg FM). Vorliegende Arbeit zeigt also deutlich, dass der antioxidative Stoffwechsel beider Tiere nicht vergleichbar ist und dass der Selenbedarf wachsender Meerschweinchen in der Vergangenheit um 50 % überschätzt wurde.

Zusammenfassung

Der Selenbedarf des Meerschweinchens wurde in der Vergangenheit von dem der Ratte abgeleitet und wurde für wachsende und ausgewachsene Meerschweinchen mit 0,15 mg/kg Futtermittel angegeben (NRC 1995). Da beide Tierarten auf Grund zahlreicher Unterschiede im antioxidativen Stoffwechsel nur begrenzt miteinander vergleichbar sind, wurde in dieser Arbeit der Selenbedarf für wachsende Meerschweinchen abgeleitet. In einem Fütterungsversuch wurden sechs Versuchsgruppen à 7 Tiere gebildet, die mit einem selenarmen Basisfutter oder diesem Futter mit einer Selenzulage von 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 mg/kg FM als Natriumselenat für 10 Wochen gefüttert wurden. Eine zusätzliche Gruppe à 7 Tiere wurde zu Versuchsbeginn als Ausgangsgruppe geschlachtet, um den initialen Selenstatus zu beurteilen. Während der zweiten Versuchswoche wurde es notwendig, eine zusätzliche Rohfaserquelle in Form von Heu und später Stroh anzubieten.

Zu Versuchsende wurden die Aktivitäten der Selenoenzyme Glutathionperoxidase (cGPx, pGPx und phospholipidhydroperoxid-reduzierende Aktivität), Thioredoxinreduktase und Deiodinase Typ 1 bestimmt. Weiterhin wurden die Parameter des antioxidativen Stoffwechsels Glutathionreduktase und Glutathion S-Transferase in Leber und Niere, Katalase in der Leber, Vitamin E- und Vitamin C-Konzentration im Plasma, Glutathionkonzentration in der Leber und die thiobarbitursäurereaktiven Substanzen in der Leber gemessen. Diese weiteren Parameter wurden weder durch einen Selenmangel noch durch die unterschiedlichen Selenzulagen beeinflusst. Lediglich der prozentuale Anteil der selenunabhängigen GPx an der Gesamt-Glutathionperoxidase in Leber und Niere war durch einen Selenmangel höchstsignifikant erhöht. Dies lässt auch beim Meerschweinchen auf eine Kompensation des mangelbedingten cGPx-Aktivitätsverlustes schließen, obwohl dieser im Vergleich zur Ratte relativ gering ist und natürlicherweise auch in Zeiten ausreichender Selenversorgung durch die tierartlich hohe Katalase- und Glutathion S-Transferase-Aktivität ausgeglichen wird. Ein Selenmangel beeinflusste weder die Gewichtsentwicklung noch den Hämatokritwert und die Hämoglobin-Konzentration der Tiere. Bei fast allen Selenoenzymen war die maximale Aktivität bereits bei einer Selenzulage von 0,05 mg/kg FM erreicht. Lediglich die Aktivitäten der cGPx in Herz und Lysat und der TrxR in der Niere ließen sich durch höhere Selenzulagen noch weiter steigern. Für diese drei Parameter wurde eine Broken-Line-Analyse

durchgeführt. Die drei errechneten Werte lagen nahe beieinander und ergaben für die cGPx im Herzen 0,062 (SD 0,009), im Lysat 0,058 (SD 0,013) und für die TrxR in der Niere 0,061 (SD 0,013) mg Selen/kg FM. Unter Einbeziehung der Standardabweichung und einer geringen zusätzlichen Selenzufuhr durch das aus diätetischen Gründen beigefütterte Stroh wurde der Selenbedarf für wachsende Meerschweinchen auf 0,08 mg Se/kg FM unter der Voraussetzung einer ausreichenden Vitamin E-Zufuhr festgelegt. Da das Meerschweinchen nur eine geringe SeGPx-Aktivität besitzt, erscheint es empfehlenswert, einen Teil der Selenzufuhr als Selenomethionin anzustreben, um Selenpeicher im Muskelgewebe anzulegen. Inwieweit sich ein Selenmangel oder unterschiedliche Selenzulagen auf die Genexpression der Selenoenzyme auswirken, kann erst gezeigt werden, wenn die Ursache für die durch die Tierspezies bedingte geringe SeGPx-Aktivität aufgeklärt worden ist und weitere Selenoenzyme des Meerschweinchens isoliert und charakterisiert worden sind, um passende Primer für Expressionsanalysen herstellen zu können.

Die vorliegende Arbeit zeigt deutlich, dass der antioxidative Stoffwechsel von Ratte und Meerschweinchen nicht vergleichbar ist und eine Ableitung des Selenbedarfs von der Ratte für das Meerschweinchen zu einer Überschätzung von fast 50 % führt. Auf Grund fehlender Selenpeicher ist das Meerschweinchen im Gegensatz zur Ratte jedoch in besonderem Maße auf eine kontinuierliche Selenzufuhr angewiesen.

Summary

The selenium requirement of 0.15 mg Se/kg diet for growing guinea pigs has to date been deduced from rats (NRC 1995). It is difficult to compare the two species because of several differences in their antioxidant metabolism. Therefore in order to estimate the selenium requirement of guinea pigs 42 growing male Dunkin Hartley guinea pigs were divided into six groups and fed either a selenium deficient basal diet (Se < 0.015 mg/kg) based on Torula yeast and wheat or the basal diet supplemented with 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 and 0.25 mg Se/kg diet as sodium selenate for 10 weeks. For determination of the initial selenium status a group of 7 animals was killed at the beginning of the feeding trial. Feeding an additional roughage source (hay/straw) was necessary from the second week of the feeding trial.

The activities of the selenoenzymes, glutathione peroxidase (cGPx, pGPx and phospholipid hydroperoxide reducing activity), thioredoxin reductase (TR) and deiodinase 1, were investigated. Further parameters of the antioxidative metabolism such as glutathione reductase and glutathione S-transferase in liver and kidney, catalase in the liver, vitamin E and vitamin C concentrations in the plasma, glutathione concentration in the liver and hepatic TBA-RS were determined. Only the percentage of the non selenium dependent GPx from the total GPx in liver and kidney was significantly increased by selenium deficiency. These results show that non selenium dependent GPx compensates for selenium dependent GPx in guinea pigs under conditions of selenium deficiency as is also the case in rats.

Selenium deficiency did not influence the growth rate, hemoglobin concentration and hematocrit of the guinea pigs. Maximal activity of selenoenzymes was reached at supplementation levels of 0.05 mg Se/kg diet with the exception of cGPx in hemolysate and heart and of TR activity in the kidneys. The broken line model was used for the latter three parameters. The break points were close together at 0.062 (SD 0.009) for cGPx in the heart and 0.058 (SD 0.013) in the hemolysate and at 0.061 (SD 0.013) for TR activity in the kidney. Adding one standard deviation to the results from broken line analysis and also taking the selenium supply of hay and straw into account, it can be assumed that 0.08 mg Se/kg diet, which includes a safety margin, will provide a reliable supply for growing guinea pigs adequately supplied with vitamin E. As guinea pigs do not have a selenium store like the GPx in rats it can be recommended that selenium supply should be partially given as selenomethionine. The influence of

selenium deficiency on gene expression of the selenoenzymes can only be investigated after the reason for the low GPx activity in guinea pigs has been clarified. Further selenoenzymes in guinea pigs should be isolated and characterized to produce adequate primers for gene expression analysis.

The study shows explicitly that the antioxidative metabolism of rats and guinea pigs is not comparable. This had resulted in a 50 % overestimation of the selenium requirement of guinea pigs in the past. In contrast to rats guinea pigs are reliant to a high degree on a continuous selenium supply due to their inability to store selenium.

Literaturverzeichnis

- AEBI H., FREI E., KNAB R., SIEGENTHALER P. (1957): Untersuchungen über die Formiatoxydation in der Leber. *Helv Physiol Acta* 15: 150-167
- ANDERS M. W. (2004): Glutathione-dependent bioactivation of haloalkanes and haloalkenes. *Drug Metab Rev* 36: 583-594
- ANUNDI I., HÖGBERG J., STÅHL A. (1984): Absorption of selenite in the rat small intestine: Interactions with glutathione. *Acta Pharmacol Toxicol* 54: 273-277
- ARAI M., IMAI H., SUMI D., IMANAKA T., TAKANO T., CHIBA N., NAKAGAWA Y. (1996): Import into mitochondria of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase requires a leader sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 227: 433-439
- ARDÜSER F., WOLFFRAM S., SCHARRER E. (1985): Active absorption of selenate by rat ileum. *J Nutr* 115: 1203-1208
- ARMSTRONG R. N. (1997): Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 10: 2-18
- ARNÉR E. S. J., ZHONG L., HOLMGREN A. (1999): Preparation and assay of mammalian thioredoxin reductase. *Meth Enzymol* 300: 226-239
- ARNÉR E. S. J., HOLMGREN A. (2000): Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 267: 6102-6109
- ARTHUR J. R., MORRICE P. C., BECKETT G. J. (1988): Thyroid hormone concentrations in selenium deficient and selenium sufficient cattle. *Res Vet Sci* 45: 122-123
- ARTHUR J. R., NICOL F., BECKETT G. J. (1990): Hepatic iodothyronine 5'-deiodinase. The role of selenium. *Biochem J* 272: 537-540
- ARTHUR J. R., NICOL F., GRANT E., BECKETT G. J. (1991): The effects of selenium deficiency on hepatic type-I iodothyronine deiodinase and protein disulphide-isomerase assessed by activity measurements and affinity labelling. *Biochem J* 274: 297-300
- AVISSAR N., ORNT D. B., YAGIL Y., HOROWITZ S., WATKINS R. H., KERL E. A., TAKAHASHI K., PALMER I. S., COHEN H. J. (1994): Human kidney proximal tubulus are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol* 266: C367-375
- BAKER A., PAYNE C. M., BRIEHL M. M., POWIS G. (1997): Thioredoxin, a gene found overexpressed in human cancer, inhibits apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 57: 5162-5167

- BALLATORI N., JACOB R., BARRETT C., BOYER J. L. (1988): Biliary catabolism of glutathione and differential reabsorption of its amino acid constituents. *Am J Physiol* 254: G1-7
- BAQUI M. M. A., GEREKEN B., HARNEY J. W., LARSEN R., BIANCO A. C. (2000): Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology* 141: 4309-4312
- BAQUI M., BOTERO D., GEREKEN B., CURCIO C., HARNEY J. W., SALVATORE D., SORIMACHI K., LARSEN P. R., BIANCO A. C. (2003): Human type 3 iodothyronine selenodeiodinase is located in the plasma membrane and undergoes rapid internalization to endosomes. *J Biol Chem* 278: 1206-1211
- BASSLER R., PUTZKA H. (1984): Neue EG-Methode zur Bestimmung von Rohfett in Futtermitteln. *Kraftfutter* 67: 129-134
- BAUDHUIN P., BEAUFAY H., DE DUVE C. (1965): Combined biochemical and morphological study of particulate fractions from rat liver. *J Cell Biol* 26: 219-243
- BECKER K., GROMER S., SCHIRMER R. H., MÜLLER S. (2000): Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. *Eur J Biochem* 267: 6118-6125
- BECKETT G. J., BEDOOWS S. E., MORRICE P. C., NICOL F., ARTHUR J. R. (1987): Inhibition of hepatic deiodination of thyroxine is caused by selenium deficiency in rats. *Biochem J* 248: 443-447
- BECKETT G. J., MACDOUGALL D. A., NICOL F., ARTHUR J. R. (1989): Inhibition of type I and type II iodothyronine deiodinase activity in rat liver, kidney and brain produced by selenium deficiency. *Biochem J* 259: 887-892
- BECKETT G. J., RUSSELL A., NICOL F., SAHU P., WOLF C. R., ARTHUR J. R. (1992): Effect of selenium deficiency on hepatic type I 5-iodothyronine deiodinase activity and hepatic thyroid hormone levels in the rat. *Biochem J* 282: 483-486
- BEGGREN M. M., MANGIN J. F., GASDASKA J. R., POWIS G. (1999): Effect of selenium on rat thioredoxin reductase activity. Increase by supranutritional selenium and decrease by selenium deficiency. *Biochem Pharmacol* 57: 187-193
- BEHNE D., WOLTERS W. (1983): Distribution of selenium and glutathione peroxidase in the rat. *J Nutr* 113: 456-461
- BEHNE D., KYRIAKOPOULOS A., SCHEID S., GESSNER H. (1991): Effects of chemical form and dosage on the incorporation of selenium into tissue proteins in rats. *J Nutr* 121: 806-814
- BEHNE D., HILMERT H., SCHEID S., GESSNER H., ELGER W. (1988): Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins. *Biochim Biophys Acta* 966: 12-21

- BEILSTEIN M. A., WHANGER P. D. (1988): Glutathione peroxidase activity and chemical forms of selenium in tissues of rats given selenite or selenomethionine. *J Inorg Biochem* 33: 31-46
- BEILSTEIN M. A., WHANGER P. D. (1983): Distribution of selenium and glutathione peroxidase in blood fractions from humans, rhesus and squirrel monkeys, rats and sheep. *J Nutr.* 113: 2138-2146.
- BERGER J., SHEPARD D., MORROW F., TAYLOR A. (1989): Relationship between dietary intake and tissue levels of reduced and total vitamin C in the nonscorbutic guinea pig. *J Nutr* 119: 734-740
- BERMANO G., ARTHUR J. R., HESKETH J. E. (1996): Role of 3' untranslated region in the regulation of cytosolic glutathione peroxidase and phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene expression by selenium supply. *Biochem J* 320: 891-895
- BERRY M. J., BANU L., LARSEN P. R. (1991a): Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature* 349: 438-440
- BERRY M. J., BANU L., CHEN Y., MANDEL S. J., KIEFFER J. D., HARNEY J. W., LARSEN P. R. (1991b): Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature* 353: 273-276.
- BERTINATO J., HIDIROGLOU N., PEACE R., COCKEL K. A., TRICK K. D., JEE P., GIROUX A., MADÈRE R., BONACCI G., ISKANDAR M., HAYWARD S., GILES N., L'ABBÉ M. R. (2007): Sparing effects of selenium and ascorbic acid on vitamin C and E in guinea pig tissues. *Nutr J* 6: 7
- BIANCO A. C., SALVATORE D., GEREBEN B., BERRY M. J., LARSEN P. R. (2002): Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23: 38-89
- BILZER M., KRAUTH-SIEGEL R. L., SCHIRMER R. H., AKERBOOM T. P. M., SIES H., SCHULZ G. E. (1984): Interaction of a glutathione S-conjugate with glutathione reductase. Kinetic and X-ray crystallographic studies. *Eur J Biochem* 138: 373-378
- BJÖRNSTEDT M., HAMBERG M., KUMAR S., XUE J., HOLMGREN A. (1995): Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. *J Biol Chem* 270: 11761-11764
- BJÖRNSTEDT M., KUMAR S., BJÖRKHEM L., SPYROU G., HOLMGREN A. (1997): Selenium and the thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biomed Environ Sci* 10: 271-279
- BORCHERT A., SAVASKAN N. E., KUHN H. (2003): Regulation of expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathione peroxidase gene. *J Biol Chem* 278: 2571-2580

- BRADFORD M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- BRAUN L., PUSKAS F., CSALA M., GYORFFY E., GARZO T., MANDL J., BANHEGYI G. (1996): Gluconeogenesis from ascorbic acid: ascorbate recycling in isolated murine hepatocytes. *FEBS Lett* 390: 183-186
- BULITTA C., GANEA C., FAHIMI D., VÖLKL A. (1996): Cytoplasmic and peroxisomal catalases of the guinea pig liver: evidence for two distinct proteins. *Biochim Biophys Acta* 1293: 55-62
- BURK R. F., NISHIKI K., LAWRENCE R. A., CHANCE B. (1978): Peroxide removal by selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidases in haemoglobin-free perfused rat liver. *J Biol Chem* 253: 43-46
- BURK R. F., LANE J. M., LAWRENCE R. A., GREGORY P. E. (1981): Effect of selenium deficiency on liver and blood glutathione peroxidase activity in guinea pigs. *J Nutr* 111, 690-693
- BURK R. F., GREGORY P. E. (1982): Some characteristics of ⁷⁵Se-P, a selenoprotein found in rat liver and plasma, and comparison of it with selenogluthione peroxidase. *Arch Biochem Biophys* 213: 73-80
- BURK R. F., HILL K. E., READ R., BELLEW T. (1991): Response of rat selenoprotein P to selenium administration and fate of its selenium. *Am J Physiol* 261: E26-E30
- BURK R. F., HILL K. E. (1994): Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein. *J Nutr* 124: 1891-1897
- BURK R. F., HILL K. E., BOEGLIN M. E., EBNER F. F., CHITTUM H. S. (1997): Selenoprotein P associates with endothelial cells in rat tissue. *Histochem Cell Biol* 108: 11-15
- BURK R. F., HILL K. E., MOTLEY A. K., AUTIN L. M., NORSWORTHY B. K. (2006a): Deletion of selenoprotein P upregulates urinary selenium excretion and depresses whole-body selenium content. *Biochim Biophys Acta* 1760: 1789-1793
- BURK R. F., CHRISTENSEN J. M., MAGUIRE M. J., AUSTIN L. M., WHETSELL W. O., MAY J. M., HILL K. E., EBNER F. F. (2006b): A combined deficiency of vitamins E and C causes severe central nervous system damage in guinea pigs. *J Nutr* 136: 1576-1581
- BURMEISTER L. A., PACHUCKI J., ST. GERMAIN D. L. (1997): Thyroid hormones inhibit type 2 iodothyronine deiodinase in the rat cerebral cortex by pre- and posttranslational mechanisms. *Endocrinology* 138: 5231-5237
- CAMMACK P. M., ZWAHLEN B. A., CHRISTENSEN M. J. (1995): Selenium deficiency alters thyroid hormone metabolism in guinea pigs. *J Nutr* 125: 302-308
- CARLBERG I., MANNERVIK B. (1975): Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 250: 5475-5480

- CARLSON B. A., XU X.-M., KRYUKOV G. V., RAO M., BERRY M. J., GLADYSHEV V. N., HATFIELD D. L. (2004): Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA^{[Ser]^{Sec}} kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 12848-12853
- CASTRO M. I., BRAVERMAN L. E., ALEX S., WU C.-F., EMERSON C. H. (1985): Inner-ring deiodination of 3,5,3'-triiodthyronine in the in situ perfused guinea pig placenta. *J Clin Invest* 76: 1921-1926
- CHAMBERS I., FRAMPTON J., GOLDFARB P., AFFARA N., McBAIN W., HARRISON P. R. (1986): The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *EMBO J* 5: 1221-1227
- CHANCE B., SIES H., BOVERIS A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605
- CHANOINE J.-P., BRAVERMAN L. E., FARWELL A. P., SAFRAN M., ALEX S., DUBORD S., LEONARD J. L. (1993): The thyroid gland is a major source of circulating T₃ in the rat. *J Clin Invest* 91: 2709-2713
- CHAUDIERE J., TAPPEL A. L. (1983): Purification and characterization of selenium-glutathione peroxidase from hamster liver. *Arch Biochem Biophys* 226: 448-457
- CHAVATTE L., BROWN B. A., DISCROLL D. M. (2005): Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol* 12: 408-416
- CHENG W. H., HO Y. S., ROSS D. A., VALENTINE B. A., COMBS G. F., LEI X. G. (1997): Cellular glutathione peroxidase knockout mice express normal levels of selenium-dependent plasma and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases in various tissues. *J Nutr* 127: 1445-1450
- CHOPRA I. J. (1977): A study of extrathyroidal conversion of thyroxine (T₄) to 3,3',5-triiodothyronine (T₃) in vitro. *Endocrinology* 101: 453-463
- CHRISTENSEN M. J., NELSON B. L., WRAY C. D. (1994): Regulation of glutathione S-transferase gene expression and activity by dietary selenium. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 271-277
- CHRISTENSEN M. J., CAMMACK P. M., WRAY C. D. (1995): Tissue specificity of selenoprotein gene expression in rat. *J Nutr Biochem* 6: 367-372
- CHU F. F., DOROSHOW J. H., ESWORTHY R. S. (1993): Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 268: 2571-2576
- COHEN G., HOCHSTEIN P. (1963): Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry* 2: 1420-1427
- COHEN M. B., DUVEL D. L. (1988): Characterization of the inhibition of glutathione reductase and the recovery of enzyme activity in exponentially growing murine

- leukemia (L1210) cells treated with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochem Pharmacol* 37: 3317-3320
- COMBS G. F., COMBS S. B. (1986): The role of selenium in nutrition. Academic Press, Inc. Orlando, Florida, USA
- CONRAD M., JAKUPOGLU C., MORENO S. G., LIPPL S., BANJAC A., SCHNEIDER M., BECK H., HATZOPOULOS A. K., JUST U., SINOWATZ F., SCHMAHL W., CHIEN K. R., WURST W., BORNKAMM G. W., BRIELMEIER M. (2004): Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Mol Cell Biol* 24: 9414-9423
- COOPER E., GIBBENS M., THOMAS C. R., LOWY C., BURKE C. W. (1983): Conversion of thyroxine to 3,3',5'-triiodothyronine in the guinea pig placenta: *in vivo* studies. *Endocrinology* 112: 1808-1815
- COPELAND P. R., FLETCHER J. E., CARLSON B. A., HATFIELD D. L., DISCROLL D. M. (2000): A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. *EMBO J* 19: 306-314
- CREWS H., ANDERSEN R., BRAESCO V., HOLST B., MAIANI G., OVESEN L., SCOTTER M., SOLFRIZZO M., VAN DEN BERG R., VERHAGEN H., WILLIAMSON G. (2001): A critical assessment of some biomarker approaches linked with dietary intake. *Brit J Nutr* 86, Suppl. 1: S5-S35
- CROTEAU W., DAVEY J. C., GALTON V. A., ST. GERMAIN D. L. (1996): Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. *J Clin Invest* 98: 405-417
- CURCIO C., BAQUI M. M. A., SALVATORE D., RIHN B. H., MOHR S., HARNEY J. W., LARSEN P. R., BIANCO A. C. (2001): The human type 2 iodothyronine deiodinase is a selenoprotein highly expressed in a mesothelioma cell line. *J Biol Chem* 276: 30183-30187
- DARROW R. A., ORGANISCIAK D. T. (1994): An improved spectrophotometric triiodide assay for lipid hydroperoxides. *Lipids* 29: 591-594
- DAS P. M., SADANA J. R., GUPTA R. K. P., GUPTA R. P. (1989): Experimental selenium toxicity in guinea pigs: haematological studies. *Ann Nutr Metab* 33: 347-353
- DEISSEROTH A., DOUNCE A. L. (1970): Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev* 50: 319-375
- DEL BELLO B., MAELLARO E., SUGHERINI L., SANTUCCI A., COMPORITI M., CASINI A. F. (1994): Purification of NADPH-dependent dehydroascorbate reductase from rat liver and its identification with 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem J* 304: 385-390
- DGE – Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. (2000): Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 1. Auflage, Umschau-Braus, Frankfurt a. M.

- DICKINSON D. A., MOELLERING D. R., ILES K. E., PATEL R. P., LEVONEN A.-L., WIGLEY A., DARLEY-USMAR V. M., FORMAN H. J. (2003): Cytoprotection against oxidative stress and the regulation of glutathione synthesis. *Biol Chem* 384: 527-537
- DING F., GRABOWSKI P. J. (1999): Identification of a protein component of a mammalian tRNA^{Sec} complex implicated in the decoding of UGA as selenocysteine. *RNA* 5: 1561-1569
- DOTAN Y., LICHTENBERG D., PINCHUK I. (2004): Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 43: 200-227
- DRINGEN R., HAMPRECHT B., BRÖER S. (1998): The peptide transporter PepT2 mediates the uptake of the glutathione precursor CysGly in astroglia-rich primary cultures. *J Neurochem* 71: 388-393
- DUAN Y.-J., KOMURA S., FISZER-SZAFARZ B., SZAFARZ D., YAGI K. (1988): Purification and characterization of a novel monomeric glutathione peroxidase from rat liver. *J Biol Chem* 263: 19003-19008
- DUTCZAK W. J., BALLATORI N. (1992): γ -Glutamyltransferase-dependent biliary-hepatic recycling of methyl mercury in the guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther* 262: 619-623
- EDER K., KRALIK A., KIRCHGESSNER M. (1995): Beeinflussung des Stoffwechsels der Schilddrüsenhormone bei defizitärer bis subtoxischer Selenversorgung. *Z Ernährungswiss* 34: 277-283
- ENGLARD S., SEIFTER S. (1986): The biochemical functions of ascorbic acid. *Ann Rev Nutr* 6: 365-406
- ENGSTRÖM N., HOLMGREN A., LARSSON A., SÖDERHÄLL S. (1974): Isolation and characterization of calf liver thioredoxin. *J Biol Chem* 240: 205-210
- ESAKI N., NAKAMURA T., TANAKA H., SODA K. (1982): Selenocysteine lyase, a novel enzyme that specifically acts on selenocysteine. *J Biol Chem* 257: 4386-4391
- FAGEGALTIER D., HUBERT N., YAMADA K., MIZUTANI T., CARBON P., KROL A. (2000): Characterization of mSELB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. *EMBO J* 19: 4796-4805
- FINLEY J. W. (2005): Selenium accumulation in plant foods. *Nutr Rev* 63: 196-202
- FISCHER A., PALLAUF, J., GOHIL K., WEBER S. U., PACKER L., RIMBACH G. (2001): Effect of selenium and vitamin E deficiency on differential gene expression in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 285: 470-475
- FLORIAN S., WINGLER K., SCHMEHL K., JACOBASCH G., KREUZER O. J., MEYERHOF W., BRIGELIUS-FLOHÉ R. (2001): Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. *Free Radic Res* 35: 655-663

- FONTAINE M., VALLI V. E. O., YOUNG L. G., LUMSDEN J. H. (1977): Studies on vitamin E and selenium deficiency in young pigs. I. Hematological and biochemical changes. *Can J Comp Med* 41: 41-51
- FORSTROM J. W., ZAKOWSKI J. J., TAPPEL A. L. (1978): Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocystein. *Biochemistry* 17: 2639-2644
- GANTHER H. E. (1966): Enzymic synthesis of dimethylselenide from sodium selenite in mouse liver extracts. *Biochemistry* 1089-1098
- GANTHER H. E. (1968): Selenotrisulfides. Formation by the reaction of thiols with selenious acid. *Biochemistry* 7: 2898-2905
- GANTHER H. E. (1971): Reduction of the selenotrisulfide derivative of glutathione to a persulfide analog by glutathione reductase. *Biochemistry* 10: 4089-4098
- GANTHER H. E. (1979): Metabolism of hydrogen selenide and methylated selenides. *Adv Nutr Res* 2: 107-128
- GANTHER H. E. (1984): Selenium metabolism and function in man and animals. In: Bratter P., Schramel P. (Hrsg.): Trace element analytical chemistry in medicine and biology. Vol. 3, S. 3-24. Proceedings of the third international workshop, Neuherberg, Deutschland. Walter de Gruyter, Berlin und New York, Deutschland und USA
- GE K., YANG G. (1993): The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China. *Am J Clin Nutr Suppl* 57: 259S-263S
- GELPI C., SONTHEIMER E. J., RODRIGUEZ-SANCHEZ J. L. (1992): Autoantibodies against a serine tRNA-protein complex implicated cotranslational selenocysteine insertion. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9739-9743
- GEREBEN B., GONCALVES C., HARNEY J. W., LARSEN P. R., BIANCO A. C. (2000): Selective proteolysis of human type 2 deiodinase: A novel ubiquitin-proteasomal mediated mechanism for regulation of hormon activation. *Mol Endocrinol* 14: 1697-1708
- GIULIVI C., HOCHSTEIN P., DAVIES K. J. A. (1994): Hydrogen peroxide production by red blood cells. *Free Radic Biol Med* 16: 123-129
- GLADYSHEV V. N., JEANG K., STADTMAN T. C. (1996): Selenocysteine, identified as a penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6146-6151.
- GODEAS C., TRAMER F., MICALI F., ROVERI A., MAIORINO M., NISII C., SANDRI G., PANFILI E. (1996): Phospholipid hydroperoxid glutathione peroxidase (PHGPx) in rat testis nuclei is bound to chromatin. *Biochem Mol Med* 59: 118-124
- GOUVEIA C. H. A., CHRISTOFFOLETE M. A., ZAITUNE C. R., DORA J. M., HARNEY J. W., MAIA A. L., BIANCO A. C. (2005): Type 2 iodothyronine

- selenodeiodinase is expressed throughout the mouse skeleton and in the MC3T₃-E1 mouse osteoblastic cell line during differentiation. *Endocrinology* 146: 195-200
- GREEN R. M., ELCE J. S. (1975): Acetylation of *S*-substituted cysteines by rat liver and kidney microsomal *N*-acetyltransferase. *Biochem J* 147: 283-289
- GRIFFITH O. W. (1980): Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106: 207-212
- GROMER S., ARSCOTT L. D., WILLIAMS C. H., SCHIRMER R. H., BECKER K. (1998a): Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds. *J Biol Chem* 273: 20096-20101
- GROSSMANN A., WENDEL A. (1983): Non-reactivity of the selenoenzyme glutathione peroxidase with enzymatically hydroperoxidized phospholipids. *Eur J Biochem* 135: 549-552
- GU Q.-P., XIA Y.-M., HA P.C., BUTLER J. A., WHANGER P. D. (1998): Distribution of selenium between plasma fractions in guinea pigs and humans with various intakes of dietary selenium. *J Trace Elem Med Biol* 12: 8-15
- GUIMARÃES M. J., PETERSON D., VICARI A., COCKS B. G., COPELAND N. G., GILBERT D. J., JENKINS N. A., FERRICK D. A., KASTELEIN R. A., BAZAN J. F., ZLOTNIK A. (1996): Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 15086-15091
- GÜNTHER T., HÖLLRIEGL V., VORMANN J., BUBECK J., CLASSEN H. G. (1994): Increased lipid peroxidation in rat tissues by magnesium deficiency and vitamin E depletion. *Mg Bull* 16: 38-43
- GÜNZLER W. A., STEFFENS G. J., GROSSMANN A., KIM S.-M. A., ÖTTING F., WENDEL A., FLOHÉ L. (1984): The amino-acid sequence of bovine glutathione peroxidase. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 365: 195-212
- GUTTERIDGE J. M. C., TICKNER T. R. (1978): The characterisation of thiobarbituric acid reactivity in human plasma and urine. *Anal Biochem* 91: 250-257
- HABIG W. H., PABST M. J., JAKOBY W. B. (1974): Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139
- HADLEY K. B., SUNDE R. A. (2001): Selenium regulation of thioredoxin reductase activity and mRNA levels in rat liver. *J Nutr Biochem* 12: 693-702
- HALLIWELL B., GUTTERIDGE J. M. C. (1995): The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 18: 125-126
- HALLOWAY D. E., RIVERS J. M. (1984): Long-term effects of inadequate and excessive dietary ascorbate on bile acid metabolism in the guinea pig. *J Nutr* 114: 1370-1376

- HALPERIN Y., SHAPIRO L. E., SURKS M. I. (1994): Down-regulation of type II L-thyroxine, 5'-monodeiodinase in cultured GC cells: Different pathways of regulation by L-triiodothyronine and 3,3',5'-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology* 135: 1464-1469
- HARATAKE M., FUJIMOTO K., ONO M., NAKAYAMA M. (2005): Selenium binding to human hemoglobin via selenotrisulfide. *Biochim Biophys Acta* 1723: 215-220
- HERRMAN J. L. (1977): The properties of a rat serum protein labelled by the injection of sodium selenite. *Biochim Biophys Acta* 500: 61-70
- HERRMANN E. C., MOORE E. C. (1973): Purification of thioredoxin from rat Novikoff ascites hepatoma. *J Biol Chem* 248: 1219-1223
- HIGDON J. V., FREI B. (2002): Vitamin C: An introduction. In: Packer L., Traber M. G., Kraemer K., Frei B. (Hrsg.): *The antioxidant vitamins C und E*. S. 1-16, AOCS Press, USA
- HILL K. E., BURK R. F. (1982): Effect of selenium deficiency and vitamin E deficiency on glutathione metabolism in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 257: 10668-10672
- HILL K. E., BURK R. F. (1985): Effect of selenium deficiency on the deposition of plasma glutathione. *Arch Biochem Biophys* 240: 166-171
- HILL K. E., BURK R. F., LANE J. M. (1987): Effect of selenium depletion and repletion on plasma glutathione and glutathione-dependent enzymes in the rat. *J Nutr* 117: 99-104
- HILL K. E., LLOYD R. S., YANG J.-G., READ R., BURK R. F. (1991): The cDNA for rat selenoprotein P contains 10 TGA codons in the open reading frame. *J Biol Chem* 266: 10050-10053
- HILL K. E., McCOLLUM G. W., BOEGLIN M. E., BURK R. F. (1997a): Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 234: 293-295
- HILL K. E., McCOLLUM G. W., BURK R. F. (1997b): Determination of thioredoxin reductase activity in rat liver supernatant. *Anal Biochem* 253: 123-125
- HILL K. E., MOTLEY A. K., LI X., MAY J. M., BURK R. F. (2001): Combined selenium and vitamin E deficiency causes fatal myopathy in guinea pigs. *J Nutr* 131, 1798-1802
- HILL K. E., MONTINE T. J., MOTLEY A. K., LI X., MAY J. M., BURK R. F. (2003): Combined deficiency of vitamins E and C causes paralysis and death in guinea pigs. *Am J Clin Nutr* 77: 1484-1488
- HILL K. E., ZHOU J., AUSTIN L. M., MOTLEY A. K., HAM A.-J. L., OLSON G. E., ATKINS J. F., GESTELAND R. F., BURK R. F. (2007): The selenium-rich C-terminal domain of mouse selenoprotein P is necessary for the supply of

- selenium to brain and testis but not for the maintenance of whole body selenium. *J Biol Chem* 282: 10972-10980
- HIMENO S., TAKEKAWA A., IMURA N. (1993a): Species differences in hydroperoxide-scavenging enzymes with special reference to glutathione peroxidase in guinea-pigs. *Comp Biochem Physiol* 104B: 27-31
- HIMENO S., TAKEKAWA A., TOYODA H., IMURA N. (1993b): Tissue-specific expression of glutathione peroxidase gene in guinea pigs. *Biochim Biophys Acta* 1173: 283-288
- HINCHMAN C. A., BALLATORI N. (1990): Glutathione-degrading capacities of liver and kidney in different species. *Biochem Pharmacol* 40: 1131-1135
- HINCHMAN C. A., MATSUMOTO H., SIMMONS T. W., BALLATORI N (1991): Intrahepatic conversion of a glutathione conjugate to its mercapturic acid. Metabolism of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in isolated perfused rat and guinea pig livers. *J Biol Chem* 266: 22179-22185
- HINCHMAN C. A., BALLATORI N. (1994): Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic process. *J Toxicol Environ Health* 41: 387-409
- HODGES R. E., HOOD J, CANHAM J. E., SAUBERLICH H. E., BAKER E. M. (1971): Clinical manifestations of ascorbic acid deficiency in man. *Am J Clin Nutr* 24: 432-443
- HOLMES R. S., MASTERS C. J. (1972): Species specific features of the distribution and multiplicity of mammalian liver catalase. *Arch Biochem Biophys* 148: 217-223
- HOLMGREN A. (1977): Bovine thioredoxin system. *J Biol Chem* 252: 4600-4606
- HOLMGREN A. (1985): Thioredoxin. *Ann Rev Biochem* 54: 237-271
- HOLLOWAY D. E., RIVERS J. M. (1984): Long-term effects of inadequate and excessive dietary ascorbate on bile acid metabolism in the guinea pig. *J Nutr* 114: 1370-1376
- HSIEH H. S., GANTHER H. E. (1975): Acid-volatile selenium formation catalyzed by glutathione reductase. *Biochemistry* 14: 1632-1636
- HSIEH H. S., NAVIA J. M. (1980): Zinc deficiency and bone formation in guinea pig alveolar implants. *J Nutr* 110: 1581-1588
- HUANG S. A., DORFMAN D. M., GENEST D. R., SALVATORE D., LARSEN P. R. (2003): Type 3 iodothyronine deiodinase is highly expressed in human uteroplacental unit and in fetal epithelium. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1384-1388
- HUSEBY N.-E. (1979): Subcellular localization of γ -glutamyltransferase activity in guinea pig liver. Effect of phenobarbital on the enzyme activity levels. *Clin Chim Acta* 94: 163-171

- IGARASHI T., SATOH T., UENO K., KITAGAWA H. (1983): Species difference in glutathione level and glutathione related enzyme activities in rats, mice, guinea pigs and hamsters. *J Pharm Dyn* 6: 941-949
- INOUE M., KINNE R., TRAN T., BIEMPICA L., ARIAS I. M. (1983): Rat liver canalicular membrane vesicles. Isolation and topological characterization. *J Biol Chem* 258: 5183-5188
- IRWIN C., O'BRIEN J. K., CHU P., TOWNSEND-PARCHMAN J. K., O'HARA P., HUNTER F. E. (1980): Glutathione peroxidase II of guinea pig liver cytosol: relationship to glutathione S-transferase. *Arch Biochem Biophys* 205: 122-131
- ISHIKAWA T. (1989a): Leukotriene C₄ inhibits ATP-dependent transport of glutathione S-conjugate across rat heart sarcolemma. *FEBS Lett* 246: 177-180
- ISHIKAWA T. (1989b): ATP/Mg²⁺-dependent cardiac transportsystem for glutathione S-conjugates. *J Biol Chem* 264: 17343-17348
- JAKUPOGLU C., PRZEMECK G. K. H., SCHNEIDER M., MORENO S. G., MAYR N., HATZOPOULOS A. K., DE ANGELIS M. H., WURST W., BORNKAMM G. W., BRIELMEIER M., CONRAD M. (2005): Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. *Mol Cell Biol* 25: 1980-1988
- JENKINS K. J., HIDIROGLOU M. (1972): Comparative metabolism of ⁷⁵Se-selenite, ⁷⁵Se-selenate, and ⁷⁵Se-selenomethionine in bovine erythrocytes. *Can J Phys Pharmacol* 50: 927-935
- JOHANSSON L. H., BORG L. A. H. (1988): A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 174: 331-336
- JÖSCH C., SIES H., AKERBOOM T. P. M. (1998a): Hepatic mercapturic acid formation: involvement of cytosolic cysteinylglycine S-conjugate dipeptidase activity. *Biochem Pharmacol* 56: 763-771
- JÖSCH C., KLOTZ L.-O., SIES H. (1998b): Identification of cytosolic leucyl aminopeptidase (EC 3.4.11.1) as the major cysteinylglycine-hydrolysing activity in rat liver. *Biol Chem* 384: 213-218
- JUNG C. H., WELLS W. W. (1997): Ascorbic acid is a stimulatory cofactor for mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 239: 457-462
- KAMEI-HAYASHI K., OSHINO R., HARA S. (1993): Amino acid sequence of glutathione S-transferase a from guinea pig liver. *J Biochem* 114: 835-841
- KELLER U., BRANDSCH C., EDER K. (2004): Supplementation of vitamin C and E increases the vitamin E status but does not prevent the formation of oxysterols in the liver of guinea pigs fed an oxidised fat. *Eur J Nutr* 43: 353-359

- KERNEBECK T., LOHSE A. W., GRÖTZINGER J. (2001): A bioinformatical approach suggests the function of the autoimmune hepatitis target antigen soluble liver antigen/liver pancreas. *Hepatology* 34: 230-233
- KIM S.-W., HARNEY J. W., LARSEN P. R. (1998): Studies of the hormonal regulation of type 2 5'-iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in pituitary tumor cells using semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocrinology* 139: 4895-4905
- KINOSHITA M., FUJIMOTO K., MIYAZAWA T. (1996): High phosphatidylcholine hydroperoxide level in plasma of guinea pigs with low and excess supplementation of ascorbic acid. *J Nutr Sci Vitaminol* 42: 35-46
- KOBAYASHI K., SOGAME Y., HARA H., HAYASHI K. (1990): Mechanism of glutathione S-conjugate transport in canalicular and basolateral rat liver plasma membrane. *J Biol Chem* 265: 7737-7741
- KOBAYASHI Y., OGRA Y., ISHIWATA K., TAKAYAMA H., AIMI N., SUZUKI K. (2002): Selenosugars are key and urinary metabolites for selenium excretion within the required to low-toxic range. *PNAS* 99: 15932-15936
- KOENIG R. J., LEONARD J. L., SENATOR D., RAPPAPORT N., WATSON A. Y., LARSEN P. R. (1984): Regulation of thyroxine 5'-deiodinase activity by 3,5,3'-triiodothyronine in cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 115: 324-329
- KOGA N., INSKEEP P. B., HARRIS T. M., GUENGERICH F. P. (1986): S-[2-(N⁷-guanyl)ethyl]glutathione, the major DNA adduct formed from 1,2-dibromoethane. *Biochemistry* 25: 2192-2198
- KONO Y., FRIDOVICH I. (1982): Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 257: 5751-5754
- KOZAK E. M., TATE S. S. (1982): Glutathione-degrading enzymes of microvillus membranes. *J Biol Chem* 257: 6322-6327.
- KUIPER G. G. J. M., KLOOTWIJK W., VISSER T. J. (2002): Substitution of cysteine for a conserved alanine residue in the catalytic center of type II iodothyronine deiodinase alters interaction with reducing cofactor. *Endocrinology* 143: 1190-1198
- KUIPER G. G. J. M., KESTER M. H. A., PEETERS R. P., VISSER T. J. (2005): Biochemical mechanisms of thyroid hormone deiodination. *Thyroid* 15: 787-798
- LANÇA A. J., ISRAEL Y. (1991): Histochemical demonstration of sinusoidal γ -glutamyltransferase activity by substrate protection fixation: Comparative studies in rat and guinea pig liver. *Hepatology* 14: 857-863
- LANGLEY S. C., KELLY F. J. (1992): Differing response to of the glutathione system to fasting in neonatal and adult guinea pigs. *Biochem Pharmacol* 44: 1489-1494

- LANKISCH P. G., SCHROETER R., LEGE L., VOGT W. (1973): Reduced glutathione and glutathione reductase – a comparative study of erythrocytes from various species. *Comp Biochem Physiol* 46B: 639-641
- LASH L. H., JONES D. P. (1984): Renal glutathione transport. *J Biol Chem* 259: 14508-14514
- LAWRENCE R. A., BURK R. F. (1976): Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71: 952-958
- LAWRENCE R. A., BURK R. F. (1978): Species, tissue and subcellular distribution of non Se-dependent glutathione peroxidase activity. *J Nutr* 108: 211-215
- LAWRENCE R. A., PARKHILL L. K., BURK R. F. (1978): Hepatic cytosolic non selenium-dependent glutathione peroxidase activity: its nature and the effect of selenium deficiency. *J Nutr* 108: 981-987
- LEE Y. H., LAYMAN D. K., BELL R. R., NORTON H. W. (1981): Response of glutathione peroxidase and catalase to excess dietary iron in rats. *J Nutr* 111: 2195-2202
- LEI X. G., EVENSON J. K., THOMPSON K. M., SUNDE R. A. (1995): Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium. *J Nutr* 125: 1438-1446
- LEONARD J. L., ROSENBERG I. N. (1980): Iodothyronine 5'-deiodinase from rat kidney: Substrate specificity and the 5'-deiodination of reverse triiodothyronine. *Endocrinology* 107: 1376-1383
- LEONARD J. L., EKENBARGER D. M., FRANK S. J., FARWELL A. P., KOEHRLE J. (1991): Localization of type I iodothyronine 5'-deiodinase to the basolateral plasma membrane in renal cortical epithelial cells. *J Biol Chem* 266: 11262-11269
- LEONARD J. L., VISSER T. J., LEONARD D. M. (2001): Characterization of the subunit structure of the catalytically active type I iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 276: 2600-2607
- LESOON A., MEHTA A., SINGH R., CHRISOLM G. M., DISCROLL D. M. (1997): An RNA-binding protein recognizes a mammalian selenocysteine insertion sequence element required for cotranslational incorporation of selenocysteine. *Mol Cell Biol* 17: 1977-1985
- LEVANDER O. A., ALFTHAN G., ARVILOMMI H., GREF C. G., HUTTUNEN J. K., KATAJA M., KOIVISTOINEN P., PIKKARAINEN J. (1983): Bioavailability of selenium to Finnish men as assessed by platelet glutathione peroxidase activity and other blood parameters. *Am J Clin Nutr* 37: 887-897
- LIU C. T. (1988): Energy balance and growth rate of outbred and inbred male guinea pigs. *Am J Vet Res* 49: 1752-1756

- LOW S. C., HARNEY J. W., BERRY M. J. (1995): Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. *J Biol Chem* 270: 21659-21664
- LUTHMAN M., HOLMGREN A. (1982): Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: Purification and characterization. *Biochemistry* 21: 6628-6633
- MA S., HILL K. E., CAPRIOLI R. M., BURK R. F. (2002): Mass spectrometric characterization of full-length rat selenoprotein P and three isoforms shortened at the C-terminus. *J Biol Chem* 277: 12749-12754
- MA S., Hill K. E., BURK R. F., CAPRIOLI R. M. (2003): Mass spectrometric identification of *N*- and *O*-glycosylation sites of full-length rat selenoprotein P and determination of selenide-sulfide and disulfide linkages in the shortest isoform. *Biochemistry* 42: 9703-9711
- MACHLIN L. J., KEATING J., NELSON J., BRIN M., FILIPSKI R., MILLER O. N. (1979): Availability of adipose tissue tocopherol in the guinea pig. *J Nutr* 109: 105-109
- MADDIPATI K. R., MARNETT L. J. (1987): Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. *J Biol Chem.* 262: 17398-17403
- MAIA A. L., KIM B. W., HUANG S. A., HARNEY J. W., LARSEN P. R. (2005): Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T₃ in euthyroid humans. *J Clin Invest* 115: 2524-2533
- MAIORINO M., AUMANN K.-D., BIGELIUS-FLOHÉ R., DORIA D., VAN DEN HEUVEL J., McCARTHY J., ROVERI A., URSINI F., FLOHÉ L. (1995): Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol Chem Hoppe Seyler* 376: 651-660
- MAIORINO M., SCAPIN M., URSINI F., BIASOLO M., BOSELLO V., FLOHÉ L. (2003): Distinct promoters determine alternative transcription of *gpx-4* into phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase variants. *J Biol Chem* 278: 34286-34290
- MANNERVIK B., JENSSON H., ÅLIN P., ÖRNING L (1984): Transformation of leukotriene A₄ methyl ester to leukotriene C₄ monomethyl ester by cytosolic rat glutathione transferases. *FEBS Lett* 174: 289-293
- MANNERVIK B., ÅLIN P., GUTHENBERG C., JENSSON H., TAHIR M. K., WARHOLM M., JÖRNVALL H. (1985): Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: Correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7202-7206
- MANSO C., WRÓBLEWSKI F. (1958): Glutathione reductase activity in blood and body fluids. *J Clin Invest* 37: 214-218

- MASSEY L. K., LIEBMAN M., KYNAST-GALES S. A. (2005): Ascorbate increases human oxaluria and kidney stone risk. *J Nutr* 135: 1673-1677
- MASUKAWA T., NISHIMURA T., IWATA H. (1984): Differential changes of glutathione S-transferase activity by dietary selenium. *Biochem Pharmacol* 33: 2635-2639
- MATSUDA A., KIMURA M., ITOKAWA Y. (1998): Influence of selenium deficiency on vital functions in rats. *Biol Trace Elem Res* 61: 287-301
- MATSUI M., OSHIMA M., OSHIMA H., TAKAKU K., MARUYAMA T., YODOI J., TAKETO M. M. (1996): Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev Biol* 178: 179-185
- MAURI P., BENAZZI L., FLOHÉ L., MAIORINO M., PIETTA P. G., PILAWA S., ROVERI A., URSINI F. (2003): Versatility of selenium catalysis in PHGPx unraveled by LC/ESI-MS/MS. *Biol Chem* 384: 575-588
- MAY J. M., COBB C. E., MENDIRATTA S., HILL K. E., BURK R. F. (1998): Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 273: 23039-23045
- McCONNELL K. P., PORTMAN O. W. (1952): Excretion of dimethyl selenide by the rat. *J Biol Chem* 195: 277-282
- McCONNELL K. P., CHO G. J. (1965): Transmucosal movement of selenium. *Am J Physiol* 208: 1191-1195
- McCONNELL K. P., CHO G. J. (1967): Active transport of L-selenomethionine in the intestine. *Am J Physiol* 13: 150-156
- McCOY R. N., HILL K. E., AYON M. A., STEIN J. H., BURK R. F. (1988): Oxidant stress following renal ischemia: Changes in the glutathione redox ratio. *Kidney Int* 33: 812-817
- McINTYRE T., CURTHOYS N. P. (1982): Renal catabolism of glutathione. Characterization of a particulate rat renal dipeptidase that catalyzes the hydrolysis of cysteinylglycine. *J Biol Chem* 257: 11915-11921
- McLEOD R., ELLIS E. M., ARTHUR J. R., NEAL G. E., JUDAH D. J., MANSON M. M., HAYES J. D. (1997): Protection conferred by selenium deficiency against aflatoxin B₁ in the rat is associated with the hepatic expression of an aldo-keto reductase and a glutathione S-transferase subunit that metabolize the mycotoxin. *Cancer Res* 57: 4257-4266
- MEISTER A., TATE S. S. (1976): Glutathione and related γ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annu Rev Biochem* 45: 559-604
- MEISTER A. (1988): Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263: 17205-17206

- MILLER E. R., PASTOR-BARRIUSO R., DALAL D., RIEMERSMA R. A., APPEL L. J., GUALLAR E. (2005): Meta-analysis: High dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 142: 37-46
- MILLS G. C. (1957): Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 229: 189-97
- MIRANDA-VIZUETTE A., DAMDIMOPOULOS A. E., PEDRAJAS J. R., GUSTAFSSON J.-Å., SPYROU G. (1999): Human mitochondrial thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 261: 405-412
- MIZUTANI T., KURATA H., YAMADA K. (1991): Study of mammalian selenocysteyl-tRNA synthesis with [⁷⁵Se]HSe⁻. *FEBS Lett* 289: 59-63
- MIZUTANI T., KURATA H., YAMADA K., TOTSUKA T. (1992): Some properties of murine selenocysteine synthase. *Biochem J* 284: 827-834
- MOAK M. A., CHRISTENSEN M. J. (2001): Promotion of lipid peroxidation by selenate and selenite and indicators of lipid peroxidation in the rat. *Biol Trace Elem Res* 79: 257-269
- MORENO-REYES R., EGRISE D., NÈVE J., PASTEELS J.-L., SCHOUTENS A. (2001): Selenium deficiency-induced growth retardation is associated with an impaired bone metabolism and osteopenia. *J Bone Miner Res* 16: 1556-1563
- MORENO S G., LAUX G., BRIELMEIER M., BORNKAMM G. W., CONRAD M. (2003): Testis-specific expression of the nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol Chem* 384: 635-643
- MORGENSTERN R., DEPIERRE (1988): Membrane-bound glutathione transferases. In: Sies H., Ketterer B. (Hrsg.): *Glutathione Conjugation. Mechanisms and Biological Significance*. S. 155-174., Academic Press, London, UK
- MORIARTY P. M., REDDY C. C., MAQUAT L. E. (1998): Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA. *Mol Cell Biol* 18: 2932-2939
- MORTIMER R. H., GALLIGAN J. P., CANNELL G. R., ADDISON R. S., ROBERTS M. S. (1996): Maternal to fetal thyroxine transmission in the human term placenta is limited by inner ring deiodination. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2247-2249
- MOSIALOU E., MORGENSTERN R. (1989): Activity of rat liver microsomal glutathione transferase toward products of lipid peroxidation and studies of the effect of inhibitors on glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 275: 289-294
- MOTSENBOCKER M. A., TAPPEL A. L. (1982): A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma. *Biochim Biophys Acta* 719: 147-153

- MUELLER A. S., PALLAUF J. (2002): Down-regulation of GPx1 mRNA and the loss of GPx1 activity causes cellular damage in the liver of selenium-deficient rabbits. *J Anim Physiol Anim Nutr* 86: 273-287
- MUGESH G., KLOTZ L. O., DU MONT W. W., BECKER K., SIES H. (2003): Selenenyl iodide: a new substrate for mammalian thioredoxin reductase. *Org Biomol Chem* 16: 3848-3852
- MYKKANEN H. M., WASSERMAN R. H. (1989): Uptake of ⁷⁵Se-Selenite by brush border membrane vesicles from chick duodenum stimulated by vitamin D. *J Nutr* 119: 242-247
- NANDI A., MUKHOPADHYAY C. K., GHOSH M. K., CHATTOPADHYAY, D. J., CHATTERJEE I. B. (1997): Evolutionary significance of vitamin C biosynthesis in terrestrial vertebrates. *Free Radic Biol Med* 22: 1047-1054
- NASR, S. H., KASHTANOVA Y., LEVCHUK V., MARKOWITZ G. S. (2006): Secondary oxalosis due to excess vitamin C intake. *Kidney Int* 70: 1672
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1977): Nutrient requirements of rabbits. 2th revised edition, National Academy Press, Washington
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1985): Nutrient requirements of sheep. 6th revised edition, National Academy Press, Washington
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1994): Nutrient requirements of poultry. 9th revised edition, National Academy Press, Washington
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1995): Nutrient requirements of laboratory animals. 4th revised edition, National Academy Press, Washington
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1998): Nutrient requirements of swine. 10th revised edition, National Academy Press, Washington
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (2000): Nutrient requirements of beef cattle. Update, National Academy Press, Washington
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (2001): Nutrient requirements of dairy cattle. 7th revised edition, National Academy Press, Washington
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (2003): Nutrient requirements of nonhuman primates. 2nd revised edition, National Academy Press, Washington
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (2006): Nutrient requirements of dogs and cats. 1st edition, National Academy Press, Washington
- NIKITOVIC D., HOLMGREN A. (1996): S-Nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. *J Biol Chem* 271: 19180-19185

- NISHIKIMI M., KAWAI T., YAGI K. (1992): Guinea pigs possess a highly mutated gene for L-gulonolactone oxidase, the key enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in this species. *J Biol Chem* 267: 21967-21972
- NOMURA K., IMAI H., KOUMURA T., ARAI M., NAKAGAWA Y. (1999): Mitochondrial phospholipid glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by mitochondrial death pathway. *J Biol Chem* 274: 29294-29302
- NONN L., WILLIAMS R. R., ERICKSON R. P., POWIS G. (2003): The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol Cell Biol* 23: 916-922
- NOONAN D. (1994): The guinea pig (*cavia porcellus*). ANZCCART Fact Sheet In: ANZCCART News 7: 1-8
- OKUNO T., MOTOBAYASHI S., UENO H., NAKAMURO K. (2005): Purification and characterization of mouse hepatic enzyme that converts selenomethionine to methylselenol by its α,γ -elimination. *Biol Trace Elem Res* 106: 77-93
- OLSON G. E., WINFREY V. P., NAGDas S. K., HILL K. E., BURK R. F. (2007): Apolipoprotein E receptor-2 (ApoER2) mediates selenium uptake from selenoprotein P by the mouse testis. *J Biol Chem* 282: 12290-12297
- OSHINO R., KAMEI K., NISHIOKA M., SHIN M. (1990): Purification and characterization of Glutathione S-Transferases from guinea pig liver. *J Biochem* 107: 105-110.
- O'TOOLE D., RAISBECK M. F. (1995): Pathology of experimentally induced chronic selenosis (alkali disease) in yearling cattle. *J Vet Diagn Invest* 7: 364-373
- OZAWA N., GUENGERICH F. P. (1983): Evidence for formation of an S-[2-(N⁷-guanyl)ethyl]glutathione adduct in glutathione-mediated binding of the carcinogen 1,2-dibromoethane to DNA. *Proc Natl Acad Sci* 80: 5266-5270
- PACKER J. E., SLATER T. F., WILLSON R. L. (1979): Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 278: 737-738
- PAGLIA D. E., VALENTINE W. N. (1967): Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab & Clin Med* 70: 158-169
- PALLUD S., LENNON A.-M., RAMAUGE M., GAVARET J.-M., CROTEAU W., PIERRE M., COURTIN F., ST. GERMAIN D. L. (1997): Expression of the type II iodothyronine deiodinase in cultured rat astrocytes is selenium-dependent. *J Biol Chem* 272: 18104-18110
- PALMER I. S., FISCHER D. D., HALVERSON A. W., OLSON O. E. (1969): Identification of a major selenium excretory product in rat urine. *Biochim Biophys Acta* 177: 336-342

- PALMER I. S., GUNSALUS R. P., HALVERSON A. W., OLSON O. E. (1970): Trimethylselenonium ion as a general excretory product from selenium metabolism in the rat. *Biochim Biophys Acta* 208: 260-266
- PATE S. K., LUKERT B. P., KIPP D. E. (1996): Tissue vitamin C levels of guinea pig offspring are influenced by maternal vitamin C intake during pregnancy. *Nutr Biochem* 7: 524-528
- PFEIFER H., CONRAD M., ROETHLEIN D., KYRIAKOPOULOS A., BRIELMEIER M., BORNKAMM G. W., BEHNE D. (2001): Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J* 15: 1236-1238
- POOVAIAH B. P., POTTER B. D., OMAJE S. T. (1987): Dietary ascorbic acid and selenium relationships in the guinea pig. *Ann Nutr Metab* 31: 9-17
- PROTEGGENTE A. R., ENGLAND T. G., RICE-EVANS C. A., HALLIWELL B. (2001): Iron supplementation and oxidative damage to DNA in healthy individuals with high plasma ascorbate. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 245-251
- PRYOR W. A., STANLEY J. P., BLAIR E. (1976): Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids* 11: 370-379
- PUSHA-REKHA T., BURDSALL A. L., OLEKSA L. M., CHISOLM G. M., DISCROLL D. M. (1995): Rat phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. *J Biol Chem* 270: 26993-26999
- QUESENBERRY M. S., LEE Y. C. (1996): A rapid formaldehyde assay using purpald reagent: Application under periodation conditions. *Anal Biochem* 234: 50-55
- RAISBECK M. F., O'TOOLE D. O., SANCHEZ D. A., SIMIEON R. L., WAGGONER J. W. (1995): Re-evaluation of selenium toxicity in grazing mammals. In: Schuman G. E., VANCE G. F. (Hrsg.): *Decades later: A time for reassessment. Proceedings of the 12th Annual Meeting of the American Society for Surface Mining and Reclamation. Vol. 1, S. 372-383*
- READ R., BELLEW T., YANG J.-G., HILL K. E., PALMER I. S., BURK R. F. (1990): Selenium and amino acid composition of selenoprotein P, the major selenoprotein in rat serum. *J Biol Chem* 265: 17899-17905
- REEVES P. G., NIELSEN F. H., FAHEY G. C. (1993): AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951
- REFFETT J. K., SPEARS J. W., PRABOWO A. (1986): Lipid peroxidation and glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase activities in lambs fed high dietary iron. *Nutr Rep Int* 34: 977-984

- RICCIARELLI R., MARONI P., ÖZER N., ZINGG J.-M., AZZI A. (1999): Age-dependent increase of collagenase expression can be reduced by α -tocopherol via proteinkinase C inhibition. *Free Radic Biol Med* 27: 729-737
- RICHMAN P. G., MEISTER A. (1975): Regulation of γ -glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* 250: 1422-1426
- RIMBACH G., MINIHAINE A. M., MAJEWICZ J., FISCHER A., PALLAUF J., VIRGLI F., WEINBERG P. D. (2002): Regulation of cell signalling by vitamin E. *Proc Nutr Soc* 61: 415-425
- ROBBINS K. R., SAXTON A. M., SOUTHERN L. L. (2006): Estimation of nutrient requirements using broken-line regression analysis. *J Anim Sci* 84 Suppl.: E155-165
- ROBINSON M. F., THOMSON C. D., HUEMMER P. K. (1985): Effect of a megadose of ascorbic acid, a meal and orange juice on the absorption of selenium as sodium selenite. *NZ Med J* 98: 627-629
- ROELS F. (1976a): Cytochemical demonstration of extraperoxisomal catalase. II. Liver of rhesus monkey and guinea pig. *J Histochem Cytochem* 25: 157-160
- ROELS F. (1976b): Cytochemical demonstration of extraperoxisomal catalase. I. Sheep liver. *J Histochem Cytochem* 24: 713-724
- ROJAS C., CADENAS S., LÓPEZ-TORRES M., PÉREZ-CAMPO R., BARJA G. (1996): Increase in heart glutathione redox ratio and total antioxidant capacity and decrease in lipid peroxidation after vitamin E dietary supplementation in guinea pigs. *Free Rad Biol Med* 21: 907-915
- ROSSOW N., BOLDUAN G. (1994): *Stoffwechselstörungen bei Haustieren*. Gustav Fischer Verlag Stuttgart
- ROTRUCK J. T., POPE A. L., GANTHER H. E., SWANSON A. B., HAFEMAN D. G., HOEKSTRA W. G. (1973): Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179: 588-590
- ROVERI A., CASASCO A., MAIORINO M., DALAN P., CALLIGARO A., URSINI F. (1992): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. *J Biol Chem* 267: 6142-6146
- ROVERI A., MAIORINO M., NISII C., URSINI F. (1994): Purification and characterization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from rat testis mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta* 1208: 211-221
- SAFRAN M., FARWELL A. P., LEONARD J. L. (1991): Evidence that type II 5'-deiodinase is not a selenoprotein. *J Biol Chem* 266: 13477-13480
- SAFRAN M., LEONARD J. L. (1991): Comparison of the physicochemical properties of type I and type II iodothyronine 5'-deiodinase. *J Biol Chem* 266: 32333-32338

- SAITO Y., HAYASHI T., TANAKA A., WATANABE Y., SUZUKI M., SAITO E., TAKAHASHI K. (1999): Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 274: 2866-2871
- SAITO Y., SATO N., HIRASHIMA M., TAKEBE G., NAGASAWA S., TAKAHASHI K. (2004): Domain structure of bi-functional selenoprotein P. *Biochem J.* 381: 841-846
- SALBE A. D., LEVANDER O. A. (1990): Effect of various dietary factors on the deposition of selenium in the hair and nails of rats. *J Nutr* 120: 200-206
- SALVATORE D., LOW S. C., BERRY M., MAIA A. L., HARNEY J. W., CROTEAU W., ST. GERMAIN D. L., LARSEN P. R. (1995): Type 3 iodothyronine deiodinase: cloning, in vivo expression, and functional analysis of the placental selenoenzyme. *J Clin Invest* 96: 2421-2430
- SANI B. P., WOODARD J. L., PIERSON M. C., ALLEN R. D. (1988): Specific binding proteins for selenium in rat tissues. *Carcinogenesis* 9: 277-284
- SANTINI F., CHOPRA I. J., HURD R. E., CHUA TECO G. N. (1992): A study of characteristics of hepatic iodothyronine 5'-monodeiodinase in various vertebrate species. *Endocrinology* 131: 830-834
- SCHNEIDER W., STAUDINGER H. J. (1965): Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide-dependent reduction of semidehydroascorbic acid. *Biochim Biophys acta* 96: 157-159
- SCHÜEP W., KECK E. (1990): The analysis of ascorbic acid derivatives. In *Proc Symp Ascorbic Acid in Domestic Animals*, 9-12 Oct. 1990, Ittlingen, Switzerland. Basel, Switzerland: F. Hoffmann-La Roche Ltd
- SCHWARZ K., FOLTZ C. M. (1957): Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J Am Chem Soc* 79: 3292-3293
- SENN E., SCHARRER E., WOLFFRAM S. (1992): Effects of glutathione and of cysteine on intestinal absorption of selenium from selenite. *Biol Trace Elem Res* 33: 103-108
- SHREVE M. R., MORRISSEY P. G., O'BRIEN P. J. (1979): Lipid and steroid hydroperoxides as substrate for the non-selenium-dependent glutathione peroxidase. *Biochem J* 177: 761-763
- SILVA J. E., LEONARD J. L. (1985): Regulation of rat cerebrocortical and adenohipophyseal type II 5'-deiodinase by thyroxine, triiodthyronine, and reverse triiodthyronine. *Endocrinology* 116: 1627-1635
- SIVARAM A. G., SURESH M. V., INDIRA M. (2003): Combined effect of ascorbic acid and selenium supplementation on alcohol-induced oxidative stress in guinea pigs. *Comp Biochem Physiol C*: 134: 397-401
- SMALL-HOWARD A., MOROZOVA N., STOYTICHEVA Z., FORRY E. P., MANSELL J. B., HARNEY J. W., CARLSON B. A., XU X.-M., HATFIELD D. L., BERRY M. J.

- (2006): Supramolecular complexes mediate selenocysteine incorporation in vivo. *Mol Cell Biol* 26: 2337-2346
- SNOKE J. E., BLOCH K. (1952): Formation and utilization of γ -glutamylcysteine in glutathione synthesis. *J Biol Chem* 199: 407-414
- SNOKE J. E., YANARI S., BLOCH K. (1953): Synthesis of glutathione from γ -glutamylcysteine. *J Biol Chem* 201: 573-586
- SPYROU G., HOLMGREN A. (1996): Desoxyribonucleoside triphosphate pools and growth of glutathione-depleted 3T6 mouse fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 220: 42-46
- SPYROU G., ENMARK E., MIRANDA-VIZUETE A., GUSTAFSSON J.-Å. (1997): Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J Biol Chem* 272: 2936-2941
- STADTMAN T. C. (1996): Selenocysteine. *Annu Rev Biochem* 65: 83-100
- STEIN A. F., GREGUS Z., KLAASSEN C. D. (1988): Species variations in biliary excretion of glutathione-related thiols and methylmercury. *Toxicol Appl Pharmacol* 93: 351-359
- STEINSAPIR J., HARNEY J., LARSEN P. R. (1998): Type 2 iodothyronine deiodinase in rat pituitary tumor cells is inactivated in proteasomes. *J Clin Invest* 102: 1895-1899
- STEINSAPIR J., BIANCO A. C., BUETTNER C., HARNEY J., LARSEN P. R. (2000): Substrate-induced down-regulation of human type 2 deiodinase (hD2) is mediated through proteasomal degradation and requires interaction with the enzyme's active center. *Endocrinology* 141: 1127-1135
- STEFFAN J. (1999): Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma und Leukozyten mit HPLC/UV und HPLC/EC: Methodenentwicklung, Validierung und Anwendung. Diss. rer. nat. Uni-GH Paderborn, Paderborn
- STERNBERG J., BRODEUR J., IMBACH A., MERCIER A. (1968): Metabolic studies with seleniated compounds – III. Lung excretion of selenium 75 and liver function. *Int J Appl Radiat Isot* 19: 669-684
- ST. GERMAIN D. L. (1988): The effects and interactions of substrates, inhibitors, and the cellular thiol-disulfide balance on the regulation of type II iodothyronine 5'-deiodinase. *Endocrinology* 122: 1860-1868
- SUN Q.-A., WU Y., ZAPPACOSTA F., JEANG K.-T., LEE B. J., HATFIELD D. L., GLADYSHEV V. N. (1999): Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *J Biol Chem* 274: 24522-24530
- SUNDE R. A. (1994): Intracellular glutathione peroxidases. Structure, regulation and function. In: Burk R. F. (Hrsg.): *Selenium in biology and human health*. S. 45-77, Springer-Verlag, New York, USA

- SUNDE (1997): Selenium. In: O'Dell B. L., Sunde R. A. (Hrsg.): Handbook of nutritionally essential mineral elements. S. 493-556, Marcel Dekker, New York, USA
- SUZUKI M., MURAOKA H., KURATA M., AGAR N. S. (1999): Glutathione reductase activity and flavin concentration in guinea pig-tissues. *Exp Anim* 48: 199-202
- SUZUKI K. T., SHIOBARA Y., ITOH M., OHMACHI M. (1998): Selective uptake of selenite by red blood cells. *Analyst* 123: 63-37
- SUZUKI T., KIM C. H., YASUMOTO K. (1988): Deterioration of membrane morphology, phospholipids, and cytoskeletal protein in rat erythrocytes exposed to *tert*-butyl hydroperoxide: Protection by exogenous glutathione fails in selenium deficiency. *J Nutr Sci Vitaminol* 34: 491-506
- TAMURA T., STADTMAN T. C. (1996): A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: Purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1006-1011
- TAPPEL A. L. (1978): Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Methods Enzymol* 52: 506-513
- TAPPEL M. E., CHAUDIERE J., TAPPEL A. L. (1982): Glutathione peroxidase activities of animal tissues. *Comp Biochem Physiol* 73B, 945-949
- THELANDER L. (1974): Reaction mechanism of ribonucleoside diphosphat reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 249: 4858-4862
- THOMAS J. P., GEIGER P. G., MAIORINO M., URSINI F., GIROTTI A. W. (1990): Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins. *Biochim Biochpys Acta* 1045: 252-260
- THOMSON C. D., ROBINSON M. F. (1986): Urinary and fecal excretions and absorption of a large supplement of selenium: superiority of selenate over selenite. *Am J Clin Nutr* 44: 659-663
- THOMSON C. D. (1998): Selenium speciation in human body fluids. *Analyst* 123: 827-831
- TIETZE F. (1969): Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27: 502-522
- TOYODA H., HIMENO S., IMURA N. (1989): The regulation of glutathione peroxidase gene expression relevant to species difference and the effects of dietary selenium manipulation. *Biochim Biophys Acta* 1008: 301-308
- TOYODA N., BERRY M. J., HARNEY J. W., LARSEN P. R. (1995): Topological analysis of the integral membrane proteine, type 1 iodothyronine deiodinase (D1). *J Biol Chem* 270: 12310-12318

- TU H. M., KIM S.-W., SALVATORE D., BARTHA T., LEGRADI G., LARSEN P. R., LECHAN R. M. (1997): Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* 138: 3359-3368
- TUJEBAJEVA R. M., COPELAND P. R., XU X.-M., CARLSON B. A., HARNEY J. W., DISCROLL D. M., HATFIELD D. L., BERRY M. J. (2000): Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. *EMBO Rep* 1: 158-163
- TURAN B., ZALOGLU N., KOC E., SARAN Y., AKKAS N. (1997): Dietary selenium- and vitamin E-induced alterations in some rabbit tissues. *Biol Trace Elem Res* 58: 237-253
- URSINI F., MAIORINO M., GREGOLIN C. (1985): The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 839: 62-70
- URSINI F., MAIORINO M., BRIGELIUS-FLOHÉ R., AUMANN K. D., ROVERI A., SCHOMBURG D., FLOHÉ L. (1995): Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 252: 38-53
- URSINI F., HEIM S., KIESS M., MAIORINO M., ROVERI A., WISSING J., FLOHÉ L. (1999): Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 258: 1393-1396
- VADHANAVIKIT S., GANTHER H. E. (1993): Selenium requirement of rats for normal hepatic and thyroidal 5'-deiodinase (type I) activities. *J Nutr* 123: 1124-1128
- VAN BLADEREN P. J. (2000): Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem Biol Interact* 129: 61-76
- VATASSERY G. T., SMITH W. E. (1987): Determination of alpha-tocopherolquinone (vitamin E quinone) in human serum, platelets, and red cell membrane samples. *Anal Biochem* 167: 411-417
- VDLUFA – Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (1976, mit Ergänzungslieferungen bis 2006): *Methodenhandbuch*. Band III. VDLUFA-Verlag, Darmstadt
- VENDELAND S. C., BUTLER J. A., WHANGER P. D. (1992a): Intestinal absorption of selenite, selenate, and selenomethionine in the rat. *J Nutr Biochem* 3: 359-365
- VENDELAND S. C., DEAGEN J. T., WHANGER P. D. (1992b): Uptake of selenotrisulfides of glutathione and cysteine by brush border membranes from rat intestine. *J Inorg Biochem* 47: 131-140
- VISSER T. J., VAN DER DOES-TOBÉ I., DOCTER R., HENNEMANN G. (1975): Conversion of thyroxine into tri-iodothyronine by rat liver homogenate. *Biochem J* 150: 489-493
- VISSER T. J., LEONARD J. L., KAPLAN M. M., LARSEN P. R. (1982): Kinetic evidence suggesting two mechanisms for iodothyronine 5'-deiodination in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 5080-5084

- VISSER T. J., KAPLAN M. M., LEONARD J. L., LARSEN P. R. (1983): Evidence for two pathways of iodothyronine 5'-deiodination in rat pituitary that differ in kinetics, propylthiouracil sensitivity, and response to hypothyroidism. *J Clin Invest* 71: 991-1002
- WANG X.Y., LIAO M.-L., HUNG T.-H., SEIB P. A. (1988): Liquid chromatographic determination of L-ascorbate 2-polyphosphate in fish feeds by enzymatic release of L-ascorbate. *J Assoc Off Anal Chem* 71: 1158-1161
- WEDEKIND K. J., HOWARD K. A., BACKUS R. C., YU S., MORRIS J. G., ROGERS Q. R. (2003): Determination of the selenium requirement in kittens. *J Anim Physiol a Anim Nutr* 87: 315-323
- WEDEKIND K. J., YU S., COMBS G. F. (2004): The selenium requirement of the puppy. *J Anim Physiol Anim Nutr* 88: 340-347
- WEINANDER R., EKSTRÖM L., RAZA H., LUNDQVIST G., LINDKVIST B., SUN T.-H., HERBERT H., SCHMIDT-KREY I., MORGENSTERN R. (1996): Microsomal glutathione transferase dimensions. In: Vermeulen N. P. E., Mulder G. J., Nieuwenhuys H., Peters W. H. M., van Bladeren P.J. (Hrsg.): *Glutathione S-transferases. Structure, function and clinical implications*. S. 49-56, Taylor & Francis, London, UK
- WEISS S., SUNDE R. A. (1998): *Cis*-acting elements are required for selenium regulation of glutathione peroxidase-1 mRNA levels. *RNA* 4: 816-827
- WEISS SACHDEV S., SUNDE R. A. (2001): Selenium regulation of transcript abundance and translational efficiency of glutathione peroxidase-1 and -4 in rat liver. *Biochem J* 357: 851-858
- WEITZEL F., URSINI F., WENDEL A. (1990): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in various mouse organs during selenium deficiency and repletion. *Biochim Biophys Acta* 1036: 88-94
- WEITZEL F., WENDEL A. (1993): Selenoenzymes regulate the activity of leukocyte 5-lipoxygenase via the peroxide tone. *J Biol Chem* 268: 6288-6292
- WELLS W. W., XU D. P., YANG Y., ROCQUE P. A. (1990): Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *J Biol Chem* 265: 15361-15364
- WELLS W. W., DOU C.-Z., DYBAS L. N., JUNG C.-H., KALBACH H. L., XU D. P. (1995): Ascorbic acid is essential for the release of insulin from scorbutic guinea pig pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11869-11873
- WHANGER P. D., BUTLER J. A. (1988): Effects of various dietary levels of selenium as selenite or selenomethionine on tissue selenium levels and glutathione peroxidase activity in rats. *J Nutr* 118: 846-852
- WHANGER P., VENDELAND S., PARK Y.-C., XIA Y. (1996): Metabolism of subtoxic levels of selenium in animals and humans. *Ann Clin Lab Sci* 26: 99-113

- WHEELER C. R., SALZMAN J. A., ELSAYED N. M., OMAJE S. T., KORTE D. W. (1990): Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Anal Biochem* 184: 193-199
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION (1996): Selenium. In: Trace elements in human nutrition and health. WHO, Genf, CH
- WINGLER K., BÖCHER M., FLOHÉ L., KOLLMUS H., BRIGELIUS-FLOHÉ R. (1999): mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins. *Eur J Biochem* 259, 149-157
- WOLFFRAM S., ARDÜSER F., SCHARRER E. (1985): In vivo intestinal absorption of selenate and selenite by rats. *J Nutr* 115: 454-459
- WOLFFRAM S., GRENACHER B., SCHARRER E. (1988): Transport of selenate and sulphate across the intestinal brush-border membrane of pig jejunum by two common mechanisms. *Quart J Exp Physiol* 73: 103-111.
- WOLFFRAM S., SCHARRER E. (1988): Bioverfügbarkeit und intestinale Absorption des Spurenelements Selen. *Übers Tierernährg* 16: 247-264
- WOLFFRAM S., BERGER B., GRENACHER B., SCHARRER E. (1989): Transport of selenoamino acids and their sulfur analogues across the intestinal brush border membrane of pigs. *J Nutr.* 119: 706-712
- WOLFFRAM S. (2000): Der Stoffwechsel ernährungsphysiologisch relevanter anorganischer und organischer Selenverbindungen. *Übers Tierernährg* 28: 65-94
- WRIGHT P. L., BELL M. C. (1966): Comparative metabolism of selenium and tellurium in sheep and swine. *Am J Physiol* 211: 6-10
- WU Q., HUANG K., XU H. (2003): Effects of long-term selenium deficiency on glutathione peroxidase and thioredoxin reductase activities and expression in rat aorta. *J Inorg Biochem* 94: 301-306
- WU S.-Y., GREEN W. L., HUANG W.-S., HAYS M. T., CHOPRA I. J. (2005): Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. *Thyroid* 15: 943-958
- XU X. M., MIX H., CARLSON B. A., GRABOWSKI P. J., GLADYSHEV V. N., BERRY M. J., HATFIELD D. L. (2005): Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery. *J Biol Chem* 280: 41568-41575
- YAGI K., KOMURA S., KOJIMA H., SUN Q., NAGATA N., OSHISHI N., NISHIKIMI M. (1996): Expression of human phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene for protection of host cell from lipid hydroperoxide-mediated injury. *Biochem Biophys Res Commun* 219: 486-491
- YAGI K., SHIDOJI Y., KOMURA S., KOJIMA H., OHISHI N. (1998): Dissipation of mitochondrial membrane potential by exogenous phospholipid monohydroperoxide and protection against this effect by transfection of cells with

- phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 528-533
- YAMAMOTO K., VÖLKL A., HASHIMOTO T., FAHIMI D. (1988): Catalase in guinea pig is localized in cytoplasm, nuclear matrix and peroxisomes. *Eur J Cell Biol* 46: 129-135
- YANG G., WANG S., ZHOU R., SUN S. (1983): Endemic selenium intoxication of humans in china. *Am J Clin Nutr* 37: 872-881
- YANG Y., SHARMA R., ZIMNIAK P., AWASTHI Y. C. (2002): Role of alpha class glutathione S-transferase as antioxidant enzymes in rodent tissues. *Toxicol Appl Pharmacol* 182: 105-115
- YU S., HOWARD K. A., WEDEKIND K. J., MORRIS J. G., ROGERS Q. R. (2002): A low-selenium diet increases thyroxine and decreases 3,5,3'triiodothyronine in the plasma of kittens. *J Anim Physiol a Anim Nutr* 86: 36-41
- YUAN J., PALIOURA S., SALAZAR J. C., SU D., O'DONOGHUE P., HOHN M. J., CARDOSO A. M., WHITMAN W. B., SÖLL D. (2006): RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea. *PNAS* 103: 18923-18927
- ZHANG L., MAIORINO M., ROVERI A., URSINI F. (1989): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: specific activity in tissues of rats of different age and comparison with other glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 1006: 140-143
- ZHONG L., ARNÉR E. S. J., LJUNG J., ÅSLUND, HOLMGREN A. (1998): Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue. *J Biol Chem* 273: 8581-8591
- ZHONG L., ARNÉR E. S. J., HOLMGREN A. (2000): Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5854-5859
- ZHONG L., HOLMGREN A. (2000): Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. *J Biol Chem* 275: 18121-18128

Anhang

Anhangstabelle 1: Gewichtsentwicklung der einzelnen Meerschweinchen innerhalb der Versuchsgruppen

Gruppe µg Se- Zulage/kg FM	Gewichtsentwicklung [g/Woche]										Gesamt [g]	[g/Tag]
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
I 0 µg	17,4	9,7	32,9	51,9	48,9	49,8	37,8	48,7	55,5	57,1	410	5,85
	-0,6	35,3	31,0	63,9	56,1	41,8	41,2	45,5	43,5	40,8	399	5,69
	-0,8	21,4	32,3	28,2	34,1	36,3	12,1	48,1	36,5	48,7	297	4,24
	-14,5	46,0	54,5	66,1	55,8	69,0	42,8	67,9	41,3	25,2	454	6,49
	-9,0	7,6	34,9	54,4	47,8	44,5	40,8	66,4	59,3	53,2	400	5,71
	0,6	14,3	49,6	63,9	62,4	65,7	35,3	76,0	46,2	55,4	469	6,71
	26,0	29,0	41,8	54,7	55,1	60,8	37,7	63,0	49,7	33,3	451	6,44
	MW SD	2,73 14,3	23,3 14,2	39,6 9,3	54,7 13,0	51,5 9,1	52,6 12,7	35,4 10,6	59,3 11,9	47,4 8,0	44,8 12,1	411 58,0
II 50 µg	40,2	25,6	44,8	53,2	63,8	54,6	36,2	80,5	53,9	60,3	513,1	7,33
	-27,2	-4,3	61,0	58,8	61,1	57,1	32,3	61,2	61,8	47,7	409,5	5,85
	5,0	12,7	59,5	55,6	44,0	59,2	38,3	70,3	68,5	80,5	493,6	7,05
	-46,9	15,9	67,5	42,1	39,1	74,2	30,9	65,8	54,3	36,1	379,0	5,41
	-14,0	-2,0	49,9	62,3	44,4	48,1	36,5	48,1	38,6	49,1	361,0	5,16
	8,0	17,6	46,1	58,0	53,1	63,8	-1,2	84,2	60,5	47,3	437,4	6,25
	-8,1	32,3	40,7	59,4	44,3	67,6	1,6	79,2	60,2	50,5	427,7	6,11
	MW SD	-6,14 27,8	14,0 13,4	52,8 9,9	55,6 6,6	50,0 9,5	60,7 8,7	24,9 17,1	69,9 12,7	56,8 9,4	53,1 14,0	432 55,9
III 100 µg	5,8	8,1	38,6	75,3	57,7	56,5	51,3	80,4	90,4	71,2	535,3	7,65
	-10,1	1,9	56,4	51,8	63,3	32,4	85,4	63,9	57,5	27,9	485,1	6,93
	-26,4	13,6	36,0	91,6	66,3	67,6	-7,4	71,2	59,7	53,7	430,4	6,15
	-4,7	6,3	47,6	41,1	64,8	86,7	40,4	88,2	58,7	56,0	425,9	6,08
	-16,5	30,8	38,9	47,0	59,7	63,9	33,6	40,9	42,3	65,7	406,3	5,80
	-47,0	7,7	51,8	71,1	64,6	57,1	18,2	80,2	59,2	50,6	413,5	5,91
	-7,7	48,4	37,8	62,7	62,9	76,2	47,6	79,6	53,7	50,6	511,8	7,31
	MW SD	-15,2 17,2	16,7 16,8	43,9 8,0	62,9 17,8	62,8 3,0	62,9 17,2	38,4 28,8	72,1 15,8	60,2 14,6	53,7 13,8	458 51,7
IV 150 µg	-7,0	16,3	44,6	57,1	70,4	63,2	27,8	72,4	50,0	66,4	461,2	6,59
	-27,0	26,8	59,7	70,1	59,6	28,9	65,6	85,3	53,4	65,8	488,2	6,97
	13,7	-0,4	37,6	58,7	59,6	76,3	46,9	68,5	43,9	68,4	473,2	6,76
	-27,7	11,7	45,5	59,7	41,8	61,2	35,2	62,8	52,1	53,7	396,0	5,66
	23,3	34,3	27,8	51,5	45,9	53,7	24,7	70,2	54,0	47,3	432,7	6,18
	-22,5	11,5	49,4	49,6	64,5	56,0	43,2	77,8	66,5	52,2	448,2	6,40
	-25,2	17,8	54,3	63,8	50,1	57,5	41,7	59,4	64,8	55,5	439,7	6,28
	MW SD	-10,3 21,1	16,9 11,2	45,6 10,6	58,6 7,0	56,0 10,4	56,7 14,3	40,7 13,7	70,9 8,8	55,0 8,0	58,5 8,3	449 30,1
V 200 µg	-38,3	37,0	52,5	65,8	52,3	51,4	42,2	62,9	59,3	47,0	432,1	6,17
	-28,2	21,9	45,7	63,9	66,1	53,8	31,6	74,0	56,0	49,5	434,3	6,20
	-4,4	53,3	44,2	60,2	59,0	55,6	35,6	59,5	61,0	31,4	455,4	6,51
	-3,3	34,9	34,8	65,4	83,5	57,4	27,6	57,1	33,2	59,2	449,8	6,43
	-32,4	40,5	37,0	42,2	31,2	39,7	36,3	35,0	26,7	48,2	304,4	4,35
	-8,7	-10,9	64,4	71,3	51,5	62,2	57,3	50,7	74,3	55,2	467,3	6,68
	-8,7	14,2	47,4	54,3	44,9	45,2	33,9	139,6	-48,5	57,2	379,5	5,42
	MW SD	-17,7 14,7	27,3 21,1	46,6 9,9	60,4 9,6	55,5 16,5	52,2 7,6	37,8 9,7	68,4 33,6	37,4 41,3	49,7 9,3	418 57,3
VI 250 µg	-28,9	15,5	53,8	51,7	44,0	54,6	40,1	67,0	17,1	63,3	378,3	5,40
	-38,7	30,2	62,5	68,5	71,2	49,1	79,1	56,9	42,2	87,2	508,2	7,26
	-28,9	41,6	38,9	65,2	29,8	55,6	35,6	40,3	42,4	51,1	371,6	5,31
	-16,0	31,6	31,2	62,4	55,5	45,7	44,0	48,3	68,3	41,1	412,1	5,89
	1,3	22,9	44,0	77,5	45,2	60,4	38,8	72,4	65,7	44,8	473,0	6,76
	1,7	2,9	48,4	59,6	59,5	60,2	62,3	65,4	32,1	58,7	450,8	6,44
	-6,6	7,6	50,7	57,0	60,5	63,4	58,8	67,2	50,9	69,8	479,3	6,85
	MW SD	-16,6 16,1	21,8 13,9	47,1 10,2	63,1 8,4	52,2 13,6	55,6 6,4	51,2 16,0	59,6 11,7	45,5 18,1	59,4 15,9	439 52,7

Anhangstabelle 2: Hämoglobinkonzentrationen und Hämatokritwerte im Vollblut

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM	Hämoglobin mmol/L	Hämatokrit %
A Ausgangsgruppe	5,60	39,0
	6,63	40,0
	7,21	41,3
	6,67	39,3
	6,66	43,3
	6,52	45,0
	6,82	39,0
MW	6,59	41,0
SD	0,49	2,35
I 0 µg	7,11	40,0
	7,39	44,0
	7,27	40,0
	6,73	42,3
	6,70	46,7
	7,24	45,3
	6,90	41,3
MW	7,05	42,8
SD	0,27	2,62
II 50 µg	6,88	44,7
	6,57	47,3
	7,53	46,0
	6,93	44,0
	5,65	43,0
	6,55	35,3
	6,93	42,3
MW	6,72	43,2
SD	0,57	3,89
III 100 µg	6,91	45,3
	5,81	43,7
	7,25	46,0
	6,63	38,7
	6,76	33,0
	6,82	43,7
	6,51	44,3
MW	6,67	42,1
SD	0,45	4,65
IV 150 µg	6,22	43,3
	6,48	40,7
	7,94	42,0
	6,06	41,7
	7,05	46,7
	6,67	42,7
	6,99	41,0
MW	6,77	42,6
SD	0,63	2,03
V 200 µg	7,30	42,7
	6,91	42,0
	7,68	43,7
	7,84	47,7
	7,84	43,3
	7,10	42,7
	7,42	42,7
MW	7,44	43,5
SD	0,36	1,91
VI 250 µg	5,60	43,0
	6,63	44,0
	7,21	49,0
	6,67	43,0
	6,66	45,3
	6,52	40,7
	6,82	44,0
MW	6,59	44,1
SD	0,49	2,56

Anhangstabelle 3: Selenkonzentrationen [$\mu\text{g}/\text{kg}$] in ausgewählten Geweben der Meerschweinchen

Gruppe/ μg Se-Zulage/kg FM	Leber	Plasma	Lysat	Muskel	Milz	Gehirn	Testes
A Ausgangsgruppe	989	113	157	145	268	159	227
	886	120	149	144	259	167	290
	942	116	155	145	275	136	291
	890	102	148	146	251	164	240
	864	109	154	155	258	169	221
	795	123	157	143	287	159	227
	635	92,5	150	140	228	159	204
MW	857	111	153	146	261	159	243
SD	115	10,7	3,8	4,6	18,9	10,9	34,4
I 0 μg	43,1	14,9	29,0	19,8	99,2	103	214
	52,1	20,4	28,8	30,3	96,7	103	217
	57,5	17,8	23,5	27,1	105	103	209
	43,3	15,3	21,4	35,5	92,3	106	164
	49,2	16,0	72,6	30,2	92,5	111	190
	37,5	15,5	25,6	29,9	97,7	84,7	235
	55,2	20,7	22,3	30,2	106	107	233
MW	48,3	17,2	31,9	29,0	98,5	103	209
SD	7,3	2,5	18,2	4,8	5,5	8,8	24,8
II 50 μg	284	95,7	107	85,0	222	137	251
	274	88,3	96,7	69,5	208	130	233
	274	90,8	97,3	65,3	206	116	234
	247	100	109	69,3	225	141	248
	278	108	129	72,0	230	140	209
	274	92,1	150	78,0	226	144	242
	277	91,9	143	70,0	227	124	224
MW	273	95,3	119	72,7	221	133	234
SD	11,8	6,8	21,9	6,6	9,4	10,3	14,6
III 100 μg	304	103	118	67,2	225	136	187
	325	106	116	82,7	238	144	256
	391	105	141	82,5	263	139	208
	383	98,8	149	71,4	242	139	214
	399	87,9	147	80,0	213	156	227
	355	108	124	73,1	232	123	272
	354	101	151	76,3	239	151	242
MW	359	101	135	76,2	236	141	229
SD	35,2	6,7	15,4	5,9	15,5	10,9	29,4
IV 150 μg	485	108	155	81,4	273	156	282
	553	95,6	148	82,0	261	153	221
	456	93,6	150	85,9	263	149	222
	422	95,7	142	84,6	241	132	185
	413	97,2	137	72,2	243	147	258
	418	98,1	151	75,4	257	149	217
	429	110	154	74,8	241	155	213
MW	454	99,8	148	79,5	254	149	228
SD	50,6	6,5	6,4	5,3	12,7	8,2	32,0
V 200 μg	607	109	170	84,1	279	162	226
	669	114	154	85,4	285	155	265
	645	118	153	72,7	297	139	249
	554	115	157	80,1	275	140	302
	666	117	140	91,7	303	158	276
	519	127	132	63,1	258	132	256
	571	107	156	74,2	286	158	258
MW	604	115	152	78,8	283	149	262
SD	58,6	6,6	12,5	9,5	14,6	11,8	23,4
VI 250 μg	542	112	164	80,8	269	164	234
	702	128	167	80,7	291	153	252
	688	115	191	75,4	297	137	210
	685	133	186	81,5	287	173	251
	729	136	188	79,2	293	138	241
	653	112	152	77,8	297	156	223
	560	127	127	69,4	270	150	213
MW	651	123	168	77,8	286	153	232
SD	72,3	10,1	23,3	4,3	11,9	13,1	17,2

Anhangstabelle 4: cGPx-Aktivität in Niere, Leber, Lysat, Plasma, Herz und Lunge

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM	Niere	Leber	Lysat	Plasma	Herz	Lunge
I 0 µg	17,4	2,32	6,74	2,07	8,18	11,7
	15,6	3,23	6,88	1,96	9,20	14,2
	18,0	3,34	12,8	2,01	9,51	13,3
	16,2	2,93	12,4	1,60	9,64	14,1
	15,5	2,59	19,2	2,04	9,28	13,3
	12,3	3,07	16,4	2,05	8,96	14,5
	11,2	3,34	9,00	2,13	9,85	11,3
	MW SD	15,2 2,54	2,98 0,39	11,9 4,74	1,98 0,18	9,23 0,55
II 50 µg	35,2	21,6	29,9	5,15	21,5	25,5
	35,9	17,1	26,2	4,40	19,9	24,1
	28,8	22,9	26,2	5,09	15,8	24,3
	27,6	16,4	35,1	6,04	17,7	26,7
	29,8	22,2	39,7	11,0	16,0	29,5
	30,9	19,5	45,4	6,28	16,7	25,2
	30,5	14,2	36,4	5,23	16,0	25,9
	MW SD	31,2 3,15	19,1 3,31	34,1 7,16	5,37 0,69	17,7 2,22
III 100 µg	25,7	16,7	40,2	5,65	17,8	30,9
	33,3	16,0	41,6	7,24	17,5	26,9
	29,4	17,5	32,4	4,52	22,1	29,8
	32,4	11,2	24,4	4,72	22,7	27,7
	34,3	17,2	31,2	4,82	20,0	28,8
	33,7	16,0	55,4	5,19	20,8	26,0
	41,9	20,1	42,6	7,19	19,9	29,3
	MW SD	32,9 4,97	16,4 2,71	38,3 10,0	5,62 1,15	20,1 1,97
IV 150 µg	33,3	16,1	50,2	6,34	19,9	31,2
	36,3	15,2	40,1	4,62	22,2	32,0
	35,0	15,4	45,8	5,54	19,1	28,7
	26,9	14,2	47,6	5,91	22,5	32,5
	24,3	13,9	34,5	3,13	19,5	25,0
	29,3	12,1	39,8	6,43	22,7	28,8
	39,4	16,8	45,3	6,40	19,8	34,2
	MW SD	32,1 5,42	14,8 1,55	43,3 5,43	5,48 1,22	20,8 1,57
V 200 µg	34,4	18,5	57,0	6,09	22,4	26,3
	32,5	16,9	45,5	4,69	23,5	26,8
	31,5	17,9	53,3	5,15	20,4	30,8
	38,7	17,5	63,7	5,22	23,4	28,6
	31,6	20,5	54,5	5,26	24,7	27,2
	26,5	13,0	39,0	6,44	20,6	25,3
	34,0	13,0	42,9	5,43	28,0	27,4
	MW SD	32,7 3,68	16,7 2,79	50,9 8,70	5,47 0,60	23,3 2,60
VI 250 µg	35,4	14,5	49,7	6,42	21,4	27,6
	30,3	18,0	40,1	5,33	22,4	29,3
	21,7	21,3	43,4	3,85	26,0	25,7
	38,6	17,2	57,3	4,01	24,2	29,1
	32,9	19,4	46,8	5,35	23,4	31,6
	29,4	20,4	49,1	4,24	21,4	30,3
	43,9	20,8	29,8	5,61	17,1	22,1
	MW SD	33,1 7,12	18,8 2,42	45,2 8,68	4,97 0,96	22,3 2,80

Anhangstabelle 5: PCOOH-reduzierende Aktivität in Niere, Leber, Herz, Testes und Gehirn

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM	Niere	Leber	Herz	Testes	Gehirn
I 0 µg	1,08	1,74	0,88	2,08	0,67
	0,65	1,72	0,35	2,01	0,75
	1,01	1,90	0,51	2,02	1,09
	0,73	2,65	0,27	2,23	1,03
	0,60	2,78	0,25	2,19	0,88
	0,77	2,86	0,29	2,25	1,12
	0,70	2,59	0,29	1,55	0,97
	MW SD	0,79 0,18	2,32 0,51	0,33 0,10	2,05 0,24
II 50 µg	0,98	3,42	0,60	2,30	1,28
	1,23	3,93	0,65	2,75	0,78
	0,99	3,28	0,60	1,97	1,28
	2,10	3,91	0,70	2,13	1,24
	1,81	3,63	0,67	2,40	1,08
	1,59	4,11	0,64	2,20	1,21
	1,66	4,10	0,53	2,92	0,86
	MW SD	1,48 0,43	3,77 0,33	0,63 0,06	2,38 0,34
III 100 µg	1,18	4,77	0,86	1,21	0,92
	1,44	4,13	0,79	1,90	1,02
	1,75	2,86	0,93	2,61	0,84
	1,75	3,72	0,64	2,85	0,95
	1,10	3,78	0,73	2,14	0,85
	1,25	2,85	0,85	2,10	1,01
	1,08	3,16	0,81	2,71	1,01
	MW SD	1,36 0,29	3,61 0,71	0,80 0,09	2,22 0,57
IV 150 µg	0,97	3,32	0,67	1,58	1,22
	1,22	3,23	0,62	2,05	1,15
	1,09	3,14	0,65	2,48	1,26
	1,55	3,50	0,78	2,07	1,25
	1,00	3,78	0,49	1,66	0,79
	1,47	3,95	0,63	1,55	0,91
	1,17	2,83	0,62	0,73	1,07
	MW SD	1,21 0,22	3,39 0,38	0,64 0,09	1,73 0,55
V 200 µg	1,21	3,31	0,54	2,38	0,97
	1,00	3,32	0,96	1,75	0,95
	1,23	3,86	0,73	2,05	0,83
	1,95	3,99	0,70	2,52	0,94
	1,23	3,77	0,61	1,61	1,19
	1,31	3,72	1,27	1,22	1,30
	1,65	4,31	0,80	2,46	1,15
	MW SD	1,37 0,32	3,75 0,36	0,72 0,15	2,00 0,49
VI 250 µg	1,12	3,91	0,85	2,66	1,15
	1,05	3,87	0,88	2,00	1,07
	1,63	3,75	0,66	2,04	1,23
	1,58	3,45	0,72	2,12	1,26
	1,28	3,24	0,89	2,22	0,92
	1,36	4,46	0,56	2,87	1,01
	1,05	3,49	0,72	2,26	1,13
	MW SD	1,30 0,24	3,74 0,40	0,75 0,12	2,31 0,33

Anhangstabelle 6: TrxR-Aktivität in Niere, Leber und Herz der Meerschweinchen

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM	Niere [mU/mg]	Leber [mU/mg]	Herz [mU/mg]
I 0 µg	3,42	4,02	1,59
	3,32	3,01	1,24
	3,66	2,75	2,39
	3,27	5,44	3,28
	3,08	2,52	2,57
	3,36	4,71	3,67
	2,78	3,66	2,67
	MW SD	3,27 0,28	3,73 1,07
II 50 µg	4,03	5,41	6,21
	4,41	6,21	5,50
	4,35	4,64	5,63
	4,01	5,70	4,63
	4,05	6,01	4,27
	4,12	4,18	3,97
	4,25	5,96	5,78
	MW SD	4,17 0,16	5,44 0,76
III 100 µg	4,12	4,30	4,39
	4,44	4,97	4,73
	4,50	4,87	5,58
	4,40	4,80	4,20
	4,78	4,55	5,56
	4,34	6,57	4,19
	4,15	4,75	4,52
	MW SD	4,39 0,22	4,97 0,74
IV 150 µg	3,90	3,91	4,62
	5,33	4,41	5,22
	4,45	5,17	4,40
	4,60	6,15	7,05
	4,57	4,57	5,10
	4,50	4,53	4,75
	4,59	7,48	3,92
	MW SD	4,56 0,42	5,17 1,24
V 200 µg	4,34	5,80	7,19
	5,04	4,81	4,22
	4,63	4,87	4,64
	3,63	6,38	4,72
	4,83	5,68	4,13
	4,78	5,52	4,16
	5,10	6,31	4,83
	MW SD	4,62 0,51	5,63 0,62
VI 250 µg	4,66	7,66	4,38
	4,75	5,94	4,36
	5,07	4,38	4,56
	4,93	5,05	4,60
	4,04	4,49	4,30
	4,68	5,73	5,72
	4,40	4,99	5,42
	MW SD	4,65 0,34	5,46 1,13

Anhangstabelle 7: Deiodinaseaktivität [fmol T₃/min/mg Protein] in der Leber, T₄- und T₃-Konzentrationen [nmol/L] und T₄:T₃-Verhältnis im Plasma

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM	Deiodinaseaktivität	T ₄	T ₃	T ₄ :T ₃
I 0 µg	1,63	29,3	0,665	44,1
	7,38	36,6	0,716	51,2
	18,4	25,0	0,669	37,4
	22,4	42,7	0,833	51,2
	13,4	39,5	0,899	43,9
	20,1	32,3	0,579	55,8
	28,0	33,3	0,715	46,5
	MW SD	15,9 9,08	34,1 6,04	0,725 0,11
II 50 µg	65,2	30,8	0,990	31,1
	48,4	26,0	0,974	26,7
	69,1	29,2	1,13	25,8
	72,6	30,6	0,959	32,0
	68,9	33,2	1,06	31,3
	77,4	26,8	0,799	33,5
	51,3	26,7	0,781	34,1
	MW SD	64,7 10,9	29,0 2,68	0,957 0,13
III 100 µg	70,9	29,2	1,05	27,9
	61,8	34,7	1,26	27,7
	72,5	26,1	0,856	30,5
	43,7	26,9	0,924	29,1
	71,1	25,6	0,639	40,1
	71,6	28,4	0,722	39,3
	50,4	32,5	0,948	34,3
	MW SD	63,1 11,7	29,1 3,40	0,913 0,20
IV 150 µg	47,3	24,0	0,823	29,2
	64,2	27,5	0,795	34,6
	55,0	27,7	0,927	29,9
	46,8	30,5	0,892	34,2
	77,3	37,4	1,13	33,2
	71,1	23,5	0,975	24,2
	59,7	29,7	0,923	32,1
	MW SD	60,2 11,5	28,6 4,67	0,923 0,11
V 200 µg	68,4	30,0	0,982	30,5
	70,0	30,0	1,09	27,6
	64,0	27,6	0,894	30,9
	75,3	32,8	1,02	32,2
	79,8	29,2	0,718	40,6
	48,9	31,6	0,890	35,5
	65,2	27,3	0,767	35,5
	MW SD	67,4 9,85	29,8 2,00	0,909 0,13
VI 250 µg	56,4	37,2	1,14	32,7
	56,5	41,8	1,21	34,5
	78,8	37,9	0,975	38,9
	66,3	37,9	1,13	33,4
	73,2	42,3	1,35	31,2
	88,8	28,8	0,88	32,9
	73,1	47,9	1,41	33,9
	MW SD	70,4 11,8	39,1 5,87	1,16 0,19

Anhangstabelle 8: GST-, Se-unabhängige, gesamt-GPx-Aktivität und der prozentuale Anteil der non-SeGPx an der Gesamt-GPx-Aktivität in der Leber

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM	GST [U/mg]	non-SeGPx [mU/mg]	Gesamt-GPx Leber [mU/mg]	%-Anteil non-SeGPx an Gesamt-GPx
I 0 µg	11,9	185	187	98,8
	11,0	137	140	97,7
	12,2	170	174	98,1
	15,3	182	185	98,4
	12,6	171	174	98,5
	15,0	193	196	98,4
	10,4	188	191	98,3
MW	12,6	175	178	98,3
SD	1,87	18,7	18,6	0,34
II 50 µg	13,4	176	198	89,1
	11,6	159	176	90,3
	16,9	196	219	89,6
	11,7	191	207	92,1
	12,8	181	203	89,1
	14,1	169	189	89,7
	14,7	160	174	91,8
MW	13,6	176	195	90,2
SD	1,86	14,4	16,5	1,26
III 100 µg	12,2	130	146	88,6
	12,4	153	169	90,5
	14,5	161	179	90,2
	12,2	169	180	93,8
	14,6	190	207	91,7
	13,3	172	187	91,5
	10,9	161	181	88,9
MW	12,9	162	179	90,7
SD	1,35	18,5	18,5	1,80
IV 150 µg	11,1	141	157	89,8
	15,6	186	201	92,5
	13,5	159	174	91,2
	11,5	193	207	93,1
	12,6	170	184	92,4
	15,9	229	241	95,0
	12,8	215	231	92,8
MW	13,3	184	199	92,4
SD	1,85	30,9	30,3	1,62
V 200 µg	14,9	167	185	90,0
	14,9	204	221	92,4
	13,4	160	178	89,9
	11,3	148	165	89,4
	11,8	185	205	90,0
	12,4	174	187	93,0
	12,6	123	136	90,5
MW	13,1	166	182	90,8
SD	1,41	26,0	27,4	1,38
VI 250 µg	12,7	218	232	93,8
	13,9	149	167	89,2
	13,5	163	185	88,5
	10,4	128	145	88,2
	12,4	190	210	90,8
	15,8	221	241	91,5
	14,4	136	151	89,7
MW	13,3	172	190	90,2
SD	1,70	38,1	38,5	1,96

Anhangstabelle 9: GST-, Se-unabhängige, gesamt-GPx-Aktivität und der prozentuale Anteil der non-SeGPx an der gesamt-GPx-Aktivität in der Niere

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM	GST [U/mg]	non-Se-GPx [mU/mg]	Gesamt-GPx Leber [mU/mg]	%-Anteil non-SeGPx an gesamt-GPx
I 0 µg	1,61	77,1	94,6	81,6
	2,01	79,8	95,3	83,7
	1,84	89,1	107	83,2
	1,82	71,0	87,3	81,4
	1,92	78,8	94,3	83,6
	1,88	88,7	101	87,8
	1,68	79,6	90,8	87,7
MW	1,82	80,6	95,8	84,1
SD	0,14	6,41	6,57	2,6
II 50 µg	1,63	53,8	89,0	60,4
	1,79	71,3	107	66,5
	1,55	58,0	86,9	66,8
	1,92	92,4	120	77,0
	1,81	66,0	95,7	68,9
	1,72	62,4	93,3	66,9
	2,04	62,7	93,2	67,2
MW	1,78	66,7	97,9	67,7
SD	0,17	12,6	11,7	4,9
III 100 µg	1,82	80,6	106	75,8
	1,76	63,7	97,0	65,6
	1,83	60,8	90,2	67,4
	1,95	68,0	100	67,7
	1,86	63,7	98,0	65,0
	1,99	71,4	105	67,9
	2,19	53,7	95,6	56,2
MW	1,92	66,0	98,9	66,5
SD	0,14	8,50	5,56	5,8
IV 150 µg	1,83	64,5	97,8	66,0
	1,66	57,6	93,9	61,3
	2,00	66,3	101	65,4
	1,71	65,4	92,3	70,9
	1,88	71,7	96,0	74,7
	2,00	77,4	107	72,5
	1,89	64,1	103	61,9
MW	1,85	66,7	98,8	67,5
SD	0,13	6,28	5,27	5,2
V 200 µg	2,08	63,8	98,2	64,9
	2,28	57,9	90,4	64,1
	1,78	72,9	104	69,8
	1,74	63,6	102	62,2
	2,28	61,5	93,1	66,0
	1,68	54,4	80,9	67,2
	2,06	73,3	107	68,3
MW	1,99	63,9	96,6	66,1
SD	0,25	7,08	9,19	2,6
VI 250 µg	2,23	78,2	114	68,8
	2,07	80,1	110	72,6
	1,87	78,4	100	78,4
	2,37	72,7	111	65,3
	1,83	72,1	105	68,7
	2,04	85,5	115	74,4
	2,33	80,6	124	64,8
MW	2,11	78,2	111	70,4
SD	0,21	4,66	7,71	5,0

Anhangstabelle 10: GR-Aktivität in Leber und Niere der Meerschweinchen

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM	GR Leber [mU/mg]	GR Niere [mU/mg]
I 0 µg	56,3	245
	48,4	257
	58,4	270
	53,6	236
	50,9	248
	53,9	252
	46,6	226
	MW SD	52,6 4,2
II 50 µg	50,8	236
	48,9	241
	58,0	254
	50,6	287
	55,7	279
	52,1	240
	47,7	243
	MW SD	52,0 3,7
III 100 µg	49,7	352
	48,7	330
	55,4	325
	44,8	337
	57,6	343
	58,4	319
	50,6	332
	MW SD	52,2 5,1
IV 150 µg	47,8	332
	60,1	340
	53,0	372
	51,4	344
	59,6	353
	54,3	341
	55,2	345
	MW SD	54,5 4,4
V 200 µg	58,5	223
	62,3	248
	53,2	239
	52,2	247
	55,0	267
	59,1	202
	49,1	255
	MW SD	55,7 4,6
VI 250 µg	60,0	280
	47,3	265
	64,4	255
	47,0	294
	55,2	246
	58,9	279
	62,3	290
	MW SD	56,4 7,0

Anhangstabelle 11: Gesamt-GSH, oxidiertes und reduziertes GSH und GSH:GSSG-Verhältnis in der Leber der Meerschweinchen

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM	tGSH [µmol/g]	GSH [µmol/g]	GSSG [µmol/g]	GSH:GSSG
I 0 µg	2,93	2,76	0,169	16,3
	4,82	4,47	0,345	12,9
	1,70	1,50	0,205	7,29
	12,9	11,3	1,58	7,15
	3,21	2,81	0,404	6,94
	1,51	1,31	0,195	6,75
	2,00	1,81	0,192	9,44
	MW SD	2,69 1,24	2,44 1,18	0,25 0,10
II 50 µg	4,57	3,99	0,581	6,87
	5,32	4,94	0,376	13,2
	2,90	2,43	0,475	5,11
	8,13	7,26	0,870	8,34
	5,93	5,17	0,764	6,76
	4,09	3,56	0,526	6,76
	5,95	5,32	0,622	8,56
	MW SD	5,27 1,66	4,67 1,54	0,60 0,17
III 100 µg	6,81	6,30	0,504	12,5
	1,88	1,51	0,370	4,09
	1,21	0,97	0,239	4,05
	4,32	3,73	0,592	6,31
	3,47	3,00	0,465	6,46
	3,44	2,91	0,532	5,47
	4,53	4,15	0,387	10,7
	MW SD	3,67 1,84	3,23 1,77	0,44 0,12
IV 150 µg	3,89	3,73	0,162	23,0
	1,55	1,37	0,185	7,36
	5,30	4,83	0,468	10,3
	5,44	5,07	0,372	13,6
	3,82	3,43	0,393	8,72
	5,08	4,53	0,551	8,21
	2,83	2,52	0,304	8,31
	MW SD	3,99 1,43	3,64 1,34	0,35 0,14
V 200 µg	5,80	5,33	0,47	11,3
	8,40	8,07	0,336	24,0
	4,94	4,46	0,477	9,34
	4,18	3,87	0,307	12,6
	5,52	5,03	0,495	10,2
	6,21	5,52	0,691	7,99
	5,56	5,05	0,517	9,75
	MW SD	5,80 1,32	5,33 1,33	0,47 0,13
VI 250 µg	8,83	8,38	0,451	18,6
	4,66	3,66	1,003	3,65
	2,80	2,45	0,353	6,93
	5,11	4,34	0,776	5,59
	4,74	4,17	0,567	7,35
	3,53	3,14	0,392	8,02
	2,97	2,68	0,293	9,14
	MW SD	4,66 2,05	4,12 2,01	0,55 0,26

Anhangstabelle 12: Vitamin E- und Vitamin C-Konzentrationen im Plasma der Meerschweinchen

Gruppe µg Se-Zulage/kg FM	α-Tocopherol [µmol/L]	γ-Tocopherol [µmol/L]	Gesamt-Tocopherol [µmol/L]	Vitamin C
A	4,15	0,304	4,23	-
Ausgangsgruppe	3,50	0,271	3,57	-
	5,81	0,293	5,88	-
	5,51	0,287	5,58	-
	7,02	0,265	7,09	-
	4,15	0,062	4,17	-
	4,18	0,192	4,23	-
MW	4,90	0,24	4,96	-
SD	1,24	0,09	1,25	-
I	7,35	0,380	7,44	21,3
0 µg	5,66	0,230	5,71	16,9
	5,17	0,132	5,21	14,2
	11,6	0,392	11,7	16,2
	9,03	0,281	9,10	17,5
	10,1	0,392	10,2	22,2
	4,59	0,146	4,63	12,2
MW	7,64	0,28	7,71	17,2
SD	2,68	0,11	2,71	3,08
II	3,72	0,088	3,74	19,8
50 µg	5,44	0,132	5,48	21,1
	4,44	0,232	4,50	20,2
	6,48	0,240	6,54	17,3
	4,36	0,210	4,41	8,74
	6,08	0,104	6,11	13,5
	3,19	0,104	3,22	15,2
MW	4,82	0,16	4,86	16,6
SD	1,22	0,07	1,23	4,42
III	10,7	0,353	10,8	26,3
100 µg	6,21	0,356	6,30	20,9
	10,1	0,686	10,3	15,4
	5,00	0,441	5,11	18,0
	3,91	0,221	3,97	11,3
	4,63	0,133	4,66	19,6
	18,06	1,919	18,5	19,0
MW	8,38	0,59	8,53	18,6
SD	5,04	0,61	5,18	4,66
IV	6,31	0,180	6,35	7,86
150 µg	4,78	0,143	4,82	15,6
	5,05	0,296	5,12	27,2
	7,54	0,648	7,71	16,1
	11,4	0,434	11,5	28,5
	7,14	0,310	7,21	17,5
	6,45	0,169	6,49	14,2
MW	6,96	0,31	7,03	18,1
SD	2,21	0,18	2,24	7,32
V	5,31	0,235	5,36	12,1
200 µg	5,91	0,260	5,98	13,2
	7,24	0,376	7,33	16,6
	12,5	0,499	12,6	9,94
	1,74	0,049	1,75	12,2
	4,68	0,204	4,73	18,9
	3,05	0,236	3,11	11,2
MW	5,77	0,27	5,83	13,5
SD	3,46	0,14	3,49	3,17
VI	8,55	0,501	8,68	11,9
250 µg	7,08	0,419	7,19	15,6
	2,14	0,094	2,16	5,05
	8,36	0,377	8,45	12,6
	8,90	0,449	9,01	12,0
	7,83	0,277	7,90	17,7
	7,42	0,353	7,51	10,7
MW	7,18	0,35	7,27	13,4
SD	2,31	0,13	2,34	2,66

Anhangstabelle 13: Thiobarbitursäurereaktive Substanzen [nmol/g FM] und peroxidative Katalaseaktivität [$\mu\text{mol H}_2\text{CO}/\text{Min}/\text{mg Protein}$] im Leberhomogenat der Meerschweinchen

Gruppe $\mu\text{g Se-Zulage}/\text{kg FM}$	TBA-RS [nmol/g FM]	peroxidative Katalaseaktivität [$\mu\text{mol H}_2\text{CO}/\text{Min}/\text{mg Protein}$]
A Ausgangsgruppe	0,64	-
	0,61	-
	0,50	-
	0,53	-
	0,47	-
	0,50	-
	0,57	-
	MW SD	0,51 0,05
I 0 μg	0,46	1,73
	0,49	0,99
	0,58	1,65
	0,52	2,18
	0,57	1,42
	0,60	1,85
	0,57	1,20
	MW SD	0,54 0,05
II 50 μg	0,45	1,66
	0,47	1,07
	0,55	2,14
	0,47	1,91
	0,61	1,47
	0,49	1,36
	0,49	1,56
	MW SD	0,50 0,06
III 100 μg	0,65	2,04
	0,50	1,40
	0,38	1,28
	0,51	1,52
	0,47	1,44
	0,47	1,20
	0,56	1,02
	MW SD	0,51 0,08
IV 150 μg	0,54	1,86
	0,57	1,80
	0,86	1,65
	0,61	2,31
	0,74	1,57
	0,76	1,81
	0,85	1,32
	MW SD	0,70 0,13
V 200 μg	0,53	2,04
	0,59	1,59
	0,51	1,54
	0,64	1,62
	0,64	1,28
	0,68	1,42
	0,75	1,69
	MW SD	0,62 0,08
VI 250 μg	0,66	1,41
	0,37	0,98
	0,56	1,74
	0,62	1,66
	0,53	1,76
	0,58	0,99
	0,61	0,96
	MW SD	0,56 0,10

Danksagung

So eine Arbeit entsteht nur durch die Mithilfe anderer, denen ich an dieser Stelle ganz herzlich danken möchte:

Herrn Prof. Dr. J. Pallauf für die Überlassung eines Themas zur Heimtierernährung.

Claudia Parys für die geduldige laborpraktische Einarbeitung, den fachlichen Austausch, das aufmerksame Korrekturlesen, die Schlemmerstunden im Büro, den Spaß bei der Arbeit ☺, für die schönen Tage im Strahlencentrum und noch für so vieles mehr!

Silke Hees für die Pflege der Meerschweinchen und die zahlreichen Aufschlüsse vor der Selenanalyse. Außerdem für die Antwort auf die Frage: „Woran erkennt man an einem Huhn, welche Farbe die Eier haben, die es legt?“, das Zeichnen einiger ChemDraw-Abbildungen und die vielen leckeren Kuchenspenden.

Frauke Frank für die Selenanalysen, die grünen Eier und die Organisation des leckeren Buffets zur Disputation.

Agnes Wescher für die netten Wortwechsel, den Realismus, die veterinärmedizinische Betreuung der Meerschweinchen und Tommy.

Dr. Astrid Bosse für den Englischsupport und die Hilfe mit dem komplizierten Bibliothekensystem der JLU.

Esther Jortzik für die Messung der PHGPx im Rahmen ihrer Bachelorarbeit.

Susanne Breitstadt für die geduldige Anleitung im Labor und die netten Worte.

Helmut Henzel für die Futtermittelanalysen, Martina Schneider für die Selen- und Mineralstoffanalysen, Anja Marx für die HPLC-Analysen und Marco Jäger und Steffen Brückel für die Pflege und Versorgung der Meerschweinchen.

Dr. Christian Kauer für ganz entscheidende Tipps vor dem Start und die veterinärmedizinische Betreuung der Meerschweinchen.

Dr. Manfred Hollenhorst und Markus Horst für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Prof. Dr. E. Weigand für den wissenschaftlichen Austausch und die Korrekturvorschläge.

Lebenslauf

Christine Jensen

Geburtsdatum 26.11.1974
Geburtsort Oldenburg
Familienstand ledig

Berufliche Erfahrungen

- seit 03.2003 Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie,
Justus-Liebig-Universität Giessen
Wissenschaftliche Mitarbeiterin
- Lehraufgaben in Tierernährung, Diätetik, Futtermittelkunde und Ernährungsphysiologie für Tiermedizin-, Ernährungs- und Agrarwissenschaftenstudenten
 - Forschung im Bereich Spurenelement- und Antioxidationsstoffwechsel von Heim- und Labortieren
 - Fütterungsberatung von Tierärzten und Tierhaltern
- 09.1996-03.2003 Alternate Computerversand GmbH, Vertrieb
- Betreuung und Beratung von B2B-, B2G- und Endkunden in Hard- und Softwarefragen
 - Hard-, Software-, Technik- und Verkaufsschulung neuer Mitarbeiter aller Abteilungen
 - Etablieren einer Firmenzeitschrift

Praktika

- 04.2002 Informations- und Dokumentationsstelle für Ernährung
Verfassen von Artikeln für die Informationssysteme nutriinfo.de und nutrichild.de
- 08.1999-09.1999 Bio-Data GmbH
Labor für Boden, Umwelt und Ernährung
Realisierung des Internetauftritts

Hochschulbildung

- 04.1995-10.2002 Haushalts- und Ernährungswissenschaften
Fachrichtung Ernährungswissenschaften,
Justus-Liebig-Universität Giessen
Diplomarbeit: „Ausgewählte nutritive Erbkrankheiten des
Hundes unter dem Aspekt tierisches Modell für analoge
Erkrankungen des Menschen“
Abschluss: Dipl.-Oecotrophologin
- 10.1993-03.1995 Veterinärmedizin, Universität Leipzig

Schulbildung

- 1990-1993 Lessing-Gymnasium Lampertheim
Mitarbeit in der Schülerversammlung, Kurssprecherin und
Chefredaktion der Schülerzeitung
Abschluss: Abitur
- 1984-1990 Liebfrauenschule Bensheim (Gymnasium)

EDV-Kenntnisse

MS Office, SPSS, Adobe Photoshop, ChemDraw u.v.m.
Programmierkenntnisse in HTML, Java Script und CSS

Sprachen

Englisch (gut)

Hobbys

Aquaristik, Fotografieren, Wandern, Ahnenforschung,
Webdesign

Giessen

26. Mai 2008