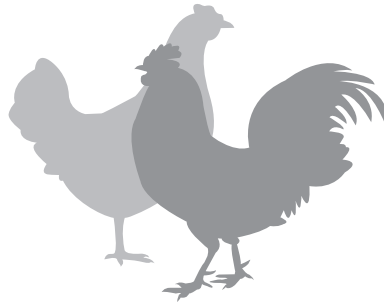


**TAMARA SCHOLZ**

---

Untersuchungen zum Einfluss der  
Methioninkonzentration des Futters auf  
den anti-oxidativen Status beim Broiler



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2022

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2022

© 2022 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY  
Tel: 0641-559888 Fax: 0641-559890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie  
der Justus- Liebig- Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Klaus Eder

# **Untersuchungen zum Einfluss der Methioninkonzentration des Futters auf den anti-oxidativen Status beim Broiler**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Tamara Scholz (geb. Ehbrecht)**

Tierärztin aus Lamspringe

Gießen 2022

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

1. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Eder  
2. Gutachter: Prof. Dr. Georgios Scheiner-Bobis  
Prüfer: Prof. Dr. Michael Lierz

Tag der Disputation: 05.04.2022

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Lamspringe, den 01.12.2021

Tamara Scholz

## Inhaltsverzeichnis

|                                                  |      |
|--------------------------------------------------|------|
| Inhaltsverzeichnis .....                         | V    |
| Abkürzungsverzeichnis .....                      | VIII |
| Abbildungsverzeichnis .....                      | XI   |
| Tabellenverzeichnis .....                        | XII  |
| 1. Einleitung und Zielsetzung .....              | 1    |
| 2. Literaturübersicht .....                      | 5    |
| 2.1 Oxidative Belastung .....                    | 5    |
| 2.2 Oxidative Schäden .....                      | 7    |
| 2.2.1 Oxidation von Fetten .....                 | 7    |
| 2.2.2 Oxidation von Cholesterol .....            | 10   |
| 2.2.3 Oxidation von Phytosterolen .....          | 14   |
| 2.2.4 Oxidation weiterer Grundbausteine .....    | 16   |
| 2.3 Antioxidantien .....                         | 17   |
| 2.3.1 Antioxidative Enzyme .....                 | 17   |
| 2.3.2 Nicht enzymatische Antioxidantien .....    | 18   |
| 2.4 Methionin .....                              | 26   |
| 2.5 Leinöl .....                                 | 29   |
| 3. Material und Methoden .....                   | 32   |
| 3.1 Fütterungsversuch .....                      | 32   |
| 3.1.1 Versuchstiere und Versuchsaufbau .....     | 32   |
| 3.1.2 Futterrationen .....                       | 33   |
| 3.2 Leistungsdaten .....                         | 38   |
| 3.2.1 Futter- und Wasseraufnahme .....           | 38   |
| 3.2.2 Massenerfassung im laufenden Versuch ..... | 38   |
| 3.3 Probengewinnung .....                        | 39   |
| 3.3.1 Schlachtung und Massenerfassung .....      | 39   |

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.2 Blut- und Organentnahme .....                                                                             | 39 |
| 3.4 Laboranalytik .....                                                                                         | 41 |
| 3.4.1 Bestimmung von Hämoglobin .....                                                                           | 41 |
| 3.4.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) .....                                                       | 42 |
| 3.4.3 Bestimmung von Vitamin C .....                                                                            | 43 |
| 3.4.4 Bestimmung von Glutathion .....                                                                           | 47 |
| 3.4.5 Bestimmung von Tocopherol.....                                                                            | 50 |
| 3.4.6 Bestimmung der TBARS .....                                                                                | 53 |
| 3.4.7 Bestimmung der Triglyceride.....                                                                          | 57 |
| 3.4.8 Bestimmung der Cholesterol-Oxidations-Produkte (COPs) und Phytosterol-<br>Oxidations-Produkte (POPs)..... | 59 |
| 3.5 Statistische Auswertung .....                                                                               | 61 |
| 4. Eigene Publikation .....                                                                                     | 62 |
| 5. Ergebnisse .....                                                                                             | 63 |
| 5.1 Leistungen und Schlachtkörper Charakteristika .....                                                         | 63 |
| 5.1.1 Versuch 1 .....                                                                                           | 63 |
| 5.1.2 Versuch 2 .....                                                                                           | 64 |
| 5.2 Antioxidativer Status.....                                                                                  | 65 |
| 5.2.1 Versuch 1 .....                                                                                           | 66 |
| 5.2.2 Versuch 2 .....                                                                                           | 67 |
| 6. Diskussion.....                                                                                              | 74 |
| 6.1 Einfluss der Methioninzulagen auf die Leistungen und die Schlachtkörper<br>Charakteristika .....            | 74 |
| 6.2 Einfluss der Methioninzulagen auf den antioxidativen Status.....                                            | 76 |
| 7. Schlussfolgerung.....                                                                                        | 84 |
| 8. Zusammenfassung.....                                                                                         | 85 |
| 9. Summary.....                                                                                                 | 88 |
| 10. Literaturverzeichnis.....                                                                                   | 90 |

|                     |     |
|---------------------|-----|
| 11. Danksagung..... | 102 |
|---------------------|-----|



## Abkürzungsverzeichnis

|                                     |                                                                                |                                                          |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| °C                                  | .....                                                                          | Grad Celsius                                             |
| µl                                  | .....                                                                          | Mikroliter                                               |
| µmol                                | .....                                                                          | Mikromol                                                 |
| a                                   | .....                                                                          | Steigung der Eichkurve                                   |
| ATP                                 | .....                                                                          | Adenosintriphosphat                                      |
| b                                   | .....                                                                          | Achsenabschnitt der Eichkurve                            |
| BHMT                                | .....                                                                          | Betain-Homocystein-Methyl-Transferase                    |
| BHT                                 | .....                                                                          | Butylhydroxytoluol, Buthylhydroxytoluol                  |
| CAT                                 | .....                                                                          | Katalase, Katalase                                       |
| CO <sub>2</sub>                     | .....                                                                          | Kohlenstoffdioxid                                        |
| CON                                 | .....                                                                          | Kontrollgruppe, Kontrollgruppe                           |
| COPs                                | .....                                                                          | Cholesterol-Oxidations-Produkte                          |
| Cu <sup>2+</sup> / Cu <sup>1+</sup> | .....                                                                          | Kupfer-Ionen                                             |
| DHA                                 | .....                                                                          | Dehydroascorbinsäure                                     |
| dl                                  | .....                                                                          | Deziliter                                                |
| DML                                 | .....                                                                          | DL-Methionin                                             |
| DNA                                 | .....                                                                          | Desoxyribonukleinsäure                                   |
| DTT                                 | .....                                                                          | Dithiothreitol                                           |
| EDTA                                | .....                                                                          | Ethyldiamintetraessigsäure, Ethylendiamintetraessigsäure |
| EOH/ Pyro                           | .....                                                                          | Ethanol-Pyrogallol-Gemisch                               |
| EOH/H <sub>2</sub> O                | .....                                                                          | Ethanol-Wasser-Gemisch                                   |
| Fe <sup>2+</sup> / Fe <sup>3+</sup> | .....                                                                          | Eisen-Ionen                                              |
| FS                                  | .....                                                                          | Fettsäure                                                |
| g                                   | .....                                                                          | Gramm                                                    |
| geom. MW                            | .....                                                                          | Geometrischer Mittelwert                                 |
| GfE                                 | Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, Gesellschaft für Ernährungsphysiologie |                                                          |
| Gpx                                 | .....                                                                          | Glutathionperoxidase                                     |
| GSH                                 | .....                                                                          | reduziertes Glutathion, Glutathion                       |
| GSSG                                | .....                                                                          | oxidiertes Glutathion                                    |
| H <sup>+</sup>                      | .....                                                                          | Wasserstoff-Ion                                          |
| H <sub>2</sub> O                    | .....                                                                          | Wasser                                                   |

## Abkürzungsverzeichnis

|                                        |                                               |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------|
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....    | <i>Wasserstoffperoxid</i>                     |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .....   | <i>Ortho-Phosphorsäure</i>                    |
| Hb .....                               | <i>Hämoglobin</i>                             |
| HCl .....                              | <i>Salzsäure</i>                              |
| HIP .....                              | <i>Hexan-Isoprpanol</i>                       |
| HPLC .....                             | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| Hz .....                               | <i>Hertz</i>                                  |
| kg .....                               | <i>Kilogramm</i>                              |
| KMB .....                              | <i>2-Keto-4-Methylthio-Buthansäure</i>        |
| LM .....                               | <i>Lebendmasse</i>                            |
| m <sup>2</sup> .....                   | <i>Quadratmeter</i>                           |
| MAT .....                              | <i>Methionin-Adenosyl-Transferase</i>         |
| MDA .....                              | <i>Malondialdehyd, Malondialdehyd</i>         |
| ME .....                               | <i>Metabolisierbare Energie</i>               |
| MeOH .....                             | <i>Methanol</i>                               |
| min .....                              | <i>Minute</i>                                 |
| MJ .....                               | <i>Megajoule</i>                              |
| ml .....                               | <i>Milliliter</i>                             |
| mM .....                               | <i>millimolar</i>                             |
| mmol .....                             | <i>Millimol</i>                               |
| MPA .....                              | <i>Metaphosphorsäure, Meta-Phosphorsäure</i>  |
| MW .....                               | <i>Mittelwert</i>                             |
| NADPH .....                            | <i>Nicotinamidadenindunucleotidphosphat</i>   |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ..... | <i>Natriumdihydrogenphosphat</i>              |
| Nal .....                              | <i>Natriumiodid</i>                           |
| NaOH .....                             | <i>Natriumhydroxid, Natriumhydroxid</i>       |
| nm .....                               | <i>Nanometer</i>                              |
| nmol .....                             | <i>Nanomol</i>                                |
| NRC .....                              | <i>National Research Council</i>              |
| O <sub>2</sub> .....                   | <i>molekularer Sauerstoff</i>                 |
| O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> .....     | <i>Superoxid-Anion</i>                        |
| OH <sup>•</sup> .....                  | <i>Hydroxyl-Radikal</i>                       |
| pmol .....                             | <i>Pikomol</i>                                |
| POPs .....                             | <i>Phytosterol-Oxidations-Produkte</i>        |

## Abkürzungsverzeichnis

|          |       |                                              |
|----------|-------|----------------------------------------------|
| PUFAs    | ..... | <i>Mehrfach ungesättigte Fettsäuren</i>      |
| RNA      | ..... | <i>Ribonukleinsäure</i>                      |
| ROS      | ..... | <i>Reaktive Sauerstoffspezies</i>            |
| SAH      | ..... | <i>S-Adenosylhomocystein</i>                 |
| SAM      | ..... | <i>S-Adenosylmethionin</i>                   |
| SD       | ..... | <i>Standardabweichung</i>                    |
| SF       | ..... | <i>Streufaktor</i>                           |
| SOD      | ..... | <i>Superoxiddismutase</i>                    |
| SSA      | ..... | <i>Sulfosalicylsäure</i>                     |
| TBA      | ..... | <i>Thiobarbitursäure</i>                     |
| TBARS    | ..... | <i>Thiobarbitursäure reaktive Substanzen</i> |
| TCA      | ..... | <i>Trichloressigsäure</i>                    |
| TCEP     | ..... | <i>Tris-(2-Carboxyethyl)-phosphin</i>        |
| TEP      | ..... | <i>1,1,3,3- Tetraethoxypropane</i>           |
| TGs      | ..... | <i>Triglyceride</i>                          |
| TM       | ..... | <i>Trockenmasse</i>                          |
| Tris-HCl | ..... | <i>Tris-Hydrochlorid</i>                     |
| U/min    | ..... | <i>Umdrehungen pro Minute</i>                |

## Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Entstehung von ROS, die antioxidativen Mechanismen und die Haber-Weiss- und Fenton-Reaktionen. .... | 7  |
| Abbildung 2: Entstehung vom MDA:TBA-Pigment nach Janero (1990).....                                              | 9  |
| Abbildung 3: Lipidperoxidation und der weitere Stoffwechselweg nach Ayala et al. (2014) .....                    | 10 |
| Abbildung 4: Strukturformel von Cholesterol .....                                                                | 11 |
| Abbildung 5: Entstehung der COPs nach Ishii et al. (2002).....                                                   | 12 |
| Abbildung 6: Tocopherole und Tocotrienole nach Astley (2003) .....                                               | 19 |
| Abbildung 7: Strukturformel von Glutathion .....                                                                 | 22 |
| Abbildung 8: Strukturformel der Ascorbinsäure .....                                                              | 23 |
| Abbildung 9: Strukturformel von Methionin.....                                                                   | 27 |
| Abbildung 10: Methionin-Stoffwechsel nach Finkelstein (2006).....                                                | 28 |

## Tabellenverzeichnis

|                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1: Zusammensetzung der Inhaltsstoffe der Basaldiät für Starter (Tag 1-10),<br>Grower (Tag 11-21) und Finisher (Tag 22-35), in %Frischmasse <sup>a</sup> .....        | 35 |
| Tabelle 2: Analysierte Nährstoffkonzentrationen in den Starter- (Tag 1-10), Grower-<br>(Tag 11-21) und Finisher- (Tag 22-35) Rationen in Versuch 1 (in % TM) <sup>a</sup> 36 |    |
| Tabelle 3: Analysierte Methioninkonzentration (in %) in den Diäten der 3 Gruppen<br>und in den unterschiedlichen Mastphasen in Versuch 1 .....                               | 36 |
| Tabelle 4: Analysierte Nährstoffkonzentrationen in den Starter- (Tag 1-10), Grower-<br>(Tag 11-21) und Finisher- (Tag 22-35) Rationen in Versuch 2 (in % TM) <sup>c</sup> 37 |    |
| Tabelle 5: Analysierte Methioninkonzentration (in %) in den Diäten der 3 Gruppen<br>und in den unterschiedlichen Mastphasen in Versuch 2 .....                               | 37 |
| Tabelle 6: Reagenzien, Lösungen und Geräte zur Hb-Analyse .....                                                                                                              | 41 |
| Tabelle 7: Reagenzien, Lösungen und Geräte zur Vitamin C Analyse .....                                                                                                       | 44 |
| Tabelle 8: Retentionzeiten, Kalibrationsbereiche und Wellenlängen für Vitamin C in<br>der HPLC .....                                                                         | 46 |
| Tabelle 9: Technische Daten und Einstellungen der HPLC zur Vitamin C-Analyse im<br>Plasma und in Geweben .....                                                               | 46 |
| Tabelle 10: Reagenzien, Lösungen und Geräte zur GSH-Analyse .....                                                                                                            | 47 |
| Tabelle 11: Technische Daten und Einstellungen der HPLC zur GSH/GSSG-<br>Bestimmung in Vollblut und Gewebe .....                                                             | 49 |
| Tabelle 12: Reagenzien, Lösungen und Geräte zur Tocopherol-Analyse .....                                                                                                     | 50 |
| Tabelle 13: Pipettierschema für die Tocopherol-Analyse in Plasma und in Geweben<br>.....                                                                                     | 51 |
| Tabelle 14: Retentionszeiten und Kalibrationsbereiche für Tocopherol in der HPLC 52                                                                                          |    |
| Tabelle 15: Technische Daten und Einstellungen der HPLC zur<br>Tocopherolbestimmung in Plasma und in Geweben .....                                                           | 52 |
| Tabelle 16: Reagenzien, Lösungen und Geräte zur TBARS-Analyse .....                                                                                                          | 54 |
| Tabelle 17: Pipettierschema zur Herstellung der Standards für die Kalibrationskurve<br>zur TBARS-Analyse .....                                                               | 54 |
| Tabelle 18: Pipettierschema zur TBARS-Analyse im Plasma und in der Leber .....                                                                                               | 55 |
| Tabelle 19: Pipettierschema zur TBARS-Analyse im rohen und erhitzten<br>Schenkelmuskel .....                                                                                 | 56 |
| Tabelle 20: Geräteeinstellung Tecan infinite M200 zur TBARS-Analyse .....                                                                                                    | 56 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 21: Reagenzien, Lösungen und Geräte zur TG-Analyse .....                                                                                                                                                                                                                                                               | 58 |
| Tabelle 22: Pipettierschema zur TG-Analyse im Plasma.....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 58 |
| Tabelle 23: Pipettierschema zur TG-Analyse im Gewebe .....                                                                                                                                                                                                                                                                     | 59 |
| Tabelle 24: Leistungsdaten und Schlachtkörper Charakteristika der Broiler des ersten Versuchs, die entweder mit einer Kontrolldiät (CON) oder mit einer Diät mit niedriger (DLM 1) oder hoher (DLM 2) Zulage an DL-Methionin gefüttert wurden <sup>1</sup> .....                                                               | 64 |
| Tabelle 25: Leistungsdaten und Schlachtkörper Charakteristika der Broiler des zweiten Versuchs, die entweder mit einer Kontrolldiät (CON) oder mit einer Diät mit niedriger (DLM 1) oder hoher (DLM 2) Zulage an DL-Methionin gefüttert wurden <sup>1</sup> .....                                                              | 65 |
| Tabelle 26: Konzentrationen von Antioxidantien und Oxidationsprodukten in Plasma, Vollblut, Leber und rohem Schenkelmuskel der Broiler des ersten Versuchs, die entweder mit einer Kontrolldiät (CON) oder mit einer Diät mit niedriger (DLM 1) oder hoher (DLM 2) Zulage an DL-Methionin gefüttert wurden <sup>1</sup> .....  | 67 |
| Tabelle 27: Konzentrationen von Antioxidantien und Oxidationsprodukten in Plasma, Vollblut, Leber und rohem Schenkelmuskel der Broiler des zweiten Versuchs, die entweder mit einer Kontrolldiät (CON) oder mit einer Diät mit niedriger (DLM 1) oder hoher (DLM 2) Zulage an DL-Methionin gefüttert wurden <sup>1</sup> ..... | 69 |
| Tabelle 28: Konzentrationen von Cholesterol und Cholesterol-Oxidations-Produkten (COPs) im erhitzten Schenkelmuskel der Broiler des zweiten Versuchs, die entweder mit einer Kontrolldiät (CON) oder mit einer Diät mit niedriger (DLM 1) oder hoher (DLM 2) Zulage an DL-Methionin gefüttert wurden <sup>1</sup> .....        | 70 |
| Tabelle 29: Konzentrationen von Phytosterolen und Phytosterol-Oxidations-Produkten (POPs) im erhitzten Schenkelmuskel der Broiler des zweiten Versuchs, die entweder mit einer Kontrolldiät (CON) oder mit einer Diät mit niedriger (DLM 1) oder hoher (DLM 2) Zulage an DL-Methionin gefüttert wurden <sup>1</sup> .....      | 72 |
| Tabelle 30: Signifikante Pearson-Korrelationskoeffizienten zwischen den Konzentrationen von Antioxidantien (GSH, Vitamin C) im rohen Schenkelmuskel und den Konzentrationen von COPs und POPs im erhitzten Schenkelmuskel <sup>1</sup> .....                                                                                   | 73 |

## 1. Einleitung und Zielsetzung

Als oxidative Belastung wird die Stoffwechselsituation eines Organismus bezeichnet, bei der eine hohe Konzentration an Oxidantien vorherrscht, die durch sauerstoffabhängige Reaktionen entstehen. Ihnen gegenüber stehen die Antioxidantien, die die oxidative Belastung abpuffern. Kommt es zu einer Imbalance in diesem System zu Gunsten der Oxidantien, kann dies oxidative Schäden verursachen, wie z. B. den Abbau von Proteinen, Nukleinsäuren sowie die Peroxidation von vor allem mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Brandsch et al. 2002). In der intensiven Broilermast folgt den Schädigungen meist eine Einbuße in Gesundheit und Leistung der Tiere. Im ersten Versuch der vorliegenden Studie wurde Sojaöl als Fettquelle in den Futterrationen verwendet, welches reich an vor allem zweifach ungesättigten Fettsäuren ist. Das Sojaöl wurde im zweiten Versuch durch Leinöl ersetzt. Das Leinöl ist reich an vor allem dreifach ungesättigten Fettsäuren, die aufgrund ihrer höheren Anzahl an Doppelbindungen leichter oxidieren.

Dennoch ist der Einsatz von Leinöl ernährungsphysiologisch und wirtschaftlich interessant, da das Fettsäureprofil von Fleisch und Fett direkt durch die Fettquelle der Nahrung beeinflusst werden kann (Shunthwal und Sheoran 2017). Leinöl ist reich an  $\alpha$ -Linolensäure, einer Omega-3-Fettsäure, welche sich positiv auf die menschliche Gesundheit auswirkt (Haug et al. 2007, Shunthwal und Sheoran 2017). Es sollte aber auch Ziel sein, die oxidative Belastung der Tiere möglichst gering zu halten. Hierbei spielt die Aminosäure Methionin eine große Rolle.

Methionin ist in den typischen Rationen der konventionellen Geflügelmast meist die erstlimitierende Aminosäure (Métayer et al. 2008, Bunchasak 2009) und bei unzureichender Bereitstellung werden verschiedene Stoffwechselprozesse beeinträchtigt (Brosnan und Brosnan 2006). Auch für die Proteinbiosynthese ist das Methionin unerlässlich (Brosnan und Brosnan 2006) und ein Mangel resultiert beim Broiler in einer verringerten Rate der Körpergewichtszunahme (Métayer et al. 2008). Daher ist Methionin wichtig für die Tiere, denn eine ausreichende Zufuhr und Verfügbarkeit resultiert in einer besseren Proteinbiosynthese und einer verringerten Fettsynthese (Bunchasak 2009). Weiter beschreiben Métayer et al. (2008) geringere Raten der Ganzkörperproteinsynthese bei methionin- und cystein-freier Fütterung

und deuten auf eine Translationsregulation des Methionins hin. Auch Brosnan et al. (2007) beschreiben, dass Methionin an der Translationsregulation beteiligt ist.

Weiter ist Methionin eine Vorstufe von Cystein, welches bei der Synthese des Antioxidans Glutathion eine wichtige Rolle spielt (Swennen et al. 2011). Zur Aufrechterhaltung der Glutathion-Homöostase ist die Verfügbarkeit von Methionin von entscheidender Bedeutung (Wu et al. 2004) und auch die Cysteinverfügbarkeit trägt zur Steuerung der Glutathionsynthese bei (Wu et al. 2004, Iwasaki et al. 2009). Diese beiden schwefelhaltigen Aminosäuren spielen eine große Rolle in der Abwehr des Organismus gegen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Métayer et al. 2008, Swennen et al. 2011) und den daraus resultierenden Schädigungen und Funktionsstörungen verschiedener Zellkomponenten (Birben et al. 2012).

Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Glutathion-Synthese bei steigender Methioninverfügbarkeit zunimmt und der Organismus einen besseren Schutzmechanismus gegen die oxidative Belastung und die daraus resultierenden Schäden aufweisen kann.

Bisherige Untersuchungen beim Broiler (7 bzw. 21 Tage alt) zeigten bei DL-Methionin-Supplementierung erhöhte GSH-Gehalte in der Darmmukosa (Shen et al. 2015) und Zeitz et al. (2018) haben nachgewiesen, dass die GSH-Gehalte in der Leber in Abhängigkeit der Menge des supplementierten Methionins zunehmen. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass bei Broilern, die mit Leinöl anstatt Sojaöl gefüttert wurden und bei denen die Menge des Antioxidans Tocopherol nicht erhöht wurde, oxidativer Stress induziert wurde (Eder et al. 2005a).

In der vorliegenden Studie wird die Wirkung des DL-Methionins (später bezeichnet als DLM) auf den anti-oxidativen Status der Broiler betrachtet. Bei den Methioninkonzentrationen des Futters wird von zwei Empfehlungen ausgegangen. Zum einen die offizielle Empfehlung des National Research Council (1994), der geringere Bedarfswerte annimmt. Zum anderen die Bedarfsempfehlung des Züchters ([www.cobb-vantress.com](http://www.cobb-vantress.com)), bei der höhere Bedarfswerte aus der Praxis angenommen werden.

Um die Auswirkungen der Methioninkonzentration des Futters auf den antioxidativen Status der Tiere zu untersuchen, werden die Tiere in drei Fütterungsgruppen eingeteilt. Die Methioninkonzentration im Futter der Kontrollgruppe entspricht der



Empfehlung des NRC (1994) mit einer bedarfsdeckenden Methioninversorgung. Im Vergleich dazu liegt die Methioninversorgung der Gruppe DLM 1 ca. 15% höher und damit im Bereich der Züchterempfehlung. Zusätzlich soll untersucht werden, ob sich mit einer Methioninversorgung von ca. 15% über die Züchterempfehlung hinaus (Gruppe DLM 2) ein eventuell positiver Effekt auf den antioxidativen Status der Tiere noch steigern lässt.

Außerdem ist die Studie in zwei Versuche unterteilt. Im ersten Versuch liegen praxisnahe Bedingungen ohne zusätzliche oxidative Belastung vor. In der Futterration wird Sojaöl als Fettquelle verwendet. Im zweiten Versuch wird das Sojaöl durch Leinöl ersetzt, welches reich an  $\alpha$ -Linolensäure ist, die aufgrund ihrer höheren Anzahl an Doppelbindungen leichter oxidiert. Außerdem wird auf eine zusätzliche Vitamin E-Zulage in den Futterrationen verzichtet. Durch diese beiden Veränderungen in den Futterrationen soll eine erhöhte oxidative Belastung der Tiere ausgelöst werden.

Um das antioxidative System bzw. die oxidative Belastung der Tiere zu beurteilen, werden die Konzentrationen der Antioxidantien Vitamin C, Vitamin E und Glutathion, sowie die Konzentration des Lipidperoxidationsproduktes Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) in Plasma bzw. Blut und unterschiedlichen Geweben gemessen. Im erhitzten Schenkelmuskel des zweiten Versuchs werden zusätzlich die Konzentrationen der Oxidationsprodukte Cholesterol-Oxidations-Produkte (COPs) und Phytosterol-Oxidations-Produkte (POPs) gemessen.

Die oxidative Belastung stellt ein generelles Problem in der Tierhaltung dar und es sollte versucht werden, dieser entgegen zu wirken. Da die oxidative Belastung durch eine Imbalance zwischen Oxidantien und Antioxidantien entsteht, kann sie gesenkt werden, indem man das antioxidative System durch z.B. die Fütterung beeinflusst. Man kann annehmen, dass die Konzentrationen der Antioxidantien durch eine höhere Methioninzulage des Futters ansteigen, da GSH in größeren Mengen produziert werden kann und so auch der Verbrauch der anderen Antioxidantien zur Bewältigung der oxidativen Belastung sinkt. Zum anderen führt eine oxidative Belastung zur Oxidation bestimmter Lipide. Ein sehr häufig verwendeter aber auch relativ unspezifischer Parameter der Lipidperoxidation sind die TBARS (Ghani et al. 2017). Im Gegensatz dazu stellen die Oxidationsprodukte von Cholesterol und Phytosterolen deutlich spezifischere Parameter für die Lipidperoxidation dar

(Hovenkamp et al. 2008). Die Wirkung von Methionin auf COPs und POPs wurde bislang noch nicht untersucht. Da diese beiden Parameter vorwiegend bei wärmebehandelten Lebensmitteln gebildet werden (Eder et al. 2005b), werden ihre Konzentrationen im erhitzten Schenkelmuskel gemessen.

In den Versuchen soll die Hypothese untersucht werden, dass eine Ergänzung des Futters mit Methionin die Konzentrationen der Antioxidantien Vitamin C, Vitamin E und Glutathion steigert und die Bildung der Lipidoxidationsprodukte TBARS, COPs und POPs senkt.

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1 Oxidative Belastung**

Durch die Verschiebung des Gleichgewichts von Oxidantien und Antioxidantien entsteht eine oxidative Belastung. Die Verschiebung zugunsten der Oxidantien bezeichnet man auch als oxidativen Stress (Birben et al. 2012). In der Anfangszeit, nach Entdeckung der Oxidantien, ab den 1950er Jahren, ging man erst nur von einer schädigenden Wirkung aus, bevor man später auch die Beteiligung am Schutz des Organismus feststellte (Lushchak 2015). In niedrigen Konzentrationen dienen sie in physiologischen Zellprozessen, aber in hoher Konzentration wirken sie nachteilig und können Zellkomponenten schädigen (Birben et al. 2012). Oxidantien werden in jedem aeroben Metabolismus produziert und unter pathophysiologischen Prozessen steigt ihre Rate (Sies 1997). Wird die oxidative Belastung chronisch und hält über einen längeren Zeitraum an, kann er an vielen Krankheitsgeschehen, wie z.B. Krebs, Atherosklerose, Diabetes (Birben et al. 2012) und Alzheimer (Grune und Berger 2007) beteiligt sein. Zur Kontrolle der Oxidantien haben aerobe Organismen integrierte Antioxidationssysteme, die enzymatisch oder nicht-enzymatisch wirken (Sies 1997).

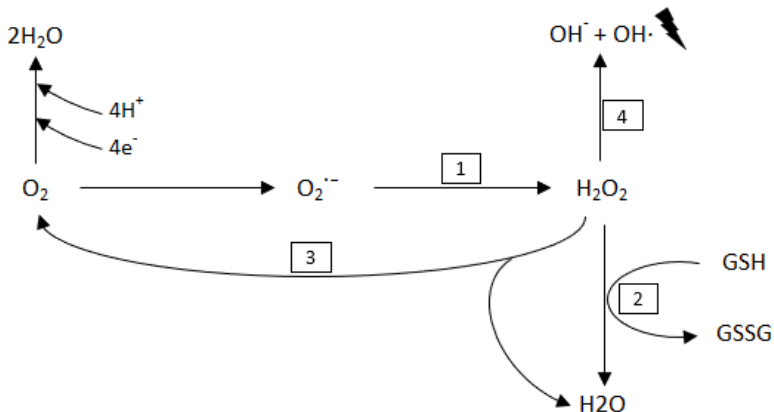
Das Gleichgewicht in dem System kann durch endogene oder exogene Faktoren gestört werden, wodurch es zur Steigerung der Produktion von Oxidantien kommt. Zu den endogenen Ursachen zählt primär die physiologische Entstehung von Superoxid-Anionen in der Atmungskette in den Mitochondrien. Die exogenen Quellen sind pathologische Entzündungsprozesse, die z.B. durch Ozonbelastung, Toxine oder Strahlung hervorgerufen werden (Birben et al. 2012, Mohrmann 2018). Neben der Erhöhung der Oxidantien kann aber auch eine Verringerung der Antioxidantien das System stören. Die nicht-enzymatischen Antioxidantien können durch vermehrten Verbrauch aufgebraucht werden oder die Enzymatischen inaktiviert werden (Lushchak 2015).

Zu den Oxidantien zählen u.a. die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Lushchak 2015). Diese sind hoch reaktive, schädliche Formen von Sauerstoffmolekülen, die die Zellstrukturen von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren, Lipiden und Proteinen verändern oder ihre Funktion beeinträchtigen können. Sie können in zwei Gruppen eingeteilt

werden: radikale und nicht radikale Moleküle, die ein oder mehr unpaare Elektronen besitzen. Sie verleihen dem Molekül Reaktivität und werden als freie Radikale bezeichnet. Zwei freie Radikale können sich auch ihre unpaaren Elektronen teilen, wodurch eine nicht radikale Form entsteht (Halliwell und Chirico 1993, Birben et al. 2012). Die drei wichtigsten ROS sind die radikalen Superoxid-Anionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) und die Hydroxyl-Radikale ( $OH^{\cdot}$ ), sowie das nicht radikale Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) (Birben et al. 2012). Da von diesen oxidierten Sauerstoffformen nur das  $O_2^{\cdot-}$  und das  $OH^{\cdot}$  freie Radikale sind, aber alle drei eine höhere Aktivität besitzen als molekularer Sauerstoff, werden sie zusammenfassend als ROS bezeichnet, auch wenn viele Autoren die beiden Begriffe, ROS und freie Radikale, synonym benutzen (Lushchak 2015).

Aus molekularem Sauerstoff entsteht normalerweise durch Zugabe von vier Elektronen und vier Protonen Wasser. Neben dieser Reaktion kommt es aber auch zu einer weiteren 1-Elektronen-Übertragung (Lushchak 2015). Durch Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff entsteht mit Hilfe der NADPH-Oxidase, der Xanthine-Oxidase oder durch das mitochondriale Elektronentransportsystem das  $O_2^{\cdot-}$ . Die Elektronen werden im Mitochondrium transportiert, um Sauerstoff zu Wasser zu reduzieren aber ca. 1 bis 3% der Elektronen produzieren  $O_2^{\cdot-}$ . Die NADPH-Oxidase findet man in Leukozyten, Monozyten und Makrophagen (Birben et al. 2012). In den Abwehrzellen erzeugt der Organismus so, in kontrollierter Weise, ROS zum Schutz gegen Mikroorganismen und Parasiten (oxidativer Burst) (Birben et al. 2012, Lushchak 2015).

Aus dem  $O_2^{\cdot-}$  entsteht durch die Superoxiddismutase (SOD)  $H_2O_2$ . Das  $H_2O_2$  kann durch die Enzyme Glutathionperoxidase (Gpx) unter Glutathion-Verbrauch zu Wasser ( $H_2O$ ) abgebaut werden oder durch die Katalase (CAT) in Wasser und Sauerstoff umgebaut werden. Des Weiteren kann es in einer Abfolge von Reaktionen, der sogenannten Haber-Weiss-Reaktion und der Fenton-Reaktion unter Anwesenheit von  $O_2^{\cdot-}$  und den Übergangsmetallen (Me)  $Fe^{2+}$  und  $Cu^{2+}$  zum  $OH^{\cdot}$  umgewandelt werden. Das  $OH^{\cdot}$  gilt als reaktivste Form der ROS (Birben et al. 2012) (Abb. 1).



**Abbildung 1: Entstehung von ROS, die antioxidativen Mechanismen und die Haber-Weiss- und Fenton-Reaktionen.**

1: Superoxiddismutase (SOD); 2: Glutathionperoxidase (Gpx); 3: Katalase (CAT); 4: Haber-Weiss- und Fenton-Reaktion

Haber-Weiss-Reaktion:  $Me^{3+} + O_2^{\bullet -} \rightarrow Me^{2+} + O_2$

Fenton-Reaktion:  $Me^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Me^{3+} + OH^- + OH^\bullet$

Schema in Anlehnung an Birben et al. (2012) und Lushchak (2015)

## 2.2 Oxidative Schäden

### 2.2.1 Oxidation von Fetten

Die Zellen jedes Organismus sind ständig den ROS ausgesetzt (Lykkesfeldt 2001) und es kommt zu einer nicht-enzymatischen Oxidation, der sogenannten Lipidperoxidation (Sies 1986, Ayala et al. 2014). Bevorzugt findet dieser Prozess bei mehrfach ungesättigten Fettsäuren statt, wogegen einfach ungesättigte und gesättigte Fettsäuren weniger anfällig sind. Außerdem ist die Lipidperoxidation abhängig von der Fettsäurezusammensetzung, der Sauerstoffkonzentration und dem Gehalt an Antioxidantien. Sie ist zudem eine der meist untersuchtesten, biologisch relevanten Kettenreaktionen von reaktiven Sauerstoffspezies (Halliwell und Chirico 1993).

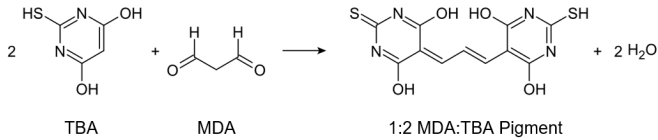
Die Lipidperoxidation kann in drei Schritte eingeteilt werden. Im ersten Schritt, der Initiation, wird durch die ROS den Fettsäuren (LH) ein Wasserstoffatom entzogen und es entsteht ein Lipidradikal ( $L^{\cdot}$ ), welches daraufhin mit Sauerstoff zum Lipidperoxy-Radikal ( $LOO^{\cdot}$ ) reagiert. Im zweiten Schritt, der Vermehrung, dient das  $LOO^{\cdot}$  als Radikal und kann weiteren Fettsäuren ein Wasserstoffatom entziehen. Neben einem Lipid-Hydroperoxid ( $LOOH$ ) wird auch ein neues Lipidradikal ( $L^{\cdot}$ ) gebildet und es entsteht eine Kettenreaktion.

Die Lipid-Hydroperoxide können zyklisieren, indem sie sich an den Doppelbindungen untereinander verbinden und so neue bitykliche Endoperoxide bilden, welche dann zu Malondialdehyd (MDA) gespalten werden. Die einzelnen Schritte sind in Abbildung 3 dargestellt. Der dritte Schritt beinhaltet die Beendigung der Reaktion. Antioxidantien, wie z.B. Vitamin E geben ein Wasserstoffatom an das Lipidperoxy-Radikal ( $LOO^{\cdot}$ ) ab und es entsteht ein Vitamin E-Radikal, welches dann mit einem weiteren  $LOO^{\cdot}$  zu einem nicht radikalischen Produkt reagiert (Ayala et al. 2014).

Die eigentlich primären Produkte der Lipidperoxidation sind die Lipid-Hydroperoxide. Das MDA und weitere Aldehyde gelten als Nebenprodukte, wovon das MDA schon in den 1980er Jahren eingehend untersucht und als das meist mutagene Produkt der Lipidperoxidation angesehen wurde (Ayala et al. 2014). Das MDA ist außerdem einer der bekanntesten Marker für oxidativen Stress. Auf Grund der leichten Reaktion von MDA mit Thiobarbitursäure (TBA) lässt es sich gut nachweisen.

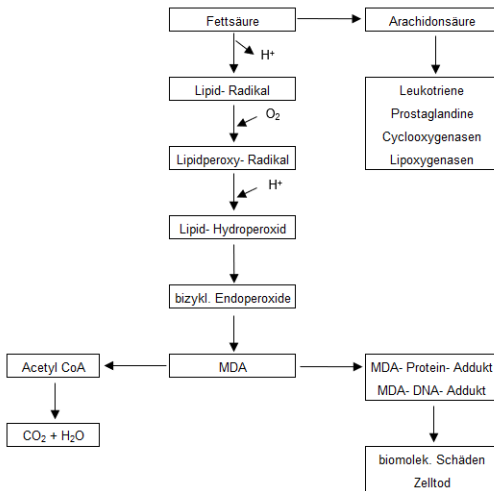
Da das MDA zwar am besten, aber auch andere Produkte der Lipidperoxidation mit TBA reagieren können, spricht man von Thiobarbitursäure-reaktiven-Substanzen (TBARS), die sich durch Bildung eines roten, fluoreszierenden Farbstoff gut nachweisen lassen (Halliwell und Chirico 1993, Wasowicz et al. 1993, Ayala et al. 2014).

Dafür reagieren zwei Moleküle TBA mit einem Molekül MDA unter sauren Bedingungen und hohen Temperaturen zu einem Addukt und können dann spektrofotometrisch oder durch eine Fluoreszenzmessung nachgewiesen werden (Esterbauer und Cheeseman 1990, Janero 1990, Giera et al. 2012) (Abb. 2).



**Abbildung 2: Entstehung vom MDA:TBA-Pigment nach Janero (1990)**

Das MDA kann einerseits enzymatisch abgebaut und metabolisiert werden. Andererseits kann es, wie die ROS auch, zu Schäden in Proteinen und DNA führen. Dazu reagiert das MDA mit Proteinen oder DNA zu MDA-Protein-Addukten bzw. MDA-DNA-Addukten und kann so zu biomolekulären Schäden und zum Zelltod führen (Ayala et al. 2014). Über diesen und weitere Wege ist die Lipidperoxidation an vielen Krankheiten im Organismus beteiligt. Sie wirkt u.a. bei Atherosklerose, Krebs, Diabetes und Alzheimer mit (Wong et al. 1987, Yin et al. 2011). Daher ist der Körper daran interessiert, die Bildung von MDA so gering wie möglich zu halten. Als Antwort auf die MDA-Bildung reagiert der Organismus bei physiologischen oder niedrigen Peroxidationsraten mit Steigerung des Antioxidationssystems um die Zellen zu schützen. Bei höheren Peroxidationsraten, wenn die oxidative Schädigung das Antioxidationssystem übersteigt, fördert der Organismus den programmierten Zelltod durch Apoptose und Nekrose (Ayala et al. 2014).



**Abbildung 3: Lipidperoxidation und der weitere Stoffwechselweg nach Ayala et al. (2014)**

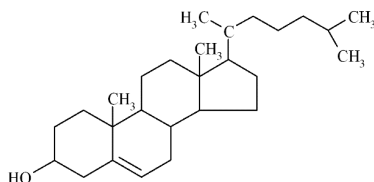
### 2.2.2 Oxidation von Cholesterol

Cholesterol ist ein polyzyklischer Alkohol, der zur Gruppe der Lipide gezählt werden kann. Bauer et al. (2014) bezeichnen es als natürliches, steroidales Fett, welches mehrere Funktionen übernimmt. Im Broiler wird das Cholesterol endogen im Organismus gebildet. Beim Abbau von Fetten entsteht während der  $\beta$ -Oxidation Acetyl-CoA, aus dem sich in vier Schritten dann das Cholesterol (Abb. 4) bildet (Bauer et al. 2014).

Neben Phospholipiden ist Cholesterol primärer Bestandteil der zellulären Membranen (Kulig et al. 2015) und ist essentiell für ihre Struktur und Funktion. Da das Cholesterol Wechselwirkungen mit Proteinen, die in die biologischen Membranen eingebettet sind, eingeht, ist es für die Regulierung einer Vielzahl biologischer Prozesse verantwortlich. Außerdem reguliert es die biophysikalischen Eigenschaften der Membranen. Die flache, steife Steroideinheit im Cholesterolmolekül sorgt dafür, dass die Konformationsordnung der Phospholipide stark gefördert wird, was sich in einer besseren Lipidpackung und verringerten Membranelastizität auswirkt (Kulig et al. 2016). Daneben ist das Cholesterol Substrat für die Synthese von Gallensäuren und



Steroidhormonen (Bauer et al. 2014, Kulig et al. 2016) und wird für die Bildung von Vitamin D3 benötigt.



**Abbildung 4: Strukturformel von Cholesterol**

Cholesterol ist ungesättigt zwischen C5 und C6 im B-Ring und daher anfällig für eine Oxidation (Raith et al. 2005, Georgiou et al. 2014, Kulig et al. 2016), wodurch sich die sogenannten Cholesterol-Oxidations-Produkte (COPs) bilden. Diese COPs werden auch Oxysterole genannt (Georgiou et al. 2014, Kulig et al. 2016). Kulig et al. (2016) verweisen jedoch darauf, dass nicht nur die Oxidationsprodukte vom Cholesterol als Oxysterole bezeichnet werden, sondern auch ihre Analoga aus der Pflanzenwelt, die Oxidationsprodukte der Phytosterole (Phytosterol-Oxidations-Produkte (POPs)). Da COPs und POPs in dieser Arbeit beschrieben werden, werden auch diese Begriffe verwendet und nicht der Oberbegriff Oxysterole.

Die Oxidation von Cholesterol ist ein physiologischer Prozess, der durch die Sauerstoffkonzentration, Bestrahlung, freie Radikale und Metallionen beeinflusst wird (Bauer et al. 2014). Die Entstehung der COPs kann, wie die Oxidation anderer Fette auch, enzymatisch oder nicht-enzymatisch ablaufen. Die nicht-enzymatische Oxidation findet dabei in der Ringstruktur statt, die enzymatische dagegen in der Seitenkette des Cholesterols (Eder et al. 2005a, Kulig et al. 2016). Die wichtigsten, nicht-enzymatischen COPs sind das 7 $\beta$ -Hydroxycholesterol (7 $\beta$ -OH-Cholesterol) und das 7-Keto-Cholesterol. Ein weiteres, wichtiges COP ist das 7 $\alpha$ -Hydroxycholesterol (7 $\alpha$ -OH-Cholesterol) (Eder et al. 2005a), von dem nur ein geringer Teil nicht enzymatisch gebildet wird. Der Hauptanteil wird enzymatisch durch eine Cholesterolhydroxylase, die Teil der Cytochrom P450-Familie ist, gebildet (Lee et al. 2008). Dadurch ist das 7 $\alpha$ -OH-Cholesterol nur bedingt zur Beurteilung der oxidativen Belastung anzusehen. Ishii et al. (2002) schreiben, dass schon die Vorstufen der Hydroxycholesterole, das 7 $\alpha$ -Hydroperoxycholesterol und das 7 $\beta$ -

Hydroperoxycholesterol als sensitive, pathogene Marker von oxidativem Stress angesehen werden können und Kulig et al. (2016) bezeichnen diese als die wichtigsten, nicht-enzymatischen COPs. Durch ihre weitere Umwandlung in 7 $\alpha$ -OH-, 7 $\beta$ -OH- und 7-Keto-Cholesterol sind diese Gewebespiegel aber deutlich höher und sie stellen die am häufigsten vorkommenden COPs dar. Ringseis und Eder (2002) sehen das 7 $\beta$ -OH-Cholesterol als Marker für die Bildung von COPs, da es die endogene, nicht-enzymatische Bildung gut widerspiegelt.

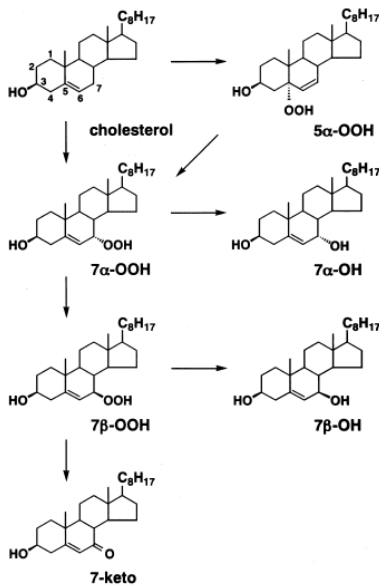


Abbildung 5: Entstehung der COPs nach Ishii et al. (2002)

Die nicht enzymatische Entstehung der COPs durch ROS läuft ähnlich zu der Lipidperoxidation der anderen Lipide ab. Die Interaktion von Cholesterol mit ROS führt erst zu einer Wasserstoffabspaltung an der C-7-Position und es entsteht ein Radikal (C $\cdot$ ), welches dann wieder mit Sauerstoff zu einem Cholesterolperoxyradikal (COO $\cdot$ ) reagieren kann. Das COO $\cdot$  übernimmt von einem weiteren Lipidmolekül ein Wasserstoffmolekül und wird zu den relativ stabilen Cholesterolhydroperoxiden (7 $\alpha$ - oder 7 $\beta$ -OOH), welche dann zu den COPs umgewandelt werden (Abb. 5).

Die endogene Bildung von COPs kann auch durch die Peroxidation von Fetten, bzw. durch die Peroxidationsprodukte gefördert werden (Ringseis und Eder 2002). Eder et al. (2005a) fanden eine Korrelation zwischen der Konzentration der COPs und der Oxidationsprodukte der PUFAs (den TBARS).

Cholesterol ist bei der Entstehung vieler Krankheiten beteiligt und kann das Risiko von z.B. Atherosklerose, Myokardinfarkt und Schlaganfall steigern (Bauer et al. 2014) und Kulig et al. (2016) beschreiben eine sehr hohe Konzentration von 7 $\beta$ -OH- und 7-Keto-Cholesterol in atherosklerotischen Plaques. Die toxikologische Relevanz der COPs zeigt sich in ihren potentiellen atherogenen, zytotoxischen, mutagenen und karzinogenen Effekten (Raith et al. 2005, Khan et al. 2015). Van Reyk et al. (2006) schreiben aber von einem sehr niedrigen Gehalt der COPs im Gegensatz zu anderen Sterolen.

Georgiou et al. (2014) nehmen an, dass COPs die Struktur und Funktion von zellulären Membranen beeinflussen. Der Unterschied der COPs zum Cholesterol ist, dass sie ein Sauerstoffmolekül mehr enthalten (Kulig et al. 2016). Die Ringoxide nehmen eine geneigte Orientierung an und stören dadurch die Doppelschichtstruktur, was Auswirkungen auf die Signalübertragung, andere biochemische Prozesse und biophysikalische Eigenschaften der Membran haben kann (Kulig et al. 2015).

Doch COPs haben, wie alle anderen Oxidationsprodukte auch, nicht nur negative Eigenschaften. Obwohl sie im Organismus nur in sehr geringen Mengen vorkommen, haben sie wichtige biologische Funktionen. Sie dienen als Modulatoren der Zellpermeabilität, sind Rezeptoren in der zellulären Signalisierung (Kulig et al. 2016) und regulieren die Cholesterinhomöostase (Georgiou et al. 2014, Kulig et al. 2016).

### 2.2.3 Oxidation von Phytosterolen

Pflanzensterine und Pflanzenstanole werden auch als Phytosterole bezeichnet. Diese sind Komponenten der Pflanzenmembranen, analog zum Cholesterol in den tierischen Zellen. Sie haben eine Methyl- oder Ethylgruppe am C24 und eine Doppelbindung zwischen C5 und C6 im B-Ring. Durch die ungesättigte Ringstruktur sind sie oxidationsanfällig (García-Llatas und Rodríguez-Estrada 2011). Sie sind essentielle Membransubstanzen in allen eukaryotischen Zellen und an der Kontrolle der Membranfluidität beteiligt (Johnsson und Dutta 2003). Sie müssen mit der Nahrung aufgenommen werden, während Cholesterol vom Körper synthetisiert werden kann (Otaegui-Arrazola et al. 2010).

In den letzten Jahrzehnten ist das Interesse an den Phytosterolen gestiegen, da sie als cholesterinsenkend gelten. Auch eine antikarzinogene und anti-atherosklerotische Wirkung wird diskutiert (García-Llatas und Rodríguez-Estrada 2011). Auch Otaegui-Arrazola et al. (2010) beschreiben eine Senkung des Serumcholesterinspiegels und des Risikos für Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Daher sind die Phytosterole in der Lebensmittelindustrie interessant (García-Llatas und Rodríguez-Estrada 2011).

Es gibt viele unterschiedliche Phytosterole, im Gegensatz zu einem Cholesterol. Obwohl die Zusammensetzung der Phytosterole auch von der Ernährung abhängig ist, sind die am häufigsten verfügbaren Phytosterole Sitosterol (65%), Campesterol (32%) und Stigmasterol (3%). Daher werden die meisten POPs auch von diesen abgeleitet (Vanmierlo et al. 2013). Auch Ryan et al. (2009) und García-Llatas und Rodríguez-Estrada (2011) beschreiben die Oxidationsprodukte von Sitosterol, Campesterol und Stigmasterol als die hauptsächlichen POPs und laut Johnsson et al. (2003) und Otaegui-Arrazola et al. (2010) sind Campesterol und Sitosterol am relevantesten, wohingegen Stigmasterol nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Es gibt noch nicht viele Untersuchungen zur Oxidation von Phytosterolen im Gegensatz zu der von Cholesterol. Man kann aber davon ausgehen, dass sie in einer ähnlichen Weise abläuft (Ryan et al. 2009). Nach Wocheslander und Engel (2018) basiert das meiste Wissen über die Oxidation von Phytosterolen auf den Studien des strukturverwandten Cholesterols und Johnsson und Dutta (2003) beschreiben, dass aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit dem Cholesterol,

Phytosterole genauso anfällig für eine Oxidation sind und Produkte entstehen können, die den COPs ähnlich sind.

Laut Ryan et al. (2009) legen Informationen zu den verwandten COPs nahe, dass die Oxidationsprodukte der Phytosterole durch nicht-enzymatische Autoxidation oder durch enzymatische Prozesse entstehen können. Die enzymatische Oxidation läuft in der Seitenkette ab. Hier können Hydroxylasen und andere Enzyme beteiligt sein (Otaegui-Arrazola et al. 2010). Ihre Wirkung soll weniger ausgeprägt sein (Johnsson et al. 2003, Wocheslander und Engel 2018), Studien auf diesem Gebiet sind aber begrenzt.

Die Hauptwege der Phytosteroloxidation laufen über nicht-enzymatische Autoxidation (Wocheslander und Engel 2018), wobei diese Steroloxidation durch Radikale abläuft (Ryan et al. 2009). Diese Autoxidation kann durch Wärme, Licht, Luft und Übergangsmetalle katalysiert werden (Johnsson und Dutta 2003, García-Llatas und Rodríguez-Estrada 2011, Wocheslander und Engel 2018).

Die Entstehung der Oxidationsprodukte ist gleich zu denen des Cholesterols. Erst wird ein Wasserstoffatom am C7 des B-Rings entzogen, es folgt die Reaktion mit Sauerstoff und anschließend wieder mit einem Wasserstoffmolekül (Ryan et al. 2009, García-Llatas und Rodríguez-Estrada 2011, Wocheslander und Engel 2018). Die entstandenen polaren, sekundären Oxidationsprodukte werden dann als POPs bezeichnet (Wocheslander und Engel 2018).

Während die Wirkungen der COPs gut dokumentiert sind, ist die biologische Wirkung der POPs noch nicht vollständig geklärt. Es gibt nur wenige Informationen, genauso wie zu den Daten an POPs-Gehalten in Lebensmitteln (García-Llatas und Rodríguez-Estrada 2011). *In vitro* konnten toxische Wirkungen von POPs gezeigt werden, die ähnlich zu den Wirkungen der COPs waren, nur weniger schwer. Eine weitere Studie konnte herausfinden, dass das Oxidationsprodukt von  $\beta$ -Sitosterol gleiche biologische Effekte zeigte wie 7 $\beta$ -Hydroxycholesterol, aber eine höhere Konzentration benötigt wird (García-Llatas und Rodríguez-Estrada 2011).

### 2.2.4 Oxidation weiterer Grundbausteine

Die oxidative Schädigung von DNA kann durch ROS, andere Oxidationsmittel oder auch durch Photooxidation (UV-Strahlung) und ionisierte Strahlung ausgelöst werden. Es kann zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen, sowie Chromosomenbrüchen kommen (Sies 1986). Des Weiteren kann der Schaden auch an den Purin- und Pyrimidin-Basen entstehen, wobei Modifikationen wie Thymin-Dimere entstehen können oder sich die Basen abbauen (Birben et al. 2012). Adenin und Cytosin stellen sich stabiler gegenüber der Oxidation dar. Diese Schäden entstehen nicht nur durch Oxidation, sondern können auch weitere Ursachen haben. Viele dieser DNA-Modifikationen oder Schäden sind unter anderem an der Krebsentstehung, der Alterung der Zellen und an Autoimmunerkrankungen beteiligt (Birben et al. 2012). Die Reparatur dieser Schäden erfolgt meist enzymatisch durch Glykosylasen, Exonukleasen und Endonukleasen gefolgt von Polymerasen (Sies 1986).

Bei den Kohlenhydraten neigen auch die Desoxyribosen der Nukleotide zu einem oxidativen Abbau, was zusätzlich zu Schäden in der DNA führen kann. Des Weiteren sind Polysaccharide, wie z.B. Hyaluronsäure, von der Oxidation betroffen und können so zerstört werden (Sies 1986). Da die Hyaluronsäure eine wichtige Rolle in der Beweglichkeit der Gelenke spielt, kann eine Verringerung zu Folgeschäden wie Arthrosen führen. Superoxiddismutase (SOD) kann die Hyaluronsäure gegen die schädigende Polymerisation schützen (Sies 1986).

Proteine sind die empfindlichste Komponente des Organismus gegenüber oxidativer Belastung (Davies 2016). Nicht nur die Proteine können angegriffen werden, sondern auch Peptide und Aminosäuren werden durch ROS geschädigt. Auch wenn die Oxidation der Seitenketten von Proteinen als wichtiges Signal in biologischen Systemen gesehen werden kann (Sies 1986), führt sie zu veränderten Proteinaktivitäten und Funktionen. ROS können zu einer Fragmentierung der Peptidkette führen, die elektrische Ladung von Proteinen ändern, zur Quervernetzung zwischen Proteinen untereinander führen oder durch Oxidation von speziellen Aminosäuren den Abbau durch Proteolyse in Verbindung mit Proteasen fördern. Cystein und Methionin sind besonders anfällig. Die Oxidation der Sulfhydrylgruppen oder der Methioninreste führt zu Konformationsänderungen und Proteinentfaltung (Birben et al. 2012). Es entstehen Proteinperoxide, die nur langsam

vom Organismus durch Proteasen eliminiert werden (Davies 2016) und es kann ein großer Schaden für den Gesamtorganismus entstehen, indem die Proteine ihre Funktion als Enzyme, Rezeptoren, Transporter u.v.m. verlieren.

## **2.3 Antioxidantien**

Der Körper hat gegen die Oxidantien eine Vielzahl von Antioxidantien entwickelt. Man kann sie in zwei große Gruppen einteilen, die enzymatischen und die nicht-enzymatischen Antioxidantien. Maraschiello et al. (1999) bezeichnen die enzymatischen Antioxidantien als vorbeugende und die nicht-enzymatischen als schützende Antioxidantien. Obwohl die enzymatischen Antioxidantien in dieser Arbeit nicht betrachtet wurden, spielen sie eine wichtige Rolle im antioxidativen System der Broiler und sind im Folgenden kurz beschrieben.

### **2.3.1 Antioxidative Enzyme**

Die bedeutendsten Antioxidantien in dieser Gruppe sind die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase (CAT) und die Glutathionperoxidase (Gpx) (Birben et al. 2012). Die Aktivität wird auf Transkriptionsebene reguliert und bei einem geringen Anstieg der ROS wird die Aktivität der antioxidativen Enzyme erhöht. Bei einem starken Anstieg können die antioxidativen Enzyme aber auch durch ROS inaktiviert werden (Lushchak 2015).

Schon in den frühen 1960er Jahren wurde die Superoxiddismutase (SOD) entdeckt, die die Umwandlung (Dismutase) von  $O_2^{\cdot-}$  zu  $H_2O_2$  katalysiert. Später wurde die SOD in fast allen aeroben Organismen und Zellkompartimenten gefunden. Durch die SOD wird  $O_2^{\cdot-}$  erst zu  $H_2O_2$  umgewandelt (Birben et al. 2012). In dieser Reaktion wird Wasserstoff ( $H^+$ ) auf  $O_2^{\cdot-}$  übertragen und es entstehen  $H_2O_2$  und  $O_2$  (Blokhina et al. 2003). Es gibt unterschiedliche SOD-Typen, die alle die gleiche Reaktion katalysieren, sich aber durch unterschiedliche, metallische Cofaktoren im aktiven Zentrum auszeichnen (Blokhina et al. 2003, Fukai und Ushio-Fukai 2011) und in unterschiedlichen Geweben lokalisiert sind. So ist die SOD1 zytoplasmatisch, die

SOD2 mitochondrial und die SOD3 im extrazellulären Raum zu finden (Fukai und Ushio-Fukai 2011).

Die CAT dient zum Schutz vor toxischen Effekten des  $\text{H}_2\text{O}_2$ , welches nicht nur durch die SOD entsteht, sondern auch in anderen physiologischen Prozessen, wie der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation sehr langkettiger Fettsäuren (Schrader und Fahimi 2006). Die CAT katalysiert in zwei Schritten die Umsetzung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$  (Reid et al. 1981).

Die Gpx ist ein Selenoenzym, mit Selen als Cofaktor im aktiven Zentrum. Ein Selenmangel kann sich daher auch negativ auf seine Aktivität auswirken (Lawrence und Burk 1976). Die größte Aktivität hat das Enzym in den Erythrozyten und der Leber, wohingegen Muskelgewebe die niedrigste Aktivität aufweist. Genauso wie die CAT katalysiert die Gpx die Umsetzung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Zusätzlich ist die Gpx auch in der Lage, Fettsäure-Hydroperoxide unschädlich zu machen (SURAI 1999). Sie reduziert das  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  und die Hydroperoxide zu den entsprechenden Alkoholen. Als Cofaktor benötigt die Gpx Glutathion, was dadurch in seine oxidierte Form (GSSG) überführt wird (Mezzetti 1990).

Im Gegensatz zu den Mechanismen gegen das  $\text{O}_2^{\cdot -}$  und das  $\text{H}_2\text{O}_2$  gibt es gegen das  $\text{OH}^\cdot$  keinen Abwehrmechanismus. Lushchak (2015) vermutet, dass es auf Grund der hohen Reaktivität keine Enzyme dagegen gibt und der einzige Schutz die Verhinderung der Bildung zu sein scheint. Da es aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  entstehen kann, sollte das  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Level so gering wie möglich gehalten werden.

## **2.3.2 Nicht enzymatische Antioxidantien**

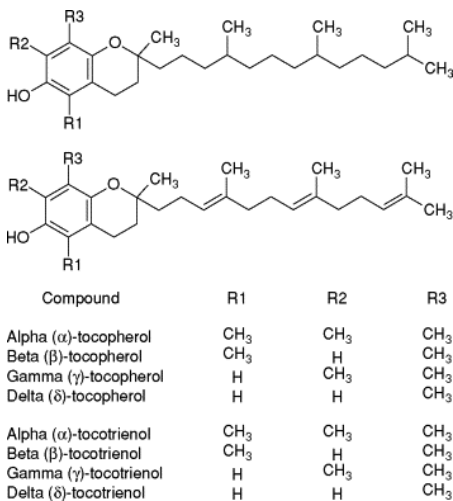
### **2.3.2.1 Tocopherol**

Der Begriff Vitamin E wird oft für alle Tocopherole und Tocotrienole verwendet (Zhao et al. 2017), wobei die Tocotrienole mengenmäßig nur eine untergeordnete Rolle spielen. Dabei unterscheiden sich diese beiden Formen lediglich in der Sättigung ihrer Seitenkette. Tocopherole haben eine gesättigte Seitenkette, während die Seitenkette der Tocotrienole dreifach ungesättigt ist.



Da in der Literatur beide Begriffe (Vitamin E und Tocopherol) zu finden sind, werden auch in dieser Arbeit beide Begriffe verwendet. Es ist aber darauf hinzuweisen, dass in der vorliegenden Arbeit nur die Tocopherole betrachtet wurden.

Vitamin E wird ausschließlich in Pflanzen synthetisiert (Zhao et al. 2017) und muss von Menschen und Tieren über die Nahrung aufgenommen werden. Nach der oralen Aufnahme werden die fettlöslichen Tocopherole in Mizellen eingebaut und im Dünndarm wieder absorbiert (Irlás-Mata et al. 2018). Es gibt vier Isomere, ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -Tocopherol), die aus einem Chromanring als Kopfgruppe und einer Phytol-Seitenkette bestehen. Die einzelnen Isomere unterscheiden sich in der Anzahl und der Lokalisation der Methylgruppen, die am Chromanring gebunden sind (Blokchina et al. 2003) (siehe Abb. 6).



**Abbildung 6: Tocopherole und Tocotrienole nach Astley (2003)**

Natürliches Tocopherol kommt nur in der RRR-Form vor, während die chemische Synthese ein Gemisch aus 8 verschiedenen Stereoisomeren in gleichen Anteilen hervorbringt. Diese nennt man all-rac-Tocopherole (Zhao et al. 2017). Die biologisch aktivste Form ist das RRR- $\alpha$ -Tocopherol (Lemaire-Ewing et al. 2010, Zhao et al.

2017) und auch die Aktivität als Antioxidans ist von der Anzahl und der Lokalisierung der Methylgruppen abhängig ( $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ ) (Blokchina et al. 2003). Zum einen hängt es damit zusammen, dass die relative Fähigkeit, Wasserstoffatome abzugeben mit zunehmender Ringmethylierung steigt (Traber und Atkinson 2007), zum anderen, dass das  $\alpha$ -Tocopherol-Transfer-Protein ( $\alpha$ -TTP), welches für den Transport der Tocopherole aus der Leber in den Blutkreislauf verantwortlich ist, eine große Bindungsaffinität zum  $\alpha$ -Isomer aufweist. Dadurch hat das  $\alpha$ -Isomer einen weiteren Vorteil gegenüber der anderen Tocopherole, da es besser im Körper verteilt werden kann (Traber und Atkinson 2007, Lemaire-Ewing et al. 2010).

Maraschiello et al. (1999) schreiben, dass das fettlösliche  $\alpha$ -Tocopherol in der zellulären Lipiddoppelschicht zu finden ist, in der es durch seine Seitenketten optimal verankert ist (Sies 1997) und Habibian et al. (2016) beschreiben Vitamin E als hauptlipidlösliches Antioxidans, das in Zellmembranen vorkommt. Als Wasserstoff-Donator verhindert es die Oxidation von Fettsäuren (Zhao et al. 2017), indem es in der Lage ist, oxidierende Radikale direkt zu hemmen oder als kettenbrechendes Antioxidans die Kettenreaktion während der Lipidperoxidation zu unterbrechen (Blokchina et al. 2003). Dabei reagiert die Hydroxylgruppe des Tocopherols mit den Lipidradikalen ( $L^{\cdot}$ ) und Lipidperoxyradikalen ( $LOO^{\cdot}$ ), welche bei der Lipidperoxidation von Fetten entstehen. Dieser Schritt findet in der Membran-Wasser-Interphase statt, wo das Tocopherol (TOH) ein Wasserstoffatom an die Radikale abgibt und es entstehen wieder Fettsäuren (LH) oder Lipid-Hydroxyperoxide ( $LOOH$ ). Außerdem entsteht ein Tocopherol-Radikal ( $TO^{\cdot}$ ), welches durch einen weiteren Wasserstoff-Donor, z.B. Vitamin C, Glutathion oder Coenzym Q wieder in die Ausgangsform umgewandelt wird (Blokchina et al. 2003). Dadurch ist es maßgeblich an der Hinderung der Ausbreitung von Schäden durch die freien Radikale beteiligt (Traber und Packer 1995).

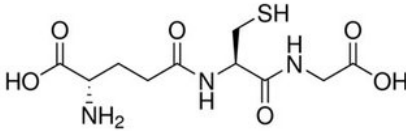
Nach der Vitamin E-Supplementierung erhöht sich der Gewebespiegel, woraus eine Kontrolle der Lipidperoxidation resultiert. Durch die Lokalisation in der Lipiddoppelschicht, die hoch ungesättigt ist, trägt das  $\alpha$ -Tocopherol maßgeblich dazu bei, viele Qualitätsmerkmale des Fleisches, wie z.B. die Farbe, den Geschmack und die Haltbarkeit zu verbessern (Ruiz et al. 1999). Maraschiello et al. (1999) zeigten außerdem, dass die Anreicherung von  $\alpha$ -Tocopherol nach oraler Supplementierung die Oxidationsstabilität auch nach dem Kochen und Lagern erhöht.

Mehrere Studien schreiben dem Vitamin E neben seiner Rolle als Antioxidans aber auch weitere Funktionen im Gesamtorganismus zu. Traber und Packer (1995) beschreiben z.B. den Eingriff an mehreren Stellen in den Arachidonsäurestoffwechsel und eine Förderung der Zelldifferenzierung durch seine antiproliferative Wirkung. Blokhina et al. (2003) schreiben, dass Tocopherole eine wichtige Rolle in der Stabilisierung und Beweglichkeit der Zellmembranen spielen und wichtig für die Durchlässigkeit kleiner Ionen und Moleküle sind. Brigelius-Flohé (2009) vermutet eine Aufgabe des Vitamin E darin, oxidative Schäden in der Lipidmembran zu erkennen und eine Antwort einzuleiten. Des Weiteren beschreibt sie, dass Vitamin E an der Regulation von Enzymen und der Genexpression beteiligt ist. Die vom Vitamin E-Status am meisten betroffenen Signalwege sind die der Entzündungsreaktion und des Zellverkehrs.

### **2.3.2.2 Glutathion**

Glutathion ( $\gamma$ -L-Glutamyl-L-Cysteinylglycine) (Abb. 7) ist ein Tripeptid und nicht-Protein Thiol (Bayram et al. 2013) und das wichtigste niedermolekulare Thiol in Säugetieren (Iwasaki et al. 2009, Giustarini et al. 2011). Diese Thiole sind endogene Antioxidationsmoleküle und die reaktivsten, reduzierenden Substanzen in der Zelle, die bei physiologischem pH-Wert gegen ROS wirken und der Zelle helfen, einen reduzierten Zustand aufrecht zu erhalten (Khan et al. 2011).

Glutathion (GSH) hat zwei charakteristische Merkmale. Zum einen eine  $\gamma$ -Glutamylbindung und zum anderen eine Sulfhydrylgruppe. Diese Strukturen dienen dem GSH bei seinen vielen Funktionen (Iwasaki et al. 2009). Es spielt eine Schlüsselrolle bei der Zellresistenz gegen oxidative Schäden, indem es Enzyme, die am Metabolismus von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt sind, Reduktionsäquivalente bereitstellt, potenziell toxische Oxidationsprodukte eliminiert und oxidierte Proteine reduziert (Giustarini et al. 2015). Zusätzlich ist es noch an der Regeneration von anderen Antioxidantien, wie z.B. Vitamin E oder Vitamin C beteiligt (Bayram et al. 2013). Dabei oxidiert das GSH selbst zu Glutathion-Disulfid (GSSG) und beide bilden zusammen das Haupt-Redoxpaar in tierischen Zellen (Wu et al. 2004).



**Abbildung 7: Strukturformel von Glutathion**

Laut Bayram et al. (2013) ist GSH ein wichtiger Marker für oxidativen Stress, laut Iwasaki et al. (2009) und Giustarini et al. (2011) ist GSH ein Indikator für den Oxidationsstatus des gesamten Organismus und Mari et al. (2009) nennen das GSH:GSSG-Verhältnis als Marker für oxidativen Stress. Das GSH:GSSG-Verhältnis ist auch ein kritischer Mechanismus für das Überleben der Zelle, da es eng in Verbindung mit Proliferation, Differenzierung und Apoptose steht. Unter oxidativem Stress verschiebt sich dieses Verhältnis (Giustarini et al. 2015). In ruhenden Zellen ist das GSH:GSSG-Verhältnis 100:1 und ändert sich unter oxidativem Stress von 10:1 bis 1:1 (Iwasaki et al. 2009).

Die GSH-Synthese aus den drei Bausteinen Glutamat, Cystein und Glycin findet in allen Zelltypen, vorzugsweise aber in der Leber statt (Wu et al. 2004, Bayram et al. 2013). Unter ATP-Verbrauch entsteht das GSH im Zytosol in zwei aufeinander folgenden Schritten (DeLeve und Kaplowitz 1991, Mari et al. 2009). Aus Glutamat und Cystein wird durch die  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase im ersten Schritt  $\gamma$ -Glutamylcystein. Im zweiten Schritt wird unter Aktivität der GSH-Synthetase aus dem  $\gamma$ -Glutamylcystein und Glycin das GSH (Wu et al. 2004, Mari et al. 2009). Bei der ersten Reaktion reagiert die  $\gamma$ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure mit der Aminogruppe vom Cystein unter Bildung einer  $\gamma$ -Peptidbindung, die das GSH vor einer Hydrolyse durch intrazelluläre Peptidasen schützt (Wu et al. 2004). Bei diesen Reaktionen ist die Aktivität der  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase der limitierende Schritt und auch die Cystein-Verfügbarkeit und eine GSH-feedback-Inhibierung tragen zur Steuerung der Synthese bei (Wu et al. 2004, Iwasaki et al. 2009). Studien zeigen außerdem, dass eine angemessene Proteinernährung und eine ausreichende Verfügbarkeit von Methionin und weiteren Cystein-Vorläufern für die

Aufrechterhaltung der GSH-Homöostase von entscheidender Bedeutung ist (Wu et al. 2004).

Die Thiolgruppe (-SH) vom Cystein verleiht dem GSH seine biologische Aktivität (Bayram et al. 2013), indem die Thiolgruppen von zwei GSH-Molekülen nicht-enzymatisch zum Dimer GSSG oxidieren (Wu et al. 2004), während die Zielmoleküle reduziert werden. Regeneriert wird das GSSG indem es durch die Glutathion-Reduktase, zusammen mit dem Co-Faktor NADPH, zurück in zwei Moleküle GSH reduziert wird (DeLeve und Kaplowitz 1991, Giustarini et al. 2015).

GSH spielt wie beschrieben eine große Rolle im antioxidativen System, ist aber auch im Nährstoffmetabolismus, der Genexpression, Zellproliferation und Apoptose, sowie weiteren Vorgängen beteiligt (Wu et al. 2004, Bayram et al. 2013). Als Wasserstoffdonor spielt es außerdem in der DNA-Synthese eine Rolle (Iwasaki et al. 2009).

### 2.3.2.3 Vitamin C

Vitamin C ist ein Sammelbegriff für alle Derivate der Ascorbinsäure und für die Stoffe, die im Organismus zu Ascorbinsäure umgebaut werden können, z.B.

Dehydroascorbinsäure (DHA). Die Salze der Ascorbinsäure sind die Ascorbate und in der Literatur werden alle drei Begriffe (Vitamin C, Ascorbinsäure und Ascorbat) oftmals synonym verwendet.

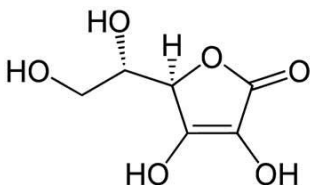


Abbildung 8: Strukturformel der Ascorbinsäure

Ascorbinsäure wird aus Glukose synthetisiert und enthält noch alle ihre sechs Kohlenstoffatome. Allerdings ist sie zu einem  $\gamma$ -Lactonring umgebaut und das zweite

und dritte Kohlenstoffatom, die chemisch eine Endiolgruppe darstellen, sind für die reduzierenden Eigenschaften verantwortlich (Abb. 8).

Die Hauptfunktion der Ascorbinsäure ist die Wirkung als Antioxidans. Neben Vitamin E gilt es im Blut und anderen extrazellulären Flüssigkeiten als wichtigste Antioxidans und spielt eine Rolle bei der Minimierung der Schäden durch Oxidationsprodukte und freie Radikale (Padh 1991, Traber und Stevens 2011). Anders als das Vitamin E, ist die Ascorbinsäure in der wässrigen Phase lokalisiert (Sahin et al. 2002) und ist ein Radikalfänger in Plasma und Zytosol (Sies et al. 1992). Es gibt Wasserstoffatome an die freien Radikale ab und macht sie damit unschädlich. Dabei wird die Ascorbinsäure selbst oxidiert, kann aber durch Enzyme, zusammen mit GSH und teils NADPH, wieder reduziert werden (Jacob 1995). Dabei stellen die GSH-abhängigen Enzyme bei der Reduktion die Wichtigsten dar (Deutsch 2000). Daher ist GSH unerlässlich für die Funktion von Vitamin C (Meister 1992).

Neben der Wirkung gegen die freien Radikale, fängt die Ascorbinsäure auch effizient die Peroxylradikale in der wässrigen Phase ab, bevor diese die weitere Lipidperoxidation auslösen können und schützt so vor weiteren Schäden. Die Hemmung der Lipidperoxidation durch Ascorbinsäure ist sogar wirksamer als durch andere Plasmakomponenten, wie z.B. Vitamin E (Sies et al. 1992). Jacob (1995) konnte feststellen, dass Plasmalipide, die oxidativem Stress ausgesetzt sind, am besten durch Vitamin C geschützt sind und der Schutz durch Vitamin E erst einsetzt, wenn Vitamin C aufgebraucht ist.

Die Ascorbinsäure dient selbst als Antioxidans, kann aber auch die oxidierte Form des Vitamin E regenerieren ( Padh 1991, El-Senousey et al. 2017), indem sie das Tocopheroxyl-Radikal reduziert und somit in seine aktive Form zurückführt (Chew 1995, Jacob 1995). Sie interagiert mit membrangebundenem, oxidiertem  $\alpha$ -Tocopherol an der Membran-Zytosol-Grenzfläche (Chew 1995).

Die Formation in ihre oxidierte Form, der DHA, gibt der Ascorbinsäure seine biologische Aktivität. Die Oxidation liefert zwei Wasserstoffatome, die zur Reduktion von biologischen Verbindungen verwendet werden können (Deutsch 2000). Zur Reduktion der DHA zurück in die aktive Form, wird sie schnell in die Zellen transportiert und durch die Dehydroascorbinsäurereduktase (DHA-Reduktase) wieder reduziert (Sato et al. 2010). DHA weist im Plasma recht niedrige Konzentrationen auf, was auf die Aktivität der DHA-Reduktase zurückzuführen ist, die Vitamin C- und

GSH-abhängig zu sein scheint (Lykkesfeldt et al. 1997). Dieser Umbau von DHA zu Ascorbinsäure muss auch effizient sein, da die DHA schnell und irreversibel abgebaut werden kann (Meister 1992). Eine Kombination aus erhöhtem oxidativem Stress und niedrigen Ascorbinsäurekonzentrationen könnte also zur Erhöhung von DHA führen und daraus resultiert, dass das Gesamt-Vitamin C:DHA-Verhältnis als Marker für oxidativen Stress dient (Lykkesfeldt et al. 1997).

Viele Lebewesen können Vitamin C selbst synthetisieren. Eine Ausnahme bilden hier die Menschen, Primaten und Meerschweinchen, denen ein entscheidendes Enzym für die Synthese fehlt (Meister 1992, Traber und Stevens 2011). In den anderen Lebewesen findet die Synthese in Leber und/oder Niere statt, wobei die Synthese beim Broiler, wie bei den meisten Geflügelarten, nur in der Niere stattfindet (Roy und Guha 1958, Hooper et al. 2000). An der Bildung von Vitamin C sind drei entscheidende Enzyme beteiligt, wovon die Gulonsäurelactonoxidase eine Schlüsselrolle einnimmt und das limitierende Enzym darstellt (Alawad et al. 1993).

Zuerst wird die Glukose durch Dehydrogenasen und Hydrolasen in Glucuronsäure umgewandelt. Hier setzen dann die drei spezifischen Enzyme an. Aus Glucuronsäure wird durch Glucuronsäurereduktase unter Verbrauch von  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  Gulonsäure gebildet. Durch die Gulonsäurelactonase entsteht unter Abspaltung von Wasser Gulonolacton und dabei kommt es zur Ringbildung. Der letzte Schritt findet durch die Gulonsäurelactonoxidase statt, wodurch sich unter Sauerstoffverbrauch und Wasserabspaltung 2-Ketogulonolacton bildet. Dieses lagert sich dann spontan in Ascorbinsäure um.

Neben seiner Rolle als Antioxidans hat das Vitamin C noch viele weitere Funktionen im Organismus. Vitamin C wirkt positiv auf Tumorwachstum, Energiemetabolismus und Apoptose (Traber und Stevens 2011). Außerdem werden viele Enzyme in verschiedenen Prozessen durch Vitamin C gefördert, wie z.B. bei der Kollagensynthese und der Carnitinsynthese (Padh 1991). Meister (1992) erörtert die Wirkung bei der Vorbeugung und Behandlung von Erkältung, AIDS und Krebs. Zudem soll es das Immunsystem und die Wundheilung positiv beeinflussen.

## 2.4 Methionin

Methionin (Abb. 9) ist eine von zwei schwefelhaltigen Aminosäuren und meist die erstlimitierende Aminosäure in der kommerziellen Weizen-Mais-Soja-Fütterung in der Broilermast. Liegt ein Mangel an schwefelhaltigen Aminosäuren vor, kann dies vor allem zu Wachstumsbeeinträchtigungen führen. Zusätzlich kann es zu geringerem Federwachstum, Stoffwechselstörungen und einem geschwächten Immunsystem führen (Swennen et al. 2011).

Bunchasak (2009) beschreibt außerdem die Vorteile der Supplementierung von Methionin in der Geflügelfütterung als kostenreduzierend. Ist eine Aminosäure nicht bedarfsdeckend im Futter enthalten, verbessert sich durch Zulage der limitierenden Aminosäure die Proteinbiosynthese und der Fleischertrag wird verbessert, da der Fettgewebsanteil durch eine verminderte Fettsynthese verringert wird. Außerdem werden Ressourcen erhalten und der Abfall minimiert (Bunchasak 2009).

Des Weiteren hat es eine große Bedeutung als Methylgruppen- und Schwefel-Donator und es dient als Vorläufer im Stoffwechselweg für Cystein (Bunchasak 2009).

Methionin wird technisch in einem chemischen Komplex synthetisch hergestellt und enthält die D- und L-Isomere im Verhältnis 1:1 (Bunchasak 2009). Das DLM liegt dabei in fester Form als kristallines Pulver vor und weist einen Methioningehalt von 99% auf (Sauer et al. 2008).

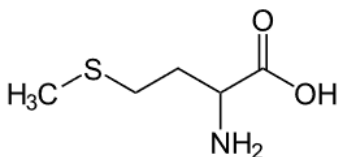
Das DLM wird über den Gastrointestinaltrakt absorbiert und die Aufnahme ist hauptsächlich auf den Dünndarm beschränkt. Die Absorption erfolgt, wie die Aufnahme aller anderen Aminosäuren auch, vermehrt über den sekundären, aktiven, ATP-abhängigen Transport und weniger über Diffusion und Carrier-abhängigen Transport. Die D- und L-Isomere nutzen dabei die gleichen Transporter, welche eine höhere Affinität zum L-Isomer als zum D-Isomer haben (Richards et al. 2005). Das D-Isomer muss außerdem vor seinem Nutzen in das biologisch aktive L-Isomer umgewandelt werden.

Die Umwandlung des D-Moleküls in L-Methionin erfolgt über zwei enzymatische Schritte. Im ersten Schritt entsteht 2-Keto-4-Methylthio-Buttersäure (KMB). Dies geschieht über die peroxisomale D-Aminosäure-Oxidase, die hauptsächlich in Leber



und Niere zu finden ist (Barnes et al. 1995, Martin-Venegas et al. 2006). Die entstandene KMB wird dann durch ein weiteres Enzym, eine Transaminase, in das L-Methionin umgewandelt (Dibner und Knight 1984, Martin-Venegas et al. 2006).

Methionin ist die hydrophobste der Aminosäuren und die meisten Methioninreste sind im inneren hydrophoben Kern von Proteinen zu finden. Dieser hydrophobe Charakter wird ihr durch die terminale Methylgruppe verliehen. Dort, wo die Methioninreste doch oberflächlich angeordnet sind, können sie leicht mit ROS zu Methionin-Sulfoxid-Resten oxidiert werden und so die ROS unschädlich machen (Levine et al. 1996, Brosnan und Brosnan 2006). Levine et al. (1996) bezeichnen diese Methionin-Reste sogar als endogene Antioxidantien in Proteinen.

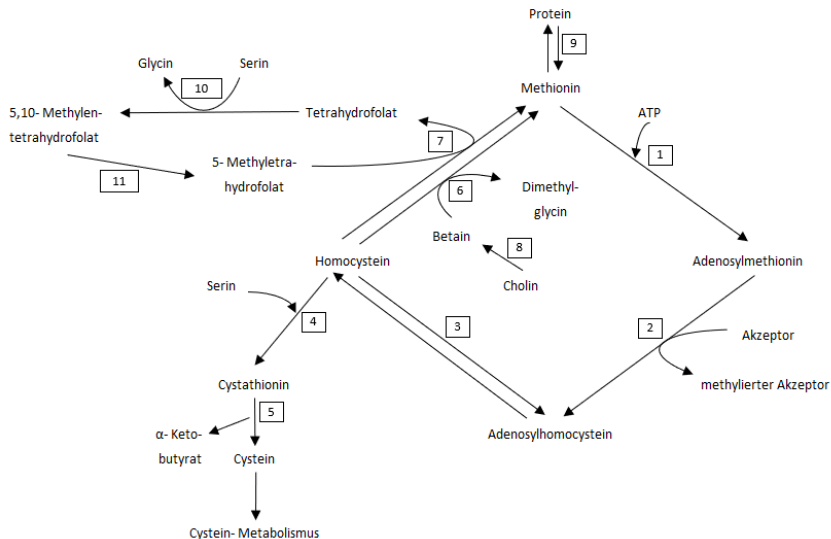


**Abbildung 9: Strukturformel von Methionin**

Bei der Proteinbiosynthese dient Methionin als initialisierende Aminosäure bei der Translation und hat somit eine große Bedeutung (Brosnan und Brosnan 2006). Nach der Proteinbiosynthese wird ein Großteil der Methioninreste wieder abgespalten (Brosnan et al. 2007).

Methionin ist nicht nur für die Proteinstruktur unerlässlich, sondern auch der Methioninmetabolismus nimmt eine wichtige Rolle ein (Brosnan et al. 2007). Das biologisch aktive L-Methionin wird in den Methionin-(Homocystein-)Kreislauf eingeschleust (Abb. 10). Wichtige Enzyme sind hierbei die Methionin-Adenosyl-Transferasen (MAT). Bei denen wird zwischen MAT1, welche in der Leber zu finden ist und MAT2 in allen anderen, extrahepatischen Geweben, unterschieden (Finkelstein 2006). Unter Verwendung von ATP bauen die MATs das Methionin in S-Adenosylmethionin (SAM) um. Durch Abgabe einer Methylgruppe vom SAM auf einen Akzeptor, der methyliert wird, dient das SAM als Methylgruppendonor und es entsteht S-Adosylhomocystein (SAH). Dieser Vorgang wird durch

Methyltransferasen unterstützt. Durch S-Adenoyl-Homocystein-Hydrolase wird das SAH weiter umgewandelt in Homocystein. Dabei entsteht als Nebenprodukt Adenosin. Das Homocystein kann dann in zwei unterschiedliche Wege geleitet werden. Es kann über die Methionin-Synthase oder die Betain-Homocystein-Methyl-Transferase (BHMT) wieder zu Methionin remethyliert werden oder in die sogenannte Transsulfonierung (Abb. 10; Reaktionen 1, 2, 3, 4, 5) eingeschleust werden. Die Transsulfonierung findet hauptsächlich in Leber, Niere, Pankreas und Darm statt. Bei der Transsulfonierung wird das Homocystein erst durch das Enzym Cystathionin- $\beta$ -Synthase in Cystathionin und weiter durch die Cystathionin- $\gamma$ -Lyase in Cystein umgewandelt. Cystein spielt bei der Glutathionsynthese eine wichtige Rolle (Swennen et al. 2011) und ist daher ein wichtiger Bestandteil im antioxidativen Schutzmechanismus. Die Transsulfonierung wird durch oxidative Belastung stimuliert, indem das Enzym Cystathionin- $\beta$ -Synthase durch Peroxide angeregt wird (Martín-Venegas et al. 2013).



**Abbildung 10: Methionin-Stoffwechsel nach Finkelstein (2006)**

Die Zahlen stellen bestimmte Enzyme oder Abschnitte dar; 1: Methionin-Adenosyl-Transferasen (MAT); 2: Methyltransferase; 3: S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase; 4: Cystathionin- $\beta$ -Synthase; 5: Cystathionin- $\gamma$ -Lyase; 6: Betain-Homocystein-Methyl-Transferase; 7: Methionin-Synthase; 8: Cholin-Aldehyd-Dehydrogenase; 9: Gleichgewicht freies und proteingebundenes Methionin; 10: Glycin-Hydroxymethyltransferase; 11: Methylen-tetrahydrofolat-Transferase

## 2.5 Leinöl

Broilerfleisch ist sehr beliebt und der Verbrauch steigt, weil das Fleisch mager, protein- und nährstoffreich ist (Haug et al. 2007). Verbraucher bevorzugen es wegen seines geringen Fettgehalts und der besseren Fettsäurezusammensetzung im Gegensatz zu Rind- oder Schweinefleisch (Shunthwal et al. 2016).

Gerade durch die Zufuhr von sogenannten Omega-3-Fettsäuren ( $\omega$ -3-FS) kann die menschliche Gesundheit verbessert werden (Haug et al. 2007, Shunthwal und Sheoran 2017). So weiß man heute, dass diese bei der Vorbeugung und Behandlung von Herzkrankheiten, Bluthochdruck und Diabetes von Bedeutung sind (Shunthwal und Sheoran 2017, Hang et al. 2018).

Die  $\omega$ -3-FS sind mehrfach ungesättigt und werden nach Lage ihrer Doppelbindungen klassifiziert. Das  $\omega$  steht dafür, dass die Bezeichnung vom Kettenende aus betrachtet wird und so liegt bei den  $\omega$ -3-Fettsäuren die erste Doppelbindung am dritten Kohlenstoffatom vom Kettenende hergezählt, bei z.B.  $\omega$ -6-FS am sechsten. Die PUFAs sind ein wichtiger Bestandteil aller Lipide. Sie sind sowohl Bestandteil des zellulären Fettdepots als auch wichtiger Baustein der Zellmembranlipide.  $\alpha$ -Linolensäure ( $\omega$ -3) und Linolsäure ( $\omega$ -6) sind für den Menschen essenziell und sie können im Gegensatz zu z.B.  $\omega$ -9-Fettsäuren nicht vom Körper aufgebaut werden (Saller et al. 2006). Da aber auch bekannt ist, dass  $\omega$ -6-FS negative Effekte haben können, sollte das Verhältnis von  $\omega$ -6- zu  $\omega$ -3-FS 4:1 bis 6:1 nicht überschreiten (Saller et al. 2006). Shunthwal et al. (2016) beschreiben sogar ein Verhältnis von 1:1 bis maximal 3:1 als optimal. Da aber die heutige Ernährung reich an  $\omega$ -6-FS ist, kommt es zur Imbalance und einem Verhältnis von oftmals bis zu 15:1 (Shunthwal et al. 2016).

In der kommerziellen Broilermast basiert das Futter auf Getreide und ist reich an  $\omega$ -6-FS (Haug et al. 2007). Fette und Öle werden als Quelle von Energie und Fettsäuren zugesetzt (Milankovic et al. 2019, Voljč et al. 2013).

Da bei monogastrischen Tieren das Fettsäureprofil von Fleisch und Fett direkt durch die Fettquelle in der Nahrung beeinflusst wird, suchen Landwirte nach einer Möglichkeit um Leinöl füttern zu können, da es einen hohen Gehalt an  $\alpha$ -Linolensäure aufweist. Vom Gesamtölgehalt des Leinsamens (35-45%) entfallen auf

die  $\alpha$ -Linolensäure 45-52%. Shunthwal und Sheoran (2017) sehen als Hauptgrund für die Einarbeitung von Leinöl in die Futtermischungen die günstige Wirkung der PUFAs auf die Gesundheit von Mensch und Tier.

Es konnte schon gezeigt werden, dass Tiere, denen Leinöl gefüttert wurde, eine bessere Wachstumsleistung zeigten als Tiere, deren Futterrationen z.B. mit Palmöl angereichert wurden (Voljč et al. 2013). Außerdem gibt es Studien, in denen berichtet wird, dass eine Futterergänzung mit  $\omega$ -3-FS das Fettsäureprofil von Fleisch beeinflussen kann und sich der Gehalt von  $\omega$ -3-FS im Fleisch erhöht (Hang et al. 2018). Die Autoren konnten außerdem zeigen, dass dieser positive Einfluss im Geflügelfleisch stärker ist, als im Schweine-, Lamm- und Rindfleisch (Hang et al. 2018).

Nach Shunthwal und Sheoran (2017) senkt Leinöl als Bestandteil des Futters beim Broiler deutlich den Gehalt an gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren im Gewebe und das Verhältnis von  $\omega$ -3- zu  $\omega$ -6-FS ändert sich zugunsten der  $\omega$ -3-FS. Laut Eder et al. (2005a) weisen die Tiere in Brust- und Schenkelmuskel einen höheren Anteil an  $\omega$ -3-FS auf, wenn sie mit Leinöl anstelle von Sojaöl gefüttert werden. Die Ergebnisse von Hang et al. (2018) zeigten keinen Unterschied zwischen den Konzentrationen der  $\omega$ -3-FS im Brustfleisch bei der Fütterung von Fischöl und Leinöl. Im Schenkelmuskel von Tieren, die mit Leinöl gefüttert wurden, konnten aber höhere  $\omega$ -3-Gehalte gezeigt werden (Hang et al. 2018). Des Weiteren konnten Shunthwal und Sheoran (2017) zeigen, dass die langkettigen  $\omega$ -3-FS eher in den Lipiden des Muskels als im Bauchfett eingebaut sind, da sie bevorzugt in Phospholipiden vorkommen. Diese haben einen höheren Anteil im Muskelfett als im Fettgewebe.

Da sich ein hoher Gehalt an  $\omega$ -3-FS in der Nahrung positiv auf die Gesundheit der Verbraucher auswirken kann, sucht die Lebensmittelindustrie nach Möglichkeiten das Fettsäureprofil des Fleisches zu Gunsten der  $\omega$ -3-FS zu verbessern. Dabei wird aber oft übersehen, dass diese, wie alle ungesättigten Fettsäuren, anfällig für Oxidation sind und zu hoher oxidativer Belastung der Tiere führen können. Die Supplementierung von PUFAs kann zu einem Ungleichgewicht zwischen Antioxidantien und Oxidantien führen und das Fleisch anfälliger für den oxidativen Abbau machen (Leskovec et al. 2018). Wenn große Mengen an PUFAs gefüttert werden, steigt auch der Bedarf an Antioxidantien im Futter, da durch diese die

Lipidperoxidation gesteuert werden kann (Voljč et al. 2013). Saller et al. (2006) beschreiben, dass  $\omega$ -3-FS mit Antioxidantien zusammen gefüttert werden müssen, um sie zu stabilisieren.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Fütterungsversuch**

Zur Darstellung der Wirkung von Methionin auf das antioxidative System der Broiler teilte sich die Studie in zwei Versuche. Im ersten Versuch erfolgte eine typische Fütterung, wie sie auch in der konventionellen Mast durchgeführt wird und im zweiten Versuch wurde das antioxidative System, durch den Austausch der Fettquelle von Sojaöl durch Leinöl einer oxidativen Belastung ausgesetzt. Durch den hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren ist das Leinöl besonders oxidationsanfällig. In beiden Versuchen wurden die Tiere in Fütterungsgruppen eingeteilt, die sich in der Methioninversorgung unterschieden. Das Ausmaß der Veränderungen der Oxidationsprodukte und im antioxidativen Schutzsystem wurde am Gehalt von Thiobarbitursäure reaktiven Substanzen (TBARS) und Oxidationsprodukten vom Cholesterol (COPs) und Phytosterol (POPs), sowie den Antioxidantien Glutathion, dem wasserlöslichen Vitamin C und dem fettlöslichen Vitaminen E im Blut bzw. Plasma und unterschiedlichen Geweben gemessen.

##### **3.1.1 Versuchstiere und Versuchsaufbau**

Als Versuchstiere dienten in jedem der beiden Versuche 72 Tiere (Broiler) der Rasse Cobb 500 der Firma Cobb Germany AVIMEX (Wiedemar, Deutschland). Diese wurden als Eintagsküken eingestallt und nach 35 Tagen fachgerecht geschlachtet, was dem Büro der Tierschutzbeauftragten, Justus-Liebig-Universität Gießen, Frankfurter Str. 104, 35392 Gießen gemeldet und unter der JLU-Nummer 637\_M geführt wurde.

Den Tieren wurde zur Identifizierung bei der Einstallung eine Flügelmarke eingezogen. Sie wurden gewogen und anschließend den 3 unterschiedlichen Fütterungsgruppen zugeteilt, sodass sich die Gruppen im Mittel ihrer Masse nicht unterschieden. Die Aufstallung der Tiere erfolgte im Stoffwechsellabor der JLU Gießen, Heinrich-Buff-Ring 23, 35392 Gießen.

Die Haltung erfolgte in 9 Käfigen (3 Käfige/Gruppe) mit je 8 Tieren, die einer Bodenhaltung angelehnt war. Die einzelnen Käfige hatten eine Grundfläche von 1m<sup>2</sup>

für die ersten zwei Wochen, um den Tieren die allgemeine Orientierung zu erleichtern und wurden dann auf 2,1m<sup>2</sup> erweitert. Die Lichtintensität lag konstant bei 40 Lux und das Lichtregime war in den Tagen 1,2,3,4,5,6 24h:0h; 23h:1h; 22h:2h; 21h:3h; 20h:4h; 19h:5h (Licht: Dunkelheit) und wurde ab Tag 7 mit 18h:6h weitergeführt. Die Temperatur wurde im Laufe des Versuchs konstant von 29°C auf 21°C reduziert. In den ersten 6 Lebenstagen wurden den Tieren Rotlichtlampen zur Verfügung gestellt, die über bzw. in die Käfige gehängt wurden und unter denen konstant 34°C vorlagen. Die Luftfeuchtigkeit betrug über den gesamten Versuch 60% ± 1,9%. Als Unterlage diente Pappe, damit die Leistungen durch eventuelle Aufnahme von Einstreumaterial nicht verfälscht werden konnten. Um den Gesundheitsstatus der Tiere zu überwachen, wurde zweimal pro Woche die Kotkonsistenz pro Käfig nach Ogunji et al. (1983) beurteilt und die Respirationsrate ab Tag 10 zweimal pro Woche gemessen und dokumentiert.

Die Fütterung erfolgte in den ersten fünf Tagen über Pappteller, um den Tieren das Auffinden zu erleichtern und wurde dann der Größe der Tiere mit Futtertrögen angepasst. Es wurde immer eine größere Menge Futter angeboten als die Tiere aufgenommen haben, sodass eine ad libitum Versorgung vorlag. Wasser stand den Tieren ebenfalls ad libitum zur Verfügung.

### **3.1.2 Futterrationen**

In beiden Versuchen erhielten die Tiere eine Basisdiät bestehend aus Mais und Sojaextraktionsschrot. Die Mineralstoff- und Vitaminversorgung wurde durch Zusatz eines Premixes für Broiler (Firma MIAVIT GmbH, Essen, Deutschland) sichergestellt und so die Empfehlungen des Züchters ([www.cobb-vantress.com](http://www.cobb-vantress.com)) zur Aufrechterhaltung und zum Wachstum der Tiere erfüllt oder übertrafen. Die genaue Zusammensetzung des Futters ist in Tabelle 1, die analysierten Nährstoffkonzentrationen der beiden Versuche sind in den Tabellen 2 und 4 dargestellt. Im ersten Versuch wurde ein Premix eingesetzt, der Vitamin E enthielt und dieses in der Futterrationsration somit über der Empfehlung des National Research Council (1994) (NRC) lag. Im zweiten Versuch wurde ein Premix ohne Vitamin E zugemischt und man erhielt eine deckende Versorgung der Tiere nach den Empfehlungen des NRC (1994), aber ohne die typischen Sicherheitszulagen und

man konnte so die ernährungsbedingte oxidative Belastung in allen Gruppen weiter provozieren. Außerdem unterschieden sich die Futter hinsichtlich der Fettquelle. Im ersten Versuch wurde Sojaöl und im zweiten Versuch Leinöl verwendet.

Die Futter wurden in 3 Fütterungsphasen (Mastphasen) eingeteilt, wie es auch in der Praxis üblich ist, um eine optimale Versorgung der Tiere zu gewährleisten. Tag 1 bis 10 erhielten die Tiere eine Starterration, Tag 11-21 eine Growerration und Tag 22-35 eine Finisherration. Außerdem wurde in den ersten drei Wochen (Starter- und Growerrationen) ein Kokzidiostatika in empfohlener Dosierung beigelegt.

Wie im Versuchsaufbau beschrieben, wurden die Futter außerdem in 3 unterschiedliche Gruppen aufgeteilt, die sich in ihrer Methioninkonzentration unterschieden. Die Tiere, denen die Basisdiät gefüttert wurde, dienten als Kontrollgruppe (CON). Ihre Energie-, Nährstoff-, Vitamin- und Aminosäureversorgung erreichte die Empfehlungen des Züchters oder übertraf sie, mit Ausnahme der Versorgung an Methionin und Cystein. Hier lag die Versorgung ca. 15% unter den Züchterempfehlungen, die Empfehlungen des NRC (1994) wurden aber erfüllt.

Die anderen beiden Gruppen unterschieden sich durch eine hohe und eine niedrige Zulage. Zur Supplementierung wurde das DL-Methionin (DLM, MetAmino®) der Firma Evonik Degussa GmbH (Essen, Deutschland) verwendet. In der Gruppe DLM 1, mit niedriger Methioninzulage, wurde die Züchterempfehlung erfüllt, in der Gruppe DLM 2, mit höherer Zulage, die Züchterempfehlung um ca. 15% übertroffen.

In den Tabellen 3 und 5 sind die analysierten Methioninkonzentrationen der unterschiedlichen Gruppen in beiden Versuchen dargestellt.



**Tabelle 1:** Zusammensetzung der Inhaltsstoffe der Basaldiät für Starter (Tag 1-10), Grower (Tag 11-21) und Finisher (Tag 22-35), in %Frischmasse<sup>a</sup>

| Komponente (g/kg)                         | Starter | Grower | Finisher |
|-------------------------------------------|---------|--------|----------|
| Mais                                      | 50,0    | 54,9   | 58,8     |
| Sojaextraktionsschrot                     | 30,6    | 29,2   | 26,0     |
| Maisgluten                                | 7,21    | 7,65   | 7,00     |
| Fischmehl                                 | 5,00    | -      | -        |
| Monocalciumphosphat                       | 1,43    | 1,53   | 1,24     |
| Futterkalk (CaCO <sub>3</sub> )           | 1,45    | 1,33   | 1,12     |
| Mineral und Vitamin Premix <sup>b,c</sup> | 1,00    | 1,00   | 1,00     |
| Salz (NaCl)                               | 0,24    | 0,36   | 0,33     |
| Biolys ® (L-Lysine)                       | 0,10    | 0,19   | 0,16     |
| Cholinchlorid                             | 0,10    | 0,12   | 0,13     |
| ThreAmino ® (L-Threonine)                 | 0,05    | 0,06   | 0,05     |
| Val Amino (L-Valine)                      | 0,03    | 0,03   | 0,01     |
| Soja-/ Leinöl                             | 2,76    | 3,60   | 4,16     |

<sup>a</sup> Starter und Grower enthielten ein Kokkzidiostatika (Maxiban, 0,375 g/kg; on top).

In Versuch 1 wurde Sojaöl eingesetzt, in Versuch 2 wurde dieses durch Leinöl ersetzt.

<sup>b,c</sup> In Versuch 1 wurde der Premix<sup>b</sup> (mit Vitamin E) eingesetzt, in Versuch 2 wurde Premix<sup>c</sup> (ohne Vitamin E) eingesetzt

<sup>b</sup> Premix (mit Vitamin E) enthält pro kg Diät: Ca, 3 g, Cl, 0.01 g, Vitamin A, 12000 IU, Vitamin D3, 4000 IU, Vitamin E, 50 mg, Vitamin K3, 3.33 mg, Biotin, 250 µg, Folsäure, 1.67 mg, Vitamin B1, 3.33 mg, Vitamin B2, 8 mg, Vitamin B6, 4.17 mg, Vitamin B12, 25 µg, Nicotinamid, 69.1 mg, Kalziumpantothenat, 20 mg, Cholinechlorid, 400 mg, Fe, 50 mg, Cu, 15 mg, Mn, 100 mg, Zn, 70 mg, I, 1.56 mg, Se, 0.25 mg.

<sup>c</sup> Premix (ohne Vitamin E) enthält pro kg Diät: Ca, 3 g, Cl, 0.01 g, Vitamin A, 12000 IU, Vitamin D3, 4000 IU, Vitamin K3, 3.33 mg, Biotin, 250 µg, Folsäure, 1.67 mg, Vitamin B1, 3.33 mg, Vitamin B2, 8 mg, Vitamin B6, 4.17 mg, Vitamin B12, 25 µg, Nicotinamid, 69.1 mg, Kalziumpantothenat, 20 mg, Cholinchlorid, 400 mg, Fe, 50 mg, Cu, 15 mg, Mn, 100 mg, Zn, 70 mg, I, 1.56 mg, Se, 0.25 mg.

**Tabelle 2:** Analysierte Nährstoffkonzentrationen in den Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher- (Tag 22-35) Rationen in Versuch 1 (in % TM)<sup>a</sup>

|                     | <b>Starter</b> | <b>Grower</b> | <b>Finisher</b> |
|---------------------|----------------|---------------|-----------------|
| ME (MJ/ kg TM)      | 12,3           | 12,5          | 12,5            |
| Trockenmasse (TM)   | 88,4           | 89,3          | 88,7            |
| Rohasche            | 6,72           | 6,42          | 5,64            |
| Rohfaser            | 2,85           | 2,97          | 2,87            |
| Rohfett             | 6,30           | 6,46          | 7,13            |
| Rohprotein          | 24,3           | 21,7          | 19,8            |
| Methionin           | 0,51           | 0,43          | 0,40            |
| Methionin + Cystein | 0,88           | 0,79          | 0,74            |
| Lysin               | 1,44           | 1,26          | 1,16            |
| Threonin            | 0,98           | 0,88          | 0,81            |
| Arginin             | 1,42           | 1,27          | 1,16            |
| Isoleucin           | 1,03           | 0,92          | 0,83            |
| Leucin              | 2,31           | 2,20          | 2,00            |
| Valin               | 1,17           | 1,05          | 0,94            |
| Phenylalanin        | 1,24           | 1,16          | 1,05            |

<sup>a</sup> Die Werte Rohprotein und Aminosäuren sind aus der Basaldiät. Für die anderen Rohnährstoffe sind Mittelwerte aus den drei Diäten berechnet worden. Die ME wurde anhand der Rohnährstoffgehalte nach der GfE (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie) (1999) berechnet.

**Tabelle 3:** Analysierte Methioninkonzentration (in %) in den Diäten der 3 Gruppen und in den unterschiedlichen Mastphasen in Versuch 1

|       | <b>Starter</b> | <b>Grower</b> | <b>Finisher</b> |
|-------|----------------|---------------|-----------------|
|       | Met            | Met           | Met             |
| CON   | 0,51           | 0,43          | 0,40            |
| DLM 1 | 0,69           | 0,58          | 0,55            |
| DLM 2 | 0,85           | 0,73          | 0,70            |

**Tabelle 4:** Analysierte Nährstoffkonzentrationen in den Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher- (Tag 22-35) Rationen in Versuch 2 (in % TM)<sup>c</sup>

|                     | <b>Starter</b> | <b>Grower</b> | <b>Finisher</b> |
|---------------------|----------------|---------------|-----------------|
| ME (MJ/ kg TM)      | 11,8           | 12,2          | 12,4            |
| Trockenmasse (TM)   | 84,6           | 85,0          | 85,3            |
| Rohasche            | 6,08           | 6,01          | 6,01            |
| Rohfaser            | 2,95           | 3,12          | 3,00            |
| Rohfett             | 5,17           | 5,71          | 5,75            |
| Rohprotein          | 23,3           | 20,4          | 19,3            |
| Methionin           | 0,48           | 0,41          | 0,38            |
| Methionin + Cystein | 0,83           | 0,73          | 0,69            |
| Lysin               | 1,39           | 1,17          | 1,11            |
| Threonin            | 0,94           | 0,81          | 0,77            |
| Arginin             | 1,38           | 1,17          | 1,11            |
| Isoleucin           | 0,98           | 0,83          | 0,78            |
| Leucin              | 2,20           | 2,03          | 1,89            |
| Valin               | 1,12           | 0,97          | 0,89            |
| Pheylalanin         | 1,17           | 1,04          | 0,98            |

<sup>c</sup>Die Werte Rohprotein und Aminosäuren sind aus der Basaldiät. Für die anderen Rohnährstoffe sind Mittelwerte aus den drei Diäten berechnet worden. Die ME wurde anhand der Rohnährstoffgehalte nach der GfE (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie) (1999) berechnet.

**Tabelle 5:** Analysierte Methioninkonzentration (in %) in den Diäten der 3 Gruppen und in den unterschiedlichen Mastphasen in Versuch 2

|       | <b>Starter</b> | <b>Grower</b> | <b>Finisher</b> |
|-------|----------------|---------------|-----------------|
|       | Met            | Met           | Met             |
| CON   | 0,48           | 0,41          | 0,38            |
| DLM 1 | 0,64           | 0,54          | 0,51            |
| DLM 2 | 0,82           | 0,68          | 0,64            |

## **3.2 Leistungsdaten**

Um die Mastleistungen erheben zu können, wurden während beider Versuche die Futtermengen und Lebendmassen genau dokumentiert, ebenso wie die Wassermengen. Außerdem wurde die Mortalität je Bucht vermerkt. Aus diesen erhobenen Daten konnte anschließend die Futterverwertung berechnet werden.

### **3.2.1 Futter- und Wasseraufnahme**

Die Futteraufnahme wurde pro Käfig erhoben. Hierzu wurde täglich die Einwaage des Futters notiert, die den Tieren zur Verfügung gestellt wurde und am darauffolgenden Tag die Rückwaage, die nicht verbraucht wurde. So konnte am Ende die Aufnahme berechnet werden. Ist ein Tier verstorben, wurde dies mathematisch berücksichtigt. Neben der Futteraufnahme wurde im gleichen Prinzip die Wasseraufnahme der Tiere erfasst, um evtl. abnorme Verbrauchsmengen zu ermitteln. Die Wasseraufnahme war in diesen Versuchen aber nicht relevant.

### **3.2.2 Massenerfassung im laufenden Versuch**

Die Tiere wurden vor der Einstellung gewogen und randomisiert nach Lebendmassen auf die Käfige verteilt, sodass kein anfänglicher Unterschied innerhalb der Käfige und Gruppen entstand. Am Tag der Schlachtung wurden die Tiere wieder gewogen, um damit, zusammen mit der Futteraufnahme, die Futterverwertung berechnen zu können. Während der Versuche wurden die Lebendmassen jedes einzelnen Tieres zusätzlich nach den Fütterungsphasen (an Tag 10 und 21) erfasst, um eventuelle große Gewichtsunterschiede, die auf Krankheit o. Ä. hinweisen könnten, direkt zu ermitteln.

### **3.3 Probengewinnung**

#### **3.3.1 Schlachtung und Massenerfassung**

Es wurden alle Tiere an Tag 35 fachgerecht geschlachtet. Dazu wurden sie mittels Strombetäubungsgerät (BTG 40A; Westerhof Geflügeltechnik, Deutschland) betäubt und dann durch Ausbluten getötet. Anschließend wurden die Federn entfernt und Kopf und Ständer abgetrennt.

Nach dem Abtrennen von Kopf und Ständer wurden die Massen inkl. Innereien erhoben (Schlachtmasse), dann die inneren Organe entfernt und die Massen inkl. Kopf und Nieren (Schlachtkörpermasse) ebenfalls erfasst.

Von 12 Tieren jeder Gruppe, also 36 Tieren in jedem der beiden Versuche, die nach Lebendmasse ausgewählt wurden und ein Massenmittel der Gruppe repräsentierten, wurden weitere Daten erhoben und Proben gewonnen.

Von diesen Tieren wurden zusätzlich die Massen der Brust- und Schenkelmuskel erfasst. Dazu wurden die Schenkelmuskel inkl. Haut und Knochen im Hüftgelenk abgetrennt und das Gewicht notiert. Für die Erfassung der Masse der Brustmuskeln wurde die Haut entfernt und der Brustmuskel entlang des Sternums und der Rippen vorsichtig abpräpariert. Dann wurden sie Richtung Schulter nach vorn geklappt und die Sehnen am Schultergelenk mit dem Messer durchtrennt. Diese Massen wurden ebenfalls notiert. Des Weiteren wurden von den ausgewählten 36 Tieren der beiden Versuche das Blut und innere Organe (Leber, Schenkelmuskel) beprobt.

Somit standen am Ende die Leistungsdaten von 9 Käfigen und weitere Daten und Proben von 36 Tieren aus jedem der beiden Versuche zur Verfügung.

#### **3.3.2 Blut- und Organentnahme**

Beim Ausbluten wurde das Blut aufgefangen und aus einem Teil direkt der Hämoglobingehalt bestimmt (Kap. 3.4.1). Ein weiterer Teil wurde zur späteren GSH-Analyse am Tag der Schlachtung weiter aufgearbeitet (Kap. 3.4.4). Anschließend wurde das Blut bei 1100 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert (Heraeus Varifuge K,

Thermo Fisher Scientific, Deutschland) um das Plasma zu gewinnen. Das Plasma wurde abgenommen und in 500 µl Portionen für die späteren Bestimmungen (TG, TBARS, Vitamin E, COPs bzw. POPs) abgefüllt. Dem Plasma für die Vitamin E- und die COPs bzw. POPs-Bestimmung wurde direkt bei der Abfüllung 2 mM Butylhydroxytoluol (BHT), welches in 99,8% Ethanol angesetzt wurde, als Antioxidans zugegeben. Das Plasma für die COPs bzw. POPs wurde anschließend bei -80°C, für die anderen Bestimmungen bei -20°C bis zu den weiteren Analysen gelagert. Für die Vitamin C-Analyse wurde das Plasma auch am Tag der Schlachtung weiter aufgearbeitet (siehe Kap. 3.4.3).

Die Leber wurde in einem Stück, inkl. Gallenblase, entnommen und ihr Gewicht erfasst. Zusätzlich wurden makroskopische Veränderungen notiert und anschließend wurde die Leber mit 0,9% NaCl gespült. Danach wurden mehrere Stücke aus dem Inneren des rechten Leberlappens herausgetrennt. Diese wurden in 2 ml-Tubes (Eppendorf AG, Hamburg Deutschland) so abgefüllt, dass ein großes Stück pro Tube vorhanden war, damit ein möglichst geringer Anteil der Leber einer Oxidation ausgesetzt war. Die Tubes wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Von den bereits gewogenen Schenkelmuskeln wurde vom Linken die Haut entfernt und möglichst große Stücke aus dem Inneren des *M. puboischiofemoralis* entnommen und auch in 2 ml-Tubes abgefüllt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Der rechte Schenkelmuskel wurde inkl. Haut und Knochen im Ganzen in einem Gefrierbeutel bei -20°C gelagert und zu einem späteren Zeitpunkt erhitzt und beprobt. Zur Herstellung der erhitzten Schenkelmuskeln wurden die tiefgefrorenen Schenkel über Nacht bei Raumtemperatur aufgetaut, im Ganzen inkl. Haut auf ein Backblech gelegt und bei 170°C für 50 min im Trockenschrank (Typ: T6200, Thermo Fisher Scientific, Deutschland) erhitzt, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und dann die Haut entfernt. Die Probe wurde, wie vom rohen Schenkelmuskel auch, aus dem Inneren des *M. puboischiofemoralis* entnommen, in 2 ml-Tubes gefüllt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert.

### 3.4 Laboranalytik

#### 3.4.1 Bestimmung von Hämoglobin

Die Hämoglobin (Hb)-Messung fand direkt nach der Blutentnahme am Tag der Schlachtung unter Verwendung des Drabkin's reagent Testkits statt.

Die verwendeten Reagenzien, Lösungen und Geräte zur Hb-Analyse sind Tabelle 6 zu entnehmen.

**Tabelle 6:** Reagenzien, Lösungen und Geräte zur Hb-Analyse

|                                      |                                                                                                              |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Brij®L23-Lösung (B4184)              | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland                                                                       |
| Drabkins-Lösung                      | Einen fertigen Ansatz Drabkins Reagent Testkit in 1000 ml bidest. Wasser gelöst, 0,5 ml Brij®L23 hinzugefügt |
| Drabkins reagent Testkit (D5941-6VL) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland                                                                       |
| Spectrophotometer, Genesys 10UV      | Thermo Fisher Scientific, Deutschland                                                                        |
| Vortexer Typ RS-VA 10                | Phoenix Instrument, Deutschland                                                                              |
| Zyanmethämoglobin                    | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland                                                                       |

Für die Messung wurden 5 ml der Drabkins-Lösung mit 20 µl Vollblut auf dem Vortexer gut gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Standardkurve wurde aus Zyanmethämoglobin hergestellt und als Blindwert diente reine Drabkins-Lösung. Anschließend konnten die Proben und die Standardkurve bei 540 nm im Spectrophotometer gemessen werden.

Über eine Formel, die auf dem Lambert-Beerschen-Gesetz basiert, konnten die genauen Konzentrationen berechnet werden. Mit Hilfe der Standards und des Blindwertes konnten die Steigung (a) und der Achsenabschnitt (b) ermittelt werden und mit der Extinktion der Probe ( $\Delta E_{\text{Probe}}$ ) wurde mit folgender Formel die Hämoglobinkonzentration im Vollblut berechnet:

$$\text{Hb (g/dl)} = \frac{\Delta \text{Ex}_{\text{Probe}} \times a + b}{10}$$

**Formel zur Berechnung der Hb-Gehalte.**  $\Delta \text{Ex}_{\text{probe}}$ = Extinktion der Probe; a= Steigung; b= Achsenabschnitt

### 3.4.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Für die Messung von Vitamin C, GSH und Vitamin E stand eine High Performance Liquid Chromatography (HPLC) mit nachgeschalteten, unterschiedlichen Detektoren zur Verfügung. Dieses Verfahren kann unterschiedliche Substanzen mit Hilfe einer stationären Phase (Säule) und einer mobilen Phase (Fließmittel) voneinander trennen. Die unterschiedlichen Substanzen gehen Wechselwirkungen mit der stationären Phase ein und je größer die Wechselwirkung ist, desto länger ist die Zeit, bis die Substanz von der mobilen Phase eluiert werden kann. Daraus resultieren unterschiedliche Retentionszeiten, was bedeutet, dass sie zu unterschiedlicher Zeit an den Detektoren ankommen und dort bei ihrer entsprechenden Wellenlänge gemessen werden können. Die technischen Daten und die Einstellungen zu den jeweiligen Messungen sind den einzelnen, folgenden Kapiteln (3.4.3-3.4.5) zu entnehmen.

Die von den Detektoren aufgefangenen Signale konnten in Flächeneinheiten umgerechnet werden. Mit Hilfe der Flächeneinheiten der Standards und des Blindwertes konnte eine Kalibrationsgerade erstellt werden. Mit den Flächeneinheiten, sowie der Einwaagen und Verdünnungen der Proben wurden zusammen mit der Steigung und des Achsenabschnitts der Kalibrationskurve die Messwerte ermittelt ( $\mu\text{g/ml}$  für Plasmaproben und  $\mu\text{g/g}$  für Gewebeproben). Die Auswertung kann mit folgender Formel beschrieben werden:

$$\mu\text{g/ml bzw. } \mu\text{g/g} = \frac{(\text{Fläche}_{\text{Probe}} \times a + b) \times V_{\text{Probe}}}{E \text{ (g)}}$$

**Formel zur Berechnung der Probenkonzentrationen der mittels HPLC gemessenen Parameter.**

$\text{Fläche}_{\text{Probe}}$ = ermittelte Flächeneinheit der Probe; a= Steigung; b= Achsenabschnitt;  $V_{\text{Probe}}$ =

Verdünnung der Probe; E= Einwaage der Probe in Gramm



### 3.4.3 Bestimmung von Vitamin C

Die Konzentrationen des Vitamin C wurde im Plasma, der Leber und im frischen Schenkelmuskel gemessen. Für die Bestimmung wurden die Proben mit einem Reduktionsmittel versetzt, wodurch das bereits oxidierte Vitamin C wieder reduziert wurde und der Gesamtgehalt gemessen werden konnte.

Die verwendeten Reagenzien, Lösungen und Geräte zur Vitamin C-Analyse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Für die Messung der Konzentrationen des Vitamin C im Plasma wurde es direkt am Tag der Schlachtung weiter aufgearbeitet. Die Aufarbeitung erfolgte im Dunkeln, um eine Lichtexposition und damit provozierte Oxidation des Vitamin C in den Proben zu vermeiden.

Die Aufarbeitung im ersten Versuch erfolgte nach der Methode von Steffan (1999). Es wurden 500 µl Plasma mit 100 µl DTT-Lösung als Reduktionsmittel versetzt, 10 sec auf dem Vortexer gut vermischt und für 10 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden 600 µl Fällungsreagenz zugegeben, erneut 10 sec vermischt und bei 3000 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt und bei -80°C gelagert.

Im zweiten Versuch wurde das Plasma mit TCEP als Reduktionsmittel nach Sato et al. (2010) aufgearbeitet. Als erstes wurden 400 µl Plasma mit 400 µl 10% MPA/EDTA versetzt, 10 sec auf dem Vortexer vermischt und anschließend bei 21000 x g und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 90 µl mit 10 µl TCEP-Lösung versetzt, 2 Stunden auf Eis im Kühlschrank inkubiert und anschließend wurden 400 µl 5% MPA/EDTA zugegeben, wieder 10 sec vermischt und bei 20000 x g und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80°C gelagert.

**Tabelle 7:** Reagenzien, Lösungen und Geräte zur Vitamin C Analyse

|                                       |                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5% MPA/EDTA                           | 5 g MPA und 29,2 mg EDTA in 100 ml H <sub>2</sub> O MS gelöst                                                                                                                                                                                                 |
| 5,4% MPA/EDTA                         | 5,4 g MPA und 29,2 mg EDTA in 100 ml H <sub>2</sub> O MS gelöst                                                                                                                                                                                               |
| 6% PerChlorsäure                      | 8,6 g PerChlorsäure auf 100 g mit H <sub>2</sub> O MS aufgefüllt                                                                                                                                                                                              |
| 10% MPA/EDTA                          | 10 g MPA und 29,2 mg EDTA in 100 ml H <sub>2</sub> O MS gelöst                                                                                                                                                                                                |
| Dithiothreitol (DTT)                  | Carl Roth GmbH, Deutschland                                                                                                                                                                                                                                   |
| DTT-Lösung                            | In einem 25 ml Meßkolben 170 mg DTT in 20 ml isotonischer Kochsalzlösung gelöst und mit 1 mol/L Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung auf pH 7,0 bis pH 7,5 eingestellt. Durch Auffüllen mit isotonischer Kochsalzlösung entstand eine 6,8 g/L (0,044 mol/L) Lösung |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland                                                                                                                                                                                                                        |
| Fällungsreagenz                       | 3 g Meta-Phosphorsäure eingewogen und auf 60 g mit 6% Perchlorsäure aufgewogen                                                                                                                                                                                |
| Fließmittel für die HPLC              | 613 µg NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O in 800 ml H <sub>2</sub> O MS gelöst, mit ortho-Phosphorsäure auf pH 2,4 eingestellt und in einem 1L Messkolben auf Marke aufgefüllt, anschließend filtriert                                        |
| Heraeus Fresco 21 Centrifuge          | Thermo Fisher Scientific, Deutschland                                                                                                                                                                                                                         |
| Meta-Phosphorsäure (MPA)              | Merck Chemicals GmbH, Deutschland                                                                                                                                                                                                                             |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | Merck Chemicals GmbH, Deutschland                                                                                                                                                                                                                             |
| Perchlorsäure (70-72%)                | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland                                                                                                                                                                                                                        |
| Standard-Fällungsreagenz              | Fällungsreagenz mit H <sub>2</sub> O MS versetzt (1+1)                                                                                                                                                                                                        |
| TCEP-Lösung                           | 1 ml TCEP mit 430 µl H <sub>2</sub> O MS versetzt                                                                                                                                                                                                             |
| TissueLyser II                        | Qiagen GmbH, Deutschland                                                                                                                                                                                                                                      |
| Tris-(2-Carboxyethyl)-phosphin (TCEP) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland                                                                                                                                                                                                                        |
| Vitamin C (L-Ascorbic Acid 99%)       | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland                                                                                                                                                                                                                        |

Die Gewebeaufarbeitung für die Messung der Vitamin C-Konzentrationen ist ähnlich der für Plasma im zweiten Versuch und basiert auf Sato et al. (2010). Die Proben wurden allerdings nicht direkt am Tag der Schlachtung aufgearbeitet, sondern zu einem späteren Zeitpunkt kurz vor der Messung. Die Aufarbeitung war in beiden Versuchen identisch. Das Leber- bzw. Schenkelmuskelgewebe wurde leicht angetaut und die Proben aus dem Inneren des Gewebes entnommen. Es wurden 50 mg eingewogen und mit 700 µl 5,4% MPA/EDTA versetzt. Die Proben wurden dann für 3 min bei 30 Hz. im TissueLyser II homogenisiert, anschließend bei 21000 x g und 4°C für 10 min abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues Tube überführt.

Vom Überstand wurden 90 µl Überstand abgenommen, dann 10 µl TCEP-Lösung zugegeben und die Proben für 2 Stunden auf Eis im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden den Leberproben 900 µl und den Muskelproben 500 µl 5% MPA/EDTA zugegeben.

Die Messung erfolgte mittels HPLC mit nachgeschaltetem EC-Detektor. Zur Messung wurden die Plasmaproben im Dunkeln bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Plasma- und Gewebeproben nochmals bei 21000 x g und 4°C für 10 min abzentrifugiert und je 200 µl in Mikrovials abgefüllt.

Die Kalibrationskurven für die unterschiedlichen Gewebe wurden in ihrer Konzentration an die des Gewebes angepasst. Für Plasma im ersten Versuch wurde Vitamin C in Fällungsreagenz aufgenommen, sodass man eine Konzentration von 20 µg/ml erhielt. Durch weitere Verdünnung mit Fällungsreagenz konnten die einzelnen Standards der Kalibrationskurve erstellt werden. Diese wurden dann mit 100 µl DTT-Lösung je 500 µl Standard versetzt. Für das Plasma im zweiten Versuch, sowie die Gewebe in beiden Versuchen wurden Standardkurven mit TCEP erstellt. Hierzu wurde Vitamin C in 5% MPA/EDTA aufgenommen, sodass eine Konzentration von 1000 µg/ml entstand. Diese wurde weiter mit 5% MPA/EDTA verdünnt, um die einzelnen Standards zu erhalten. Diese wurden dann mit 25 µl TCEP-Lösung je 10 ml Standard versetzt.

Die Retentionszeiten, Kalibrationsbereiche und Wellenlängen der Messung können Tabelle 8, die technischen Daten und Einstellungen der HPLC Tabelle 9 entnommen werden.

**Tabelle 8:** Retentionszeiten, Kalibrationsbereiche und Wellenlängen für Vitamin C in der HPLC

|                  | <b>Retentionszeit</b> | <b>Kalibrationsbereiche</b> | <b>Wellenlängen</b> |
|------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------|
| Plasma Versuch 1 | 3,3 Min               | 1-15 µg/ml                  | 243 nm              |
| Plasma Versuch 2 | 3,3 Min               | 0,1-2 µg/ml                 | 243 nm              |
| Leber& Muskel    | 3,3 Min               | Leber: 1-4 µg/ml            | 243 nm              |
| Versuch 1&2      |                       | Muskel: 0,167-2 µg/ml       |                     |

**Tabelle 9:** Technische Daten und Einstellungen der HPLC zur Vitamin C-Analyse im Plasma und in Geweben

|                   | <b>Plasma</b>                | <b>Gewebe</b>                                         | <b>Plasma</b>                | <b>Gewebe</b>                |
|-------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                   | <b>Versuch 1</b>             | <b>Versuch 1</b>                                      | <b>Versuch 2</b>             | <b>Versuch 2</b>             |
| Pumpe             |                              | L-7100 (LaChrom)                                      |                              |                              |
| Säulenofen        |                              | Säule im ECD                                          |                              |                              |
| Autosampler       |                              | L-7200 (LaChrom)                                      |                              |                              |
| Detektor          |                              | EC-Detektor                                           |                              |                              |
| Auswertung        |                              | EZChrom Elite Version 3.3.1                           |                              |                              |
| Sättigungssäule   |                              | Lichrospher 100 RP-18 5µm; Lot. 58118817; No. 721447  |                              |                              |
| Säule             |                              | Lichrospher 100 RP-18 5µm; 250x4mm Merck 50983        |                              |                              |
| Vorsäule          |                              | RP18                                                  |                              |                              |
| Fließmittel       |                              | 20mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer, pH 2,4 |                              |                              |
| Probenschleife    | 100 µl                       | 100µl                                                 | 100µl                        | 100µl                        |
| Injektionsvolumen | 5 µl                         | 25µl                                                  | 25µl                         | 25µl                         |
| Durchfluss        | 1 & 1,2 ml/min               | 1ml/min                                               | 1 ml/min                     | 1 ml/min                     |
| Druck             | 195-300 bar                  | 195 bar                                               | 195 bar                      | 195 bar                      |
| Temp.Säulenofen   | 30 °C                        | 30°C                                                  | 30°C                         | 30°C                         |
| Analysezeit       | Std. 6 Min,<br>Proben 16 Min | Std. 6 Min,<br>Proben 8 Min.                          | Std. 6 Min,<br>Proben 8 Min. | Std. 6 Min,<br>Proben 8 Min. |

### 3.4.4 Bestimmung von Glutathion

Beim Glutathion wurde die Konzentration der reduzierten Form (GSH) gemessen. Da GSH im Blut in den Erythrozyten vorliegt, wurde die Menge an GSH im Vollblut gemessen und zur Standardisierung auf die Hämoglobinkonzentration bezogen.

Die Analyse wurde nach der Methode von Giustarini et al. (2013) durchgeführt. Das Vollblut und das Gewebe mussten noch am Tag der Schlachtung stabilisiert und am Tag der Messung weiter aufgearbeitet werden.

Die Reagenzien, Lösungen und Geräte zur GSH-Analyse sind Tabelle 10 zu entnehmen.

**Tabelle 10:** Reagenzien, Lösungen und Geräte zur GSH-Analyse

|                          |                                                                                                                                                                              |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2% SSA                   | 2% Sulfosalicylsäure in 15% MeOH                                                                                                                                             |
| 6% TCA                   | 6 g TCA in 100 ml H <sub>2</sub> O MS gelöst                                                                                                                                 |
| Acivin                   | Cayman Chemicals Company, Deutschland                                                                                                                                        |
| Borsäure                 | Merck Chemicals GmbH, Deutschland                                                                                                                                            |
| GSH                      | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland                                                                                                                                       |
| GSH-D3                   | Cambridge Isotope Laboratories, USA                                                                                                                                          |
| H <sub>2</sub> O/6%TCA   | Wasser und 6% TCA im Gemisch 90:10                                                                                                                                           |
| H <sub>2</sub> O/MeOH    | Wasser und Methanol im Gemisch 90:10                                                                                                                                         |
| L-Serin                  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland                                                                                                                                       |
| Methanol                 | Carl Roth GmbH, Deutschland                                                                                                                                                  |
| Natriumiodid (NaI)       | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland                                                                                                                                       |
| N-Ethymaleimid (NEM)     | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland                                                                                                                                       |
| NEM 310                  | 3,88 g NEM in 100 ml H <sub>2</sub> O MS gelöst                                                                                                                              |
| Sulfosalicylsäure (SSA)  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland                                                                                                                                       |
| TCA60                    | 60 g TCA in 100 ml H <sub>2</sub> O MS gelöst                                                                                                                                |
| Trichloressigsäure (TCA) | Carl Roth GmbH, Deutschland                                                                                                                                                  |
| Tris                     | Carl Roth GmbH, Deutschland                                                                                                                                                  |
| Tris-BSAN-Puffer         | 3,03 g TRIS, 0,62 g Borsäure, 105 mg Serin und 2 mg Acivin in 430 ml H <sub>2</sub> O mit 50 ml NEM310 gelöst und pH mit HCl auf 8 eingestellt. Danach auf 500 ml aufgefüllt |
| Wasserstoffperoxid       | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland                                                                                                                                       |

Am Tag der Schlachtung wurde ein Teil des Vollblutes nach Giustarini et al. (2013) mit NEM310 versetzt, um eine direkte Oxidation zu vermeiden und die Proben zu stabilisieren. Hierzu wurden 200 µl Vollblut mit 20 µl NEM310 versetzt, 5-mal geschwenkt, 1 min inkubiert und anschließend bei -80°C gelagert.

Für die Stabilisierung der Gewebeproben wurden diese am Tag der Schlachtung nach Giustarini et al. (2013) aufgearbeitet. Dazu wurden 50 mg des Gewebes (Leber und roher Schenkelmuskel) mit 500 µl eiskaltem Tris-BSAN-Puffer versetzt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 50 µl TCA60 zugegeben und die Probe wurde im TissueLyser II für 3 min bei 30Hz. homogenisiert. Hinterher bei 14000 x g und Raumtemperatur für 2 min abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Überstand wurde in ein Tube überführt und bei -80°C gelagert.

Auch bei dieser Analyse erfolgte die Berechnung über Kalibrationskurven. Dazu wurde GSH in Wasser gelöst und man erhielt die Stammlösungen mit der Konzentration 3,44mM. Der GSH-Standard musste zur Stabilisierung mit NEM versetzt werden, wobei das NEM mit einer Konzentration von 31mM im Standard vorlag.

Aus dieser Stammlösung wurden für Vollblut- und Gewebeproben unterschiedliche Kalibrations-Mix-Stämme angesetzt. Für die Vollblutproben wurden die Stammlösungen mit H<sub>2</sub>O/MeOH weiter auf die Konzentrationen 2995µM verdünnt. Aus diesem entstandenen Kalibrations-Mix-Stamm wurden dann durch weitere Verdünnung mit H<sub>2</sub>O/MeOH die einzelnen Standards der Kalibrationskurve erstellt. Die Standards wurden weiter behandelt wie die dazugehörigen Proben. Für die Gewebeproben wurden die Stammlösungen auf die Konzentrationen 1378µM mit Wasser verdünnt. Aus diesem Kalibrations-Mix-Stamm wurden die Standards durch weitere Verdünnung mit H<sub>2</sub>O/6%TCA erstellt. Auch hier wurden die Standards weiter behandelt wie die dazugehörigen Proben.

Für die Messungen der GSH-Konzentrationen wurde außerdem auch ein interner Standard eingesetzt, der den Proben und Standards zur Überprüfung dieser zugesetzt wurde. Der interne Standard, GSH-D3, wurde in Wasser gelöst, hatte eine Konzentration von 323,6µM und wurde zur Stabilisierung auch mit NEM versetzt (GSH-D3-NEM), welches mit einer Konzentration von 31mM vorlag. Vom internen Standard GSH-D3-NEM wurden dann den Proben und Standards 40µl direkt zugegeben.

Am Tag der Messung wurde das stabilisierte Vollblut im Dunkeln aufgetaut und 40 µl des Vollblutes mit 160 µl 2% SSA und dem internen Standard versetzt, auf dem Vortexer gut vermischt und für 5 min zur Proteinfällung auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben bei 21000 x g und 10°C für 10 min zentrifugiert und 200 µl des Überstandes in Mikrovials überführt. Auch die Gewebeproben wurden im Dunkeln aufgetaut, 50 µl der Probe mit dem internen Standard versetzt, auf dem Vortexer gut vermischt und bei 21000 x g und 10°C für 10 min abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 90 µl in Microvials überführt.

Die Messung der GSH-Konzentrationen erfolgte mittels HPLC-MS. Die technischen Daten und Einstellungen sind Tabelle 11 zu entnehmen.

**Tabelle 11:** Technische Daten und Einstellungen der HPLC zur GSH/GSSG-Bestimmung in Vollblut und Gewebe

| Parameter         | Gerät/ Einstellung                                |
|-------------------|---------------------------------------------------|
| Pumpen            | L2160U Binäres Pumpensystem<br>L-6000 HPLC-Pumpe  |
| Säulenofen        | L-2300 Säulenthmostat                             |
| Autosampler       | L2200U Autosampler                                |
| Organizer         | Organiser LaChromItra                             |
| MS-System         | MS/MS 3200 Qtrap                                  |
| Auswertung        | Software Analyst 1.5.1                            |
| Säule             | Agilent Zorbax SB-C18 Säule 100 x 3 mm, 3,5µm     |
| Vorsäule          | Phenomenx RP18 4 x 3 mm                           |
| Fließmittel       | A= 10% MeOH in Ameisensäure (0,1%)<br>B= Methanol |
| Injektionsvolumen | 2 µl (GSH-NEM)                                    |
| Durchfluss        | 0,6 ml/min                                        |
| Druck             | 154bar                                            |
| Temp.Säulenofen   | 30°C                                              |
| Retentionszeit    | GSH-NEM1: 2,5 Min<br>GSH-NEM2: 3 Min              |

### 3.4.5 Bestimmung von Tocopherol

Beim Tocopherol wurden die Konzentrationen der  $\alpha$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Isomere in Plasma, Leber und rohem Schenkelmuskel gemessen. Die Konzentration von  $\delta$ -Tocopherol lag aber weit unter der Kalibrationskurve und wurde daher vernachlässigt. Für das Gesamttocopherol wurden  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol addiert. Auf Grund der lipophilen Eigenschaften ist das Tocopherol im Plasma mit Lipoproteinen assoziiert. Die darin enthaltenen Triglyceride sind somit eine geeignete Bezugsgröße, um die Tocopherolkonzentration darzustellen.

Die Messung in Plasma und Leber erfolgte nach der Methode von Zeitz et al. (2016), für die Messung im rohen Schenkelmuskelgewebe wurde diese Methode leicht modifiziert. Sie beruht auf einer Verseifung der Fette, mit dem darin gebundenen, fettlöslichen Tocopherol, gefolgt von einer Extraktion durch Hexan.

Die zur Aufarbeitung und Messung des Tocopherols verwendeten Reagenzien, Lösungen und Geräte sind Tabelle 12 zu entnehmen.

**Tabelle 12:** Reagenzien, Lösungen und Geräte zur Tocopherol-Analyse

|                                       |                                             |
|---------------------------------------|---------------------------------------------|
| $\alpha$ -Tocopherol                  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland      |
| $\delta$ -Tocopherol                  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland      |
| $\gamma$ -Tocopherol                  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland      |
| Butylhydroxytoluol (BHT)              | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland      |
| Ethanol 99,8%                         | Carl Roth GmbH, Deutschland                 |
| Ethanol-Pyrogallol-Gemisch (EOH/Pyro) | 1 g Pyrogallol in 100 ml Ethanol gelöst     |
| NaOH (gesättigte Lösung)              | NaOH im Überschuss in bidest. Wasser gelöst |
| Heraeus Labofuge 400R                 | Thermo Fisher Scientific, Deutschland       |
| Hexan                                 | Carl Roth GmbH, Deutschland                 |
| MeOH/BHT                              | 0,05 g BHT in 100 ml Methanol gelöst        |
| Pyrogallol                            | Merck Chemicals GmbH, Deutschland           |
| Retinol                               | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland      |
| Stickstoffverdampfer Typ: 6201        | Liebisch Labortechnik, Deutschland          |
| Thermoblock „Accu Block“              | Labnet International, USA                   |



Die gesamte Aufarbeitung der Proben zur Messung der Tocopherolkonzentrationen wurde im Dunkeln durchgeführt, um eine provozierte Oxidation zu vermeiden.

Das Plasma konnte nach langsamem Auftauen bei Raumtemperatur verwendet werden. Die Gewebeproben wurde leicht angetaut und die Proben aus der Mitte entnommen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte bei Plasma und Gewebe gleich.

Nach dem Einpipettieren bzw. Einwiegen der Proben in Glasröhrchen wurden den Proben ein Ethanol/Pyrogallol-Gemisch und gesättigte NaOH zugegeben, um die Proteine auszufällen. Anschließend wurden die Röhrchen mit Stickstoff begast, gut verschlossen und auf dem Vortexer vermischt. Anschließend verseiften sie im Thermoblock für 30 min bei 70°C. Nach dem Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur, wurden sie mit Hexan und bidest. Wasser versetzt, bevor sie nochmals auf dem Vortexer kräftig vermischt und dann bei 1000 x g und 10°C für 5 min abzentrifugiert wurden. Danach wurden die Proben im Dunkeln wieder auf Raumtemperatur gebracht und Aliquote direkt abgefüllt. Diese wurden bis zur Messung bei -20°C gelagert.

Zur Analyse wurden die Proben am Messtag bei Raumtemperatur aufgetaut, mit dem Stickstoffverdampfer bei 37°C abgedampft, in MeOH/BHT aufgenommen und gut auf dem Vortexer vermischt. Für die Messung wurden 200µl in Microvials überführt. Die genau verwendeten Mengen der Aufarbeitung sind Tabelle13 zu entnehmen.

**Tabelle 13:** Pipettierschema für die Tocopherol-Analyse in Plasma und in Geweben

| Probe         | Einwaage<br>g oder ml | Zugabe   |      |       | Zugabe |         | Auf-         |
|---------------|-----------------------|----------|------|-------|--------|---------|--------------|
|               |                       | EOH/Pyro | NaOH | Hexan | Bidest | Abnahme | nahme        |
|               |                       | ml       | µl   | ml    | Wasser | Hexan   | MeOH/<br>BHT |
|               |                       |          |      |       | ml     | ml      | ml           |
| Broilerplasma | 0,2                   | 2        | 300  | 2     | 2      | 0,4     | 0,3          |
| Broilerleber  | 0,05                  | 2        | 300  | 2     | 2      | 0,1     | 0,5          |
| Broilerleber  | 0,1                   | 2        | 300  | 2     | 2      | 0,1     | 0,4          |
| Broilermuskel | 0,15                  | 2        | 300  | 2     | 2      | 0,5     | 0,25         |

Zum Erstellen der Kalibrationskurven wurden die Einzelstandards in MeOH/BHT gelöst und es wurde ein Mix-Standard erstellt, in dem alle Standards vorhanden waren. Aus

diesem wurden mit unterschiedlichen Verdünnungen mit MeOH/BHT die einzelnen, den Proben angepassten Standards hergestellt.

Die Messung erfolgte mittels HPLC mit nachgeschaltetem Fluoreszenz-Detektor. Die Retentionszeiten und Kalibrationsbereiche sind Tabelle 14, die technischen Daten und Geräteeinstellungen für die Messung Tabelle 15 zu entnehmen.

**Tabelle 14:** Retentionszeiten und Kalibrationsbereiche für Tocopherol in der HPLC

|              | Retentionszeiten | Kalibrationsbereiche | Wellenlängen |
|--------------|------------------|----------------------|--------------|
| δ-Tocopherol | 4,4 Min          | -*                   | 295 nm       |
| γ-Tocopherol | 5,1 Min          | 0,008-0,33 µg/ml     | 295 nm       |
| α-Tocopherol | 5,9 Min          | 0,05-2,09µg/ml       | 295 nm       |

\*Die Werte von δ-Tocopherol waren sehr niedrig und konnten nicht gemessen werden. Sie werden daher vernachlässigt.

**Tabelle 15:** Technische Daten und Einstellungen der HPLC zur Tocopherolbestimmung in Plasma und in Geweben

| Parameter         | Gerät/ Einstellung                                    |
|-------------------|-------------------------------------------------------|
| Pumpe             | L-7100 (LaChrom)                                      |
| Säulenofen        | L-7360 (LaChrom)                                      |
| Autosampler       | L-7200 (LaChrom)                                      |
| Detektoren        | Fluorescence Detector L-7485 (LaChrom)                |
| Auswertung        | EZChrom Elite Version 3.3.1                           |
| Säule             | Phenomenex Luna 5u C18(2); 150*4,6mm (S/No 681886-19) |
| Vorsäule          | Merck RP 18                                           |
| Fließmittel       | MeOH:H <sub>2</sub> O (98:2)                          |
| Probenschleife    | 50 µl                                                 |
| Injektionsvolumen | 50µl                                                  |
| Durchfluss        | 1,5 ml/min                                            |
| Druck             | 70 bar                                                |
| Temp. Säulenofen  | 40 °C                                                 |
| Analysenzeit      | 7,6 min                                               |

### 3.4.6 Bestimmung der TBARS

Die Konzentrationen der Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) wurden in Plasma, Leber, rohem und erhitztem Schenkelmuskel gemessen.

Die Methode beruht auf der Entstehung von Malondialdehyd (MDA) als Produkt der Lipidperoxidation. Dieses MDA bildet zusammen mit Thiobarbitursäure ein fluoreszierendes Derivat, welches photometrisch nachgewiesen werden kann und somit als Nachweis der Lipidperoxidation dient. Die Bestimmung basiert auf der Grundlage von Zeitz et al. (2018) und wurde für das Muskelgewebe angepasst.

Genauso wie das Tocopherol sind die TBARS im Plasma mit Lipoproteinen assoziiert und die Triglyzeride bieten auch hier eine geeignete Bezugsgröße.

Die zur Aufarbeitung und Messung der TBARS-Konzentrationen verwendeten Reagenzien, Lösungen und Geräte sind Tabelle 16 zu entnehmen.

Das Plasma wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und konnte direkt verwendet werden, das Gewebe musste weiter aufgearbeitet werden. Das Leber- und Schenkelmuskelgewebe wurde leicht angetaut, aus der Mitte die Probe von 50 mg in ein 2 ml-Tube eingewogen und mit 500  $\mu$ l Tris-HCl-Puffer und einer Homogenisierungskugel versetzt. Die Tubes wurden mit Stickstoff begast und für 6 min bei 20 Hz. im TissueLyser II homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 500 x g und 2°C für 10 min konnte der Überstand abgenommen und als Probenextrakt zur Messung verwendet werden.

Die TBARS-Konzentrationen wurden anhand einer Kalibrationskurve aus 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (TEP) berechnet. Zum Erstellen dieser Kurve wurde aus TEP mit EOH/H<sub>2</sub>O die Stammlösung A (8,0245mM) angesetzt. Diese Stammlösung A wurde weiter mit EOH/H<sub>2</sub>O verdünnt und man erhielt die Stammlösung B (120,37 $\mu$ M). Durch weitere Verdünnung der Stammlösung B mit EOH/H<sub>2</sub>O konnte die Kalibrationskurve mit 7 Standards erstellt werden (siehe Tabelle 17). Als Blindwert diente reines EOH/H<sub>2</sub>O.

**Tabelle 16:** Reagenzien, Lösungen und Geräte zur TBARS-Analyse

|                                           |                                                                                                                   |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0,44 mol/L H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | 10 ml ortho-Phosphorsäure mit bidest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt                                               |
| 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (TEP)          | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland                                                                            |
| µClear® Mikroplatte 96 Well schwarz       | Greiner bio-One GmbH, Deutschland                                                                                 |
| EOH/H <sub>2</sub> O                      | 410 ml Ethanol mit bidest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt                                                          |
| Methanolisches NaOH                       | 9 ml 1M NaOH mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt                                                                   |
| Natriumhydroxid (NaOH)                    | Merck Chemicals GmbH, Deutschland                                                                                 |
| ortho-Phosphorsäure (85%)                 | Carl Roth GmbH, Deutschland                                                                                       |
| Stammlösung A (8,0245 mM)                 | 50 µl TEP mit EOH/H <sub>2</sub> O auf 25 ml aufgefüllt                                                           |
| Stammlösung B (120,37 µM)                 | 300 µl von Stammlösung A mit EOH/H <sub>2</sub> O auf 20 ml aufgefüllt                                            |
| Thiobarbitursäure (TBA)                   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland                                                                            |
| TBA-Reagenz 0,6%                          | 0,12 g TBA in 10 ml bidest Wasser gelöst und auf 20 ml aufgefüllt                                                 |
| Tecan infinite M200                       | Tecan Austria GmbH, Österreich                                                                                    |
| Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)              | Carl Roth GmbH, Deutschland                                                                                       |
| Tris-HCl-Puffer                           | 1,576 g Tris-HCl in 900 ml bidest. Wasser gelöst, mit 7,5 M KOH auf pH 7,4 eingestellt und auf 1000 ml aufgefüllt |
| Wasserbad Typ 1083                        | Gesellschaft für Labortechnik mbH, Deutschland                                                                    |

**Tabelle 17:** Pipettierschema zur Herstellung der Standards für die Kalibrationskurve zur TBARS-Analyse

| Standard | µl Stammlösung B in 10 ml<br>EOH/H <sub>2</sub> O | c (nmol/ml) |
|----------|---------------------------------------------------|-------------|
| 1        | 50                                                | 0,60        |
| 2        | 100                                               | 1,20        |
| 3        | 200                                               | 2,41        |
| 4        | 400                                               | 4,82        |
| 5        | 600                                               | 7,22        |
| 6        | 1000                                              | 12,03       |
| 7        | 1200                                              | 14,4        |

Die Standards wurden für das Plasma bzw. das Gewebe angepasst und zusammen mit diesen nach dem Schema in den Tabellen 18 und 19 in 2 ml-Tubes einpipettiert. Die Standards wurden weiter identisch zu den Proben behandelt.

Nach gutem Vermischen auf dem Vortexer inkubierten die Tubes für 60 min im Wasserbad bei 100°C, bevor sie direkt auf Eis abkühlten (10 min), um die Reaktion zu stoppen. Anschließend wurden jedem Tube 750 µl methanolisches NaOH zugegeben, um die Proteine auszufällen. Die Tubes wurden nochmal vermischt und bei 1500 x g und 10°C für 10 min zentrifugiert. Danach wurden 300µl der Proben und Standards in Doppelbestimmung in die µClear® Wellplatten pipettiert und im Tecan infinite M200 gemessen. Die Standards wurden bei jeder Messung mitgemessen und die TBARS-Konzentrationen konnten so anhand der Emission der entsprechenden Kalibrationskurve und der Emissionen der Proben berechnet werden. Die Einstellungen des Tecan infinite M200 sind Tabelle 20 zu entnehmen.

**Tabelle 18:** Pipettierschema zur TBARS-Analyse im Plasma und in der Leber

|                                        | <b>Probe<br/>Plasma</b> | <b>Standard<br/>Plasma</b> | <b>Probe<br/>Leber</b> | <b>Standard<br/>Leber</b> |
|----------------------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------|---------------------------|
| Probe                                  | 50µl                    | -                          | 25µl                   | -                         |
| Standard 1-7                           | -                       | 50µl                       | -                      | 25µl                      |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (0,44M) | 375µl                   | 375µl                      | 375µl                  | 375µl                     |
| Bidest Wasser                          | 225µl                   | 225µl                      | 225µl                  | 225µl                     |
| TBA-Reagenz                            | 125µl                   | 125µl                      | 125µl                  | 125µl                     |

**Tabelle 19:** Pipettierschema zur TBARS-Analyse im rohen und erhitzten Schenkelmuskel

|                                        | <b>Probe<br/>Muskel<br/>roh</b> | <b>Standard<br/>Muskel<br/>roh</b> | <b>Probe<br/>Muskel<br/>erhitzt</b> | <b>Standard<br/>Muskel<br/>erhitzt</b> |
|----------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|
| Probe                                  | 300µl                           | -                                  | 50µl                                | -                                      |
| Standard 1-7                           | -                               | 25µl                               | -                                   | 50µl                                   |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (0,44M) | 375µl                           | 375µl                              | 375µl                               | 375µl                                  |
| Bidest Wasser                          | 225µl                           | 500µl*                             | 225µl                               | 225µl                                  |
| TBA-Reagenz                            | 125µl                           | 125µl                              | 125µl                               | 125µl                                  |

\* Da in den rohen Schenkelmuskelpuben sehr geringe Mengen an TBARS vorhanden waren, wurde eine größere Probenmenge verwendet. Da die Gesamtmenge von Probe/Standard und bidest Wasser in Proben- und Standardansatz gleich sein muss, ist die Menge an bidest Wasser entsprechend angepasst worden.

**Tabelle 20:** Geräteeinstellung Tecan infinite M200 zur TBARS-Analyse

| <b>Parameter</b>       | <b>Einstellungen</b>                    |
|------------------------|-----------------------------------------|
| Programm               | Tecan i-control                         |
| Platte                 | Greiner 96 Flat Bottom Black Polysterol |
| Modus                  | Fluoreszenz Messung von unten           |
| Exzitationswellenlänge | 532nm                                   |
| Emissionswellenlänge   | 560nm                                   |
| Exzitationsbreite      | 9nm                                     |
| Emissionsbreite        | 20nm                                    |
| Verstärkung            | 100 Manuell                             |
| Anzahl der Blitze      | 15                                      |
| Integrationszeit       | 20µs                                    |
| Verzögerungszeit       | 2µs                                     |
| Ruhezeit               | 0ms                                     |

### 3.4.7 Bestimmung der Triglyceride

Die Konzentrationen der Triglyceride (TG) wurden in Plasma, Leber und rohem Schenkelmuskel gemessen.

Zur Messung im Plasma und vorher aufgearbeitetem Gewebe nach Zeitz et al. (2018) wurde das Fluitest® TG-Kit verwendet. Das Reagenz des Fluitest® TG-Kits bildet zusammen mit dem TG der Probe einen roten Farbkomplex, der photometrisch nachzuweisen war.

Anhand der Extinktionswerte der Proben und des Standards, der als Standardlösung im Kit enthalten war, konnte die TG-Konzentration im Plasma über unten dargestellte Formeln berechnet werden. Für Gewebe musste die verwendete Menge Extraktionsmittel, sowie die Einwaage und die verwendete Menge der Probe berücksichtigt und die Formel angepasst werden.

$$\text{TG (mg/ml)} = \frac{\Delta\text{Ex}_{\text{Probe}} \times \text{C}_{\text{Std}}}{\Delta\text{Ex}_{\text{Std}}}$$

**Formel zur Berechnung des TG-Gehaltes in Plasma.**  $\Delta\text{Ex}_{\text{Probe}}$  = Extinktion der Probe;  $\text{C}_{\text{Std}}$  = Konzentration des Standards ( $\mu\text{g}$ );  $\Delta\text{Ex}_{\text{Std}}$  = Extinktion des Standards

$$\text{TG (mg/g)} = \frac{\Delta\text{Ex}_{\text{Probe}} \times \text{C}_{\text{Std}} \times V}{\Delta\text{Ex}_{\text{Std}} \times E \times V_{\text{Probe}} \times 1000}$$

**Formel zur Berechnung des TG-Gehaltes im Gewebe.**  $\Delta\text{Ex}_{\text{Probe}}$  = Extinktion der Probe;  $\text{C}_{\text{Std}}$  = Konzentration des Standards ( $\mu\text{g}$ );  $V$  = verwendete Menge an Extraktionsmittel ( $\mu\text{l}$ );  $\Delta\text{Ex}_{\text{Std}}$  = Extinktion des Standards;  $E$  = Einwaage (g);  $V_{\text{Probe}}$  = Verwendete Menge der Probe ( $\mu\text{l}$ )

Die verwendeten Reagenzien, Lösungen und Geräte zur TG-Analyse sind in Tabelle 21 dargestellt.

Die Plasmaproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und wurden laut Kit-Anleitung gemessen. Proben, Standards und Blindwert wurden in 1,5 ml-Tubes einpipettiert und die Fluitest®TG Reagenz dazugegeben. Die genauen Mengen sind Tabelle 22 zu entnehmen.

**Tabelle 21:** Reagenzien, Lösungen und Geräte zur TG-Analyse

|                                          |                                                        |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Cary® 50 Bio UV-Visible                  | Varian GmbH, Deutschland                               |
| Chloroform                               | Carl Roth GmbH, Deutschland                            |
| Fluitest TG-Kit (5741)                   | Analyticon Biotechnologies AG, Deutschland             |
| Halbmikroküvetten Typ: 67.742            | Sarstedt AG & Co., Deutschland                         |
| Hexan:Isopropanol (HIP)                  | Hexan und Isopropanol im Verhältnis 3:2 gemischt       |
| Isopropanol                              | Merck Chemicals GmbH, Deutschland                      |
| Stickstoffverdampfer Typ: 6201           | Liebisch Labortechnik, Deutschland                     |
| Triton-X 100                             | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland                 |
| Triton-X 100/Chloroform                  | Triton-X 100 und Chloroform im Verhältnis 1:1 gemischt |
| Zentrifugalverdampfer, Concentrator Plus | Eppendorf, Deutschland                                 |

**Tabelle 22:** Pipettierschema zur TG-Analyse im Plasma

|                     | Probe | Std. 1 | Std. 2 | Std. 3 | Blindwert |
|---------------------|-------|--------|--------|--------|-----------|
| Plasma              | 20µl  | -      | -      | -      | -         |
| Standardlösung      | -     | 20µl   | 10µl   | 5µl    | -         |
| Fluitest®TG Reagenz | 500µl | 500µl  | 510µl  | 515µl  | 500µl     |

Für die Aufarbeitung des Gewebes wurden 75 mg Leber bzw. roher Schenkelmuskel in ein 2 ml-Tube eingewogen und 1,5 ml Hexan:Isopropanol (HIP) nach Hara und Radin (1978) dazugegeben. Anschließend wurde das Gewebe im TissueLyser II für 3 min bei 30 Hz. homogenisiert und im Dunkeln für 18 Stunden extrahiert. Danach wurden die Proben bei 1900 x g und 15°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand, welcher den Probenextrakt darstellt, abgenommen. Probenextrakt, Standards und HIP als Blindwert wurden in 1,5 ml-Tubes pipettiert, die Mengen sind Tabelle 23 zu entnehmen.

Nach dem Einpipettieren wurde das HIP im Stickstoffverdampfer bei 37°C für 8 min abgedampft, anschließend 25 µl Triton-X 100/Chloroform dazugegeben und auf dem Vortexer gut vermischt. Die Tubes dampften für 18 Stunden bei Raumtemperatur unter dem Abzug ab und kamen anschließend, zum vollständigen Verdampfen des



Chloroforms, für 1 Stunde bei 45°C in den Zentrifugalverdampfer. Nachdem die Proben wieder auf Raumtemperatur gekommen waren, konnte ihnen die Fluitest®TG Reagenz (Menge siehe Tabelle 23) zugegeben und die Proben gemessen werden.

**Tabelle 23:** Pipettierschema zur TG-Analyse im Gewebe

|                     | Probe  | Std. 1 | Std. 2 | Std. 3   | Blindwert |
|---------------------|--------|--------|--------|----------|-----------|
| Extrakt             | 30µl   | -      | -      | -        | -         |
| Standardlösung      | -      | 10µl   | 5µl    | 2,5µl    | -         |
| HIP                 | -      | -      | -      | -        | 30µl      |
| Fluitest®TG Reagenz | 1000µL | 1000µL | 1005µL | 1007,5µL | 1000µL    |

Nach dem Zugabe der Fluitest®TG Reagenz wurden alle Proben auf dem Vortexer gut vermischt und anschließend die Plasmaproben für 5 min, die Gewebeproben für 15 min bei 37°C im Thermoblock inkubiert, bevor sie erneut kurz aufgeschüttelt, in Halbmikroküvetten umgefüllt und bei 500 nm im Cary® 50 gemessen wurden.

### **3.4.8 Bestimmung der Cholesterol-Oxidations-Produkte (COPs) und Phytosterol-Oxidations-Produkte (POPs)**

Die Menge der Oxidationsprodukte von Cholesterol und Phytosterolen ist abhängig von ihren Ausgangsstoffen. Daher wurden auch Cholesterol und die Phytosterole Campesterol und Sitosterol gemessen. Damit standen anschließend die Absolut- und die Relativwerte der COPs und POPs zur Verfügung.

Es wurden jeweils die 7β-Hydroxy- und 7-Keto-Oxidationsprodukte gemessen, da sie die wichtigsten Produkte in Bezug auf den oxidativen Stress und die Autoxidation sind. Daneben wurde auch das 7α-Hydroxyprodukt gemessen. Es entsteht neben der Autoxidation auch durch enzymatische Oxidation, ist aber dennoch eins der wichtigsten Oxidationsprodukte der COPs und POPs.

Zusätzlich zu den oben genannten Phytosterolen wurden noch die Phytosterole Campestanol, Stigmasterol und Sitostanol gemessen.

Die Messungen der Cholesterol-Oxidations-Produkte (COPs) und der Phytosterol-Oxidations-Produkte (POPs) wurden von einem externen Labor durchgeführt. Die Messung erfolgte am Universitätsklinikum Bonn durch die AG von Herrn Prof. Dr. Dr. rer. nat. Dieter Lütjohann am Institut für klinische Chemie und klinische Pharmakologie– Labor für spezielle Lipiddiagnostik, Sigmund-Freud-Str. 25, 53127 Bonn.

Die Konzentrationen von Cholesterol, Phytosterolen, COPs und POPs wurden im erhitzten Schenkelmuskel gemessen. Die Aufarbeitung und Messung der Konzentrationen von Phytosterolen, COPs und POPs erfolgte nach Husche et al. (2011) und Schött et al. (2017) mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie im vakuumgetrockneten Muskel. Die Konzentrationen des Cholesterols wurden mit Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektor nach Šošić-Jurjević et al. (2019) gemessen.

### 3.5 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden mit dem Programm Minitab (13.1, Minitab, State College, PA, USA) ausgewertet. Die Daten wurden auf Normalverteilung geprüft. Bei quantitativen, normalverteilten Merkmalen wurden der arithmetische Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) dargestellt. Bei rechtsschiefer Verteilung positiver, quantitativer Merkmale wurde eine logarithmische Transformation der Daten durchgeführt und die Datenbeschreibung mit Hilfe vom geometrischen Mittelwert (geom. MW) und Streufaktor (SF) dargestellt, in Form von Intervallen (geom. MW x SF bzw. geom. MW / SF). Die Daten wurden für die Darstellung in den Tabellen wieder entlogarithmiert.

Die Behandlungseffekte wurden durch eine Varianzanalyse (ONEWAY) mit der Gruppe als Faktor ausgewertet. Der Mittelwertvergleich der drei Gruppen wurde mit Hilfe des Fisher's multiple range test durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert  $<0,05$  anerkannt.

Weiterhin wurden Korrelationen zwischen den Konzentrationen von GSH und Vitamin C im rohen Schenkelmuskel und den Konzentrationen von COPs und POPs im erhitzten Schenkelmuskel berechnet. Die Korrelationsanalyse wurde mit dem linear regression tool von Minitab durchgeführt.

#### **4. Eigene Publikation**

Ein Teil der Daten des zweiten Versuchs der Promotionsschrift wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Zeitz JO, Ehbrecht T, Fleischmann A, Most E, Gessner DK, Friedrichs S, Sparenberg M, Failing K, Whelan R, Lütjohann D, Eder K (2020): Effect of DL-Methionine Supplementation on Tissue and Plasma Antioxidant Status and Concentrations of Oxidation Products of Cholesterol and Phytosterols in Heat-Processed Thigh Muscle of Broilers. *Animals* 10: 2050

## 5. Ergebnisse

Da die beiden Versuche nacheinander und nicht parallel durchgeführt wurden, wurden sie auch getrennt voneinander ausgewertet und kein statistischer Vergleich zwischen den Versuchen durchgeführt.

### 5.1 Leistungen und Schlachtkörper Charakteristika

Während der laufenden Versuche wurden die Leistungsdaten anhand verschiedener Parameter aufgezeichnet. Hierzu zählten die Anfangs- und Endmasse, sowie die daraus errechnete Zunahme. Zusätzlich wurde die Futteraufnahme während beider Versuche registriert. Aus dem Quotienten der Futteraufnahme und der Zunahme konnte die Futterverwertung berechnet werden.

Zu den Schlachtkörper Charakteristika zählten die Schlachtkörpermasse sowie die prozentuelle Ausschachtung, die aus Schlachtkörpermasse und Endmasse berechnet wurde. Außerdem wurden die Massen der Brustmuskeln, der Schenkelmuskeln und der Leber, prozentual auf die Endmasse bezogen, dargestellt und ausgewertet.

Zur besseren Übersicht sind erst die Ergebnisse aus dem ersten Versuch im Ganzen dargestellt und danach die Ergebnisse des zweiten Versuchs.

#### 5.1.1 Versuch 1

Bei der Einstellung wurde darauf geachtet, dass die Tiere aller Gruppen und Käfige eine durchschnittlich gleiche Startmasse hatten (im ersten Versuch  $45,8 \text{ g} \pm 0,3 \text{ g}$ ).

Bei den Leistungsdaten und den Schlachtkörper Charakteristika konnten im ersten Versuch keine Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen gezeigt werden (Tabelle 24).

**Tabelle 24:** Leistungsdaten und Schlachtkörper Charakteristika der Broiler des ersten Versuchs, die entweder mit einer Kontrolldiät (CON) oder mit einer Diät mit niedriger (DLM 1) oder hoher (DLM 2) Zulage an DL-Methionin gefüttert wurden<sup>1</sup>

|                                       | Gruppe      |             |             |
|---------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                                       | CON         | DLM 1       | DLM 2       |
| <b>Leistungsdaten</b>                 |             |             |             |
| Anfangsmasse, g                       | 46,0 ± 0,3  | 45,6 ± 0,5  | 45,9 ± 0,1  |
| Endmasse, g                           | 2560 ± 75,0 | 2583 ± 106  | 2413 ± 221  |
| Zunahme, g                            | 2514 ± 75,5 | 2537 ± 107  | 2367 ± 221  |
| Futterraufnahme, g                    | 3570 ± 116  | 3553 ± 169  | 3294 ± 286  |
| Futterverwertung, g/g                 | 1,42 ± 0,01 | 1,40 ± 0,02 | 1,40 ± 0,03 |
| <b>Schlachtkörper Charakteristika</b> |             |             |             |
| Schlachtkörpermasse, g                | 1965 ± 51   | 1938 ± 97   | 1898 ± 97   |
| Ausschlachtung, %                     | 73,2 ± 1,4  | 72,5 ± 1,9  | 72,5 ± 1,5  |
| Brustmuskel, % der LM                 | 24,7 ± 0,9  | 23,7 ± 1,8  | 24,0 ± 1,7  |
| Schenkelmuskel, % der LM              | 18,8 ± 0,3  | 19,1 ± 1,0  | 18,9 ± 1,1  |
| Leber, % der LM                       | 1,78 ± 0,19 | 1,89 ± 0,18 | 1,76 ± 0,16 |

<sup>1</sup>Es wird der Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt, n= 3 Käfige pro Gruppe für die Leistungen, n=12 Tiere pro Gruppe für die Schlachtkörper Charakteristika;

LM= Lebendmasse

## 5.1.2 Versuch 2

Auch hier wurde bei der Einstellung darauf geachtet, dass die Tiere aller Gruppen und Käfige eine durchschnittlich gleiche Startmasse hatten (40,7 g ± 0,6 g).

Im zweiten Versuch konnten bei den Leistungsdaten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede innerhalb der drei Versuchsgruppen gezeigt werden (Tabelle 25).

Wie auch schon im ersten Versuch konnten für die Daten der Schlachtkörper Charakteristika des zweiten Versuchs keine Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen gezeigt werden (Tabelle 25).

**Tabelle 25:** Leistungsdaten und Schlachtkörper Charakteristika der Broiler des zweiten Versuchs, die entweder mit einer Kontrolldiät (CON) oder mit einer Diät mit niedriger (DLM 1) oder hoher (DLM 2) Zulage an DL-Methionin gefüttert wurden<sup>1</sup>

|                                       | Gruppe      |             |             |
|---------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                                       | CON         | DLM 1       | DLM 2       |
| <b>Leistungsdaten</b>                 |             |             |             |
| Anfangsmasse, g                       | 40,5 ± 0,3  | 40,7 ± 0,6  | 40,8 ± 0,8  |
| Endmasse, g                           | 2587 ± 16   | 2551 ± 88   | 2512 ± 94   |
| Zunahme, g                            | 2546 ± 17   | 2510 ± 88   | 2471 ± 95   |
| Futtermassenaufnahme, g               | 3787 ± 73,2 | 3720 ± 51,9 | 3703 ± 158  |
| Futterverwertung, g/g                 | 1,48 ± 0,04 | 1,48 ± 0,04 | 1,50 ± 0,01 |
| <b>Schlachtkörper Charakteristika</b> |             |             |             |
| Schlachtkörpermasse, g                | 1911 ± 100  | 1900 ± 106  | 1858 ± 70,8 |
| Ausschlachtung, %                     | 73,3 ± 1,4  | 73,6 ± 2,5  | 73,4 ± 1,8  |
| Brustmuskel, % der LM                 | 22,7 ± 1,57 | 22,2 ± 1,08 | 22,3 ± 156  |
| Schenkelmuskel, % der LM              | 19,1 ± 0,7  | 20,5 ± 1,7  | 19,8 ± 0,8  |
| Leber, % der LM                       | 1,97 ± 0,20 | 1,96 ± 0,25 | 1,86 ± 0,13 |

<sup>1</sup>Es wird der Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt, n= 3 Käfige pro Gruppe für die Leistungen, n=12 Tiere pro Gruppe für die Schlachtkörper Charakteristika;  
LM= Lebendmasse

## 5.2 Antioxidativer Status

Zur Beurteilung des antioxidativen Status der Broiler wurden die Konzentrationen unterschiedlicher, nicht enzymatischer Antioxidantien und von Oxidationsprodukten im Plasma bzw. Blut und verschiedenen Geweben gemessen. Dazu gehörten die Antioxidantien Vitamin C, Tocopherol und Glutathion, sowie die Oxidationsprodukte TBARS, COPs und POPs, wovon die beiden letzten nur im zweiten Versuch im erhitzten Schenkelmuskel bestimmt wurden. Außerdem wurden die Korrelationen zwischen den Antioxidantien GSH und Vitamin C und den COPs und POPs ermittelt.

### 5.2.1 Versuch 1

Im ersten Versuch zeigten die Konzentrationen der Parameter Vitamin C, Tocopherol und TBARS im Plasma zwischen den drei Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede. Auch die GSH-Konzentration im Vollblut zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Versuchsgruppen (Tabelle 26).

Bei den Analysen aus dem Lebergewebe zeigte sich die Konzentration des Vitamin C in der Gruppe DLM 2 signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Konzentration der Gruppe DLM 1 unterschied sich nicht signifikant von den anderen beiden Gruppen. Beim Tocopherol waren die Konzentrationen der Gruppen DLM 1 und DLM 2 nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe (Tabelle 26).

Die GSH-Konzentration in der Leber stieg mit der Methioninzulage im Futter. Die GSH-Konzentrationen in den Gruppen DLM 1 und DLM 2 waren signifikant höher als die GSH-Konzentration der Kontrollgruppe (Tabelle 26).

Bei den TBARS in der Leber zeigte die Gruppe DLM 1 eine signifikant niedrigere Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Gruppe DLM 2 unterschied sich nicht signifikant von den anderen beiden Gruppen (Tabelle 26).

Im rohen Schenkelmuskel wiesen die Konzentrationen des Vitamin C, des Tocopherols und der TBARS keine signifikanten Unterschiede innerhalb der drei Versuchsgruppen auf. Die GSH-Konzentration zeigte im rohen Schenkelmuskel signifikante Unterschiede, die beiden Gruppen mit Methioninzulage im Futter zeigten signifikant höhere Konzentrationen im Gegensatz zur Kontrollgruppe (Tabelle 26).



**Tabelle 26:** Konzentrationen von Antioxidantien und Oxidationsprodukten in Plasma, Vollblut, Leber und rohem Schenkelmuskel der Broiler des ersten Versuchs, die entweder mit einer Kontrolldiät (CON) oder mit einer Diät mit niedriger (DLM 1) oder hoher (DLM 2) Zulage an DL-Methionin gefüttert wurden<sup>1</sup>

|                                    | Gruppe                       |                               |                              |
|------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
|                                    | CON                          | DLM 1                         | DLM 2                        |
| <b>Plasma</b>                      |                              |                               |                              |
| Gesamt Vit. C, $\mu\text{mol/l}$   | 65,0 $\pm$ 14,8              | 66,6 $\pm$ 17,0               | 67,3 $\pm$ 8,4               |
| Tocopherol, $\mu\text{mol/mol TG}$ | 64,4 $\pm$ 12,3              | 60,7 $\pm$ 23,9               | 70,1 $\pm$ 23,1              |
| TBARS, $\mu\text{mol/mol TG}$      | 5,95 $\pm$ 2,42              | 4,67 $\pm$ 1,64               | 4,57 $\pm$ 1,10              |
| <b>Blut</b>                        |                              |                               |                              |
| GSH, $\mu\text{mol/g Hb}$          | 14,8 $\pm$ 1,1               | 13,9 $\pm$ 1,6                | 14,9 $\pm$ 0,7               |
| <b>Leber</b>                       |                              |                               |                              |
| Gesamt Vit. C, $\mu\text{mol/g}$   | 2,36 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup> | 2,14 $\pm$ 0,26 <sup>ab</sup> | 1,90 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup> |
| Tocopherol, $\text{nmol/g}$        | 40,8 $\pm$ 5,5 <sup>ab</sup> | 45,6 $\pm$ 12,9 <sup>a</sup>  | 36,4 $\pm$ 7,5 <sup>b</sup>  |
| GSH, $\mu\text{mol/g}$             | 2,71 $\pm$ 0,32 <sup>b</sup> | 4,28 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>  | 4,77 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup> |
| TBARS, $\text{nmol/g}$             | 47,6 $\pm$ 6,8 <sup>a</sup>  | 36,8 $\pm$ 7,3 <sup>b</sup>   | 43,7 $\pm$ 8,6 <sup>ab</sup> |
| <b>Schenkelmuskel, roh</b>         |                              |                               |                              |
| Gesamt Vit. C, $\mu\text{mol/g}$   | 0,26 $\pm$ 0,05              | 0,28 $\pm$ 0,06               | 0,27 $\pm$ 0,04              |
| Tocopherol, $\text{nmol/g}$        | 27,2 $\pm$ 6,6               | 29,4 $\pm$ 6,5                | 27,6 $\pm$ 6,4               |
| GSH, $\mu\text{mol/g}$             | 1,28 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup> | 1,59 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>  | 1,67 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup> |
| TBARS, $\text{nmol/g}$             | 5,49 $\pm$ 2,32              | 4,78 $\pm$ 2,02               | 4,60 $\pm$ 2,07              |

<sup>1</sup>Es wird der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt, n= 12 Tiere pro Gruppe

<sup>a,b</sup>Mittelwerte ohne die gleichen Indizes sind signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ )

TG= Triglyzeride, Hb= Hämoglobin, TBARS=Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen, GSH= Glutathion

## 5.2.2 Versuch 2

Die Konzentrationen von Vitamin C, Tocopherol und TBARS im Plasma des zweiten Versuchs zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen. Auch die GSH-Konzentrationen im Vollblut waren zwischen den drei Gruppen nicht unterschiedlich (Tabelle 27).

In der Leber war die Konzentration des Vitamin C in der Gruppe DLM 2 signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Konzentration in der Gruppe DLM 1 unterschied sich nicht zur Kontrollgruppe.

Die Konzentrationen des GSH in der Leber waren in den beiden Gruppen mit Methioninzulage (DLM 1 und DLM 2) signifikant höher als die Konzentration der Kontrollgruppe (Tabelle 27).

Bei den Konzentrationen des Tocopherols und der TBARS in der Leber traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit Methioninzulage und der Kontrollgruppe auf (Tabelle 27).

Im rohen Schenkelmuskelgewebe war die Vitamin C-Konzentration der Gruppe DLM 1 signifikant höher als die Konzentration der Kontrollgruppe. Die Konzentration der Gruppe DLM 2 unterschied sich nicht von der Konzentration der Kontrollgruppe. Die Konzentration des GSH im rohen Schenkelmuskel war in den Gruppen DLM 1 und DLM 2 signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Tabelle 27).

Die Konzentrationen von Tocopherol und TBARS waren im rohen Schenkelmuskelgewebe zwischen den drei Versuchsgruppen nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 27).

Im erhitzten Schenkelmuskel war die Konzentration von Cholesterol in der Gruppe DLM 1 signifikant niedriger als die Konzentration in der Kontrollgruppe. Die Cholesterol-Konzentration der Gruppe DLM 2 unterschied sich nicht von den Konzentrationen der anderen beiden Gruppen (Tabelle 28).

Die Konzentrationen von  $7\alpha$ -OH Cholesterol,  $7\beta$ -OH Cholesterol, 7-Keto Cholesterol, sowie der Summe dieser COPs waren im erhitzten Schenkelmuskel in den Gruppen DLM 1 und DLM 2 signifikant niedriger im Vergleich zu den Konzentrationen der Kontrollgruppe (sowohl die Absolutkonzentrationen als auch die Relativkonzentrationen, bezogen auf die Cholesterolkonzentration) (Tabelle 28).

**Tabelle 27:** Konzentrationen von Antioxidantien und Oxidationsprodukten in Plasma, Vollblut, Leber und rohem Schenkelmuskel der Broiler des zweiten Versuchs, die entweder mit einer Kontrolldiät (CON) oder mit einer Diät mit niedriger (DLM 1) oder hoher (DLM 2) Zulage an DL-Methionin gefüttert wurden<sup>1</sup>

|                                    | Gruppe                       |                              |                              |
|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                                    | CON                          | DLM 1                        | DLM 2                        |
| <b>Plasma</b>                      |                              |                              |                              |
| Gesamt Vit. C, $\mu\text{mol/l}$   | 65,1 $\pm$ 11,8              | 63,2 $\pm$ 6,5               | 57,2 $\pm$ 6,0               |
| Tocopherol, $\mu\text{mol/mol TG}$ | 15,2 $\pm$ 4,9               | 17,5 $\pm$ 5,3               | 19,6 $\pm$ 6,3               |
| TBARS, $\mu\text{mol/mol TG}$      | 2,05 $\pm$ 0,39              | 2,70 $\pm$ 1,00              | 2,25 $\pm$ 0,68              |
| <b>Blut</b>                        |                              |                              |                              |
| GSH, $\mu\text{mol/g Hb}$          | 20,5 $\pm$ 2,1               | 20,3 $\pm$ 2,2               | 21,7 $\pm$ 3,2               |
| <b>Leber</b>                       |                              |                              |                              |
| Gesamt Vit. C, $\mu\text{mol/g}$   | 1,92 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup> | 1,99 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup> | 1,75 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup> |
| Tocopherol, $\text{nmol/g}$        | 19,7 $\pm$ 2,8               | 19,7 $\pm$ 2,5               | 22,1 $\pm$ 3,4               |
| GSH, $\mu\text{mol/g}$             | 2,61 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup> | 3,51 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup> | 3,28 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup> |
| TBARS, $\text{nmol/g}$             | 41,6 $\pm$ 8,2               | 38,8 $\pm$ 7,3               | 40,8 $\pm$ 8,3               |
| <b>Schenkelmuskel, roh</b>         |                              |                              |                              |
| Gesamt Vit. C, $\mu\text{mol/g}$   | 0,18 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup> | 0,22 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup> | 0,19 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup> |
| Tocopherol, $\text{nmol/g}$        | 9,97 $\pm$ 1,45              | 8,39 $\pm$ 2,00              | 8,92 $\pm$ 2,07              |
| GSH, $\mu\text{mol/g}$             | 1,13 $\pm$ 0,27 <sup>b</sup> | 1,39 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup> | 1,55 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup> |
| TBARS, $\text{nmol/g}^2$           | 5,37; 3,63                   | 5,14; 2,21                   | 4,49; 2,14                   |

<sup>1</sup>Es wird der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt, n= 12 Tiere pro Gruppe

<sup>2</sup>Daten, die nicht normalverteilt waren, werden als geometrischer Mittelwert und Streufaktor dargestellt

<sup>a,b</sup>Mittelwerte ohne die gleichen Indizes sind signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ )

TG= Triglyzeride, Hb= Hämoglobin, TBARS=Thiobarbitursäure reaktive Substanzen, GSH= Glutathion

**Tabelle 28:** Konzentrationen von Cholesterol und Cholesterol-Oxidations-Produkten (COPs) im erhitzten Schenkelmuskel der Broiler des zweiten Versuchs, die entweder mit einer Kontrolldiät (CON) oder mit einer Diät mit niedriger (DLM 1) oder hoher (DLM 2) Zulage an DL-Methionin gefüttert wurden<sup>1</sup>

|                                                  | Gruppe             |                   |                      |
|--------------------------------------------------|--------------------|-------------------|----------------------|
|                                                  | CON                | DLM 1             | DLM 2                |
| Cholesterol, $\mu\text{mol/g}$                   | $10,5 \pm 1,14^a$  | $9,04 \pm 0,64^b$ | $9,53 \pm 0,79^{ab}$ |
| <b>COPs, absolut</b>                             |                    |                   |                      |
| 7 $\alpha$ -OH Cholesterol, nmol/g               | $6,86 \pm 2,41^a$  | $2,34 \pm 0,58^b$ | $3,67 \pm 1,56^b$    |
| 7 $\beta$ -OH Cholesterol, nmol/g                | $11,63 \pm 4,44^a$ | $4,13 \pm 1,04^b$ | $6,81 \pm 3,15^b$    |
| 7-Keto Cholesterol, nmol/g                       | $11,77 \pm 4,45^a$ | $4,06 \pm 0,85^b$ | $6,19 \pm 2,67^b$    |
| Gesamt COPs, nmol/g                              | $30,3 \pm 11,1^a$  | $10,5 \pm 2,5^b$  | $16,7 \pm 7,4^b$     |
| <b>COPs, relativ zu Cholesterol</b>              |                    |                   |                      |
| 7 $\alpha$ -OH Cholesterol, mmol/mol Cholesterol | $0,68 \pm 0,28^a$  | $0,26 \pm 0,08^b$ | $0,41 \pm 0,14^b$    |
| 7 $\beta$ -OH Cholesterol, mmol/mol Cholesterol  | $1,15 \pm 0,54^a$  | $0,46 \pm 0,14^b$ | $0,77 \pm 0,30^b$    |
| 7-Keto Cholesterol, mmol/mol Cholesterol         | $1,16 \pm 0,54^a$  | $0,45 \pm 0,12^b$ | $0,70 \pm 0,25^b$    |
| Gesamt COPs, mmol/mol Cholesterol                | $2,99 \pm 1,35^a$  | $1,16 \pm 0,34^b$ | $1,87 \pm 0,69^b$    |

<sup>1</sup>Es wird der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt, n= 8 Tiere pro Gruppe

<sup>a,b</sup>Mittelwerte ohne die gleichen Indizes sind signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ )

Die Konzentrationen der gemessenen Phytosterole im erhitzten Schenkelmuskel waren zwischen den drei Versuchsgruppen nicht unterschiedlich (Tabelle 29).

Bei den Absolutkonzentrationen der Campesterol-Oxidations-Produkte im erhitzten Schenkelmuskel war die Konzentration der Gruppe DLM 1 signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Konzentration der Gruppe DLM 2 unterschied sich nicht von den Konzentrationen der anderen beiden Versuchsgruppen. Beim 7 $\beta$ -OH Campesterol zeigten die beiden Gruppen DLM 1 und DLM 2 signifikant niedrigere Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Beim 7-Keto Campesterol war die Konzentration der Gruppe DLM 2 signifikant niedriger als die Konzentration der Kontrollgruppe, die Konzentration der Gruppe DLM 1 unterschied sich nicht von der Konzentration der Kontrollgruppe. Bei der Summe der Campesterol-Oxidations-Produkte stellten sich signifikant niedrigere Konzentrationen der Gruppen mit

Methioninzulage im Gegensatz zur Konzentration der Kontrollgruppe dar (Tabelle 29).

Die Absolutkonzentrationen der Sitosterol-Oxidations-Produkte im erhitzten Schenkelmuskel zeigten für  $7\alpha$ -OH Sitosterol und  $7\beta$ -OH Sitosterol signifikant niedrigere Konzentrationen in den Gruppen mit Methioninzulage im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Konzentrationen des 7-Keto Sitosterol zeigten keine Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen. Ebenso konnten auch bei den Konzentrationen der Summe der Sitosterol-Oxidations-Produkte keine Unterschiede innerhalb der drei Versuchsgruppen gezeigt werden (Tabelle 29).

Die Relativ-Konzentrationen (bezogen auf die Gehalte des Campesterols) der Campesterol-Oxidations-Produkte waren bei  $7\alpha$ -OH,  $7\beta$ -OH und bei 7-Keto Campesterol signifikant niedriger in den Gruppen DLM 1 und DLM 2 im Gegensatz zur Kontrollgruppe. Auch die Summe der Campesteroloxidationsprodukte zeigte in beiden Versuchsgruppen mit Methioninzulage signifikant niedrigere Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Relativ-Konzentrationen (bezogen auf die Gehalte des Sitosterols) des  $7\alpha$ -OH und  $7\beta$ -OH Sitosterols waren in den Gruppen DLM 1 und DLM 2 signifikant niedriger als die Konzentrationen der Kontrollgruppe. Die Konzentrationen des 7-Keto Sitosterol, sowie der Summe der Sitosterol-Oxidations-Produkte konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen zeigen (Tabelle 29).

Signifikant negative Korrelationen konnten zwischen der GSH-Konzentration im rohen Schenkelmuskel und den Konzentrationen der einzelnen COPs ( $7\alpha$ -OH Cholesterol,  $7\beta$ -OH Cholesterol und 7-Keto Cholesterol) sowie der Summe der COPs im erhitzten Schenkelmuskel gezeigt werden (Tabelle 30).

Außerdem traten signifikant negative Korrelationen zwischen der Vitamin C-Konzentration im rohen Schenkelmuskel und der Konzentration der einzelnen COPs ( $7\alpha$ -OH Cholesterol,  $7\beta$ -OH Cholesterol und 7-Keto Cholesterol) und der Summe der COPs im erhitzten Schenkelmuskel auf. Weiter konnten signifikant negative Korrelationen zwischen der Vitamin C-Konzentration und der Konzentration der Summe der POPs und der Summe der Campesterol-Oxidations-Produkte im erhitzten Schenkelmuskel gezeigt werden (Tabelle 30).

**Tabelle 29:** Konzentrationen von Phytosterolen und Phytosterol-Oxidations-Produkten (POPs) im erhitzten Schenkelmuskel der Broiler des zweiten Versuchs, die entweder mit einer Kontrolldiät (CON) oder mit einer Diät mit niedriger (DLM 1) oder hoher (DLM 2) Zulage an DL-Methionin gefüttert wurden<sup>1</sup>

|                                                       | Gruppe                   |                           |                           |
|-------------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                                                       | CON                      | DLM 1                     | DLM 2                     |
| <b>Phytosterole, absolut</b>                          |                          |                           |                           |
| Campesterol, nmol/g                                   | 88 ± 28                  | 90 ± 10                   | 107 ± 43                  |
| Sitosterol, nmol/g                                    | 35 ± 8                   | 34 ± 3                    | 42 ± 19                   |
| Stigmasterol, nmol/g                                  | 4,1 ± 0,7                | 3,7 ± 0,5                 | 5,0 ± 1,8                 |
| Campestanol, nmol/g                                   | 15 ± 4                   | 14 ± 2                    | 17 ± 9                    |
| Sitostanol, nmol/g                                    | 5,1 ± 0,8                | 4,6 ± 0,4                 | 6,1 ± 2,6                 |
| <b>POPs, absolut</b>                                  |                          |                           |                           |
| 7α-OH Campesterol, pmol/g                             | 0,08 ± 0,03 <sup>a</sup> | 0,04 ± 0,01 <sup>b</sup>  | 0,06 ± 0,03 <sup>ab</sup> |
| 7β-OH Campesterol, pmol/g                             | 0,19 ± 0,06 <sup>a</sup> | 0,09 ± 0,02 <sup>b</sup>  | 0,13 ± 0,07 <sup>b</sup>  |
| 7-Keto Campesterol, pmol/g                            | 1,17 ± 0,18 <sup>a</sup> | 1,03 ± 0,10 <sup>ab</sup> | 0,91 ± 0,18 <sup>b</sup>  |
| 7α-OH Sitosterol, pmol/g                              | 0,08 ± 0,03 <sup>a</sup> | 0,06 ± 0,01 <sup>b</sup>  | 0,05 ± 0,01 <sup>b</sup>  |
| 7β-OH Sitosterol, pmol/g                              | 0,18 ± 0,04 <sup>a</sup> | 0,13 ± 0,01 <sup>b</sup>  | 0,14 ± 0,03 <sup>b</sup>  |
| 7-Keto Sitosterol, pmol/g                             | 2,11 ± 0,32              | 2,37 ± 0,39               | 2,50 ± 0,60               |
| Campesterol-Oxidations-Produkte, pmol/g               | 1,45 ± 0,23 <sup>a</sup> | 1,13 ± 0,09 <sup>b</sup>  | 1,10 ± 0,27 <sup>b</sup>  |
| Sitosterol-Oxidations-Produkte, pmol/g                | 2,34 ± 0,36              | 2,56 ± 0,39               | 2,69 ± 0,62               |
| <b>POPs, relativ zu den Phytosterolen</b>             |                          |                           |                           |
| 7α-OH Campesterol, mmol/mol Campesterol               | 1,01 ± 0,40 <sup>a</sup> | 0,48 ± 0,11 <sup>b</sup>  | 0,59 ± 0,25 <sup>b</sup>  |
| 7β-OH Campesterol, mmol/mol Campesterol               | 2,32 ± 0,83 <sup>a</sup> | 0,98 ± 0,21 <sup>b</sup>  | 1,25 ± 0,52 <sup>b</sup>  |
| 7-Keto Campesterol, mmol/mol Campesterol              | 14,1 ± 3,4 <sup>a</sup>  | 11,6 ± 1,9 <sup>b</sup>   | 9,5 ± 3,0 <sup>b</sup>    |
| 7α-OH Sitosterol, mmol/mol Sitosterol                 | 2,34 ± 0,61 <sup>a</sup> | 1,69 ± 0,33 <sup>b</sup>  | 1,30 ± 0,47 <sup>b</sup>  |
| 7β-OH Sitosterol, mmol/mol Sitosterol                 | 5,11 ± 0,97 <sup>a</sup> | 3,86 ± 0,43 <sup>b</sup>  | 3,93 ± 1,9 <sup>b</sup>   |
| 7-Keto Sitosterol, mmol/mol Sitosterol                | 62,7 ± 12,5              | 71,2 ± 16,3               | 71,4 ± 46,1               |
| Campesterol-Oxidations-Produkte, mmol/mol Campesterol | 17,4 ± 4,5 <sup>a</sup>  | 12,8 ± 2,1 <sup>b</sup>   | 11,3 ± 3,5 <sup>b</sup>   |
| Sitosterol-Oxidations-Produkte, mmol/mol Sitosterol   | 68,4 ± 13,1              | 76,9 ± 17,2               | 59,2 ± 9,4                |

<sup>1</sup>Es wird der Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt, n= 8 Tiere pro Gruppe

<sup>a,b</sup>Mittelwerte ohne die gleichen Indizes sind signifikant unterschiedlich (p< 0,05)

**Tabelle 30:** Signifikante Pearson-Korrelationskoeffizienten zwischen den Konzentrationen von Antioxidantien (GSH, Vitamin C) im rohen Schenkelmuskel und den Konzentrationen von COPs und POPs im erhitzten Schenkelmuskel<sup>1</sup>

| Variable 1 | Variable 2                            | R2    | p     |
|------------|---------------------------------------|-------|-------|
| GSH        | Summe der COPs                        | -0,57 | 0,007 |
|            | 7 $\alpha$ -OH Cholesterol            | -0,62 | 0,003 |
|            | 7 $\beta$ -OH Cholesterol             | -0,51 | 0,019 |
|            | 7-Keto Cholesterol                    | -0,60 | 0,004 |
| Vitamin C  | Summe der COPs                        | -0,57 | 0,008 |
|            | 7 $\alpha$ -OH Cholesterol            | -0,56 | 0,009 |
|            | 7 $\beta$ -OH Cholesterol             | -0,57 | 0,007 |
|            | 7-Keto Cholesterol                    | -0,60 | 0,004 |
|            | Summe der POPs                        | -0,43 | 0,049 |
|            | Summe der Campesteroxidationsprodukte | -0,44 | 0,046 |

<sup>1</sup>n=24

## 6. Diskussion

Methionin fungiert in der Geflügelmast meist als erstlimitierende Aminosäure und spielt daher eine wichtige Rolle in der Broilerfütterung. In der vorliegenden Studie sollten in zwei Versuchen die Auswirkungen zweier Methioninzulagen in unterschiedlichen Mengen, im Vergleich zur bedarfsdeckenden Ration nach Empfehlung des NRC (1994) untersucht werden. Dabei wurde das Augenmerk besonders auf das antioxidative System der Tiere gerichtet.

Im ersten Versuch wurde in den Rationen Sojaöl als Fettquelle verwendet, das vor allem zweifach ungesättigte Fettsäuren enthält. Im anschließenden zweiten Versuch wurde das Sojaöl durch Leinöl ausgetauscht und es wurde auf eine Vitamin E-Supplementierung der Rationen verzichtet. Durch die überwiegend dreifach ungesättigten Fettsäuren im Leinöl und der fehlenden Vitamin E-Supplementierung konnte angenommen werden, dass die Belastung auf das antioxidative System der Broiler erhöht wurde. Zu untersuchen war die Hypothese, dass die Methioninzulage die zu erwartenden negativen Auswirkungen abpuffern konnte.

Im Folgenden sollen die oben dargestellten Versuchsergebnisse, auch unter Einbeziehung von Ergebnissen aus der Literatur, diskutiert und eingeordnet werden.

### 6.1 Einfluss der Methioninzulagen auf die Leistungen und die Schlachtkörper Charakteristika

Im ersten sowie im zweiten Versuch konnten für die Leistungen und die Schlachtkörper Charakteristika keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen gezeigt werden. Die Methioninkonzentrationen der Futterrationen in den vorliegenden Versuchen erfüllten bereits in den Kontrollgruppen die Empfehlung des NRC (1994). In den Gruppen DLM 1 und DLM 2 wurde die Empfehlung um ca. 15% bzw. 30% (in Relation zu den Empfehlungen des NRC (1994)) übertroffen. Das bedeutet, dass die Methioninkonzentrationen bereits in den Kontrollgruppen für das maximale Wachstum, auch unter diätetisch induzierter, oxidativer Belastung, ausreichend waren.



Dass Methionin einen Einfluss auf das Wachstum der Broiler hat, konnten Zeitz et al. (2018) in ihrer Studie zeigen. Die Tiere denen eine bedarfsdeckende Ration oder eine Ration über die Empfehlung des NRC (1994) hinaus gefüttert wurde, zeigten bessere Leistungen (Endgewichte und Futterverwertung) und bessere Schlachtkörper Charakteristika (Ausschlachtung und Brustmuskelmassen) als Tiere, deren Futterration eine Methioninkonzentration 15% unter der Empfehlung des NRC (1994) aufwies. Dass die Leistungen bei einer Unterversorgung mit Methionin schlechter sind ist damit zu erklären, dass Methionin eine relevante Funktion in der Proteinbiosynthese hat und bei der Translation als Starter-Aminosäure fungiert (Farke 2011). Methionin ist weiterhin in der Lage das Protein mammalian Target of Rapamycin (mTOR) zu aktivieren, welches zusätzlich einen wichtigen Bestandteil in der Proteinsynthese darstellt (Métayer et al. 2008). Des Weiteren reduziert Methionin die Autophagie auf molekularer Ebene, was mit der Wirkung von GSH auf die zellulären ROS zusammenhängt und es verringert die Genexpression von Atrogin-1, einer muskelspezifischen Ubiquitin-E3-Ligase, die das Schlüsselenzym für den Proteinabbau über das Ubiquitin-Proteasomen-System ist (Zeitz et al. 2018).

Es ist zu beachten, dass die Effekte des Methionins auf die Leistungen und Schlachtkörper Charakteristika nicht das primäre Ziel dieser Studie waren und das Versuchsdesign aus technischen Gründen nur bedingt geeignet war, um diese Wirkungen zu beurteilen.

Dennoch konnten Zeitz et al. (2018) gleiche Ergebnisse wie die vorliegende Studie zeigen. Bei Broilern, deren Futterrationen unterschiedliche Methioninkonzentrationen über die Empfehlung des NRC (1994) hinaus enthielten, konnten keine Unterschiede bei den Leistungen und Schlachtkörper Charakteristika beobachtet werden (Zeitz et al. 2018).

Es wurde auch schon berichtet, dass eine diätetisch erzeugte oxidative Belastung durch den Einsatz unterschiedlicher Öle und einer unterschiedlichen Vitamin E-Konzentration der Rationen beim Broiler keinen Einfluss auf die Leistungen hat (Eder et al. 2005a).

## 6.2 Einfluss der Methioninzulagen auf den antioxidativen Status

Um die Zulagen von Methionin und ihren Einfluss auf das antioxidative System der Broiler beurteilen zu können, wurden unterschiedliche Parameter bestimmt. Dies waren zum einen die Konzentrationen von nicht-enzymatischen Antioxidantien (GSH, Tocopherol und Vitamin C) und zum anderen die Konzentrationen von Oxidationsprodukten (TBARS, COPs und POPs).

Die Konzentrationen von Vitamin C und Vitamin E wurden in beiden Versuchen der vorliegenden Studie im Plasma, in der Leber und im rohen Schenkelmuskel nur gering beeinflusst. Im ersten Versuch zeigte nur die Vitamin C-Konzentration der Leber in der Gruppe DLM 2 niedrigere Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im zweiten Versuch zeigte die Vitamin C-Konzentration der Leber ebenfalls niedrigere Werte in der Gruppe DLM 2 im Vergleich zur Kontrollgruppe und im rohen Schenkelmuskel war die Vitamin C-Konzentration der Gruppe DLM 1 höher als die Konzentration in der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse implizieren, dass die Methioninkonzentration in den Rationen unter und über der Züchterempfehlung (aber über der Empfehlung des NRC (1994)) nur geringe Effekte auf das antioxidative System der Broiler hat. Diese Parameter werden aber im Gegensatz zum GSH nur indirekt durch die Methioninzulage beeinflusst.

Gleiche Ergebnisse konnten auch Zeitz et al. (2018) zeigen. Die Vitamin E-Konzentrationen im Plasma und in der Leber bei Broilern unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen, in denen die Methioninkonzentration des Futters über der Empfehlung des NRC (1994) lag.

Auch die GSH-Konzentration im Blut unterschied sich in beiden Versuchen der vorliegenden Studie nicht zwischen den drei Versuchsgruppen.

Diese Ergebnisse bestätigen den vorangegangenen Versuch von Zeitz et al. (2018), bei dem sich die GSH-Konzentration im Blut bei unterschiedlichen Methioninzulagen im Futter über die Empfehlung des NRC (1994) hinaus ebenfalls nicht unterschied. Im Gegensatz dazu konnten Yang et al. (2016) auch im Blut unterschiedliche GSH-Gehalte zeigen. In ihrem Versuch wurden die Tiere bei Normaltemperatur und bei einer niedrigeren Temperatur gehalten. Hier zeigten sich bei beiden Umgebungstemperaturen höhere GSH-Konzentrationen im Blut mit steigender

Methioninsupplementierung über die Empfehlung des NRC (1994) hinaus (Yang et al. 2016).

In der Leber und im rohen Schenkelmuskel der Broiler konnte in beiden Versuchen der vorliegenden Studie ein Anstieg der GSH-Konzentrationen in den Rationen mit Methioninzulage gezeigt werden. Das kann damit erklärt werden, dass aus Methionin über das Zwischenprodukt SAM durch die Transsulfonierung Cystein entsteht. Dieser Vorgang findet hauptsächlich in Leber, Niere und Pankreas statt (Martín-Venegas et al. 2013). Kommt es zu einem hohen SAM-Gehalt, z.B. durch die hohe Verfügbarkeit an Methionin, wird die Cystathionin- $\beta$ -Synthase allosterisch aktiviert und SAM wird in die Transsulfonierung eingeschleust. Das entstehende Cystein wird zur GSH-Synthese genutzt und insbesondere die Leber fungiert dann als Speicherpool für das GSH (Zeitz et al. 2018). Dadurch wird die GSH-Konzentration direkt von der Methionin-Zulage beeinflusst.

Damit wurde die Hypothese, dass eine Methioninsupplementierung der Rationen den GSH-Gehalt erhöht, bestätigt. In beiden Versuchen war die Konzentration von GSH in der Leber und im rohen Schenkelmuskel in den Gruppen mit Methioninzulage signifikant höher als ohne Zulage. Da GSH eines der wichtigsten Antioxidantien darstellt, deutet diese Beobachtung darauf hin, dass das antioxidative System der Broiler durch die Zulage von Methionin verbessert wurde. Allerdings unterschieden sich die GSH-Konzentrationen der supplementierten Gruppen im Blut, in der Leber und im rohen Schenkelmuskel nicht voneinander. Dass die GSH-Konzentration nicht stetig mit steigender Methioninzulage zunimmt zeigt, dass das Maximum der Methionin-Versorgung bereits mit der ersten Zulage erreicht war.

Dass Methionin einen Einfluss auf die GSH-Gehalte der Leber hat, konnte in vorangegangenen Versuchen gezeigt werden. Del Vesco et al. (2014) konnten feststellen, dass Tiere, die einer induzierten Belastung (Hitzestress) ausgesetzt waren, signifikant höhere GSH-Konzentrationen in der Leber aufwiesen, wenn ihre Ration eine höhere Methioninsupplementierung enthielt im Gegensatz zu Tieren mit einer methioninarmen Ration. Im Versuch von Zeitz et al. (2018) waren die GSH-Konzentrationen der Leber bei einer Unterversorgung von Methionin niedriger als bei einer bedarfsgerechten Methioninversorgung. Über die bedarfsgerechte Versorgung nach der Empfehlung des NRC (1994) hinaus, konnten die Autoren aber keine Unterschiede der GSH-Gehalte der Leber feststellen (Zeitz et al. 2018).

Magnuson et al. (2020) lösten bei den Broilern eine erhöhte Belastung durch eine hohe Besatzdichte aus. Die Methioninkonzentrationen in den verwendeten Diäten erfüllten die Züchterempfehlung oder übertrafen sie um 30%. Die Autoren konnten die Ergebnisse aus der vorliegenden Studie bestätigen. Auch in ihrem Versuch unterschieden sich die GSH-Konzentrationen in Leber und Muskel nicht, wenn die Methioninkonzentration in den Futterrationen die Züchterempfehlung erreichten oder überstiegen (mit hoher und niedriger Besatzdichte).

In einem weiteren Versuch wurde die Auswirkung unterschiedlicher Fettquellen untersucht. Der Methioningehalt der Rationen lag dabei im Bereich der Kontrollgruppe des vorliegenden Versuchs. Weder im Plasma noch in der Leber zeigten die GSH-Konzentrationen einen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen deren Futterrationen Sojaöl enthielten und denen, deren Futterrationen Leinöl zugesetzt wurde. Es konnte nicht gezeigt werden, dass Leinöl das antioxidative System in Bezug auf die GSH-Konzentrationen in Plasma und Leber negativ beeinflusst, wenn die Methioninkonzentration die Empfehlung des NRC (1994) erfüllt (Fébel et al. 2008).

In der vorliegenden Studie war es nicht möglich, die Tiere beider Versuche zeitgleich zu halten und daher können die Versuche aus technischen Gründen nicht direkt miteinander verglichen werden. Es konnten aber keine großen Unterschiede zwischen den beiden Versuchen in Bezug auf die Konzentrationen der Antioxidantien und der TBARS gezeigt werden. Lediglich die Vitamin E-Konzentration in den Geweben war in Versuch 1 höher als in Versuch 2. Dies dürfte daran liegen, dass keine oder nur eine geringfügige oxidative Belastung durch das Leinöl und die fehlende Vitamin E-Zulage ausgelöst wurde, im Gegensatz zum ersten Versuch mit Sojaöl und der Vitamin E-Supplementierung in den Futterrationen.

Unter der Annahme, dass die Zulage von Methionin den antioxidativen Status der Tiere positiv beeinflusst, sollten auch die Konzentrationen der Oxidationsprodukte in den Gruppen mit Methioninzulage sinken. Entgegen dieser Annahme blieben die TBARS-Konzentrationen im Plasma, in der Leber und im rohen Schenkelmuskel aber in beiden Versuchen weitgehend unverändert. Lediglich in der Leber des ersten Versuchs war die TBARS-Konzentration in der Gruppe DLM 1 niedriger als in der Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse bestätigen den vorangegangenen Versuch von Zeitz et al. (2018), bei dem sich die TBARS-Konzentrationen in Plasma und Leber bei unterschiedlichen Methioninzulagen über die Empfehlungen des NRC (1994) hinaus nicht unterschieden. Del Vesco et al. (2014) haben in ihrem oben erwähnten Hitzestressversuch die TBARS-Konzentrationen in der Leber gemessen. Auch hier zeigten die Werte der Tiere, die mit unzureichendem Methioningehalt gefüttert wurden, keine Unterschiede im Vergleich zu den Tieren, die eine Ration mit ausreichender Methioninversorgung erhielten.

In einem weiteren Versuch wurden die TBARS-Konzentrationen in unterschiedlichen Geweben gemessen. Die Tiere wurden mit Rationen gefüttert, deren Methioningehalt in Höhe der Züchterempfehlung lag oder diese um 50% bzw. 100% übertraf. Zusätzlich wurde den Rationen, mit Ausnahme der Kontrollgruppe, Leinsamen hinzugefügt. Durch den hohen Anteil von Leinöl im Leinsamen sollte die oxidative Belastung der Tiere diätetisch gesteigert werden. In der Leber konnten die Autoren keine Unterschiede der TBARS-Konzentrationen zwischen den Versuchsgruppen feststellen. Im Schenkelmuskel dagegen waren die TBARS-Konzentrationen der Tiere, die mit Leinsamen und ohne Methioninzulage gefüttert wurden, signifikant höher als in den anderen Gruppen. Hier konnte bestätigt werden, dass die TBARS-Konzentration steigt, wenn die Tiere Leinsamen bekommen und so einer erhöhten oxidativen Belastung ausgesetzt sind. Auch konnte bestätigt werden, dass diese negativen Effekte mit einer höheren Methioninzulage abgepuffert werden können (Beheshti Moghadam et al. 2017).

Bei diesen unterschiedlichen Ergebnissen der TBARS-Konzentrationen ist zu beachten, dass die TBARS ein sehr unspezifischer Parameter für den oxidativen Stress sind. Die Thiobarbitursäure bildet dabei nicht nur mit dem MDA und den Nebenprodukten der Lipidoxidation einen farbigen Komplex, sondern auch mit den Abbauprodukten von Proteinen und Kohlenhydraten (Ghani et al. 2017). Der Nachweis der Lipidoxidation durch die TBA-Methode ist schon kritisiert worden (Lykkesfeldt 2001), v.a. wegen seiner geringen Spezifität (Esterbauer und Cheeseman 1990, Grune und Berger 2007) und Artefaktbildung (Lykkesfeldt 2001). Trotz der Nachteile konnte aber Lykkesfeldt (2001) zeigen, dass die Methode brauchbare Daten zum Nachweis der Lipidoxidation liefert und durch die Einfachheit und die günstige Durchführung einen der meist gebrauchten Tests darstellt (Halliwell und Chirico 1993).

Für die vorliegende Studie bedeutet das, dass die unveränderten TBARS-Konzentrationen auf die geringe Spezifität des Testverfahrens zurück zu führen sein könnten. Die TBARS-Werte müssen nicht mit der Vermutung zusammenhängen, dass die Supplementierung von Methionin keinen Einfluss auf das antioxidative System der Tiere hat.

Die Oxidationsprodukte von Cholesterol und Phytosterolen (COPs und POPs) sind dagegen sehr spezifische Indikatoren für die Lipidperoxidation in Geweben und stellen somit einen guten Marker für eine oxidative Belastung dar. In der vorliegenden Studie wurden die Konzentrationen der COPs und POPs im erhitzten Schenkelmuskel des zweiten Versuchs (mit Leinöl als Fettquelle und ohne Vitamin E-Supplementierung der Rationen) gemessen. Grau et al. (2001) beobachteten, dass Kochen zu einer signifikant erhöhten Oxidation von Cholesterol führt und Eder et al. (2005a) konnten zeigen, dass Nahrungsfette, die reich an PUFAs sind, zu einem drastischen Anstieg der COPs-Konzentration im Broilermuskel führen, insbesondere während des Erhitzens, bei gleichzeitig niedriger Vitamin E-Versorgung. Während des Erhitzens auf 180°C für 20 Minuten hat sich die COPs-Konzentration in Brust- und Schenkelmuskel um das 10- bis 40-fache erhöht (Eder et al. 2005a). Zusätzlich wird die COPs-Konzentration im Schenkelmuskel stärker durch die zugeführten Nahrungsfette beeinflusst, als z.B. im Brustmuskel. Eder et al. (2005a) vermuten, dass die Wirkung von Leinöl auf den Einbau von n-3-PUFAs in die Membranphospholipide zurückzuführen ist und der Schenkelmuskel aufgrund seines höheren Gehaltes an Gesamtlipiden und Phospholipiden anfälliger für eine Oxidation ist (Eder et al. 2005a). Auch Galvin et al. (1998) berichten in ihrer Studie von einer höheren COPs-Konzentration im Schenkelmuskel, im Vergleich zum Brustmuskel. Darüber hinaus hat der Schenkelmuskel eine höhere Cholesterolkonzentration als der Brustmuskel ( Galvin et al. 1998, Eder et al. 2005a), was die Bildung von COPs zusätzlich begünstigt.

Eder et al. (2005a) konnten außerdem zeigen, dass eine Vitamin E-Supplementierung die nachteilige Wirkung von Leinöl auf die COPs-Bildung während des Erhitzens unterdrückt. Die Autoren erachten es als wahrscheinlich, dass durch Vitamin E u.a. die Bildung von Fettacylradikalen verringert wird und das wiederum das Ausmaß der Cholesterodoxidation verringert (Eder et al. 2005a).

Im Gegensatz zu den o.g. Versuchen wurde im vorliegenden Versuch nicht ein Antioxidans gefüttert, sondern Methionin, welches eine Vorstufe vom Glutathion ist und sich positiv auf das antioxidative System auswirken soll. Die Cholesterolkonzentration im erhitzten Schenkelmuskel stellte sich in der Gruppe DLM 1 signifikant niedriger dar als die Konzentration der Kontrollgruppe, was dafürspricht, dass Methionin einen positiven Einfluss auf die Cholesterolkonzentration im erhitzten Schenkelmuskel ausüben kann und diese senken kann.

Die absoluten Konzentrationen der einzelnen COPs ( $7\alpha$ -OH,  $7\beta$ -OH und 7-Keto Cholesterol) und die Konzentrationen der gesamten COPs, sowie die Konzentrationen in Relation zum Cholesterolgehalt, zeigten im erhitzten Schenkelmuskel signifikant niedrigere Werte in den Fütterungsgruppen mit Methioninzulage als in der Kontrollgruppe, was für einen positiven Einfluss von Methionin auf die Bildung von COPs schließen lässt. Dass sich die beiden Gruppen mit Methioninzulage hinsichtlich der COPs-Konzentrationen nicht unterscheiden zeigt, dass die Methioninzulage in der Gruppe DLM 1 ausreichend war, um das antioxidative System der Broiler positiv zu beeinflussen.

Dass die geringere Bildung von COPs auf die erhöhten Gehalte der Antioxidantien zurückzuführen ist, zeigen die negativen Korrelationen zwischen den Antioxidantien GSH und Vitamin C im rohen Schenkelmuskel und den Konzentrationen der COPs im erhitzten Schenkelmuskel.

COPs können das Risiko für Krankheiten steigern (Raith et al. 2005, Khan et al. 2015) und ihre Aufnahme wird mit koronaren Herzkrankheiten und Krebs in Verbindung gebracht (Kulig et al. 2016). Daher kann man die Methioninsupplementierung und die daraus resultierende COPs-Reduzierung nicht nur in Hinblick auf die Tiergesundheit, sondern auch hinsichtlich der Lebensmittelsicherheit als positiv ansehen.

Neben Cholesterol und dessen Oxidationsprodukten wurden im erhitzten Schenkelmuskel des zweiten Versuchs auch Phytosterole und deren Oxidationsprodukte gemessen. Da die Tiere diese Phytosterole nicht endogen synthetisieren können, müssen sie mit dem Futter aufgenommen worden sein. In der vorliegenden Studie konnten die Phytosterole Campesterol, Sitosterol und Stigmasterol nachgewiesen werden und es wurden auch die gesättigten Derivate, die sogenannten Phytostanole (Campestanol und Sitostanol), gemessen. Studien haben

gezeigt, dass gesättigte Phytostanole weniger reaktiv gegenüber Oxidation sind als ungesättigte Phytosterole. Nach Erhitzen konnte z.B. gezeigt werden, dass deutlich mehr Sitosterol als Sitostanol oxidiert wurde (Ryan et al. 2009).

In den letzten Jahren fand ein steigender Verbrauch von Produkten, die mit Phytosterolen angereichert sind, statt. Diese können durch Hemmung der Cholesterinabsorption und -synthese (Zhao et al. 2019) die Cholesterolkonzentration im Blut senken (Ryan et al. 2009, Vanmierlo et al. 2013), wodurch Phytosterole auch in der Lebensmittelindustrie eine Rolle spielen.

In der vorliegenden Studie hatte das Methionin bei beiden Zulagemengen keinen Einfluss auf die Konzentration der Phytosterole im erhitzten Schenkelmuskel.

Aber genauso wie Cholesterol können auch die Phytosterole durch Autoxidation oxidieren und es entstehen die sogenannten Phytosterol-Oxidations-Produkte (POPs). In der vorliegenden Studie konnten die Oxidationsprodukte von Campesterol und Sitosterol im erhitzten Schenkelmuskel nachgewiesen werden. Auch hier sind die 7 $\alpha$ -Hydroxy-, 7 $\beta$ -Hydroxy- und 7-Keto-Derivate die Hauptprodukte (Vanmierlo et al. 2013), wobei die 7-Keto-Derivate die höchsten Konzentrationen zeigen. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Barriuso et al. (2017) überein, die die 7-Keto-Derivate als am häufigsten vorkommende Oxidationsprodukte von Phytosterolen in verschiedenen Testmatrizen beschreiben. Sie sind häufig Endprodukte der Oxidationsroute und sind daher auch gute Indikatoren für die Steroloxidation (Barriuso et al. 2017).

Die Konzentrationen der Oxidationsprodukte von Campesterol zeigten in der vorliegenden Studie niedrigere Werte in den Gruppen mit Methioninzulage im Gegensatz zur Kontrollgruppe. Bei den Oxidationsprodukten vom Sitosterol zeigten nur die Konzentrationen von 7 $\alpha$ -Hydroxy- und 7 $\beta$ -Hydroxy-Derivate niedrigere Werte in den Gruppen mit Methioninsupplementierung im Gegensatz zur Kontrollgruppe. Die 7-Keto-Sitosterol-Konzentration zeigte keinen Unterschied innerhalb der drei Versuchsgruppen.

Betrachtet man die Summen der Oxidationsprodukte eines Phytosterols, stellten sich die Konzentrationen der supplementierten Gruppen sowohl bei den Absolut-, als auch bei den Relativwerten (bezogen auf die Konzentration des jeweiligen Phytosterols) bei den Campesterol-Oxidations-Produkten signifikant niedriger dar im



Gegensatz zur Kontrollgruppe. Dagegen konnten für die Konzentrationen der Gesamt-Sitosterol-Oxidationsprodukte keine Unterschiede gezeigt werden. Der Grund für diesen Unterschied zwischen den einzelnen POPs bleibt unklar. Möglich wäre eine unterschiedlich schnelle Oxidation der einzelnen Phytosterole.

Die Korrelationsanalyse zeigt eine negative Korrelation zwischen der Vitamin C-Konzentration im rohen Schenkelmuskel und der Gesamt-POPs-Konzentration im erhitzten Schenkelmuskel. Das zeigt, dass schon der geringe Anstieg der Vitamin C-Konzentration der Gruppen mit Methioninzulage im Gegensatz zur Kontrollgruppe reicht, um die Bildung der POPs zu reduzieren.

Ryan et al. (2005) verglichen zytotoxische Wirkungen von POPs und COPs an menschlichen Modellzellen. Sie konnten zeigen, dass POPs ähnliche Wirkungen auf die Zellen haben wie COPs, die Konzentration muss aber deutlich höher sein, um den gleichen Toxizitätseffekt zu erzielen. Die Total-POPs-Konzentration im erhitzten Schenkelmuskel liegt in der vorliegenden Studie im Bereich zwischen 3,5 bis 4 pmol/g Schenkelmuskel (äquivalent 0,875 bis 1 µg/100g). Damit ist die Konzentration niedriger als in anderen Lebensmitteln (Bortolomeazzi et al. 2003, Lin et al. 2016) und sie ist sehr viel niedriger als die Konzentration der COPs. Damit ist die Aufnahme von POPs über erhitztes Hähnchenfleisch eher als unkritisch anzusehen.

Die COPs und POPs sind sehr spezifische Parameter für die Lipidperoxidation. Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass ihre Konzentrationen mit einer Methioninzulage der Rationen sinken und es konnte ein positiver Effekt des Methionins auf das antioxidative System der Tiere gezeigt werden.

## 7. Schlussfolgerung

Als Schlussfolgerung kann festgehalten werden, dass die Zulage von Methionin über die Empfehlungen des NRC (1994) hinaus auf die Antioxidantien Vitamin E und Vitamin C, sowie auf das Oxidationsprodukt TBARS nur einen geringen Einfluss hat. Dies gilt auch, wenn die Tiere einer diätetisch erhöhten oxidativen Belastung ausgesetzt sind.

Die Konzentration von GSH in der Leber und im rohen Schenkelmuskel wird durch die Zulage von Methionin direkt positiv beeinflusst. Allerdings stieg die GSH-Konzentration nicht stetig mit steigender Methioninzulage, was dafürspricht, dass das Maximum schon mit der ersten Zulagemenge in der Gruppe DLM 1 erreicht war.

Auch die Konzentrationen von COPs und POPs, welche gute Indikatoren für eine oxidative Belastung sind, wurden durch die Methioninsupplementierung der Rationen positiv beeinflusst. Die COPs-Konzentrationen waren in den Gruppen mit Methioninzulage niedriger als in der Kontrollgruppe und auch bei den POPs-Konzentrationen stellten sich die meisten Werte der Gruppen mit Methioninzulage niedriger dar als die Kontrollgruppe.

Es kann festgehalten werden, dass die Methioninsupplementierung der Futterrationen sowohl im ersten Versuch, als auch im zweiten Versuch unter induzierter, oxidativer Belastung einen positiven Einfluss auf die antioxidative Kapazität der Broiler hat. Gerade durch die positive Wirkung der Methioninzulagen auf die Konzentrationen von COPs und POPs, könnte die Verabreichung von zusätzlichem Methionin, über den Bedarf für ein optimales Wachstum hinaus, als positiv angesehen werden. Auch als günstiger Effekt in der Lebensmittelsicherheit, in Bezug auf die ernährungsphysiologische Qualität von Geflügelfleisch.

## 8. Zusammenfassung

Bei der Fütterung von Broilern ist Methionin ein wichtiger Faktor, da es meist die erstlimitierende Aminosäure beim Geflügel ist. Es ist wichtig in vielen Stoffwechselprozessen, unerlässlich für die Proteinbiosynthese und außerdem eine Vorstufe der Aminosäure Cystein, die an der Bildung des Antioxidans Glutathion (GSH) beteiligt ist. Dadurch kann Methionin die GSH-Bildung direkt beeinflussen und spielt eine wichtige Rolle im antioxidativen System.

In der vorliegenden Studie sollte die Hypothese untersucht werden, dass Methioninzulagen in den Rationen über die Empfehlungen des National Research Council (1994) hinaus, das antioxidative System bei Broilern verbessern und die Oxidation von Lipiden hemmen. Im ersten Versuch wurde in den Rationen Sojaöl als Fettquelle verwendet und Vitamin E den Rationen supplementiert. Im zweiten Versuch wurde das Sojaöl durch Leinöl ersetzt und eine Vitamin E-Supplementierung der Futterrationen wurde nicht vorgenommen. Sojaöl ist reich an Linolsäure, einer zweifach ungesättigten Fettsäure. Leinöl ist reich an  $\alpha$ -Linolensäure, einer dreifach ungesättigten Fettsäure, die leichter oxidiert und das antioxidative System der Broiler stärker beansprucht. Methionin wurde in zwei unterschiedlichen Mengen den Futterrationen zugelegt um zu prüfen, ob eine Methioninversorgung nach der Empfehlung des NRC (1994) ausreicht oder ob sich die Zulagen positiv auf das antioxidative System der Tiere auswirken.

Für die beiden Versuche wurden jeweils 72 Tiere (Broiler) der Rasse Cobb 500 als Eintagsküken eingestallt und in drei Versuchsgruppen (CON, DLM 1, DLM 2) aufgeteilt. Die Futterrationen basierten auf Mais und Sojaextraktionsschrot in einer Drei-Phasen-Fütterung (Phase 1: Tag 1-10; Phase 2: Tag 11-21; Phase 3: Tag 22-35). In der Kontrollgruppe (CON) entsprach die Methioninkonzentration der Empfehlung des NRC (1994). In den Gruppen DLM 1 und DLM 2 wurde Methionin zugelegt, sodass die Empfehlung des NRC (1994) für Methionin in der Gruppe DLM 1 um ca. 15% und in der Gruppe DLM 2 um ca. 30% überschritten wurden.

In beiden Versuchen wurden von 36 Tieren bei der Schlachtung Proben von Blut/Plasma, Leber und Schenkelmuskel genommen, in denen später die Konzentrationen der Oxidationsprodukte und der nicht enzymatischen Antioxidantien gemessen wurden.

Bei den Konzentrationen der Antioxidantien und dem Oxidationsprodukt TBARS konnten im Plasma bzw. Blut in beiden Versuchen keine Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen festgestellt werden. Im ersten Versuch war die Vitamin C-Konzentration der Leber in der Gruppe DLM 2 niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe und die Konzentration der TBARS war in der Leber des ersten Versuchs in der Gruppe DLM 1 niedriger als in der Kontrollgruppe. In der Leber des zweiten Versuchs war die Vitamin C-Konzentration der Gruppe DLM 2 niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe und im rohen Schenkelmuskel des zweiten Versuchs war die Vitamin C-Konzentration in der Gruppe DLM 1 höher als in der Kontrollgruppe. Die GSH-Konzentration in der Leber und im rohem Schenkelmuskel ist in beiden Versuchen in den Gruppen mit Methioninzulage höher im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Weiterhin wurden im erhitzten Schenkelmuskel des zweiten Versuchs die Konzentrationen von Cholesterol und Phytosterolen sowie deren Oxidationsprodukte gemessen. Die Cholesterolkonzentration war in der Gruppe DLM 1 signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Die Gruppe DLM 2 unterschied sich nicht von den anderen beiden Gruppen. Die Oxidationsprodukte 7 $\alpha$ -OH, 7 $\beta$ -OH und 7-Keto Cholesterol wiesen bei den Absolutkonzentrationen und auch bei den Relativwerten, bezogen auf den Cholesterolgehalt, signifikant niedrigere Konzentrationen in den Versuchsgruppen mit Methioninzulage auf, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Konzentration der Phytosterole wurde von den Methioninzulagen innerhalb der drei Versuchsgruppen nicht beeinflusst. Die Absolutwerte der Konzentrationen von 7 $\beta$ -OH Campesterol, 7 $\alpha$ -OH und 7 $\beta$ -OH Sitosterol, sowie die Summe der Campesterol-Oxidations-Produkte zeigten in den Gruppen mit Methioninzulage niedrigere Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Absolutwert der Konzentration von 7 $\alpha$ -OH Campesterol zeigte in der Gruppe DLM 1 eine niedrigere Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe, die Konzentration der Gruppe DLM 2 zeigte keinen Unterschied im Vergleich zu den anderen beiden Versuchsgruppen. Der Absolutwert der Konzentration von 7-Keto Campesterol zeigte in der Gruppe DLM 2 eine niedrigere Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe, die Konzentration der Gruppe DLM 1 zeigte keinen Unterschied im Vergleich zu der Kontrollgruppe und der Gruppe DLM 2. Die Absolutwerte der Konzentrationen von 7-Keto Sitosterol und der Summe der Sitosterol-Oxidations-Produkte zeigten keine Unterschiede innerhalb der drei Versuchsgruppen.

Die Relativwerte der Konzentrationen der Oxidationsprodukte von Campesterol, bezogen auf den Campesterolgehalt, zeigten für die Derivate 7 $\alpha$ -OH, 7 $\beta$ -OH, und 7-Keto Campesterol, sowie die Summe der Campesterol-Oxidations-Produkte in den Gruppen mit Methioninzulage niedrigere Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Konzentrationen der Relativwerte des Sitosterols, bezogen auf den Sitosterolgehalt, waren für die Derivate 7 $\alpha$ -OH und 7 $\beta$ -OH Sitosterol in den Gruppen DLM 1 und DLM 2 niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Konzentrationen von 7-Keto Sitosterol und der Summe der Sitosterol-Oxidations-Produkte zeigten keine Unterschiede innerhalb der drei Versuchsgruppen.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Methioninzulagen über den Bedarf für das optimale Wachstum hinaus einen Einfluss auf die GSH-Konzentrationen haben und das antioxidative System positiv beeinflussen. Die Methioninzulagen führten im erhitzten Schenkelmuskel unter futterinduzierter oxidativer Belastung zu einer Reduktion der COPs-Konzentrationen. Dieser Effekt ist im Hinblick auf die ernährungsphysiologische Qualität von Broilerfleisch interessant, da COPs als Bestandteile von Nahrungsmitteln unerwünschte Effekte für die menschliche Gesundheit haben können.

Auch die Konzentrationen der POPs im erhitzten Schenkelmuskel unter futterinduzierter oxidativer Belastung waren mit Methioninzulagen verringert. Aufgrund der niedrigeren Konzentrationen der POPs ist ihre Relevanz aber viel geringer als die der COPs.

## 9. Summary

In broiler nutrition, methionine is an important factor which is usually the first limiting amino acid. Methionine is important in many metabolic processes, essential for protein biosynthesis and also a precursor of the amino acid cysteine, which is involved in the formation of the antioxidant glutathione (GSH). Methionine can directly influence the formation of GSH and plays an important role in the antioxidant system.

The aim of the present study was to investigate the hypothesis that supplementation of methionine to the diet, in excess of the recommendations of the National Research Council (1994), improves the antioxidant system of broilers and inhibits the oxidation of lipids. In the first trial, soybean oil was used as source of fat in the diets and the vitamin E supply was above the NRC (1994) recommendations. In the second trial, soybean oil was replaced by linseed oil and there was no vitamin E supplementation of the diet. Linseed oil is rich of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which is susceptible to oxidation, and thus can lead to the occurrence of oxidative stress. Methionine was added in two different concentrations to investigate whether a methionine supply according to NRC (1994) recommendations was sufficient or whether the supplements had a positive effect on the animals' antioxidant system.

In both trials, 72 day-old male Cobb 500 broilers were allotted to three experimental groups (CON, DLM 1, DLM 2). The basal diets were based on corn and soy meal in a three-phase feeding (days 1-10, 11-21, 22-35). In the control group (CON) the methionine concentration was close to the NRC (1994) recommendations. Diets DLM 1 and DLM 2 were supplemented with methionine, so that the NRC (1994) recommendations were exceeded by approx. 15% in the group DLM 1 and by approx. 30% in the group DLM 2.

Samples of blood/plasma, liver and thigh muscle were taken in both trials from 36 animals each at slaughter. On these samples the concentrations of the oxidation products and non-enzymatic antioxidants were measured later.

In both trials, no differences could be found in the concentrations of the antioxidants and the oxidationproduct TBARS in the plasma or blood. In the first trial, the vitamin

C concentration of the liver was lower in the group DLM 2 than in the control group and the concentration of TBARS in the liver of the first trial was lower in the group DLM 1 than in the control group. In the liver of the second trial, the vitamin C concentration in the group DLM 2 was lower than in the control group, and in the raw thigh muscle of the second trial, the vitamin C concentration was higher in the group DLM 1 than in the control group. In both trials, the GSH concentration in liver and raw thigh muscle was higher in the groups supplemented with methionine than in the control groups.

Furthermore, the concentrations of cholesterol and phytosterols and their oxidation products were determined in the heated thigh muscle of the second trial. The cholesterol in the group DLM 1 showed significantly lower concentrations than in the control group and the oxidation products 7 $\alpha$ -OH-, 7 $\beta$ -OH- and 7-keto-cholesterol showed significantly lower concentrations for the absolute and for the relative values (expressed per mol cholesterol) in the groups supplemented with methionine than in the control group. The concentration of phytosterols was not influenced by methionine supplementation. The relative concentrations of the oxidation products of campesterol (expressed per mol campesterol), the derivatives 7 $\alpha$ -OH-, 7 $\beta$ -OH- and 7-keto-campesterol, as well as the sum of the campesterol oxidation products showed lower concentrations in the groups supplemented with methionine than in the control group. For the concentrations of the relative values of sitosterol (expressed per mol sitosterol), the derivatives 7 $\alpha$ -OH- and 7 $\beta$ -OH-sitosterol showed lower concentrations in groups DLM 1 and DLM 2 than in the control group. The concentrations of 7-keto-sitosterol and the sum of the sitosterol oxidation products showed no differences between the three groups of broilers.

Overall, the present study shows that the methionine supplements beyond the requirement for optimal growth have an influence on the GSH concentration in tissues and have a positive influence on the antioxidant system. The methionine supplements resulted in a reduction of COPs concentrations in the heated thigh muscle under feed-induced oxidative stress. This effect is of interest with regard to the nutritional quality of broiler meat, because COPs as constituents of food can have undesirable effects on human health.

## 10. Literaturverzeichnis

- Alawad A, Kolb E, Wahren M (1993): Die Aktivität der L-Gulonolactonoxidase in der Niere sowie der Gehalt an Ascorbinsäure in der Niere, in der Leber und im Plasma von Hühnern, Enten, Gänsen und Wachteln. *Archiv für Geflügelkunde* 4: 185-189
- Astley SB (2003): ANTIOXIDANTS | Role of Antioxidant Nutrients in Defense Systems. In: Caballero B (Hrsg.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press, Amsterdam, 282–289.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014): Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014: 1-31
- Barnes DM, Calvert CC, Klasing KC (1995): Methionine deficiency decreases protein accretion and synthesis but not tRNA acylation in muscles of chicks. *The Journal of Nutrition* 125: 2623–2630.
- Barriuso B, Ansorena D, Astiasarán I (2017): Oxysterols formation: A review of a multifactorial process. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 169: 39–45.
- Bauer LC, Santana DdA, Macedo MdS, Torres AG, Souza NEd, Simionato JI (2014): Method validation for simultaneous determination of cholesterol and cholesterol oxides in milk by RP-HPLC-DAD. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 25: 161–168.
- Bayram B, Rimbach G, Frank J, Esatbeyoglu T (2013): Rapid method for glutathione quantitation using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 402–408.
- Beheshti Moghadam M, Shehab A, Cherian G (2017): Methionine supplementation augments tissue n-3 fatty acid and tocopherol content in broiler birds fed flaxseed. *Animal Feed Science and Technology* 228: 149–158.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012): Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal* 5: 9.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003): Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91: 179–194.



- Bortolomeazzi R, Cordaro F, Pizzale L, Conte LS (2003): Presence of phytosterol oxides in crude vegetable oils and their fate during refining. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2394–2401.
- Brandsch C, Ringseis R, Eder K (2002): High dietary iron concentrations enhance the formation of cholesterol oxidation products in the liver of adult rats fed salmon oil with minimal effects on antioxidant status. *The Journal of Nutrition* 132: 2263–2269.
- Brigelius-Flohé R (2009): Vitamin E: the shrew waiting to be tamed. *Free Radical Biology and Medicine* 46: 543–554.
- Brosnan JT, Brosnan ME (2006): The sulfur-containing amino acids: an overview. *The Journal of Nutrition* 136: 1636S-1640S.
- Brosnan JT, Brosnan ME, Bertolo RFP, Brunton JA (2007): Methionine: a metabolically unique amino acid. *Livestock Science* 112: 2–7.
- Bunchasak C (2009): Role of dietary methionine in poultry production. *The Journal of Poultry Science* 46: 169–179.
- Chew BP (1995): Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. *The Journal of Nutrition* 125: 1804S-1808S.
- Davies MJ (2016): Protein oxidation and peroxidation. *Biochemistry Journal* 473: 805–825.
- Del Vesco AP, Gasparino E, Grieser DO, Zancanela V, Gasparin FRS, Constantin J, Oliveira Neto AR (2014): Effects of methionine supplementation on the redox state of acute heat stress-exposed quails. *Journal of Animal Science* 92: 806–815.
- DeLeve LD, Kaplowitz N (1991): Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics* 52: 287–305.
- Deutsch JC (2000): Dehydroascorbic acid. *Journal of Chromatography A* 881: 299–307.
- Dibner JJ, Knight CD (1984): Conversion of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid to L-methionine in the chick: a stereospecific pathway. *The Journal of Nutrition* 114: 1716–1723.
- Eder K, Grünthal G, Kluge H, Hirche F, Spilke J, Brandsch C (2005a): Concentrations of cholesterol oxidation products in raw, heat-processed and frozen-

stored meat of broiler chickens fed diets differing in the type of fat and vitamin E concentrations. *British Journal of Nutrition* 93: 633–643.

Eder K, Müller G, Kluge H, Hirche F, Brandsch C (2005b): Concentrations of oxysterols in meat and meat products from pigs fed diets differing in the type of fat (palm oil or soybean oil) and vitamin E concentrations. *Meat Science* 70: 15–23.

El-Senousey HK, Chen B, Wang JY, Am Atta, Mohamed FR, Nie QH (2017): Effects of dietary vitamin C, vitamin E, and alpha-lipoic acid supplementation on the antioxidant defense system and immune-related gene expression in broilers exposed to oxidative stress by dexamethasone. *Poultry Science* 97: 30–38.

Esterbauer H, Cheeseman KH (1990): Determination of Aldehydic Lipid Peroxidation Products Malonaldehyde and 4 Hydroxynonenal. *Methods in Enzymology* 186: 407–421.

Fébel H, Mézes M, Pálfi T, Hermán A, Gundel J, Lugasi A, Balogh K, Kocsis I, Blázovics A (2008): Effect of dietary fatty acid pattern on growth, body fat composition and antioxidant parameters in broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92: 369–376.

Finkelstein JD (2006): Inborn errors of sulfur-containing amino acid metabolism. *The Journal of Nutrition* 136: 1750–1754.

Fukai T, Ushio-Fukai M (2011): Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* 15: 1583–1606.

Galvin K, Morrissey PA, Buckley DJ (1998): Cholesterol oxides in processed chicken muscle as influenced by dietary  $\alpha$ -tocopherol supplementation. *Meat Science* 48: 1–9.

García-Llatas G, Rodríguez-Estrada MT (2011): Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chemistry and Physics of Lipids* 164: 607–624.

Georgiou CA, Constantinou MS, Kapnissi-Christodoulou CP (2014): Sample preparation: a critical step in the analysis of cholesterol oxidation products. *Food Chemistry* 145: 918–926.

- Ghani MA, Barril C, Bedgood DR, Prenzler PD (2017): Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chemistry* 230: 195–207.
- Giera M, Lingeman H, Niessen WMA (2012): Recent advancements in the LC-and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): a brief overview. *Chromatographia* 75: 433–440.
- Giustarini D, Dalle-Donne I, Milzani A, Fanti P, Rossi R (2013): Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide. *Nature Protocols* 8: 1660.
- Giustarini D, Dalle-Donne I, Milzani A, Rossi R (2011): Detection of glutathione in whole blood after stabilization with N-ethylmaleimide. *Analytical Biochemistry* 415: 81–83.
- Giustarini D, Galvagni F, Tesei A, Farolfi A, Zannoni M, Pignatta S, Milzani A, Marone IM, Dalle-Donne I, Nassini R (2015): Glutathione, glutathione disulfide, and S-glutathionylated proteins in cell cultures. *Free Radical Biology and Medicine* 89: 972–981.
- Grau A, Codony R, Grimpa S, Baucells MD, Guardiola F (2001): Cholesterol oxidation in frozen dark chicken meat: influence of dietary fat source, and  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid supplementation. *Meat Science* 57: 197–208.
- Grune T, Berger MM (2007): Markers of oxidative stress in ICU clinical settings: present and future. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 10: 712–717.
- Habibian M, Ghazi S, Moeini MM (2016): Effects of dietary selenium and vitamin E on growth performance, meat yield, and selenium content and lipid oxidation of breast meat of broilers reared under heat stress. *Biological Trace Element Research* 169: 142–152.
- Halliwell B, Chirico S (1993): Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition* 57: 715S-725S.
- Hang TTT, Molee W, Khempaka S (2018): Linseed oil or tuna oil supplementation in slow-growing chicken diets: Can their meat reach the threshold of a “high in n-3 polyunsaturated fatty acids” product? *Journal of Applied Poultry Research* 27: 389–400.

- Hara A, Radin NS (1978): Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry* 90: 420–426.
- Haug A, Eich-Greatorex S, Bernhoft A, Wold JP, Hetland H, Christophersen OA, Sogn T (2007): Effect of dietary selenium and omega-3 fatty acids on muscle composition and quality in broilers. *Lipids in Health and Disease* 6: 29.
- Hooper CL, Maurice DV, Lightsey F, Toler E (2000): Factors affecting ascorbic acid biosynthesis in chickens. I. Adaptation of an assay and the effect of age, sex and food deprivation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 84: 48–56.
- Hovenkamp E, Demonty I, Plat J, Lütjohann D, Mensink RP, Trautwein EA (2008): Biological effects of oxidized phytosterols: a review of the current knowledge. *Progress in Lipid Research* 47: 37–49.
- Husche C, Weingärtner O, Pettersson H, Vanmierlo T, Böhm M, Laufs U, Lütjohann D (2011): Validation of an isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry method for analysis of 7-oxygenated campesterol and sitosterol in human serum. *Chemistry and Physics of Lipids* 164: 425–431.
- Irias-Mata A, Sus N, Flory S, Stock D, Woerner D, Podszun M, Frank J (2018):  $\alpha$ -Tocopherol transfer protein does not regulate the cellular uptake and intracellular distribution of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols and-tocotrienols in cultured liver cells. *Redox Biology* 19: 28–36.
- Ishii K, Adachi J, Tomita M, Kurosaka M, Ueno Y (2002): Oxysterols as indices of oxidative stress in man after paraquat ingestion. *Free Radical Research* 36: 163–168.
- Iwasaki Y, Saito Y, Nakano Y, Mochizuki K, Sakata O, Ito R, Saito K, Nakazawa H (2009): Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples. *Journal of Chromatography B* 877: 3309–3317.
- Jacob RA (1995): The integrated antioxidant system. *Nutrition Research* 15: 755–766.
- Janero DR (1990): Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine* 9: 515–540.

Johnsson L, Andersson RE, Dutta PC (2003): Side-chain autooxidation of stigmasterol and analysis of a mixture of phytosterol oxidation products by chromatographic and spectroscopic methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80: 777–783.

Johnsson L, Dutta PC (2003): Characterization of side-chain oxidation products of sitosterol and campesterol by chromatographic and spectroscopic methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80: 767–776.

Khan A, Khan MI, Iqbal Z, Shah Y, Ahmad L, Nazir S, Watson DG, Khan JA, Nasir F, Khan A (2011): A new HPLC method for the simultaneous determination of ascorbic acid and aminothiols in human plasma and erythrocytes using electrochemical detection. *Talanta* 84: 789–801.

Khan MI, Min J-S, Lee S-O, Yim DG, Seol K-H, Lee M, Jo C (2015): Cooking, storage, and reheating effect on the formation of cholesterol oxidation products in processed meat products. *Lipids in Health and Disease* 14: 89.

Kulig W, Cwiklik L, Jurkiewicz P, Rog T, Vattulainen I (2016): Cholesterol oxidation products and their biological importance. *Chemistry and Physics of Lipids* 199: 144–160.

Kulig W, Olżyńska A, Jurkiewicz P, Kantola AM, Komulainen S, Manna M, Pourmousa M, Vazdar M, Cwiklik L, Rog T (2015): Cholesterol under oxidative stress—how lipid membranes sense oxidation as cholesterol is being replaced by oxysterols. *Free Radical Biology and Medicine* 84: 30–41.

Lawrence RA, Burk RF (1976): Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 71: 952–958.

Lee C-YJ, Huang SH, Jenner AM, Halliwell B (2008): Measurement of F2-isoprostanes, hydroxyeicosatetraenoic products, and oxysterols from a single plasma sample. *Free Radical Biology and Medicine* 44: 1314–1322.

Lemaire-Ewing S, Desrumaux C, Néel D, Lagrost L (2010): Vitamin E transport, membrane incorporation and cell metabolism: Is  $\alpha$ -tocopherol in lipid rafts an oar in the lifeboat? *Molecular Nutrition & Food Research* 54: 631–640.

Leskovec J, Levart A, Nemec Svete A, Perić L, Đukić Stojčić M, Žikić D, Salobir J, Rezar V (2018): Effects of supplementation with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbic acid, selenium, or their combination in linseed oil-enriched diets on the oxidative status in broilers. *Poultry Science* 97: 1641–1650.

- Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman ER (1996): Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 15036–15040.
- Lin Y, Knol D, Trautwein EA (2016): Phytosterol oxidation products (POP) in foods with added phytosterols and estimation of their daily intake: A literature review. *European Journal of Lipid Science and Technology* 118: 1423–1438.
- Lushchak VI (2015): Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stresses and their classifications. *The Ukrainian Biochemical Journal*: 11–18.
- Lykkesfeldt J (2001): Determination of malondialdehyde as dithiobarbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorescence detection: comparison with ultraviolet-visible spectrophotometry. *Clinical Chemistry* 47: 1725–1727.
- Lykkesfeldt J, Loft S, Nielsen JB, Poulsen HE (1997): Ascorbic acid and dehydroascorbic acid as biomarkers of oxidative stress caused by smoking. *The American Journal of Clinical Nutrition* 65: 959–963.
- Magnuson AD, Liu G, Sun T, Tolba SA, Xi L, Whelan R, Lei XG (2020): Supplemental methionine and stocking density affect antioxidant status, fatty acid profiles, and growth performance of broiler chickens. *Journal of Animal Science* 98: 1-12.
- Maraschiello C, Sárraga C, Garcia Regueiro JA (1999): Glutathione peroxidase activity, TBARS, and  $\alpha$ -tocopherol in meat from chickens fed different diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 867–872.
- Mari M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC (2009): Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxidants & Redox Signaling* 11: 2685–2700.
- Martin-Venegas R, Geraert PA, Ferrer R (2006): Conversion of the methionine hydroxy analogue DL-2-hydroxy-(4-methylthio) butanoic acid to sulfur-containing amino acids in the chicken small intestine. *Poultry Science* 85: 1932–1938.
- Martín-Venegas R, Brufau MT, Guerrero-Zamora AM, Mercier Y, Geraert P-A, Ferrer R (2013): The methionine precursor DL-2-hydroxy-(4-methylthio) butanoic acid protects intestinal epithelial barrier function. *Food Chemistry* 141: 1702–1709.

- Meister A (1992): On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione. *Biochemical Pharmacology* 44: 1905–1915.
- Métayer S, Seiliez I, Collin A, Duchêne S, Mercier Y, Geraert P-A, Tesseraud S (2008): Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 19: 207–215.
- Mezzetti A (1990): Glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione transferase activities in the human artery, vein and heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 22: 935–938.
- Milankovic B, Ciric J, Krstick M, Starcevic M, Baltic B, Sefer D, Dordevic V, Popovic M, Markovic R (2019): Effect of dietary fatty acid pattern on growth performance, carcass characteristics, fatty acid profile, and serum biochemistry parameters in broiler chickens. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* 25: 507–516.
- Mohrmann S (2018): Experimentelle Untersuchungen zur Wirkung von Methionin auf den antioxidativen Status beim Broiler. Inaugural-Dissertation, Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- National Research Council (1994): Nutrient requirements of poultry: 1994. National Academies Press.
- Ogunji PA, Brewer RN, Roland Sr DA, Caldwell D (1983): Effect of dietary sodium chloride, protein, and strain difference upon water consumption and fecal moisture content of broiler breeder males. *Poultry Science* 62: 2497–2500.
- Otaegui-Arrazola A, Menéndez-Carreño M, Ansorena D, Astiasarán I (2010): Oxysterols: A world to explore. *Food and Chemical Toxicology* 48: 3289–3303.
- Padh H (1991): Vitamin C: newer insights into its biochemical functions. *Nutrition Reviews* 49: 65–70.
- Raith K, Brenner C, Farwanah H, Müller G, Eder K, Neubert RHH (2005): A new LC/APCI-MS method for the determination of cholesterol oxidation products in food. *Journal of Chromatography A* 1067: 207–211.
- Reid TJ, Murthy MR, Sicignano A, Tanaka N, Musick WD, Rossmann MG (1981): Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78: 4767–4771.

- Richards JD, Atwell CA, Vazquez-Anon M, Dibner JJ (2005): Comparative in vitro and in vivo absorption of 2-hydroxy-4 (methylthio) butanoic acid and methionine in the broiler chicken. *Poultry Science* 84: 1397–1405.
- Ringseis R, Eder K (2002): Insufficient dietary vitamin E increases the concentration of 7 $\beta$ -hydroxycholesterol in tissues of rats fed salmon oil. *The Journal of Nutrition* 132: 3732–3735.
- Roy RN, Guha BC (1958): Species difference in regard to the biosynthesis of ascorbic acid. *Nature* 182: 319–320.
- Ruiz JA, Pérez-Vendrell AM, Esteve-García E (1999): Effect of  $\beta$ -carotene and vitamin E on oxidative stability in leg meat of broilers fed different supplemental fats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 448–454.
- Ryan E, Chopra J, McCarthy F, Maguire AR, O'Brien NM (2005): Qualitative and quantitative comparison of the cytotoxic and apoptotic potential of phytosterol oxidation products with their corresponding cholesterol oxidation products. *British Journal of Nutrition* 94: 443–451.
- Ryan E, McCarthy F, Maguire A, O'Brien N (2009): Phytosterol Oxidation Products: Their Formation, Occurrence, and Biological Effects. *Food Reviews International* 25: 157–174.
- Sahin K, Sahin N, Yarlioglu S (2002): Effects of vitamin C and vitamin E on lipid peroxidation, blood serum metabolites, and mineral concentrations of laying hens reared at high ambient temperature. *Biological Trace Element Research* 85: 35–45.
- Saller R, Römer-Lüthi C, Brignoli R, Meier R (2006): Mehrfach ungesättigte Fettsäuren PUFA: Ein wichtiger Bestandteil in Zellstoffwechsel und Ernährung. *Schweizerische Zeitschrift für Ganzheitsmedizin/Swiss Journal of Integrative Medicine* 18: 384–392.
- Sato Y, Uchiki T, Iwama M, Kishimoto Y, Takahashi R, Ishigami A (2010): Determination of dehydroascorbic acid in mouse tissues and plasma by using tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride as reductant in metaphosphoric acid/ethylenediaminetetraacetic acid solution. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 33: 364–369.
- Sauer N, Emrich K, Piepho H-P, Lemme A, Redshaw MS, Mosenthin R (2008): Meta-analysis of the relative efficiency of methionine-hydroxy-analogue-free-acid



compared with DL-methionine in broilers using nonlinear mixed models. *Poultry Science* 87: 2023–2031.

Schött H-F, Baumgartner S, Husche C, Luister A, Friedrichs S, Miller CM, McCarthy FO, Plat J, Laufs U, Weingärtner O, Lütjohann D (2017): Oxidation of sitosterol and transport of its 7-oxygenated products from different tissues in humans and ApoE knockout mice. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 169: 145–151.

Schrader M, Fahimi HD (2006): Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1763: 1755–1766.

Shen YB, Ferket P, Park I, Malheiros RD, Kim SW (2015): Effects of feed grade L-methionine on intestinal redox status, intestinal development, and growth performance of young chickens compared with conventional DL-methionine. *Journal of Animal Science* 93: 2977–2986.

Shunthwal J, Sheoran N (2017): Influence of linseed oil feeding on performance and fatty acid composition of muscles in broiler chicks. *The Pharma Innovation Journal* 6: 268–273.

Shunthwal J, Yadav AS, Sihag S, Kumar R, Baloda S, Sheoran N (2016): Effect of linseed oil feeding on serum lipids and fatty acid profile of breast and thigh muscle in broiler chicken. *Indian Journal of Animal Nutrition* 33: 461–466.

Sies H (1986): Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English* 25: 1058–1071.

Sies H (1997): Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration* 82: 291–295.

Sies H, Stahl W, Sundquist AR (1992): Antioxidant Functions of Vitamins: Vitamins E and C, Beta-Carotene, and Other Carotenoids a. *Annals of the New York Academy of Sciences* 669: 7–20.

Šošić-Jurjević B, Lütjohann D, Renko K, Filipović B, Radulović N, Ajdžanović V, Trifunović S, Nestorović N, Živanović J, Manojlović Stojanoski M, Köhrle J, Milošević V (2019): The isoflavones genistein and daidzein increase hepatic concentration of thyroid hormones and affect cholesterol metabolism in middle-aged male rats. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 190: 1–10.

Steffan J (1999): Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma und Leukozyten mit HPLC/UV und HPLC/EC. Genehmigte Dissertation, Fachbereich Chemie und Chemietechnik, Universität-Gesamthochschule, Paderborn.

Surai PF (1999): Tissue-specific changes in the activities of antioxidant enzymes during the development of the chicken embryo. *British Poultry Science* 40: 397–405.

Swennen Q, Geraert P-A, Mercier Y, Everaert N, Stinckens A, Willemsen H, Li Y, Decuyper E, Buyse J (2011): Effects of dietary protein content and 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid or DL-methionine supplementation on performance and oxidative status of broiler chickens. *British Journal of Nutrition* 106: 1845–1854.

Traber MG, Atkinson J (2007): Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine* 43: 4–15.

Traber MG, Packer L (1995): Vitamin E: beyond antioxidant function. *The American Journal of Clinical Nutrition* 62: 1501S-1509S.

Traber MG, Stevens JF (2011): Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology and Medicine* 51: 1000–1013.

van Reyk DM, Brown AJ, Hult'en LM, Dean RT, Jessup W (2006): Oxysterols in biological systems: sources, metabolism and pathophysiological relevance. *Redox Report* 11: 255–262.

Vanmierlo T, Husche C, Schött HF, Pettersson H, Lütjohann D (2013): Plant sterol oxidation products-analogs to cholesterol oxidation products from plant origin? *Biochimie* 95: 464–472.

Voljč M, Levart A, Žgur S, Salobir J (2013): The effect of  $\alpha$ -tocopherol, sweet chestnut wood extract and their combination on oxidative stress in vivo and the oxidative stability of meat in broilers. *British Poultry Science* 54: 144–156.

Wasowicz W, Neve J, Peretz A (1993): Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clinical Chemistry* 39: 2522–2526.

Wocheslander SP, Engel K-H (2018): Phytosterol and acyl chain oxidation products formed upon thermal treatment of phytosteryl/-stanyl fatty acid esters. Genehmigte

- Dissertation, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Technische Universität, München.
- Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN, Sunderman F (1987): Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clinical Chemistry* 33: 214–220.
- Wu G, Fang Y-Z, Yang S, Lupton JR, Turner ND (2004): Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of Nutrition* 134: 489–492.
- Yang GL, Zhang KY, Ding XM, Zheng P, Luo YH, Bai SP, Wang JP, Xuan Y, Su ZW, Zeng QF (2016): Effects of dietary DL-2-hydroxy-4(methylthio)butanoic acid supplementation on growth performance, indices of ascites syndrome, and antioxidant capacity of broilers reared at low ambient temperature. *International Journal of Biometeorology* 60: 1193–1203.
- Yin H, Xu L, Porter NA (2011): Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews* 111: 5944–5972.
- Zeitz JO, Ehbrecht T, Fleischmann A, Most E, Gessner DK, Friedrichs S, Sparenberg M, Failing K, Whelan R, Lütjohann D, Eder K (2020): Effect of DL-Methionine Supplementation on Tissue and Plasma Antioxidant Status and Concentrations of Oxidation Products of Cholesterol and Phytosterols in Heat-Processed Thigh Muscle of Broilers. *Animals* 10: 2050
- Zeitz JO, Mohrmann S, Fehse L, Most E, Helmbrecht A, Saremi B, Eder K (2018): Tissue and plasma antioxidant status in response to dietary methionine concentration and source in broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 102: 999–1011.
- Zeitz JO, Most E, Eder K (2016): Conjugated linoleic acid influences the metabolism of tocopherol in lactating rats but has little effect on tissue tocopherol concentrations in pups. *Lipids in Health and Disease* 15: 102.
- Zhao Y, Monahan FJ, McNulty BA, Li K, Bloomfield FJ, Duff DJ, Brennan L, Nugent AP, Gibney ER (2017): Plasma n-3 polyunsaturated fatty status and its relationship with vitamin E intake and plasma level. *European Journal of Nutrition* 56: 1281–1291.
- Zhao YR, Chen YP, Cheng YF, Qu HM, Li J, Wen C, Zhou YM (2019): Effects of dietary phytosterols on growth performance, antioxidant status, and meat quality in Partridge Shank chickens. *Poultry Science* 98: 3715–3721.

## **11. Danksagung**

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Eder bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat an seinem Institut meine Dissertation anzufertigen und mir das Projekt und das Thema überlassen hat.

Ein großer Dank gilt Frau Dr. Johanna O. Zeitz, die das Projekt mit betreut hat und mir immer engagiert und hilfsbereit zur Seite stand. Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Dr. Erika Most und Frau Dr. Denise Geßner für ihre fachlich kompetente Beratung und Betreuung bedanken.

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern sowie Doktorandinnen und Doktoranden des Instituts bedanken, die an dieser Arbeit beteiligt waren. Vielen Dank Frauke Frank und Marco Jäger für eure Hilfe in allen Lebenslagen.

Anne Fleischmann und Sandra Meyer vielen Dank für alles!!

Ich danke meinen Freunden und meiner Familie, die immer für mich da sind und mir mit Rat und Tat zur Seite stehen. Vor allem danke ich meinem Vater Gerald Ehbrecht, der mich bei jeder Entscheidung in meinem Leben unterstützt hat und mir den Weg des Studiums und dieser Arbeit ermöglicht hat.

Von Herzen bedanke ich mich bei meinem Mann Fabrian Scholz für die Unterstützung, seinen Zuspruch und seine endlose Geduld.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-7039-7



9 783835 197039 7