

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

**Auswirkungen einer Supplementierung von
n-3-Fettsäuren und Selen unterschiedlicher Quellen auf
Blutparameter des antioxidativen Stoffwechsels beim
Pferd**

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

vorgelegt von
Dominique Rauch
Tierärztin aus Starnberg

Berlin 2018
Journal-Nr.: 4002

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

**Auswirkungen einer Supplementierung von
n-3-Fettsäuren und Selen unterschiedlicher Quellen auf
Blutparameter des antioxidativen Stoffwechsels beim
Pferd**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dominique Rauch

Tierärztin aus

Starnberg

Berlin 2018

Journal-Nr.: 4002

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Gehlen
Dritter Gutachter: PD Dr. Christoph Gabler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Horses; selenium; unsaturated fatty acids; saturated fatty acids; oxidation;
blood parameters; metabolism; blood plasma

Tag der Promotion: 24.04.2018

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-891-7

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2018

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2018

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT.....	2
2.1	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren.....	2
2.1.1	Metabolismus essenzieller Fettsäuren.....	2
2.1.2	Einfluss ungesättigter Fettsäuren auf physiologische und pathologische Prozesse.....	4
2.1.2.1	Immunmodulation und Entzündungsreaktion.....	4
2.1.2.2	Antioxidativer Stoffwechsel und körperliche Leistung	7
2.1.3	Fett in der Pferdefütterung	9
2.1.4	Natürliche Quellen von n3-Fettsäuren	10
2.1.5	Fettsäuremuster in Plasma und Zellen des Pferdes	11
2.1.6	Veränderung des Fettsäuremusters durch gezielte Ölsupplementierung beim Pferd	13
2.2	Selen – Bedeutung in physiologischen und pathologischen Prozessen	15
2.2.1	Metabolismus.....	15
2.2.2	Biochemische Funktionen von Selen	16
2.2.3	Selenstatus des Pferdes	18
2.2.4	Selenbedarf des Pferdes	19
2.2.5	Bedeutung von Selen in physiologischen und pathologischen Prozessen.....	20
2.2.5.1	Immunsystem	20
2.2.5.2	Skelettmuskulatur	22
2.2.6	Bedeutung von Selen im antioxidativen Stoffwechsel	23
2.3	Antioxidativer Stoffwechsel.....	25
2.3.1	Oxidatives System.....	25
2.3.2	Antioxidative Schutzsysteme	26
2.3.3	Oxidativer Stress.....	27
2.3.4	Radikalassozierte Erkrankungen beim Pferd	28
2.3.4.1	Recurrent airway obstruction (RAO).....	28
2.3.4.2	Neurologische Erkrankungen	30
2.3.4.3	Muskelerkrankungen	31
2.3.4.4	Perfusionsstörungen	32
2.3.4.5	Gelenkerkrankungen.....	33
2.3.4.6	Chronische intestinale Erkrankungen.....	33
2.3.5	Oxidativ/ Antioxidatives Gleichgewicht bei physiologischen Prozessen	34
2.3.5.1	Reproduktion	34

2.3.5.2	Körperliche Leistung / Belastung	34
2.3.6	Supplementierung von Antioxidantien beim Sportpferd.....	36
3	MATERIAL UND METHODEN	39
3.1	Versuchstiere	39
3.1.1	Haltung.....	39
3.1.2	Futter und Futterzusätze.....	39
3.1.2.1	Untersuchung von Futtermittelproben (Weender Analyse, Spurenelemente)	41
3.2	Studiendesign.....	46
3.2.1	Versuchsplan.....	46
3.2.2	Versuchszeitraum.....	46
3.3	Blutprobengewinnung und –aufbereitung	47
3.4	Untersuchungsmethoden	48
3.4.1	Zusammensetzung der Fettsäuren im Blutplasma.....	48
3.4.2	Selengehalte im Blutserum	50
3.4.3	Untersuchungen zur Beurteilung des antioxidativen Status	50
3.4.3.1	Messung der antioxidativen Kapazität (TEAC).....	50
3.4.3.2	Bestimmung von GSH und GSSG im Erythrozytenlysat	51
3.4.3.3	Glutathionperoxidase.....	52
3.4.3.4	Bestimmung Hb-Gehalt.....	53
3.4.5	Statistische Analyse	53
4	ERGEBNISSE	57
4.1	Fettsäuremuster im Blutplasma	57
4.1.1	Gesättigte Fettsäuren des Plasmas	57
4.1.2	Einfach ungesättigte Fettsäuren im Plasma.....	58
4.1.3	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren des Plasmas	59
4.1.3.1	n-6 Fettsäuren	59
4.1.3.2	n- 3 Fettsäuren	61
4.3	Selengehalte im Blutserum	63
4.4	Antioxidativer Status	64
4.4.1	Totale antioxidative Kapazität (TEAC)	64
4.4.2	Glutathion (GSH) im Erythrozytenlysat	66
4.4.3	Glutathionperoxidase	68

5	DISKUSSION	72
5.1	Kritik der verwendeten Methoden	72
5.1.1	Versuchstiere – Haltung – Fütterung	72
5.1.2	Probenentnahme, -analysen, Auswertung der Daten.....	73
5.2	Fettsäuremuster im Plasma des Pferdes.....	74
5.2.1	Dosierung der Fettsäuren	74
5.2.2	Fettsäuremuster in Blutplasma	74
5.2.3	Einfluss einer Ölsupplementierung auf das Fettsäuremuster beim Pferd.....	74
5.2.4	Beeinflussung des antioxidativen Stoffwechsels	76
5.3	Selengehalte im Blutserum	77
5.4	Einfluss von n3-Fettsäuren und Selen auf den antioxidativen Status	78
5.4.1	Totale antioxidative Kapazität (TEAC)	79
5.4.2	Glutathion im Erythrozytenlysat	80
5.4.3	Glutathionperoxidase	80
5.5	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	83
6	ZUSAMMENFASSUNG	85
7	SUMMARY.....	86
8.	LITERATURVERZEICHNIS	87

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
Abb	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AfBN	Ausschuss für Bedarfsnormen
ALA	α -Linolensäure
AST	Aspartat-Aminotransferase
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveolar Lavage Flüssigkeit
CAT	Katalase
CK	Kreatinkinase
COX	Cyclooxygenase
Cu	Kupfer
DGLA	Dihomogammalinolensäure
DHA	Docosahexaensäure
EIPH	Exercise-induced pulmonary hemorrhage
EMND	Equine Motor Neuron Disease
EPA	Eicosapentaensäure
Fe	Eisen
FRAP	ferric reducing ability of plasma
FS	Fettsäure
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IE	internationale Einheit
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KM	Körpermasse
LA	Linolsäure
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LTB	Leukotrien B
MDA	Malondialdehyd
Mn	Mangan
MPO	Myeloperoxidase
MW	Mittelwert
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMD	nutritive Muskeldegeneration
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PGE	Prostaglandin E
pH-Wert	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PPID	Pituitary Pars Intermedia Dysfunction
Ra	Rohasche

RAO	Recurrent Airway Obstruction
Rfa	Rohfaser
Rfe	Rohfett
ROS	reactive oxygen species
Rp	Rohprotein
Se	Selen
SOD	Superoxiddismutase
SD	Standardabweichung
Tab	Tabelle
TAG	Triacylglyceride
TEAC	Trolox Equivalente Antioxidative Capacity (totale antioxidative Kapazität)
TNF	Tumornekrosefaktor
TS	Trockensubstanz
TXB	Thromboxan B
WMD	White Muscle Disease
Zn	Zink

1 Einleitung

Das antioxidative System des Körpers dient dem Schutz von Zellmembranen und Komponenten des Zytoplasmas vor schädlich wirkenden freien Radikalen (Winnefeld, 1996). Oxidativer Stress entsteht als Folge eines Ungleichgewichtes zwischen pro- und antioxidativen Prozessen und deutet darauf hin, dass die antioxidative Kapazität eines Individuums überschritten ist (Stohrer *et al.*, 2002). In der Humanmedizin gilt die Beteiligung von oxidativem Stress an der Entstehung diverser chronischer Erkrankungen, wie der chronischen Polyarthrit, der Colitis ulcerosa, des Diabetes mellitus, kardialer Myopathien sowie verschiedener Krebs- und Tumorerkrankungen, als wissenschaftlich erwiesen. Auch Studien am Pferd deuten bereits eine Beteiligung freier Radikale an der Pathogenese zahlreicher Krankheiten wie der „Equine Motor Neuron Disease“ (EMND), der Recurrent Airway Obstruction (RAO), chronischer Gelenkerkrankungen, der Grass Sickness, diverser Myopathien und des equinen Cushing Syndroms (PPID) an. Studien am Sportpferd zeigten, dass oxidativer Stress auch während körperlicher Leistung auftritt und von Belastungsintensität, -dauer sowie der Umgebungstemperatur abhängt (Mills *et al.*, 1996). Die Bekämpfung von oxidativem Stress ist somit auch zu einem zentralen Thema in der Ernährung von Pferden geworden. Untersuchungen an Reit- und Rennpferden haben gezeigt, dass oxidativer Stress durch Verfütterung antioxidativ wirkender Substanzen positiv beeinflusst werden kann (Butenandt, 2002).

In der vorliegenden Studie sollen die Auswirkungen einer Supplementierung von n-3-Fettsäuren aus Leinöl und Selen unterschiedlicher Quellen (Na-Selenit, Selenhefen) auf Blutparameter des antioxidativen Stoffwechsels bei Pferden untersucht werden.

Folgende Hypothese lag der Arbeit zu Grunde:

Eine Supplementierung von n-3-Fettsäuren aus Leinöl und von Selen als Na-Selenit oder als Selenhefe, verändert das Fettsäuremuster im Plasma und erhöht die Selengehalte im Serum junger Vollblutpferde; Blutparameter des antioxidativen Systems (TEAC, GSH, GPx) werden durch die Gabe von Selen in Abhängigkeit von der Darreichungsform beeinflusst.

2 Literaturübersicht

2.1 Mehrfach ungesättigte Fettsäuren

2.1.1 Metabolismus essenzieller Fettsäuren

Linolsäure (LA, C18:2 n6) und α -Linolensäure (ALA, C18:3 n3) sind essenzielle Fettsäuren für Säugetiere, da ihnen die enzymatische Ausstattung fehlt, Doppelbindungen an den Positionen 6 und 3 in Fettsäuren einzufügen. Alle übrigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren können auf der Basis dieser beiden vom Organismus über Desaturasen und Elongasen synthetisiert werden (Chapkin, 2000). Für Feliden ist zusätzlich noch die Arachidonsäure (AA, C20:4 n6) ein essentieller Nahrungsbestandteil (Berdanier, 2000).

Eine unzureichende orale Aufnahme essenzieller Fettsäuren kann zu diversen Mangelercheinungen wie Wachstumsdepression, schuppiger Dermatitis, erhöhter Wasseraufnahme infolge eines erhöhten transepidermalen Wasserverlustes und Fruchtbarkeitsstörungen führen (Ziboh *et al.*, 2000).

Als wesentlicher Bestandteil der Zellmembran beeinflussen mehrfach ungesättigte Fettsäuren die Membranfluidität. Der funktionelle Effekt mehrfach ungesättigter Fettsäuren liegt im Aufbau von Lipidmediatoren über Cyclooxygenase (Entstehung von Prostaglandinen, Thromboxanen) sowie Lipoxygenase (Entstehung von Leukotrienen), die dabei entstehenden Eicosanoide beeinflussen zahlreiche physiologische sowie pathologische Prozesse (Tab. 1). Als Substrat dienen die Arachidonsäure (AA, C20:4 n6) und die Eicosapentaensäure (EPA, C20:5 n3) (Sipka *et al.*, 1996).

Tab.1: Überblick über verschiedene Eicosanoide, ihre Ausgangsfettsäuren und die hauptsächlichliche Wirkung im Stoffwechsel (modifiziert nach Seidel 2004)

Eicosanoid	Fett-säure	Wirkung
<u>Prostaglandine</u> (PG)		
PGE ₁	DGLA	<ul style="list-style-type: none"> • Hemmt LOX, Phospholipase und Blutplättchenaggregation • Fördert Vasodilatation
PGE ₂	AA	<ul style="list-style-type: none"> • Hemmt T-Zellproliferation und Lymphozytenfunktion
PGD ₂	AA	<ul style="list-style-type: none"> • Fördert Vasodilatation und Ödembildung
PGI ₂	AA	<ul style="list-style-type: none"> • Hemmt Blutplättchenaggregation • Fördert Vasokonstriktion
PGF ₂	AA	<ul style="list-style-type: none"> • Fördert Vasokonstriktion
PGE ₃	EPA	<ul style="list-style-type: none"> • Geringere Vasodilatation • antiinflammatorisch
<u>Leukotriene</u>		
LTB ₄	AA	<ul style="list-style-type: none"> • Fördert Leukozytenchemotaxis, -aktivierung und -degranulation • Erhöht Gefäßpermeabilität
LTC ₄ , D ₄ , E ₄	AA	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöht Gefäßpermeabilität • Fördert Vasokonstriktion
LTB ₅	EPA	<ul style="list-style-type: none"> • 10 – 100x weniger aktiv als LTB₄ • Blockiert LTB₄-Rezeptor

AA = Arachidonsäure, DGLA = Dihomogammalinolensäure, EPA = Eicosapentaensäure, LOX = Lipoxygenase

Sowohl die Aufnahme essenzieller Fettsäuren als auch der Influx der Substrate in den Cyclooxygenase- bzw. Lipoxygenaseweg beeinflussen die Bildung pro- oder antiinflammatorischer Eicosanoide. Aus AA synthetisierte Eicosanoide zeigen eine proinflammatorische Wirkung, wohingegen Mediatoren aus DGLA und EPA die Bildung von AA-Metaboliten und deren Wirkung hemmen (Calder, 1998; Boissonneault, 2000).

2.1.2 Einfluss ungesättigter Fettsäuren auf physiologische und pathologische Prozesse

2.1.2.1 Immunmodulation und Entzündungsreaktion

Sowohl als Bestandteil der Zellmembran (Membranfluidität) als auch als Ausgangssubstrat der Eicosanoide spielen mehrfach ungesättigten Fettsäuren als Immunmodulatoren eine wichtige Rolle (Boissonneault, 2000).

Die forcierte Einnahme von n-6-FS erhöhte die Blutviskosität, reduzierte die Gerinnungszeit und zeigte eine vasokonstriktorische, thrombotische und proaggregatorische Wirkung. Die Effekte einer Supplementierung mit n-3-FS zeigten sich als antiinflammatorische, antithrombotische, antiarrhythmische und vasodilatatorische Wirkung. So wird den n-3-FS in der Humanmedizin ein therapeutisch nützlicher Effekt in der Prävention von Herzinfarkten, Bluthochdruck, Typ 2 Diabetes, Nierenerkrankungen, rheumatischen Gelenkserkrankungen, ulzerativer Colitis und chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen zugesprochen (Simopoulos, 1999, 2002; Cherubini *et al.*, 2009).

Wie es genau zu einer immunmodulierenden Wirkung durch n-3-FS kommt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Calder *et al.* (2002) zeigten eine Reduktion proinflammatorischer Zytokine durch Supplementierung von n-3-FS; es konnte ein Austausch von AA durch EPA in der Membran von Entzündungszellen beobachtet werden und somit die Produktion von AA-Derivaten beeinflusst werden.

Babcock *et al.* (2000) stellten die Regulation der Expression von Schlüsselgenen für Immunzell-Funktionen durch EPA in den Vordergrund.

EPA fungiert auch als Stabilisator der Zellmembran und vermag somit die Chemotaxis von Leukozyten und Phagozytose abzuschwächen sowie die Produktion von Zytokinen anzuregen; die Gabe von Fischöl an Colitis-Patienten reduzierte die Schädigung und Entzündung des Colonepithels und schwächte Gewichtsverluste ab (Calder, 2008).

Simopoulos *et al.* (2002) untersuchten die Beteiligung von n-3-FS an entzündlichen Prozessen und autoimmunbedingten Erkrankungen. Bei Patienten, die an Erkrankungen der Herzkranzgefäße, Depressionen, Tumoren, rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn oder ulzerativer Colitis litten, konnte ein Anstieg der proinflammatorischen Zytokine Interleukin 1 und LTB 4 nachgewiesen werden. DHA und EPA führten über die Inhibition des Metabolismus von AA in proinflammatorischen Eicosanoiden zu einer Reduktion der Zytokine IL-1 und LTB 4.

In einer Studie von Ruggiero *et al.* (2009) verbesserte die Verabreichung von n-3-FS die Symptome rheumatisch bedingter Arthritis; sowohl die Schmerzen wie auch die morgendliche Steifheit der Gelenke veränderte sich für die Patienten zum Positiven, die Einnahme nicht-steroidaler Antiphlogistika konnte reduziert und die körperliche Fitness verbessert werden.

Eine Supplementierung von n-3-FS führte im Allgemeinen zu reduzierten Entzündungsreaktionen von Versuchstieren auf verschiedene Stimuli. Die Überlebensrate nach Endotoxingabe (Lipopolysaccharide) war im Zusammenhang mit einer n-3-fettsäurenreichen Fütterung deutlich höher und die Fieber- und Anorexiereaktion auf Zytokininfusionen konnte durch Fischöl-Zulage reduziert werden. Die Gabe von Fischöl führte zu einem Austausch von AA durch EPA in der Zellmembran und beeinflusste somit die Eicosanoid-Synthese. Daher wird oft eine unterstützende Verabreichung von n-3-FS bei chronischen Entzündungen und Erkrankungen mit einer Dysfunktion des Immunsystems empfohlen (Blok *et al.*, 1996; Calder, 1998).

Vorliegende in-vitro-Ergebnisse lassen eine Reduktion der Entzündungsreaktion durch n-3-FS auch bei Pferden vermuten. Nach einer achtwöchigen Supplementierung mit Leinöl zeigte sich eine deutlich reduzierte Thromboxan B₂ Produktion isolierter Pferdemonozyten nach Stimulation durch *Escherichia coli*-Endotoxin im Vergleich mit der Kontrollgruppe, die Leukotrien B₄ Produktion blieb jedoch unverändert (Henry *et al.*, 1990).

Die Fettsäurezusammensetzung (hoher Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren) des Futters korreliert positiv mit dem Fettsäuremuster von Lymphozyten und anderen Immunzellen; somit führt eine Supplementierung von Fettsäuren zu einer erhöhten Eicosanoid-Bildungskapazität. EPA erwies sich als besonders potent und führte maßgeblich zu einer Reduzierung der T-Helferzellen (Calder *et al.*, 2002).

In der Studie von Hall *et al.* (2004) konnte ein Zusammenhang zwischen der Gabe von Fischöl und einer geringeren PGE₂-Synthese sowie einer erhöhten Bildungsrate von Tumornekrosefaktor α und Leukotrien B bei gesunden Pferden aufgezeigt werden.

In einem anderen Versuch ließ sich die Entzündungsreaktion der Monozyten in vitro durch Gabe einer n-3- und n-6-haltige Infusion modifizieren. Die Synthese von Thromboxanen und TNF α konnte durch eine n-3-haltige Infusion deutlich reduziert werden; eine Infusion mit n-6-FS führte zu einer entgegengesetzten Reaktion (McCann *et al.*, 2000).

Mustermann *et al.* (2005) untersuchten den Einfluss von ALA auf synoviale Strukturen nach Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) als Modell einer synovialen Entzündung beim Pferd. Die Verabreichung von LPS in synoviale Expanstate führte zu einer signifikant

gesteigerten Synthese von PGE₂ (zelluläre Entzündungsreaktion) und einer verminderten Produktion von Hyaluronsäure in der Kontrollgruppe. Die Verabreichung von α -Linolensäure hemmte die Synthese von PGE₂; die Ergebnisse weisen auf einen antiinflammatorischen Effekt von n-3-Fettsäuren in der Pathogenese der Synovitis beim Pferd hin.

Eine Zufütterung von Leinsamen über 42 Tage führte bei Pferden mit Sommerekzem zu einer abgeschwächten Reaktion auf Culicoides-Toxin im Hauttest; zugleich konnte eine Abnahme der langkettigen Fettsäuren C22:0 und C24:0 in Haarproben beobachtet werden (O'Neill *et al.*, 2002).

Kohl-Parisini *et al.* (2007) erforschten die unterschiedlichen Effekte einer Supplementierung mit Sonnenblumen- und Seehundöl bei Pferden mit RAO (recurrent airway obstruction). Die zugeführten Fettsäuren beeinflussten sowohl das Fettsäuremuster im Plasma wie auch in Phospholipiden der Leukozyten. Die Gabe von Seehundöl reduzierte das n-6 : n-3 FS-Verhältnis in Plasma und der Phospholipidfraktion der Leukozyten und führte zu einer signifikanten Reduktion von Leukozyten in der Alveolarflüssigkeit. Unabhängig von der Art der Ölzulage stieg die Atemfrequenz der Tiere im Verlauf des Versuches an, wobei die Mittelwerte stets im physiologischen Bereich lagen; eine Konfrontation der Tiere mit diversen Antigenen könnte ein möglicher Faktor gewesen sein. Es konnte kein Einfluss der gefütterten Öle auf Lungenfunktion und klinische Parameter nachgewiesen werden.

Nach Zufütterung von DHA in einer Dosierung von 1,5 bis 3 g über zwei Monate konnten deutlich verbesserte klinische Parameter bei Pferden mit RAO nachgewiesen werden. Die Patienten zeigten um 60% weniger Husten, die Lungenfunktion konnte gesteigert werden und im BALF reduzierte sich der Gehalt neutrophiler Granulozyten von 23% auf 9% (Nogradi *et al.*, 2015).

Vineyard *et al.* (2010) untersuchten die Auswirkungen einer Supplementierung mit n-3-FS unterschiedlicher Quellen (Leinöl / Fischöl) auf die Verteilung freier Fettsäuren im Plasma und in Erythrozytenmembranen sowie die Beeinflussung der Immunfunktion bei Jährlingen über eine fettangereicherte Fütterung. Die Gabe von Fischöl erhöhte die Gehalte an EPA, DHA und n-3-FS im Plasma. Zwischen beiden Versuchsgruppen (Leinöl / Fischöl) konnten keine unterschiedlichen Ergebnisse der Supplementierung hinsichtlich der Lymphozytenproliferation und der PGE-Synthese aufgezeigt werden. Nach einer Injektion von Concanavalin-A entwickelten diejenigen Versuchstiere, die eine Ölzulage erhielten, unabhängig von der Ölquelle ausgedehntere Hautirritationen als Tiere der Kontrollgruppe.

2.1.2.2 Antioxidativer Stoffwechsel und körperliche Leistung

Eine Supplementierung von Fettsäuren in der Pferdefütterung erhöht nicht nur maßgeblich die Energiedichte in der Ration und eignet sich somit sehr gut für die Fütterungspraxis des Sportpferdes, es wurde auch eine diätbedingte Veränderung metabolischer Parameter während einer Trainingsperiode beobachtet. Eine fettreiche Diät mit Sojaöl führte zu erhöhten Leber-Glykogenwerten in Ruhe, im Verlauf des Trainings wurde ein signifikanter Abfall belastungsinduzierter Enzymschwankungen und Elektrolytgehalte im Serum und ein Anstieg langkettiger Fettsäuren im Plasma beobachtet (Hambleton *et al.*, 1980).

Nach einer zehnwöchigen Supplementierung von Fettsäuren zeigten trainierte Vollblüter einen signifikanten Abfall postprandialer TAG-Konzentrationen im Plasma, begleitet von einem Anstieg der plasmatischen Lipaseaktivität und erhöhten postprandialen Plasmacholesterinwerten. Die Aktivität der Muskelzitratsynthase erhöhte sich deutlich. Die Muskelglykogenwerte in Ruhe blieben durch die Fettzulage unbeeinflusst. Es wird vermutet, dass eine erhöhte Plasmalipaseaktivität Auswirkungen auf die Lipoproteinlipase der Muskulatur hat, was die Fettaufnahme-Kapazität der Muskulatur positiv beeinflussen würde. Somit würde eine Supplementierung von Fettsäuren die oxidative Kapazität der Muskulatur verbessern (Orme *et al.*, 1997).

Harris *et al.* (1999) konnten in ihrer Studie an Rennpferden durch Ölfütterung keine signifikant veränderten Insulin- und Laktatwerte nach körperlicher Leistung feststellen, auch die hämatologischen Parameter blieben im Laufe des Fütterungsversuches unbeeinflusst. Die Zulage von Öl führte lediglich zu signifikant erhöhten Cholesterin- und TAG-Werten.

Aktuellere Studien zeigten höhere Blut-pH- und Bicarbonatwerte infolge körperlicher Leistung nach Zulage von Fettsäuren zu einer proteinreduzierten Diät (Graham-Thiers *et al.*, 2001).

Auch Zeyner *et al.* (2002) konnten positive Effekte einer fettreichen Ration auf die pH-Homöostase im Plasma ermitteln.

O'Connor *et al.* (2004) untersuchten die Effekte der Anwendung von Fischöl auf metabolische Parameter beim Rennpferd unter Trainingsbedingungen. Pferde, die täglich Fischöl zugefüttert bekamen, zeigten unter Belastung signifikant geringere Herzfrequenzen und niedrigere Hämatokritwerte als Pferde der Kontrollgruppe. Die Plasmalaktatwerte blieben durch die Fütterung unbeeinflusst. Es zeigte sich kein Unterschied der Plasmaglucosewerte unter Belastung, allerdings wurden bei den supplementierten Tieren geringere Werte während der Rekonvaleszenzphasen gemessen. Unter Belastung hatten die Tiere der Versuchsgruppe geringere Insulinwerte im Serum und ein höheres Glucose:Insulin-Verhältnis als die

Kontrollgruppe. Die Gabe von Fischöl führte bei den Versuchstieren zu geringeren Konzentrationen freier Fettsäuren im Plasma. Diese Ergebnisse deuten einen positiv beeinflussten Leistungsstoffwechsel durch die Gabe von Fischöl an.

Nach einer vierwöchigen n-3-FS-reichen Diät zeigten sich bei Sportpferden keine fütterungsbedingten Veränderungen der Membranfluidität in der Erythrozytenfraktion, das Fettsäuremuster in den Zellmembranen modifizierte sich signifikant zu Gunsten der n-3-FS. Unter Leistungsbedingungen reduzierte sich die Membranfluidität der Erythrozyten in der Placebogruppe signifikant, wohingegen bei supplementierten Pferden nur ein undeutlicher Abfall gemessen wurde. Es konnten keine Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung in den Erythrozytenmembranen ermittelt werden. Direkt nach körperlicher Belastung fielen die Werte der Membranfluidität bei den supplementierten Pferden signifikant ab, die Placebogruppe wies nur undeutlich veränderte Werte auf. Es lässt sich folgern, dass eine Supplementierung mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren den leistungsinduzierten Abfall der Membranfluidität durch eine Veränderung des Fettsäuremusters der Membranen modifizieren kann (Portier *et al.*, 2006).

De Moffarts *et al.* (2007) untersuchten die leistungsinduzierten Effekte einer n-3-FS-reichen Diät auf Blutparameter des antioxidativen Stoffwechsels und die Membranfluidität der Erythrozytenfraktion beim Sportpferd. Die Membranfluidität der Erythrozyten ließ sich durch die Supplementierung mit n-3-FS nicht beeinflussen, es konnte aber ein deutlich schwächerer Abfall der Fluidität nach körperlicher Leistung bei den zugefütterten Pferden festgestellt werden. Die Aktivität der Glutathionperoxidase veränderte sich bei den supplementierten Pferden nicht durch körperliche Leistung, wohingegen die Werte in der Kontrollgruppe belastungsinduziert abfielen.

In einer Studie von Westermann *et al.* (2008) zeigten Traber unter Belastung erhöhte Plasmalaktatwerte und einen Anstieg ungesättigter freier Fettsäuren.

Piccione *et al.* (2009) konnte keine leistungsinduzierte Modifikation des Fettsäuremusters im Plasma des Pferdes ermitteln, allerdings zeigte sich ein Abfall der Membranfluidität der Erythrozytenfraktion. Dieser Effekt ließ sich durch eine fettreiche Diät verzögern und abschwächen.

2.1.3 Fett in der Pferdefütterung

Fett wird in der Pferdefütterung vor allem zur Erhöhung der Energiedichte der Futtermischung eingesetzt, besonders entscheidend in der Fütterung von Rennpferden zur Reduktion von „Totgewicht“ im Gastrointestinaltrakt (Bush *et al.*, 2001).

In diversen Versuchen konnten positive Auswirkungen von Fett auf den Muskelstoffwechsel, die Wärmeproduktion in der Muskulatur und den Blut-Glucosespiegel sowie den Blut-pH-Wert erzielt werden (Lewis, 1995; Frape, 1998).

Holland *et al.* (1996) untersuchten die Effekte einer Ölsupplementierung auf das Verhalten von Pferden, gemessen an Spontanaktivität sowie der Reaktion auf auditive, visuelle und taktische Reize. Es konnte gezeigt werden, dass eine fettreiche Diät beim Pferd sowohl die Spontanaktivität als auch die Reaktionen auf Außenreize reduziert. In der Humanmedizin führte die Gabe von Lecithin zu einer Erhöhung des Plasma-Cholinwertes und zu veränderten Acetylcholin-Gehalten im Gehirn (Mauron, 1987; Canty & Zeisel, 1994); möglicherweise liegen den beobachteten Verhaltensänderungen beim Pferd ähnliche Mechanismen zu Grunde. Die Zufütterung von Fett führte nicht zu einer negativen Beeinflussung der Verdaulichkeit der übrigen Futterkomponenten, die Energie der Ration konnte sogar effizienter vom Organismus genutzt werden (Pagan, 1998; Bush *et al.*, 2001).

Die Verdaulichkeit von pflanzlichen Fetten ist beim Pferd höher einzustufen als die Verdaulichkeit tierischer Fettquellen. Fettzulagen von 0,5 – 0,75 g/ kg KM/ Mahlzeit scheinen tolerierbar (Lewis, 1995; Meyer & Coenen, 2014).

Die Zulage von 5,5 % Sonnenblumenöl in der Ration führte zu einer verlangsamten Futteraufnahme. Steigende Fettgehalte im Futter erhöhten den Rohfasergehalt im Kot; die reduzierte Rohfaserverdaulichkeit ist möglicherweise auf eine Veränderung des mikrobiellen Milieus im Dickdarm durch forcierte Fettfütterung zurückzuführen (Zeyner, 2002).

Eine forcierte Fettfütterung kann in einem vermehrten Influx von Fett in das Dickdarmlumen resultieren und zu einer negativen Beeinflussung der Aktivität von Mikroorganismen des Darmes mit eingeschränkter Rohfaserverdaulichkeit führen (Jansen *et al.*, 2000; Jansen *et al.*, 2002; Jansen *et al.*, 2007). Jansen *et al.* (2000) zeigten in einer Studie an Trabern eine Verminderung der Rohfaser-Verdaulichkeit von 8 % nach Gabe von Sojaöl in einem Anteil von 8,75 % der Ration. Ein Jahr später wurde berichtet, dass eine Erhöhung des Anteils von Sojaöl um 1 % in der Ration eine Reduktion der Faserverdaulichkeit um 0,9 % zur Folge hatte. In anderen Studien wirkte sich eine Fettzulage nicht negativ auf die Verdaulichkeit anderer Komponenten aus, nur die Fettverdaulichkeit selbst zeigte sich erhöht (Bush *et al.*, 2001).

Die Fütterung von Maiskeimöl an tragende und laktierende Stuten führte zu erhöhten IgG- und Linolsäurewerten in der Milch, was als positiv für die Fohlengesundheit zu werten ist (Hoffman *et al.*, 1998).

Der Ausschuss für Bedarfsnormen beim Pferd der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie empfiehlt, eine Menge von 1 g Fett / kg KM / Tag nicht zu überschreiten (GfE, 2014).

2.1.4 Natürliche Quellen von n3-Fettsäuren

Die prädominanten Quellen der n3-FS in der Nahrung sind verschiedene Pflanzenöle und Fette marinen Ursprungs. Manche Pflanzenöle, insbesondere Leinsamenöl, enthalten viel α -Linolensäure während Fette marinen Ursprungs (Fischöl, Seehundöl, Algen) hohe Gehalte von EPA und DHA aufweisen (O'Connor *et al.*, 2004).

Tab 2 gibt einen Überblick über das Fettsäuremuster von Leinöl im Vergleich zu Fetten marinen Ursprungs.

Tab.2: Literaturangaben zum n3/n6-Fettsäuremuster (% Gesamtfettsäuren) verschiedener Quellen

Fettsäure	Leinöl	Fischöl	Seehundöl	Mikroalgen
C18:2n6	16,3	1,7	2,07	1,9
C18:3n6	0,09	1,03	0	0,4
C18:3n3	54,32	1,37	0,62	2,7
C20:3n6	0,04	0,45	0	1,6
C20:4n6	0	0,53	0,48	0,8
C20:5n3	0,05	10,62	7,87	1,9
C22:5n3	0,1	1,66	5,52	18,3
C22:6n3	0,34	8,01	7,34	42,3

Quellen: Barclay *et al.* (1998); O'Connor *et al.* (2004); Khol-Parisini *et al.* (2007); Heckel (2008)

2.1.5 Fettsäuremuster in Plasma und Zellen des Pferdes

Im Plasma von Pferden, die eine Ration von Heu und Hafer erhielten, ließen sich vier dominante Fettsäuren nachweisen: C16:0, C18:0, C18:1, C18:2. In geringen Konzentrationen (<1 %) ließen sich folgende Fettsäuren differenzieren: C16:1, C18:3, C20:0, C22:0, C20:1, C20:4, C24:0 und C14:0 (Luther *et al.*, 1981).

Nach einer Studie von Orme *et al.* (1994) wurden im Plasma des Pferdes insgesamt Gehalte freier FS von 30 µmol/ l ermittelt mit folgenden dominanten Fettsäuren (90 % der Gesamtfettsäuren) in abfallenden Konzentrationen: C16:0, C18:2, C18:1, C18:0, C18:3.

Die Konzentration freier Fettsäuren im Plasma war morgens doppelt so hoch wie im übrigen Tagesverlauf.

Newsholme *et al.* (1983) diskutieren den im Plasma auftretenden Fettsäuren-Peak in den frühen Morgenstunden als Resultat reduzierter Plasma-Glucose-Werte in der Nacht während Fernandez *et al.* (1978) die morgens erhöhten Plasma-Cortisol-Werte als auslösend für die Anhäufung freier Fettsäuren im Plasma betrachten.

Von den freien Fettsäuren im Plasma lassen sich die Fettsäuren in Phospholipiden abgrenzen. Die Phospholipide im Plasma des Pferdes lassen sich dabei in folgende Fraktionen einteilen: 70 % Lecithin, 15,5 % Lysolecithin, 11,2 % Sphingomyelin, 3, 3% Kepheline (Altmann & Weik, 1971).

In den Membranen von Pferdeerythrozyten waren C16:0, C18:0 und C18:1 als Hauptfettsäuren nachzuweisen und geringe Gehalte von C24:0, C22:0, C18:2, C20:0, C16:1, C20:1, C14:0, C20:4 und C18:3 (Luther *et al.*, 1982).

Tab.3: Literaturangaben zum Fettsäuremuster (% der Gesamtfettsäuren) in Plasma, Erythrozyten und Phospholipidfraktionen von Leukozyten des Pferdes ohne diätetische Supplementierung von Fettsäuren

Quelle	1	2	3	4	5	6	7			
Probe, Einheit	Plasma Gew%	Plasma Gew%	Plasma Lecithin	Plasma Lyso- Lecithin	Plasma Sphingo- myelin	Plasma Mol%	Erythro- zyten Mol%	Plasma Mol%	Plasma Gew%	Leuko- zyten Gew%
C14:0	1,8	3,5			1,0	<1	1,5	<5	0,51	1,7
C16:0	23,6	33,4	14,0	13,1	24,8	13,5	23,4	26,1	12,8	0,9
C16:1	6,6	3,2				1,9	2,3	<5	3,2	14,3
C18:0	7,4	18,2	28,2	21,7	11,8	16,5	26,1	17	17,4	20,3
C18:1	30,3	20,1	9,2	9,3	2,7	14,7	22,7	19,2	10,6	17,6
C18:2	9,6	15,1	47,3	54,8	3,9	44	3,1	24,9	44,7	22,2
C18:3	18,2	6,6	1,3	1,1		2,8	1,0	7,3	2,5	0,8
C20:0					8,3	1,5	2,6		0,6	0,9
C20:1						1,3	2,3		0,3	2,0
C20:4						1,3	1,4		1,4	3,0
C22:0					9,5	1,4	5,8		0,5	6,6
C24:0					5,9	<1	7,8		0,5	0,5
C24:1					19,6				1,3	

Quellen: ¹Weik, 1967; ²Weik und Altmann, 1971; ³Altmann und Weik, 1971; ⁴Luther et al., 1981; ⁵Luther et al., 1982; ⁶Orme et al., 1994; ⁷Khol-Parisini et al., 2007

Mol%: Mol-Prozent; Gew%: Gewichtsprozent

2.1.6 Veränderung des Fettsäuremusters durch gezielte Ölsupplementierung beim Pferd

Eine 18-wöchige Zulage von Leinöl (47,4 % n-3-FS) in einer Menge von 10 % der Kraftfütterration zeigte bei gesunden Pferden keine Auswirkungen auf die Blutplättchenaggregation. Es kam zu einem Anstieg von C18:3 n3, C18:2 n6 und C20:5 n3, die Konzentrationen von C20:4 n6 fielen nicht signifikant ab und es wurde kein signifikanter Anstieg von C22:6 n3 ermittelt. Es wird vermutet, dass Leinöl nicht potent genug gewesen ist, das Verhältnis n3 : n6-FS zu erhöhen und somit auch positive Effekte auf die Blutplättchenaggregation zu erzielen (Hansen *et al.*, 2002).

O'Connor *et al.* (2007) untersuchten die Auswirkungen einer täglichen Gabe von Fischöl auf die Zusammensetzung freier Fettsäuren im Plasma. Das supplementierte Öl enthielt 10,8 % EPA und 8 % DHA und wurde über 63 Tage zugefüttert. Das Verhältnis von n6 : n3 betrug in der Versuchsgruppe 1,4 : 1, Tiere der Kontrollgruppe erhielten Pflanzenöl und zeigten ein Verhältnis von 3,6 : 1. Vor Versuchsbeginn konnten keine Unterschiede im Fettsäuremuster zwischen den Gruppen ermittelt werden; die Konzentration von EPA zeigte Werte von 0,04 mg/ml, DHA erreichte 0,01 mg/ml. Die Zulage von Fischöl führte zu einem Anstieg von EPA, DHA, C22:0, C22:1 und C22:5; generell konnte ein Abfall der n-6-FS und ein Anstieg der n-3-Fraktion ermittelt werden, es resultierte ein geringeres n6: n3 Verhältnis.

Die Serumcholesterinwerte stiegen im Laufe des Versuches unter der Gabe von Pflanzenöl signifikant an, Fischöl führte zu keiner Beeinflussung. Die Triglyceride im Serum wurden durch die Gabe von Fischöl im Vergleich zu Pflanzenöl erniedrigt.

Nach Supplementierung mit Seehundöl in einer Menge von 320 mg/kg Körpermasse über 10 Wochen reduzierten sich die Konzentrationen von C18:2 n6 im Plasma und in den Phospholipiden der Leukozyten. C20:5 n3 und C22:6 n3 stiegen fütterungsbedingt signifikant an, C22:5 n3 erhöhte sich nur im Plasma, nicht dagegen in der Phospholipidfraktion.

Die Ergänzung von n-3-FS führte zu einer Verschiebung des n3: n6-Verhältnisses, das sich analog zu anderen Tierarten in einer immunmodulierenden Wirkung dieser Fettsäuren fortsetzen könnte (Khol-Parisini *et al.*, 2007).

King *et al.* (2008) untersuchten die Konzentrationen freier Fettsäuren im Plasma von Stuten nach Gabe von Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure in unterschiedlichen Dosierungen (0, 10, 20 oder 40 g/Tag) und ermittelten einen dosisabhängigen Anstieg dieser Fettsäuren im Plasma; die Konzentrationen von C14:0, C17:1, C18:1, C18:3 n6, C18:4 n3, C20:3 n6, C20:4 n6, C22:5 n3 stiegen ebenfalls an, während ein Abfall von C18:1 n9 verzeichnet werden

konnte. Der Anstieg von C18:4 n3 und C22:5 n3 lässt sich auf erhöhte Konzentrationen im Versuchsfutter zurückführen, während C18:3 n3 im Futter der Kontrollgruppe höher konzentriert war und C20:3 n3 in keiner der unterschiedlichen Futterrationen erfasst wurde. Man geht von verzögerten Reaktionen gewisser Fettsäuren auf eine Supplementierung sowie von komplexen Interaktionen um Enzymsysteme besonders zwischen den Fraktionen der n3- und n6-FS aus.

Hess *et al.* (2012) erforschten die differenzierenden Effekte einer Supplementierung von zwei n-3-reichen Ölen (Fischöl vs. Leinöl, 38 g/ Tag über 90 Tage) auf die Fettsäurezusammensetzung im Plasma, in den Erythrozyten und in der Skelettmuskulatur.

Die Gehalte an LA und ALA im Plasma waren bei Fischölgabe 10 % geringer als bei der Gabe von Leinöl und 60 % geringer als in der Kontrollgruppe ohne Ölzulage. EPA und DHA konnten nur im Plasma von Pferden, welche Fischöl erhielten, nachgewiesen werden; im Laufe des Versuches stiegen die Werte von EPA um 40 %, von DHA um 19 % an. Die Konzentrationen von LA und ALA in Erythrozyten blieben durch die Fütterung unbeeinflusst. Die Gehalte von LA in der Muskulatur waren um 17 % geringer bei den mit Fischöl supplementierten Pferden.

2.2 Selen – Bedeutung in physiologischen und pathologischen Prozessen

2.2.1 Metabolismus

Die Aufnahme und die Bioverfügbarkeit des Spurenelements Selen im Organismus variiert stark zwischen den verschiedenen Tierarten und wird sowohl von der Applikationsform (oral oder parenteral) wie auch von der chemischen Bindungsform im Futter (anorganisch oder organisch) bestimmt (Levander, 1985; Ullrey, 1987; Behne *et al.*, 1996).

Selen wird hauptsächlich im Dünndarm absorbiert, wobei Monogastrier eine deutlich höhere Absorptionsrate (80-95 %) als Wiederkäuer (17-53 %) zeigen. Im Pansenmilieu scheint es zu einer Umwandlung des oral aufgenommenen Selen in eine schlecht resorbierbare Form durch Pansenmikroben zu kommen (Wright & Bell, 1964; Wolfram & Scharrer, 1988; Koenig *et al.*, 1997; Ivancic & Weiss, 2001). Dort wird ein großer Teil des oxidierten Selenits und Selenats zu unlöslichem elementarem Selen und Metallseleniden reduziert. Es ist somit kaum absorbierbar und wird zu einem großen Anteil mit dem Kot ausgeschieden (Wolfram, 2000).

Im Duodenum erfolgt die Resorption je nach Bindungsform des Spurenelements Selen unterschiedlich. Selenit wird weitgehend passiv über Diffusion absorbiert. Selenat wird sowohl in einem Na^+ -abhängigen Sulfat/ Selenat-Cotransport wie auch im Austausch gegen OH^- resorbiert. Selenat scheint in höherem Maße absorbiert werden zu können als Selenit (Barceloux, 1999). Selenomethionin wird über einen Na^+ -abhängigen Resorptionsmechanismus neutraler Aminosäuren aufgenommen; in Konkurrenz um Transportsysteme können sowohl Methionin wie auch andere Aminosäuren die Aufnahme von organisch gebundenem Selen hemmen (Wolfram, 1995).

Selen anorganischer Bindungsformen scheint vom Körper schneller in das Enzym Glutathionperoxidase eingebaut zu werden als Selen organischer Quellen (Levander *et al.*, 1983; Mahan & Parrett, 1996; Mahan *et al.*, 1999).

Selenomethionin lässt sich hingegen im Austausch mit Methionin unspezifisch und besser in nahezu jedes Gewebe inkorporieren (Mahan *et al.*, 1999; Schrauzer, 2000).

Es kommt zu einer kompetitiven Hemmung der Selenaufnahme durch chemisch verwandte anorganische sowie organische Anionen (Wolfram & Scharrer, 1988; Wolfram, 1995); der Selenstatus des Organismus scheint die Absorptionsrate des Spurenelements nicht zu beeinflussen (Brown *et al.*, 1971).

Die Verteilung von Selen im Organismus erfolgt zunächst über das Blut; Selen ist sowohl im Plasma wie auch in den zellulären Bestandteilen vorhanden. Im Plasma liegt Selen vor allem proteingebunden vor (Selenoprotein P, GPx) (Hill *et al.*, 1996).

In der Erythrozytenfraktion zeigt sich eine höhere Selenkonzentration als im Plasma, die höchste Selenkonzentration und eine besonders hohe GPx-Aktivität weisen die Thrombozyten auf (Kiem, 1988; Schmidt & Bayer, 1988).

Der Transport von Selen über die Plazenta ist beim Wiederkäuer sehr effizient (Koller *et al.*, 1984), beim Pferd überwinden jedoch nur geringe Selenmengen die Plazentaschranke; somit kommt einer ausreichenden Selenversorgung der Stute während der Laktation große Bedeutung zu (Maylin *et al.*, 1980; Puls, 1994).

In Bezug auf die Trockenmasse nimmt die Selenkonzentration in den einzelnen Geweben in folgender Reihenfolge ab:

Niere > Leber > Pankreas, Herz > Skelettmuskel (Combs & Combs, 1986).

Bezogen auf die Gesamtspeicherkapazität beinhaltet die Skelettmuskulatur ungefähr 40 %, die Leber etwa 30 % und jedes der restlichen Organe weniger als 10 % des Gesamtseleens (Behne *et al.*, 1988).

Die Exkretion von Selen erfolgt über Urin, Fäzes und Exhalation (Wiesner *et al.*, 1974). Besonders die Ausscheidung über den Urin spielt eine wichtige Rolle in der Selenhomöostase des Organismus (Ellis *et al.*, 1997; Ivancic & Weiss, 2001). Auch der beträchtliche Verlust von Selen über die Milch darf nicht vernachlässigt werden, da die Höhe der Selenausscheidung über die Milch bis zu 20 % der Gesamtexkretion betragen kann (Ivancic & Weiss, 2001; Juniper *et al.*, 2008).

2.2.2 Biochemische Funktionen von Selen

Das Spurenelement Selen spielt als Bestandteil des Enzyms Glutathionperoxidase (GPx) eine entscheidende Rolle im antioxidativen Stoffwechsel, insbesondere bei dem Schutz des Organismus vor freien Radikalen (Rotruck *et al.*, 1973).

Neben der antioxidativen Wirkung ist Selen als Bestandteil der Aminosäure Selenocystein an der Bildung zahlreicher biologisch aktiver Selenoproteine beteiligt (Arthur & Beckett, 1994; McPherson *et al.*, 1994; Beckett & Arthur, 2005).

Im tierischen Organismus wurden bislang vier Glutathionperoxidasen unterschiedlicher Struktur, Funktion und antigener Eigenschaft isoliert (Avissar *et al.*, 1994).

Eine zytosolische Glutathionperoxidase konnte aus Erythrozyten, Phagozyten, Thrombozyten, Hepatozyten und aus dem Auge isoliert werden; sie dient dem Schutz der Zellmembran vor freien Radikalen (Arthur & Beckett, 1994).

Eine plasmatische extrazelluläre Glutathionperoxidase (plGPx) konnte im menschlichen Plasma, in Brustdrüsensekret und in den Nierentubuli charakterisiert werden (Avisar *et al.*, 1994).

Eine gastrointestinale Glutathionperoxidase (giGPx), die eine von den beiden erstgenannten abweichende antigene Struktur aufweist, wurde in Leber und Colon des Menschen gefunden; eine Schutzfunktion gegen aufgenommene Hydroperoxide wird vermutet (Chu *et al.*, 1993).

Die Phospholipidhydroperoxid Glutathionperoxidase (PGPx) steht in enger Verbindung mit der intrazellulären Membran; sie benötigt im Gegensatz zu den anderen Glutathionperoxidasen nicht ausschließlich Glutathion als reduzierendes Substrat. Die PGPx bleibt bei Selenmangel am längsten funktionsfähig. Sie ist zudem zur Phosphorylierung von Enzymen befähigt und scheint einen Einfluss auf den Arachidonsäuremetabolismus zu haben (Cao *et al.*, 1992; Arthur & Beckett, 1994; Kleene, 1994).

Im Prozess der Spermareifung kommt der Glutathionperoxidase als Zellwandschutz große Bedeutung zu; ein Selenmangel führt sowohl zu einer erniedrigten Spermienproduktion als auch zu mechanischen Defekten an den Spermien (Wolffram, 2000; Beckett & Arthur, 2005).

Neben der Funktion im antioxidativen Stoffwechsel ist Selen als Bestandteil der Typ I Jodthyronin-5-Dejodinase zusammen mit dem Spurenelement Jod auch am Metabolismus der Schilddrüsenhormone beteiligt; Selenmangel führt zu einem Abfall von Trijodthyronin (T3) und einem Anstieg von Thyroxin (T4) im Plasma (Arthur & Beckett, 1994; Beckett & Arthur, 2005).

Im Plasma kommt Selen vor allem Protein-gebunden vor, wobei Selenoprotein P mit 60-80 % den größten Teil des Plasmaselens bindet; Selenoprotein P scheint vornehmlich als Transportprotein von Selen im Blut zu dienen, eine antioxidative Funktion wäre ebenso möglich (Arthur & Beckett, 1994; Burk & Hill, 2005, 2009).

2.2.3 Selenstatus des Pferdes

Der Selenstatus eines Organismus variiert nicht nur entsprechend der Fütterung, sondern zeigt auch eine Abhängigkeit sowohl von Geschlecht, Alter, Rasse als auch von körperlicher Leistung.

Vergleicht man den Selengehalt im Vollblut, so weisen Hengste im Vergleich zu Stuten und Wallachen die höchsten Werte auf (Crisman *et al.*, 1994).

In der Regel lagen die Selengehalte im Blut von Saugfohlen unter denen der Mutterstuten; hatten die Stuten allerdings Selenwerte im Vollblut unter 48 µg/l, so konnte im Vollblut der Fohlen sogar ein höherer Selengehalt gemessen werden (Stowe, 1967; Bergsten *et al.*, 1970; Maylin *et al.*, 1980; Hospes & Bostedt, 1996). Die niedrigeren Selengehalte im Blut verglichen mit der Mutterstute zeigten sich auch beim Absatzfohlen bis zu einem Alter von einem Jahr (Greiwe-Crandell *et al.*, 1992). Ab einem Alter von einem Jahr zeigten sich keine signifikanten Unterschiede mehr hinsichtlich des Selenstatus; auch Unterschiede bezüglich des Geschlechtes konnten in dieser Arbeit nicht ermittelt werden (Gallagher & Stowe, 1980; Carmel *et al.*, 1990).

Versuche mit parenteraler Selensupplementierung von Mutterstuten in der Späträchtigkeit zeigten, dass nur eine begrenzte Menge des Selens die Plazentaschranke passieren kann; dennoch wirkt eine Selensupplementierung der Mutterstute während der Gravidität und in der Laktation einem Selenmangel des Fohlens entgegen (Maylin *et al.*, 1980).

Bei Vollblutpferden wurden durchschnittlich geringere Selengehalte im Blut ermittelt als bei Warmblutpferden trotz zum Teil höherer Selengehalte in der Futtermittelration, welche an Vollblüter verfüttert wurde. Stowe führte dies auf unterschiedliche Einstreuarten zurück; die Warmblutpferde wurden ausschließlich auf Tabakstroh gehalten, welches – wie man später herausfand - den Selengehalt im Serum beeinflusst (Stowe, 1967; Hayes *et al.*, 1987).

Der Einfluss von körperlicher Leistung auf den Selengehalt im Blut wird widersprüchlich beschrieben. Körperliche Anstrengung führt zu einem Anstieg der Bildung freier Radikale. Selen als Bestandteil der Glutathionperoxidase spielt eine wesentliche Rolle im antioxidativen Stoffwechsel und dem Schutz des Körpers vor freien Radikalen. Messungen des Selengehaltes im Blut im Anschluss an körperliche Leistungen zeigten einen Anstieg der Selenkonzentration im Blut (Gallagher & Stowe, 1980; Haggitt *et al.*, 2010).

Eine Supplementierung von Selen in Form von Na-Selenit (0,05 ppm, 0,1 ppm, 0,2 ppm Se) führte zu signifikant höheren Selengehalten im Blut (Shellow *et al.*, 1985). Nach Zufütterung von Selenhefen waren die Werte höher als nach Gabe von Natriumselenit (Calamari *et al.*, 2009; Montgomery *et al.*, 2012). Vergleicht man Serumselewerte nach Supplementierung mit Natriumselenat bzw. Natriumselenit, so zeigten sich keine Unterschiede (Podoll *et al.*, 1992). Bei einer Supplementierung von Selen länger als 56 Tage zeigte sich hinsichtlich der chemischen Bindungsform (organisch/ anorganisch) des Selens (Selenhefen vs. Na-Selenit) kein Unterschied im Selengehalt des Blutes (Richardson *et al.*, 2006).

Stuten zeigten nach einer Substituierung mit Selenhefen (0,3 mg/ kg TS) höhere Selengehalte im Plasma, in der Muskulatur und auch im Kolostrum als Probanden einer Kontrollgruppe; auch bei den neugeborenen Fohlen dieser Stuten wurden höhere Plasma- und Muskelseleengehalte gemessen (Karren *et al.*, 2010).

2.2.4 Selenbedarf des Pferdes

Bei der Versorgung des Pferdes mit Selen ist darauf zu achten, dass der Organismus nur eine geringe bis keine homöostatische Kontrolle dieses Spurenelements leisten kann (Wolffram, 2000; Jeroch *et al.*, 2008). Eine forcierte bzw. zu geringe Supplementierung mit Selen führt somit zu einem Risiko der Über- oder Unterversorgung mit Selen.

Die optimale Versorgung des Pferdes mit Selen liegt relativ nah an dem Schwellenwert zur Toxizität. **Tabelle 4** gibt einen Überblick über die Empfehlungen einzelner Autoren zum Selengehalt in der Futterrationsration für Pferde unter Berücksichtigung der Toxizitätsschwelle.

Tab.4: Empfehlungen zum Selengehalt in Futterrationsrationen für Pferde (mg Se/kg TS)

Empfohlener Selengehalt	Mögliche Mangelerscheinungen	Toxizitätsschwelle	Autor
0,3 – 2,0	0,01 – 0,10	5 – 40	Puls (1994)
0,1		5	NRC (2007)
0,1 – 0,2		3,3 (akut), 2-3 (chronisch)	Kupper (2010)
0,11 – 0,17		2 (chronisch)	GfE (2014)

Die Bedarfswerte variieren je nach Autor stark zwischen 0,1 – 2,0 mg Se/ kg TS, wobei ein Gehalt von 2,0 mg Se/ kg TS (Puls, 1994) von der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (2014) und dem National Research Council (2007) schon als Schwellenwert zur chronischen Toxizität beurteilt wird.

Zur Deckung des Erhaltungsbedarfs wird eine Selensupplementierung von 0,02 µg Se/ kg KM empfohlen; ein durchschnittlich beanspruchtes Reitpferd sollte mit 11 µg Se/ d versorgt werden. Zuchtstuten und Fohlen haben einen erhöhten Selenbedarf (Meyer & Coenen, 2014). Eine ausreichende Selenversorgung über wirtschaftseigene Grundfuttermittel ist in Selenmangelgebieten (Mangel an Selen-speichernden Pflanzenarten im Bestand) selbst über eine Selendüngung nur schwer möglich (Carmel *et al.*, 1990; Heikens, 1992).

Der tägliche Selenbedarf des Pferdes wird sowohl von nutritiven Faktoren als auch von dem Ausmaß körperlicher Arbeit beeinflusst (Meyer & Coenen, 2014). Unter den nutritiven Faktoren lassen sich Wechselwirkungen zwischen dem Selenbedarf und dem Gehalt an Vitamin E, Fettsäuren und schwefelhaltigen Aminosäuren in der Futtermittellation zusammenfassen (Schwarz & Kirchgessner, 1979).

Besonderes Augenmerk hinsichtlich der Selenversorgung des Pferdes gilt den Selengehalten im Erdboden und somit den Werten im Grundfutter. Gebiete in Meeresnähe weisen eine bessere Selenversorgung auf als Gebiete in Zentraleuropa; die selenreichsten Böden fand man in Dänemark und den Niederlanden, während Luxemburg und Österreich als Selenmangelgebiete gelten. Somit kommt einer individuellen und regional angepassten Selenversorgung eine große Bedeutung zu (Muller *et al.*, 2012).

2.2.5 Bedeutung von Selen in physiologischen und pathologischen Prozessen

2.2.5.1 Immunsystem

Ein ausreichender Selengehalt im Organismus ist entscheidend für eine adäquate Ausbildung der zellulären und humoralen Immunität (Koller & Exon, 1986).

Nach Supplementierung mit Selen und Vitamin E zeigte sich bei den untersuchten Pferden eine ausgeprägtere humorale Immunantwort auf die Impfung mit Tetanustoxin und Influenza Virus (Baalsrud & Overnes, 1986).

In einer aktuellen Studie konnte nach Selenergänzung in Form von Na-Selenit bzw. Selenhefen (0,3 mg/ kg TS) keine spezifisch verbesserte Immunantwort auf die Impfung von Ovalbumin und equinem Influenzavirus beim Pferd vermerkt werden; verglichen mit der Kontrollgruppe, zeigten die zugefütterten Pferde jedoch eine verstärkte Expression von IL-10. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass ein geringer Selenstatus die Ausbildung zellulärer Immunität nachteilig beeinflusst (Brummer, Hayes, Adams, *et al.*, 2013).

Montgomery *et al.* (2012) untersuchten die Effekte unterschiedlicher Selenquellen (Natrium-Selenit/ Selenhefe) auf das Immunsystem beim Pferd. Die Probanden wurden in drei Gruppen eingeteilt und wurden während der Studie in Einzelboxen gehalten mit täglichem Weidegang; alle Gruppen erhielten eine Futtermischung bestehend aus Heu und Hafer, welche einen Selengehalt von max. 0,05 mg/ kg TS aufwies. Die beiden Versuchsgruppen erhielten eine Selensupplementierung von 0,3 mg/ kg TS (Natrium-Selenit/ Selenhefe). Die immunologische Stimulation der Lymphozyten erfolgte durch Concavalin A, die Phagozytoseaktivität der neutrophilen Granulozyten und die Antikörperbildung wurde anhand der Reaktion nach einer Tollwutimpfung untersucht. Unabhängig von der Selenquelle zeigten beide supplementierten Gruppen im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine gesteigerte Expression von IL-1 und IL-8. Die Pferde, welche Selenhefen erhielten, zeigten im Vergleich zu der anorganisch versorgten Gruppe eine höhere Bildungsrate von IL-5 (Montgomery *et al.*, 2012).

Eine Selenzulage in Form von Natrium-Selenit (0,3 mg/ kg TS) vs. Selenhefe (0,2 mg/ kg TS; 0,3 mg/ kg TS; 0,4 mg/ kg TS) führte unabhängig von der Selenquelle nicht zu einer Veränderung der Gesamtzahl der weißen Blutkörperchen im Vergleich mit der Kontrollgruppe (0,085 mg Se/ kg TS), jedoch konnte eine Erhöhung der Lymphozytenzahl nach Gabe von 0,4 mg Se/ kg TS Selenhefe gezeigt werden (Calamari *et al.*, 2010).

Eine Supplementierung von Selenhefe (0,3 mg/ kg TS) im letzten Trächtigkeitstertel der Stute zeigte keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des Kolostrums (Fett-/ Proteingehalt, IgG) oder auf den IgG-Gehalt im Blut des Fohlens. Die Nachgeburt supplementierter Stuten wies eine geringere Größe plazentaler Zellen auf was möglicherweise einen positiven Effekt auf die Plazentafunktion ausübt (Thorson *et al.*, 2010).

2.2.5.2 Skelettmuskulatur

Eine Mangelversorgung des Pferdes mit Selen und Vitamin E wird assoziiert mit fütterungsbedingten Myopathien, auch bekannt als Weißmuskelkrankheit (White Muscle Disease). Klinische Symptome dieser Erkrankung zeigen vor allem Fohlen, wobei man eine Frühform im Alter von wenigen Tagen von einer Spätform mit zwei bis zwölf Monaten abgrenzt (Bostedt, 1977, 1979; Lofstedt, 1997).

Die nutritiv bedingte Weißmuskelkrankheit (klinische Symptomatik, erhöhte CK-Werte) – in Abhängigkeit von niedrigen Serumselengehalten - konnte bei unter 30 Tagen alten Fohlen bestätigt werden; sieben der acht untersuchten Fohlen, welche jünger als 30 Tage waren und Symptome der WMD zeigten, hatten Selenwerte von $< 1,26 \mu\text{mol/l}$ (Streeter *et al.*, 2012).

Die Frühform der nutritiven Muskeldegeneration (NMD) entwickelt sich bereits intrauterin als Folge einer unzureichenden Selenversorgung der Stute während der Hochträchtigkeit. Die Fohlen zeigen in den ersten Lebenstagen mit Apathie, Anorexie, Orientierungslosigkeit und muskuläre Schwäche undifferenzierte Krankheitssymptome, welche schwer von Infektionskrankheiten, einem Fehlanpassungssyndrom oder Entgleisungen des metabolischen Stoffwechsels abzugrenzen sind (Bostedt, 1977).

Studien zeigten, dass Mutterstuten erkrankter Fohlen geringe Serumselenelemente aufwiesen (Higuchi *et al.*, 1989).

Bei der Spätform der Weißmuskelkrankheit im Alter von zwei bis zwölf Monaten sind meist nur einzelne Muskelgruppen betroffen; je nach Funktion der betroffenen Muskulatur äußern sich die Symptome in einer Verhärtung der lokomotorischen Muskulatur, erschwerter Atmung, Dysphagien und Herzproblemen. Die massive Zerstörung von Muskelzellen führt zu einer dunklen Verfärbung des Harns (Myoglobinurie) (Bostedt, 1979; Dill & Rebhun, 1985).

Akut verlaufende, nutritiv bedingte Myopathien beim erwachsenen Pferd scheinen nur sehr selten vorzukommen (Owen *et al.*, 1977; Step *et al.*, 1991; Zentek, 1991).

Das Vorliegen eines Selen- und Vitamin E – Mangels als Ursache für die Entstehung einer Belastungsmyopathie beim adulten Pferd wird kontrovers diskutiert.

Zentek (1991) untersuchte Myopathien an sechs Pferden aus einem Reitpferdebestand in einem Selenmangelgebiet und sieht einen Zusammenhang zwischen einer unzureichenden Versorgung von Pferden mit Selen und dem Auftreten von Belastungsmyopathien sowie einem Leistungsabfall.

Andere Autoren ziehen keine direkten Schlüsse aus einer Selenmangelversorgung als Ursache für Belastungsmiopathien beim Pferd, empfehlen jedoch sowohl prophylaktisch wie auch therapeutisch Selen in der Ration zu ergänzen (Stashak, 2008).

Eine Untersuchung der Effekte einer Supplementierung von Vitamin E und Selen über 120 Tage auf subjektive Aspekte beim Reiten, welche in Zusammenhang mit Störungen des Muskelstoffwechsels stehen, ergab sowohl in den substituierten wie auch in den Placebogruppen eine verbesserte Durchlässigkeit und eine verringerte Intensität der Schweißbildung beim Reiten (Kienzle *et al.*, 2006).

2.2.6 Bedeutung von Selen im antioxidativen Stoffwechsel

Selen ist ein Bestandteil der Glutathionperoxidase; das Enzym Glutathionperoxidase spielt als Komponente des antioxidativen Stoffwechsels eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Hydroperoxiden in der Zelle (Arthur, 1997; Ferguson & Karunasinghe, 2011).

Das cytosolische Enzym der Superoxiddismutase katalysiert im Vorfeld die Umbildung des Sauerstoffradikals Superoxid zu Wasserstoffperoxid und steht somit in engem Zusammenspiel mit der Glutathionperoxidase (Sunde & Hoekstra, 1980).

Ein veränderter Selenstatus des Organismus, bedingt durch einen Selenmangel oder eine Supplementierung, steht in Verbindung mit einer Veränderung der GPx-Aktivität und somit des antioxidativen Systems (Brummer, Hayes, Dawson, *et al.*, 2013).

Shellow *et al.* (1985) wiesen nach einer 12-wöchigen Supplementierung von Natrium-Selenit in verschiedenen Dosierungen (0,05 ppm – 0,1ppm – 0,2ppm) einen linearen Anstieg des Blutselenpiegels bei den untersuchten Pferden nach, konnten aber keinen Effekt auf die GPx-Aktivität feststellen.

In einer neueren Studie von Karren *et al.* (2010) führte eine Zufütterung von Selenhefen (0,3 mg/ kg TS) bei tragenden Stuten weder zu einer Veränderung der GPx bei den Stuten selbst noch bei deren Fohlen; die Selengehalte im Plasma, in der Muskulatur und im Kolostrum der Stuten stiegen nach der Supplementierung an.

In den Untersuchungen von Shellow *et al.* (1985) und Podoll *et al.* (1992) konnte bei einem Selengehalt in der Grundration von 0,06 mg/ kg TS weder ein Einfluss der aufgenommenen Selenmenge (Shellow: 0,05 ppm, 0,1 ppm, 0,2 ppm; Podoll: 0,3 mg/ kg TS) noch der Bindungsform (Na-Selenit vs. Na-Selenat) auf die Aktivität der GPx nachgewiesen werden.

Deaton *et al.* (2002) untersuchten die Auswirkungen einer „antioxidativen Diät“, basierend auf Vitamin E, C und Selen, auf die gesamte antioxidative Kapazität und die antioxidative Kapazität im Blut sowie in der Lunge im Zustand körperlicher Ruhe und unter Belastung. Beim gesunden Pferd und einer ausgewogenen Futterration zeigte eine Supplementierung mit Antioxidantien keinen positiven Effekt auf die Lungenfunktion während eines moderaten Leistungsniveaus. Die Notwendigkeit einer Verabreichung von Antioxidantien ergibt sich bei unausgewogenen Futterrationen, bei hoher Leistungsintensität und -dauer sowie während eines Krankheitsgeschehens oder durch andere zusätzliche Stressoren.

Richardson *et al.* (2006) haben in ihrer Studie die Effekte unterschiedlicher Selengaben bei Pferden eruiert. Die Versuchstiere wurden in drei Gruppen eingeteilt: eine Gruppe ohne zusätzliche Selenergänzung mit einem Selengehalt von 0,15 mg/ kg TS in der Grundration, eine Gruppe erhielt 0,41 mg Na-Selenit/ kg TS in der Ration und eine Gruppe wurde mit 0,46 mg Zink-L-Selenomethionin/ kg TS zugefüttert.

Die GPx-Aktivität im Blut stieg im Laufe des Fütterungsversuches bei allen Gruppen unabhängig von der Menge des aufgenommenen Selens und auch von der Selenquelle an. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Höhe des Plasmaselenspiegels und der GPx-Aktivität. Bei der mit Zink-L-Selenomethionin supplementierten Gruppe konnten die höchsten Selenspiegel im Plasma gemessen werden, die Aktivität der GPx lag jedoch unter den Werten der anderen Gruppen.

Haggett *et al.* (2010) untersuchten den Blutselenstatus bei Distanzpferden im Verlauf körperlicher Leistungen. Physische Arbeit erhöht die Produktion freier Sauerstoffradikale im Blut und führt zu einer Verschiebung des oxidativ-antioxidativen Gleichgewichts. Als Bestandteil der Glutathionperoxidase spielt Selen als antioxidativer Katalysator eine entscheidende Rolle. Höhere Selenwerte im Blut führten allerdings nicht zu verbesserten Leistungen, jedoch konnte bei Pferden, welche den Ritt über die volle Distanz beendeten durchschnittlich höhere Werte nachgewiesen werden als bei den disqualifizierten Teilnehmern. Es konnte ein Anstieg der Blutselenwerte im Anschluss an körperliche Leistungen vermerkt werden.

In der Studie von Contri *et al.* (2011) zeigte sich, dass eine Supplementierung mit Antioxidantien (1500 mg α -Tocopherol Acetat, 360 mg Zink, 2,5 mg Selenhefe) die Fähigkeit des Seminalplasmas, oxidativen Stress zu reduzieren, verbesserte und positiv korrelierte mit der Motilität der Spermien.

2.3 Antioxidativer Stoffwechsel

2.3.1 Oxidatives System

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind sauerstoffenthaltende Moleküle, welche reaktionsfreudiger sind als der Sauerstoff in der Luft (Noguchi, 1999). ROS umfassen sowohl freie Radikale wie auch reaktive Verbindungen mit freien Elektronen in der äußersten Schale (Peroxynitrite, Hydroperoxide, Hypochlorsäure).

Freie Radikale sind Moleküle, Molekülfragmente oder Atome, die in ihren Außenschalen einzelne oder mehrere ungepaarte (freie) Elektronen aufweisen, welche die Reaktionsfreudigkeit von Molekülen maßgeblich erhöhen (Halliwell, 1999).

Die Gruppe der freien Radikale umfasst Hydroxyl-, Hydroxyperoxyl-, Superoxidanion-, Alkoxyl-, α -Tocopheryl-, Askorbyl- und Kohlenwasserstoffradikale.

Freie Radikale entstehen durch homolytische Spaltung eines Elektronenpaares, ausgelöst durch thermische, chemische, elektrochemische, mechanische oder strahlungsbedingte Energie; gebildet werden zwei reaktive radikalische Atome mit ungepaarten Elektronen (Ohlenschläger, 1995).

Der Organismus ist permanent exogenen wie endogenen Oxidantien ausgesetzt. Exogene Oxidantien spielen vor allem im Bereich der Atemwege eine Rolle, welche mit inhalierten Oxidantien wie Ozon, Feinstaubpartikeln und Endotoxinen konfrontiert werden (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007).

Endogene Radikale lassen sich abhängig von ihrer Entstehung in drei Gruppen einteilen. Im Verlauf der Atmungsketten-Phosphorylierung in den Mitochondrien entstehen Superoxid-Radikale durch Reduktion von molekularem Sauerstoff (Nivière, 1995; Kowaltowski & Vercesi, 1999); der Atmungsketten-Phosphorylierung kommt vor allem bei Erhöhung des Sauerstoffverbrauches (oxidativer Stress) im Rahmen körperlicher Leistungen eine große Bedeutung zu (Art & Lekeux, 1993).

Radikale entstehen darüber hinaus enzymabhängig beim Purinabbau über die Xanthinoxidase, im Verlauf der Arachidonsäurekaskade über die Cyclooxygenase und die Lipooxygenase und bei Detoxifikationsprozessen über Cytochrom P-450 (Nivière, 1995).

Weiterhin entstehen Sauerstoffradikale im Verlauf von Entzündungsprozessen in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Oxidantien spielen im Rahmen der unspezifischen Immunantwort eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung und Bekämpfung von eindringenden Mikroorganismen (Kowaltowski & Vercesi, 1999; Kobayashi *et al.*, 2001).

Die Aktivierung der Phagozyten zur Synthese von ROS erfolgt durch Komplement-Spaltprodukte, Immunkomplexe, Endotoxine und Autoaktivatoren wie Leukotrien B und den Thrombozyten-aktivierenden Faktoren (Müller-Peddinghaus, 1987).

2.3.2 Antioxidative Schutzsysteme

Die antioxidativen Schutzsysteme des Körpers gliedern sich in präventive Abwehrmechanismen, Antioxidantien und Reparatursysteme (Cheeseman & Slater, 1993). Exogen können die körpereigenen Radikal-Abwehrmechanismen durch oral aufgenommene antioxidative Zusatzstoffe positiv beeinflusst werden (Young & Woodside, 2001).

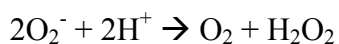
Antioxidantien dienen dem Schutz von Zellmembranen und Komponenten des Zytosols vor Schäden durch freie Radikale. Antioxidantien vermögen freie Radikale zu inaktivieren, in weniger reaktive Formen zu transformieren und von Radikalen induzierte Kettenreaktionen zu unterbrechen (Winnefeld, 1996).

Die wichtigsten enzymatischen Antioxidantien sind die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase (CAT) und die Glutathionperoxidase (GPx) (Fridovich, 1995).

Nicht enzymatische Antioxidantien umfassen Vitamin E, Vitamin C, β -Karotin, Glutathion, Flavine, organische Säuren, Plasmaproteine und technische Antioxidantien (Sies & Cadenas, 1985).

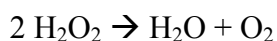
Enzymatische Antioxidantien zeigen effizientere Anpassungsmechanismen an freie Radikale als nicht enzymatische (Ohlenschläger, 1995). Antioxidative Enzyme katalysieren die Transformation von Superoxidanionen in Hydrogenperoxide (H_2O_2) und Wasser. Die Spurenelemente Selen (Se), Zink (Zn), Kupfer (Cu) und Mangan (Mn) katalysieren unter anderem die Enzymaktivität der Glutathionperoxidase (Se) und der Superoxiddismutase (Zn, Mn, Cu) (Maughan, 1999; Mates, 2000).

Die Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die Reaktion von Superoxid-Radikalen zu Wasserstoffperoxid:

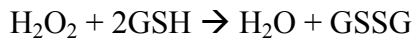


SOD kommt sowohl in den Mitochondrien als Mangan-katalysiertes Enzym (Mn-SOD) als auch im Zytosol vor (CuZn-SOD).

Anschließend katalysiert die Katalase Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff:



Die Glutathionperoxidase ist selenhaltig und wandelt Glutathionsulfydryl (GSH) in Anwesenheit von H_2O_2 zu Glutathiondisulfid (GSSG) und Wasser um:



Antioxidantien lassen sich in endogene und exogene Systeme einteilen. Die endogenen oder körpereigenen antioxidativen Schutzsysteme umfassen Enzyme (SOD, CAT, GPx), welche Radikale aktiv inaktivieren bzw. transformieren und antioxidativ wirkende Substanzen wie Glutathion, Harnsäure, Bilirubin, Ubiquinol, NADH und NADPH. Metallbindende Proteine, sogenannte Chelatbildner (Albumin, Coeruloplasmin, Metallothionin, Transferrin, Ferritin und Myoglobin), zeigen ebenfalls eine antioxidative Wirkung (Winnefeld, 1996; Kleczkowski *et al.*, 2004)

Exogene Antioxidantien sind Substanzen, welche über die Nahrung aufgenommen werden und auch gezielt supplementiert werden können wie Vitamin C, Vitamin E, Karotinoide, Flavonoide, Spurenelemente, Allopurinol, Glucocorticoide, Iodid, Desferrioxamin, L-Arginin und Dimethylsulfoxid (Winnefeld, 1996; Fürll *et al.*, 1999).

2.3.3 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress entsteht als Folge eines Ungleichgewichtes zwischen pro- und antioxidativen Prozessen und deutet darauf hin, dass die antioxidative Kapazität eines Individuums überschritten ist (Stohrer *et al.*, 2002). Sowohl eine erhöhte Bildung von Radikalen im Gewebe als auch eine Unterversorgung mit niedermolekularen Antioxidantien oder die Hemmung antioxidativer Enzymsysteme führen zu oxidativem Stress (Halliwell, 1999). Oxidative Gewebeschäden entstehen zunehmend mit einer Abnahme beziehungsweise Überlastung körpereigener antioxidativer Schutz- und Reparaturmechanismen (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007).

Besondere Angriffspunkte für freie Radikale bieten ungesättigte Fettsäuren in Zellmembranen, Eiweißstrukturen und Cholesterin; Oxidantien können somit alle wichtigen Stoffwechselprozesse des Körpers, die Reaktivität des Immunsystems und die Integrität von Zell- und Mitochondrienmembranen beeinflussen. Über oxidative Veränderungen der DNA kann es sogar zu Schäden des Erbgutes kommen (Gramzow, 2001).

Oxidativer Stress stellt somit die pathogenetische Grundlage vieler chronischer Erkrankungen dar. Freie Radikale als pathogenes Agens spielen in der Humanmedizin beispielsweise bei chronischen Polyarthritiden, Colitis ulcerosa, Diabetes mellitus, Entzündungen jeglicher Form, Ischämien, Katarakt und verschiedenen Tumorerkrankungen, Arteriosklerosen und

kardialen Myopathien eine prädisponierende Rolle. Oxidativer Stress vermag die Reaktivität phagozytierender Zellen negativ zu beeinflussen und trägt maßgeblich zu altersassoziiertem zellulärem und systemischem Organversagen bei (Martin *et al.*, 1996; Finkel & Holbrook, 2000; Guarente & Kenyon, 2000).

2.3.4 Radikalassozierte Erkrankungen beim Pferd

2.3.4.1 Recurrent airway obstruction (RAO)

In der Humanmedizin ist die Beteiligung von freien Radikalen an der Pathogenese diverser Lungenerkrankungen (Heffner & Repine, 1989), wie zum Beispiel dem Akuten Respiratorischen Distress Syndrom (Baldwin *et al.*, 1986), Asthma (Barnes, 1990) und chronischer Bronchitis (Cantin & Crystal, 1985), bereits lange bekannt. Oxidantien beeinträchtigen über diverse Pathomechanismen die Funktion des Atmungstraktes. Reaktive Sauerstoffradikale können die Schleimproduktion epithelialer Zellen erhöhen, Mastzellen in der Mukosa des Atmungstraktes aktivieren und zu einer Bronchokonstriktion führen; somit erhöht sich die Empfänglichkeit für Infektionen (Barnes, 1990).

Auch bei Pferden mit rezidivierenden obstruktiven Lungenerkrankungen lassen sich Parallelen ziehen; so konnten bei Pferden mit RAO erhöhte Gehalte von GSH, GSSG, 8-Isoprostan und MPO sowie reduzierte Vitamin C-Werte im Bronchialsekret und erhöhte GSH- und GSSG-Werte in Erythrozyten gemessen werden (Art *et al.*, 1999; Kirschvink, Art, *et al.*, 2002; Deaton *et al.*, 2004; Art *et al.*, 2006).

Pulmonale oxidative Marker und Antioxidantien korrelierten mit dem Grad der entzündlichen Veränderung der Atemwege, vor allem mit dem Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Sekret (Kirschvink, Art, *et al.*, 2002; Deaton *et al.*, 2004; Art *et al.*, 2006).

Kirschvink *et al.* (2002) stellten eine signifikante Korrelation zwischen Funktionsparametern der Lunge und oxidativen Markern bei RAO-erkrankten Pferden dar; die Ergebnisse deuten einen direkten Einfluss von oxidativem Stress auf die Lungenfunktion an.

Deaton *et al.* (2004) zeigten, dass der Gehalt an H₂O₂ im Kondensat der Ausatemluft mit dem Gehalt an Ascorbinsäure im Bronchialsekret korrelierte.

Pferde mit obstruktiven Lungenerkrankungen zeigten dauerhaft eine erhöhte Aktivität der GPx in Erythrozyten; die GPx-Aktivität der Leukozyten erhöhte sich nur während bzw. nach der Konfrontation mit staubigem Heu und Stroh. Staubexposition ließ auch die GPx – Aktivität im BAL-Sekret ansteigen. Die Vitamin C-Konzentration im BAL-Sekret von RAO-

Patienten glich unter Normalbedingungen der von gesunden Probanden; die Konfrontation mit staubigem Heu bzw. Stroh führte zu erniedrigten Werten bei erkrankten Pferden (Tan *et al.*, 2010).

Youssef *et al.* (2012) untersuchten diverse antioxidative Marker im Serum von Zugpferden mit akuten oder chronischen Erkrankungen der unteren Atemwege. Bei erkrankten Pferden konnte ein signifikanter Abfall der Spurenelemente Se, Cu, Zn, Fe und ein Anstieg des Cu/Zn-Verhältnisses und von Mn nachgewiesen werden. Bei chronisch erkrankten Pferden war im Vergleich zu akuten Zuständen Se signifikant reduziert und Mn erhöht. Pferde mit Atemwegserkrankungen zeigten einen Anstieg von Malondialdehyd, LDL, Hydrogenperoxiden und Glutathionreduktase; es konnte ein signifikanter Abfall der Enzymaktivitäten der Glutathion-S-Transferase und der Katalase gemessen werden. Bei akut erkrankten Pferden fiel sowohl eine negative Korrelation zwischen der Glutathionreduktase-Aktivität und H₂O₂, als auch zwischen LDL und der Katalaseaktivität auf, während in chronischen Fällen eine negative Korrelation zwischen Selenwerten und MDA vorlag. Die Ergebnisse der Untersuchung deuten an, dass oxidativer Stress in Verbindung mit erhöhten Werten des antioxidativen Stoffwechsels charakteristisch ist für Erkrankungen der unteren Atemwege.

Eine Untersuchung über die Evaluierung oxidativer Stress-Marker (ROS, FRAP, schwefelhaltige Antioxidantien, oxidierte Proteinbestandteile) beim Vollblutfohlen zeigte einen erhöhten oxidativen Stress-Index bei Fohlen in der Rekonvaleszenzphase einer Pneumonie. Fohlen mit Erkrankungen der oberen Atemwege hatten erhöhte Hydrogenperoxidgehalte in der Ausatemluft und reduzierte schwefelhaltige Antioxidantien gekoppelt mit erhöhten oxidierten Proteinbestandteilen im Blut. Lokale und systemische oxidative Stressmarker variierten nicht zwischen verschiedenen Herkunftsställen oder zwischen den Geschlechtern (Po *et al.*, 2013).

Pferde mit temporären obstruktiven Lungenerkrankungen im Sommer auf der Weide hatten erhöhte Nitritoxidase-Aktivitäten in den Alveolen (Costa *et al.*, 2001).

Analog zu humanmedizinischen Asthmastudien, wurden auch in der Tiermedizin zunehmend die Auswirkungen einer oralen Supplementation mit Antioxidantien in Form von Vitamin C und E, Selen und natürlichen Flavonoiden bei Pferden mit obstruktiven Lungenerkrankungen erforscht (Deaton *et al.*, 2002; Kirschvink, Fievez, *et al.*, 2002). Die Ergebnisse zeigten, dass die Zulage von Vitaminen und Spurenelementen die Blutkonzentrationen dieser signifikant erhöhte, ebenso stiegen die Vitamin C-Gehalte im Bronchialsekret an. Dagegen blieben

andere oxidative Marker unbeeinflusst. Es zeigte sich ein verbesserter Bronchoskopie-Score, funktionelle Parameter konnten allerdings nicht positiv beeinflusst werden.

Leistungsinduziertes Lungenbluten beim Rennpferd (EIPH) scheint auch mit einem Ungleichgewicht des antioxidativen Stoffwechsels zu korrelieren. Radikale vermögen den Stickstoffmonoxid-Gehalt in der Lunge zu verringern und induzieren eine erhöhte Synthese vasokonstriktorisch wirkender Agentien; dies führt zu einem erhöhten Druck im pulmonalen Gefäßsystem und kann folglich zur Ruptur von Kapillaren führen (Mills & Higgins, 1997).

Als weiterer Mechanismus in der Pathogenese des Lungenblutens wird die radikalinduzierte Veränderung der Membranfluidität der Erythrozyten diskutiert. Extreme Belastungssituationen reduzierten die Membranfluidität von Erythrozyten signifikant. Bei einer reduzierten Fluidität der Erythrozytenmembran, erhöht sich gleichsam die Viskosität des Blutes, was in einer erhöhten Gefäßspannung resultiert (Baskurt & Meiselman, 1999; de Moffarts *et al.*, 2006; Portier *et al.*, 2006).

2.3.4.2 Neurologische Erkrankungen

Ein Ungleichgewicht im antioxidativen Stoffwechsel wird auch mit diversen neurologischen Erkrankungen des Pferdes in Verbindung gebracht, beispielsweise mit der Pathologie der Grass-Sickness (McGorum *et al.*, 2000; McGorum *et al.*, 2003), der Equinen Motor Neuron Disease (EMND) (de la Rua-Domenech *et al.*, 1997; Hahn & Mayhew, 1997; Divers *et al.*, 2006; McGorum *et al.*, 2006) und der equinen degenerativen Myeloencephalopathie (Blythe *et al.*, 1991).

An EMND erkrankte Pferde wiesen hohe Serumkonzentrationen an Kupfer (prooxidativ) und erniedrigte Vitamin E Gehalte sowie einen Mangel an Selen auf (Divers *et al.*, 2006).

Delguste *et al.* (2007) konnten bei Pferden aus einem Stall, in dem Fälle von Equine Motor Neuron Disease auftraten, signifikant veränderte Parameter des antioxidativen Stoffwechsels (Vitamin E: 1,82 mg/ g Cholesterol; SOD: 1095 IU/ g Hb; GPx: 35,5 IU/ g Hämoglobin) nachweisen.

Pflanzen von Weideflächen auf denen Fälle von Equine Grass Sickness auftraten, wiesen reduzierte antioxidative und erhöhte pro-oxidative Aktivitäten auf. Es konnten erhöhte Fruktangehalte sowie reduzierte Konzentrationen von Weinsäure und Vitamin C nachgewiesen werden. Diese Befunde wurden in Verbindung gebracht mit erhöhtem oxidativen Stress für die dort grasenden Pferde. Bei Fällen von Equine Grass Sickness konnten erhöhte Dihydroxyphenylalanin-Werte im Blut der Patienten gemessen werden, was

möglicherweise auf einen generell gestörten Catecholamin-Metabolismus schließen lässt. Catecholamine werden durch Oxidation von Tyrosin produziert, die durch freie Sauerstoffradikale katalysiert wird (McGorum *et al.*, 2000; McGorum *et al.*, 2003).

McFarlane *et al.* (2005) erwägen einen Zusammenhang von oxidativem Stress und dem Verlust von Neuronen bei Pferden mit Cushing Syndrom. Es konnte ein Anstieg von 3-Nitrotyrosin, einem Marker für oxidativen Stress, bei den Versuchspferden nachgewiesen werden. Dies wurde in der Humanmedizin ebenfalls bei Patienten mit Parkinson, Alzheimer und multipler Sklerose beobachtet (Spencer *et al.*, 1996; Keen *et al.*, 2004).

2.3.4.3 Muskelerkrankungen

Oxidativer Stress kann auch als Auslöser für muskuläre Dysfunktionen fungieren. Fohlen mit White Muscle Disease zeigten eine verminderte GPx-Aktivität und einen Mangel an Selen und Vitamin E (Caple *et al.*, 1978; Lofstedt, 1997).

Auch bei Pferden mit atypischer Weidemyopathie scheint ein Ungleichgewicht im antioxidativen Stoffwechsel beteiligt zu sein (Finno *et al.*, 2006).

Belastungsinduzierte Myopathien bei Pferden können auf Lipid-Peroxidation durch Radikale zurückgeführt werden; nach einer schnellen Arbeit auf dem Laufband stiegen die Konzentration peroxidierter Phosphatidylethanolamine und die des Malondialdehyds in den Muskelfasern an (Matsuki *et al.*, 1991; Avellini *et al.*, 1999).

Meijer *et al.* (1990) untersuchten Veränderungen in der Skelettmuskulatur bei Rhabdomyolyse-sensitiven Trabrennpferden nach dem Training. Rennleistungen nahe der individuellen Belastungsgrenze erhöhten die Aktivitäten von Glc-6-Phosphat-Dehydrogenase, Phosphogluconat-Dehydrogenase, Glutathionreduktase und GPx signifikant und von SOD und Katalase geringgradig.

Pferde mit postanästhetischer Myositis zeigten einen signifikanten Anstieg der Anti-Perferryl-Aktivität, sobald die Muskulatur nach Gewichtsentslastung wieder besser durchblutet wurde. Auslösend für die Form der Myositis scheint die Kombination aus halogenierten anästhetischen Agenzien in Verbindung mit einer Ischämie der Muskulatur durch Hypotension und Kompression. Eine massive Freisetzung von ROS führt zu einer Lipidperoxidation von Zellmembranen und somit zu Läsionen der Muskelzellen (Lindsay *et al.*, 1980; Grandy *et al.*, 1987; Serteyn *et al.*, 1990).

2.3.4.4 Perfusionsstörungen

Ischämien und Reperfusionprozesse sind nicht nur an der Pathogenese muskulärer Probleme beteiligt. Auch bei intestinalen Koliken ist nach vorangegangener Ischämie durch Darmverlagerungen oder Obturationen und nachfolgender Reperfusion des Gewebes eine massive Freisetzung von ROS zu beobachten. Versuche an isolierten Darmschlingen von Jejunum und großem Kolon an anästhesierten Pferden zeigten signifikant veränderte Parameter des antioxidativen Stoffwechsels nach einer Ischämie über zwei Stunden und darauffolgender Reperfusion. 60 bzw. 120 Minuten nach beginnender Reperfusion der Darmschlingen konnten in Gewebeproben des Jejunums hohe Konzentrationen von Malondialdehyden und Alkenen nachgewiesen werden sowie eine Anreicherung von Superoxiden in Endothelzellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Ischämien des Kolons führten in dieser Untersuchung nicht zu veränderten oxidativ-antioxidativen Werten (Kooreman *et al.*, 1998).

Die Aktivität der Myeloperoxidase im Plasma erhöhte sich signifikant bei Kolonobturationen; dieser Parameter eignet sich zur Einschätzung des Schweregrades der Strangulation und unterstreicht die Freisetzung von ROS sowie eine Aktivierung von Leukozyten im Verlauf von intestinalen Ischämien (Gulke *et al.*, 1999).

Durchblutungsbedingte Störungen lassen sich auch im Krankheitsgeschehen der Hufrehe beobachten. Dabei bedingt eine initiale Entzündungsreaktion die Freisetzung von ROS. Freie Radikale spielen die Hauptrolle in der Pathophysiologie der Hufrehe. In rezenten Studien zeigte sich, dass die equine Huflederhaut nur eine limitierte SOD-Aktivität aufweist, was die Sensitivität gegenüber oxidativen Stress begründen kann (Loftus *et al.*, 2007).

In der Humanmedizin geht man davon aus, dass oxidativer Stress auch im Infarktgeschehen eine entscheidende Rolle spielt (Kaminski *et al.*, 2002). Nach anhaltender Ischämie freigesetzte Radikale bedingen durch Peroxidation von Membranlipiden die Reperfusionsschäden am Herzmuskel (Ambrosio *et al.*, 1991; Paradies *et al.*, 1999)

2.3.4.5 Gelenkerkrankungen

Untersuchungen erkrankter Gelenke beim Pferd zeigten erhöhte Gehalte von Proteincarbonyl und 8-Isoprostan, einem Indikator für Lipidperoxidation, in der synovialen Flüssigkeit (Dimock *et al.*, 2000; Daix, 2007).

Bei Pferden mit Osteoarthritis konnten erhöhte Gehalte von Nitrotyrosin und Nitriten im Knorpelgewebe und in subchondralen Knochenstrukturen gemessen werden (van der Harst *et al.*, 2006).

Studien mit in-vitro kultivierten Synoviozyten zeigten eine erhöhte ROS-Freisetzung nach wiederholten Zyklen von Sauerstoffentzug mit anschließender Reoxygenierung; dies könnte die Entstehung einer Osteoarthritis begünstigen (Schneider *et al.*, 2005)

2.3.4.6 Chronische intestinale Erkrankungen

Für die Entstehung chronischer intestinaler Erkrankungen werden radikalbedingte Lipidperoxidationen der Zellmembranen des Darmes verantwortlich gemacht (Parks *et al.*, 1984).

Das Darmepithel dient nicht nur als Barriere gegenüber Schadstoffen zwischen dem Darmlumen und dem restlichen Organismus, seine Hauptfunktion liegt in der Resorption von Nährstoffen und Wasser aus der Ingesta. Oxidativer Stress kann die Funktion des Darmepithels nachhaltig beeinträchtigen. Auftretende Schäden am Darmepithel korrelieren mit dem Ausmaß einer Ischämie und den nachfolgenden Reperfusionsschäden. Eine Ischämie des Darmes führt zu zellulären Veränderungen der Mukosa. Im Rahmen der nachfolgenden Reperfusion des Gewebes werden massiv hoch reaktive zytotoxische Sauerstoffradikale eingeschwemmt (Argenzio & Hintz, 1970; Snyder, 1989).

2.3.5 Oxidativ/ Antioxidatives Gleichgewicht bei physiologischen Prozessen

2.3.5.1 Reproduktion

Aus humanmedizinischen Studien im Bereich der Reproduktion und der Endokrinologie geht hervor, dass ROS sowohl bei diversen physiologischen Prozessen, als auch bei pathologischen Prozessen wie beim Abortgeschehen oder der Pathogenese von Endometriosen eine Schlüsselfunktion spielen (Agarwal & Allamaneni, 2004).

Beim Pferd wurde die Bedeutung von Radikalen vor allem beim Hengst anhand der Samenqualität untersucht (Baumber *et al.*, 2000; Baumber *et al.*, 2002). Der Einfluss freier Radikale sowie die Kryokonservierung führen zu einer Fragmentation der DNA im Samen des Hengstes (Baumber *et al.*, 2003).

ROS spielen vor allem bei Tiefgefriersperma eine Rolle bei der Zusammensetzung von stabilisierenden Samenverdünnern (Aurich, 2005).

2.3.5.2 Körperliche Leistung / Belastung

In den letzten Jahren wurden vermehrt Studien beim Pferd durchgeführt, um den Einfluss körperlicher Leistungen verschiedener Dauer und Intensität unter diversen Umweltbedingungen auf den antioxidativen Status zu ermitteln.

Ein erhöhter Sauerstoffverbrauch unter körperlichen Leistungsbedingungen steigert den mitochondrialen Elektronentransport in die Muskelzellen (Di Meo & Venditti, 2001). Die freigesetzten Radikale senken über Peroxidationsmechanismen die Membranintegrität von Muskelzellen und begünstigen somit das Auftreten muskulärer Schäden. Des Weiteren wurde im Verlauf körperlicher Belastung ein Verlust von Muskelenzymen sowie eine gesteigerte Lipidperoxidation ermittelt (Williams *et al.*, 2004).

In Abhängigkeit von der Intensität körperlicher Leistung nimmt die Sauerstoffversorgung der Muskulatur ab; die in der Rekonvaleszenz auftretende Reperfusion kann zur forcierten Bildung freier Radikale führen. Entscheidend bei der Regulation der Balance zwischen dem metabolischen und dem antioxidativen Schutzmechanismus der Muskulatur beim Sportpferd scheint vor allem der mitochondriale Komplex I zu sein (Ceusters *et al.*, 2013).

Die Quantität freigesetzter Radikale ist wahrscheinlich sowohl von Art, Dauer und Intensität körperlicher Belastung, dem Trainingszustand der Versuchspferde wie auch den klimatischen Bedingungen abhängig (Kirschvink *et al.*, 2008). Je länger ein Organismus körperlicher Belastungen ausgesetzt ist, desto eher entsteht oxidativer Stress (Kirschvink, Art, *et al.*,

2002). Dies lässt sich möglicherweise auf eine zunehmende Abschwächung der körpereigenen antioxidativen Kapazität zurückführen (Marlin *et al.*, 2002; Deaton, 2006).

Eine leistungsinduzierte Veränderung des antioxidativen Status tritt aber nicht zwingend schon während oder unmittelbar nach Belastung auf, sondern zum Teil mit einem zeitlichen Verzug von 16 – 24 Stunden (Balogh *et al.*, 2001; Marlin *et al.*, 2002).

Im Verlauf eines 140 km Ausdauertrittes stiegen die CK und AST an, während die Gehalte von Vitamin C und Glutathion erst zeitverzögert nach der Belastung abfielen.

Bei starker körperlicher Belastungen unter Rennbedingungen stiegen oxidative Marker wie Isoprostan, MDA und Glutathion signifikant an (Chiaradia *et al.*, 1998; Kirschvink *et al.*, 1999).

Sich wiederholende Einheiten körperlicher Belastungen im Sinne eines Trainings fördern nachweislich die antioxidative Kapazität eines Individuums. Nach einer zwölfwöchigen Trainingsperiode konnte bei Trabern ein Anstieg folgender Antioxidantien im Blutplasma beobachtet werden: Vitamin C, Harnsäure, GPx, SOD (de Moffarts *et al.*, 2007).

Menn (2006) untersuchte die Auswirkungen von Hypoxietraining auf den oxidativen Stress und die physiologische Leistungsfähigkeit an Maultieren und Haflingern. Die Ergebnisse deuten an, dass Hypoxietraining die antioxidative Kapazität gegen freie Radikale erhöht; es konnten erhöhte Gehalte von Vitamin C, TEAC, GPx erzielt werden.

Untersuchungen an Rennpferden ermittelten eine direkte Auswirkung körperlicher Belastung auf den Gehalt an ROS und Homocystein-Werte im Blut unmittelbar nach Rennbelastung (Fazio *et al.*, 2009).

Moderates Training veränderte Parameter des antioxidativen Stoffwechsels bei jungen Trabern. Mit zunehmender körperlicher Anstrengung kam es zu einem Abfall von GPx, NADP⁺ und GSH/ GSSG und einem Anstieg von GSSG; mit Ausnahme der GPx-Aktivität blieben die Werte auch 60 Minuten nach Belastung unverändert. Die Aktivität der Glutathionreduktase stieg erst 60 Minuten nach Belastung signifikant an (Janiak *et al.*, 2010).

Niedzwiedz *et al.* (2012, 2013) untersuchten den antioxidativen Status des Pferdes unter Transportbedingungen. Ein achtstündiger Transport erhöhte nicht nur die Herz- und Atemfrequenz der Versuchspferde, sondern führte auch zu einer erhöhten Aktivität der FRAP (ferric-reducing ability of plasma). Die Aktivität der Glutathionreduktase reduzierte sich unmittelbar nach dem Transport, 24 Stunden später konnten bereits wieder Normalwerte ermittelt werden. Die Glutathionperoxidase fiel mit einer Verzögerung von 24 Stunden ab, während die Aktivität der Glutathion-S-Transferase durch den Transport unbeeinflusst blieb.

Die transportbedingte Veränderung des antioxidativen Status erklärt möglicherweise das Auftreten einer erhöhten Infektanfälligkeit bei Pferden in Folge langer Transporte.

2.3.6 Supplementierung von Antioxidantien beim Sportpferd

Durch eine Supplementierung von antioxidativ wirkenden Substanzen im Sport wird versucht, Mangelzustände auszugleichen, die Leistungs- und Regenerationsfähigkeit des Organismus zu steigern und positive Effekte auf das Immunsystem zu erzielen. Zahlreiche Studien attestierten Antioxidantien eine protektive Rolle gegen oxidativen Stress. Bisher konnten keine leistungssteigernden Effekte sowie positive Einflüsse auf den Muskelstoffwechsel nachgewiesen werden (Nieß, 2008). Trotzdem spielen oxidativer Stress und seine Beeinflussung auch in der Literatur zur Pferdefütterung eine entscheidende Rolle (Chow, 1991; Avellini *et al.*, 1999; Kirschvink, Fievez, *et al.*, 2002).

McMeniam *et al.* (1992) untersuchten die Effekte einer Zulage von Vitamin E in Form von Maiskeimöl an Ponies bei Laufbandtraining auf die Konzentrationen von Vitamin E im Blut sowie auf die Lipidperoxidation. Die Pferde zeigten nach Supplementierung mit Vitamin E erhöhte Aktivitäten von GPx und SOD sowie erhöhte Gehalte von Vitamin C.

Rennpferde im Training, deren Futterration mit Vitamin E und Selen ergänzt wurde, zeigten in Folge körperlicher Beanspruchung eine geringere Freisetzung von Malondialdehyd und signifikant erhöhte TEAC-Werte im Plasma. Sowohl die Zulage von Vitamin E wie auch Liponsäure führte bei Distanzpferden sowohl zu einem Anstieg von Vitamin E und C, erhöhten GSH-Konzentrationen im Blut sowie zu einer gesteigerten GPx-Aktivität der Leukozyten; die GPx-Aktivität im Vollblut reduzierte sich im Verlauf des Versuches (Williams *et al.*, 2004).

Im Vergleich zu einer bedarfsgerechten Vitamin E Versorgung führten sehr hohe Zulagen um das Zehnfache des Bedarfes (10.000 IU DL- α -Tocopherol/ Tag) nicht zu verbesserten Effekten auf den antioxidativen Status. Es konnte ein Abfall der β -Carotingehalte beobachtet werden (Williams & Carlucci, 2006).

Eine intravenöse Verabreichung von Vitamin C unmittelbar vor einem Rennen führte bei Vollblütern zu erhöhten Vitamin C Gehalten im Plasma. Der leistungsinduzierte Anstieg von freigesetzten Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen war reduziert und die TEAC-Werte blieben im Plasma stabil. Vitamin C scheint somit geeignet zu sein, dem Auftreten von

belastungsinduziertem oxidativen Stress entgegenzuwirken; muskuläre Schäden in Folge einer Überbelastung können jedoch nicht verhindert werden. Die Werte der Kreatinkinase stiegen unabhängig von der Behandlung nach dem Rennen deutlich an (White *et al.*, 2001).

Williams *et al.* (2004) erforschten die Auswirkungen einer trainingsbegleitenden Gabe von Vitamin E und/ oder Vitamin C bei Distanzpferden. Im Verlauf des Rennens blieben die Vitamin C-Werte nach gleichzeitiger Supplementierung mit beiden Antioxidantien höher, während in Abhängigkeit von der Fütterung keine Unterschiede der Lipidperoxide, GSH der Erythrozyten, GPx-Aktivität der Erythrozyten und Leukozyten, der CK- und AST-Aktivität im Plasma feststellbar waren.

Die Verabreichung eines vitamin- und spurenelementreichen Zusatzfutters (Ascorbinsäure: 11.500 mg/ Tag, α -Tocopherol: 7.000 mg/ Tag, β -Carotin: 500 mg/ Tag, Cu: 187 mg/ Tag, Zn: 769 mg/ Tag, Se: 7 mg/ Tag) während der Rennsaison an 40 Vollblüter erhöhte signifikant die Gehalte von α -Tocopherol, β -Carotin und Selen im Plasma und verhinderte dort gleichzeitig einen leistungsinduzierten Abfall der GPx-Aktivität sowie der Selengehalte. In der Kontrollgruppe konnte im Verlauf der Rennsaison ein Abfall von GSH, SOD, GPx und Selen sowie ein Anstieg von GSSG im Plasma beobachtet werden (de Moffarts *et al.*, 2005).

In einer weiteren Studie an Rennpferden wurde die Auswirkung einer L-Glutamin-Gabe auf den antioxidativen Stoffwechsel überprüft. Die Supplementierung erhöhte die Glutaminwerte im Blut und schaffte somit eine erhöhte Substratbasis für die GSH-Synthese. Des Weiteren konnte ein Anstieg der totalen antioxidativen Kapazität und der Vitamin C-Konzentration im Blut beobachtet werden sowie ein Abfall der GSSG. Die Ergänzung mit L-Glutamin konnte den trainingsbedingten Anstieg der Kreatinkinase signifikant abschwächen und somit Muskelschäden reduzieren (Brincker, 2004).

Die orale Supplementierung von SOD in einer Dosierung von 520 IE/ Tag führte bei Trabern im Training zu einem signifikanten Anstieg der Resistenz der Erythrozyten gegen Hämolyse. Die Aktivität der Kreatinkinase konnte durch die Zulage von SOD unter körperlicher Belastung konstant gehalten werden, während in der Kontrollgruppe ein Anstieg zu verzeichnen war. Nach einer Anwendungsdauer von 60 Tagen konnten die CK-Werte in der Versuchsgruppe nach körperlicher Belastung sogar signifikant gesenkt werden (Notin *et al.*, 2010).

Smarsh *et al.* (2010) untersuchten den antioxidativen Status bei Pferden mit extremer körperlicher Belastung in Abhängigkeit diverser Zusatzstoffe, welche den Pferden einmal in der Trainingsperiode eine Stunde vor der Leistung per Nasenschlundsonde verabreicht wurden. Die Gabe von schwarzem Tee und Orangenschalenextrakten zeigte keine Effekte auf die Lipidhydroperoxidation, GSH, GPx, α -Tocopherol und β -Carotin, während sich die Retinol-Konzentrationen nach der Gabe von Wasser oder Tee erhöhten.

Die einmalige Gabe von Kranbeere und Ingwer zeigte keinerlei Effekte auf antioxidative Parameter.

In der Literatur waren keine Arbeiten über die Interaktion von n-3-FS und Selen unterschiedlicher Bindungsformen sowie die Auswirkungen einer Supplementierung auf Parameter des antioxidativen Stoffwechsels zu finden.

Sowohl bei anderen Tierarten wie auch bei Pferden wird über deutliche Veränderungen der Plasmafettsäurezusammensetzung in Korrelation zu den supplementierten Fettsäuren berichtet; auch Veränderungen metabolischer Parameter im zeitlichen Zusammenhang mit körperlichen Leistungen wurden bereits dokumentiert.

Dem Spurenelement Selen wird als Bestandteil der GPx eine entscheidende Rolle bei der Regulation des antioxidativen Stoffwechsels zugesprochen.

Ziel der vorliegenden Studie war es, anhand von unterschiedlichen Fütterungsprotokollen die Interaktionen von n-3-FS und Selen zu untersuchen sowie die Effekte auf diverse Parameter des antioxidativen Stoffwechsels bei jungen Vollblütern zu eruieren.

Folgende Hypothese lag der Arbeit zu Grunde:

Eine Supplementierung von n-3-Fettsäuren aus Leinöl und von Selen als Na-Selenit oder als Selenhefe, verändert das Fettsäuremuster im Plasma und erhöht die Selengehalte im Serum junger Vollblutpferde; Blutparameter des antioxidativen Systems (TEAC, GSH, GPx) werden durch die Gabe von Selen in Abhängigkeit von der Darreichungsform beeinflusst

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die Studie wurde an 20 Pferden -zehn Jährlings-Hengsten, neun Jährlings-Stuten und einem Wallach im Alter von sieben Jahren (aus der Studie ausgeschieden nach sechs Wochen) der Rasse englisches Vollblut durchgeführt. Alle Pferde waren während des Versuchszeitraums in demselben Stall eines Gestütes untergebracht und standen in dessen Besitz. Die Probanden waren von dem Gestüt selbst gezüchtet; bei den 19 Jährlingen handelte es sich größtenteils um die Nachzucht eines gestütseigenen Hengstes. Die mittlere Körpermasse der Tiere betrug zu Versuchsbeginn 336 (260-400) kg.

3.1.1 Haltung

Alle Pferde waren während des Untersuchungszeitraums in einem Stallgebäude des Gestüts in Einzelboxen auf Stroh untergebracht. Die Tiere hatten täglich acht Stunden Koppelgang; die Gruppenzusammenstellung erfolgte nach Alter und Geschlecht der Tiere.

3.1.2 Futter und Futterzusätze

Die Pferde erhielten zweimal täglich Heu in einer Tagesration von 1 kg/ 100 kg KM. Morgens wurden 1,5 kg Pellets, 0,9 kg gequetschter Hafer und 100 g eines Mineralergänzungsfutters gefüttert; abends erhielten die Tiere nochmals 0,9 kg Hafer.

Leinöl wurde in der sechswöchigen Versuchsphase in einer Dosis von 320 mg/ kg Körpermasse und Tag der morgentlichen Kraftfuttermenge zugegeben; die Fettzulage wurde langsam über einen Zeitraum von sieben Tagen auf die volle Dosis gesteigert. Die Pferde zeigten alle eine gute Akzeptanz. In dem sechswöchigen Versuchszeitraum erhielten die Pferde außerdem eine Supplementierung von Na-Selenit bzw. Selenhefen in einer Dosierung von 0,5 mg/ kg Futter-TS. In den je vierwöchigen Kontrollphasen vor und nach dem Versuchszeitraum enthielt die Fütterungsration minimalbedarfsdeckende Selenkonzentrationen von 0,15 mg Na-Selenit/ kg Futter-TS.

Tabelle 5 fasst die Gruppeneinteilung der Versuchstiere sowie die Supplementierung mit unterschiedlichen Selenquellen und Leinöl in einer Dosierung von 320 mg/ kg KM zusammen.

Tab.5: Supplementierung von Selen (Na-Selenit/ Selenhefen) und Leinöl (320 mg/ kg KM)

Gruppe	Tier	Körpermasse (kg)	Selenquelle	Ölmenge (ml)
A	2	550 (geschätzt)	Selenhefen	176
A	11	343	Selenhefen	110
A	13	307	Selenhefen	98
A	18	306	Selenhefen	98
A	20	260	Selenhefen	83
B	1	350	Na-Selenit	112
B	3	394	Na-Selenit	126
B	7	360	Na-Selenit	115
B	9	353	Na-Selenit	113
B	14	329	Na-Selenit	105
C	5	348	Selenhefen	-
C	8	377	Selenhefen	-
C	15	320	Selenhefen	-
C	16	327	Selenhefen	-
C	17	314	Selenhefen	-
D	4	327	Na-Selenit	-
D	6	314	Na-Selenit	-
D	10	306	Na-Selenit	-
D	12	305	Na-selenit	-
D	19	260	Na-Selenit	-

3.1.2.1 Untersuchung von Futtermittelproben (Weender Analyse, Spurenelemente)

Die für die Futtermitteluntersuchungen verwendeten Geräte und Chemikalien sind in *Tabelle 8* aufgelistet. Die Analysen der Futtermittelproben wurden im Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin eigenständig durchgeführt.

Analyse des Fettsäuremusters der Futterproben

Zur Bestimmung des Fettsäuremusters wurden 50 mg der homogen gemahlene Futterprobe in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß verbracht und mit 1 ml einer Hexan-Isopropanol (3:2 v:v)-Lösung versetzt. Die Proben wurden für eine Minute im Ultraschallbad inkubiert, für 60 min geschüttelt und anschließend für 12 Stunden bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben erneut für 10 min geschüttelt und für 3 min bei 250 G zentrifugiert. Es wurden 100 µl des Überstandes abgenommen, mit 20 µl eines internen Standards (C13 3 mg/ l) und 50 µl TMSH (Trimethylsulfoniumhydroxid) versetzt. Zur Analyse wurde 1 µl der Probe in den Gaschromatographen (GC Agilent Technologies 6890 N) injiziert. Als interner Standard wurden 0,0002627 µmol/ ml einer Tridecansäure verwendet.

Die Analyse des Fettsäuremusters des im Versuch verwendeten Leinöls erfolgte in Anlehnung an die Methode zur Bestimmung des Fettsäuremusters im Blutplasma von Lepage und Roy (1986) mit einem Probenvolumen von 5 µl.

Rohnährstoffe (Weender Analyse)

Die Analyse der Rohnährstoffe wurde nach den Standardmethoden der Empfehlungen der VDLUFA, Methodenbuch III durchgeführt (Naumann und Bassler, 2004). Die Futtermittelproben wurden zuvor gemahlen auf eine Einheitsgröße von 0,5 mm; die Analysen erfolgten für jeden Parameter separat und jeweils in Doppelbestimmung.

In der *Tabelle 5* sind die Rohnährstoffe der verwendeten Futtermittel aufgeführt.

Trockensubstanz (TS):

Für die Bestimmung der Trockensubstanz wurden 1 g Futter in ein nummeriertes, vorgetrocknetes (1 h bei 120 °C) und tariertes Porzellanwiegegläschen (T 1) eingewogen und für 4 h bei 103 °C mit offenem Deckel getrocknet. Nach Abkühlen der Proben im Exsikkator wurde erneut das Gewicht (T 2) bestimmt und der TS-Gehalt in Prozent der ursprünglichen Substanz (uS) errechnet.

Rohasche (Ra):

In einen konstant geglühten Tiegel (T 1) wurde 1 g der gemahlene Futterprobe eingewogen und über Nacht bei 600 °C in einem Muffelofen verascht. Nach Abkühlen im Exsikkator konnte die Rohasche über die Auswaage wie folgt ermittelt werden:

$$\text{Ra in g/kg} = ((T2 - T1) / \text{Einwaage}) * 1000$$

Rohprotein (Rp):

Die Analyse des Rohproteingehalts erfolgte nach Einwaage von 400 mg der gemahlene Futterproben anhand der Messung des Stickstoffgehaltes (Dumas-Verbrennungsmethode) mithilfe eines Makro-Elementaranalysators.

Rohfett (Rfe):

Zur Bestimmung von Fetten und anderen in Petroleumbenzin löslichen Substanzen wurde 1 g des gemahlene Futters in spezielle Filterbags eingewogen und diese mit einem Schweißgerät fest verschlossen. Die Fettextraktion nach Soxhlet erfolgte mit Petrolether über drei Stunden; im Anschluss wurden die Proben für 30 min bei 103 °C in den Trockenschrank verbracht, um den Petrolether zu verdampfen. Der Rohfettgehalt der Proben wurde nach Rückwiegen der getrockneten und abgekühlten Gläschen rechnerisch ermittelt:

$$\text{Rfe in g/kg} = ((T2 - T1) / \text{Einwaage}) * 1000$$

Rohfaser (Rfa):

Die Rohfaseranalyse zur Bestimmung des organischen Restes erfolgte durch Extraktion mit Schwefelsäure und Natronlauge. Hierfür wurden 0,5 g Probenmaterial in spezielle Filterbags eingewogen und fest verschlossen. Zum Entfetten wurden die Proben 10 min in 350 ml Petrolether extrahiert und anschließend luftgetrocknet. Nach Beendigung der Extraktion mit 1,25 %iger Schwefelsäure und 1,25 %iger Natronlauge im Rohfaseranalysator wurden die Proben für 5 min in Aceton eingeweicht, um das Wasser zu entfernen, und anschließend bei 104 °C im Trockenschrank getrocknet. Nach Abkühlen der Bags im Exsikkator wurden die Proben zurückgewogen und dann über Nacht bei 600 °C im Muffelofen verascht. Der Rohfasergehalt errechnet sich nun durch Subtraktion der Rohasche vom Gewicht des getrockneten Inhaltes der Filterbeutel.

$$\% \text{ Rfa} = (w3 - (w1 * c1)) / w2 * 100$$

W1 = Gewicht des Beutels in g

W2 = Probengewicht in g

W3 = Gewicht der organischen Substanz in g

C1 = Blindwertkorrektur

Tab. 6: Rohnährstoffe der Versuchsfuttermittel

Probe	Trockensubstanz	Rohasche	Rohprotein	Rohfett	Rohfaser
	g/ kg US				
Heu	908	50,4	72,8	15,7	33,4
Hafer	889	22,2	111	43,9	12,6
Pellets Vor- /Nachphase	881	58,7	155	24,0	7,7
Pellets Versuchsphase	881	37,8	152	22,9	7,5
Mineralfutter (Na- Selenit)	943	402	154	38,8	4,9
Mineralfutter (Selenhefe)	940	407	155	40,6	4,8
Aminobreed	940	237	203	83,6	7,0

Mineralstoffe und Spurenelemente

Probenvorbereitung:

Zur Vorbereitung der Aufschlüsse wurde 1 g der gemahlene Futtermittelproben in einem Porzellantiegel eingewogen und über Nacht im Muffelofen verascht. Nach Abkühlen der Proben im Exsikkator wurde der Tiegelinhalt quantitativ mit 6 ml konzentrierter Salzsäure (37 - 38 %) und 20 ml destilliertem Wasser in ein Becherglas überführt. Die Proben wurden anschließend für 50 min in einem Sandbad (210 – 220 °C) inkubiert und der Inhalt nach Abkühlung quantitativ über einen Faltenfilter in einen 50 ml Messkolben überführt und mit destilliertem Wasser bis zur Messmarke aufgefüllt. Die Lagerung bis zur Analyse erfolgte in 50 ml Polyethylen-Flaschen bei Raumtemperatur.

Die Analyse der Mengen- und Spurenelemente der verwendeten Futtermittel wird in **Tabelle 7** zusammengefasst.

Kalzium, Natrium, Magnesium, Kalium, Kupfer, Zink und Eisen:

Die Bestimmung erfolgte aus der Aschelösung mittels Atomabsorptionsspektrometrie (Contra 700, Analytik Jena).

Phosphor:

Für die Bestimmung des Phosphorgehaltes in den Futterproben wurde zunächst eine Nitrovanadatmolybdat-Lösung (Farbreagenz) bestehend aus Salpetersäure und den P-Komplexbildnern Ammoniummolybdat (Lösung A) und Ammoniummetavanadat (Lösung B) nach folgendem Schema hergestellt:

Lösung A:	Ammoniummolybdat	100 g
	Ammoniak (25%ig)	10 ml
	Reinstwasser ad	1000 ml
Lösung B:	Ammoniummetavanadat	2,35 g
	Salpetersäure (65%ig)	7 ml
	Reinstwasser ad	1000 ml

Unter ständigem Rühren wurden 200 ml der Lösung A langsam mit 200 ml der Lösung B versetzt, 134 ml Salpetersäure (65 %ig) hinzugegeben und mit Reinstwasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Für die Phosphoranalytik wurden 100 µl der Probenaschelösung mit 500 µl der Nitrovanadatmolybdat-Lösung versetzt und mit Reinstwasser auf 1,5 ml aufgefüllt. Unter Anwesenheit von Salpetersäure reagierte das Phosphat aus der Futterprobe zu einem gelben Farbkomplex, dessen Extinktion bei einer Wellenlänge von 436 nm photometrisch gemessen wurde.

Die Bestimmung des Phosphorgehaltes erfolgte mithilfe einer Kalibrierkurve anhand einer Verdünnungsreihe von Monokaliumphosphat.

Selen:

Für die Selenbestimmung wurden 400 mg der Futterprobe eingewogen, mit 3 ml HNO₃ und 500 µl HClO₄ versetzt um das vorliegende vierwertige Selen der Futterproben in die sechswertige, weniger flüchtige Form zu überführen und für 30 min in einen Heizblock verbracht (100 °C → 140 °C). Nach Zugabe von 1000 µl H₂SO₄ wurden die Proben erneut über 75 min in einem Heizblock mit stufenweiser Temperatursteigerung (140 °C → 300 °C)

inkubiert. Nach Abkühlung der Quarzgefäße wurden 20 ml 6M HCl hinzugegeben und die Proben erneut in einen Heizblock verbracht (20 °C → 100 °C; 30 min 100 °C), um Selen wieder zurück in die messbare vierwertige Phase zu bringen. Die Proben wurden nach Abkühlung mit Reinstwasser auf 40 ml aufgefüllt und vermischt. Die Messung erfolgte mittels Atomabsorptionsspektrometrie.

Tab.7: Mengen- und Spurenelementgehalte der Versuchsfutter

Mengenelemente	Calcium	Phosphor	Magnesium	Natrium	Kalium
Probe	g/ kg US				
Heu	3,58	1,84	1,23	0,48	12,6
Hafer	0,77	3,22	0,79	0,15	3,56
Pellets Vor- /Nachphase	9,39	4,74	2,59	1,96	7,81
Pellets Versuchsphase	3,87	3,50	1,47	0,92	7,93
Mineralfutter (Na- Selenit)	77,7	36,1	11,2	26,9	9,86
Mineralfutter (Selenhefe)	75,8	34,2	15,3	28,1	4,69
Aminobreed	39,7	10,8	4,19	13,5	9,43
Spurenelemente	Zink	Kupfer	Mangan	Eisen	Selen
Probe	mg/ kg US				
Heu	9,77	2,51	14,7	31,8	
Hafer	13,4	2,92	13,9	150	
Pellets Vor- /Nachphase	111	18,7	50,0	325	0,44
Pellets Versuchsphase	32,0	6,05	22,7	163	0,10
Mineralfutter (Na- Selenit)	5262	1003	1331	5597	25,3
Mineralfutter (Selenhefe)	5413	1004	1354	5566	23,5
Aminobreed	2765	480	559	2217	5,70
			unterhalb der Nachweisgrenze		

3.2 Studiendesign

3.2.1 Versuchsplan

Im Rahmen des Fütterungsversuches wurden die insgesamt 20 Pferde zufällig in vier Gruppen (A, B, C, D) zu je fünf Tieren eingeteilt (*Tabelle 8*). Diese randomisierte Studie gliederte sich in drei Phasen: eine vierwöchige Vorphase ohne Zulage von Öl bei bedarfsgerechter Selen- (0,15 mg/kg TS) und Vitamin E-Versorgung, eine sechswöchige Versuchsphase mit einer diätetischen Zulage von Fettsäuren und Selen unterschiedlicher Quellen (Na-Selenit, Selenhefe) in einer Dosierung von 0,5 mg Selen/ kg TS sowie eine vierwöchige Nachphase ohne Supplementierung von Fettsäuren bei bedarfsgerechter Vitamin E- und Selenversorgung. In Bezug auf die Supplementierung von Selen wird die Vorphase (minimalbedarfsgerechte Selenversorgung) als Kontrollgruppe für die jeweiligen Versuchsgruppen herangezogen. Der Versuch ist genehmigt durch die Regierung von Oberbayern (Geschäftszeichen: 55.2-1-54-2532.3-90-11).

Tab.8: Einteilung der Versuchsgruppen während der 6-wöchigen Versuchsphase

Leinöl	A (Tier-Nr.: 2-11-13-18-20)	B (Tier-Nr.: 1-3-7-9-14)
kein Öl	C (Tier-Nr.: 5-8-15-16-17)	D (Tier-Nr.: 4-6-10-12-19)
	Selen organisch (Selenhefe)	Selen anorganisch (Na-Selenit)

3.2.2 Versuchszeitraum

Der Versuch gliederte sich in eine vierwöchige Vorphase, gefolgt von einer sechswöchigen Versuchsphase und einer vierwöchigen Nachphase. Insgesamt dauerte der Versuch 14 Wochen. Im Anschluss an jede Versuchsphase erfolgte jeweils eine Blutprobenentnahme.

3.3 Blutprobengewinnung und –aufbereitung

Die für die Blutuntersuchungen verwendeten Geräte und Chemikalien sind in *Tabelle 9* zusammengefasst. Die Analysen wurden im Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin eigenständig durchgeführt.

Blutprobenentnahme

In Absprache mit dem betreuenden Gestütstierarzt und unter Berücksichtigung der täglichen Betriebsabläufe erfolgte die Entnahme der Blutproben nach der Morgenfütterung um 9 Uhr. Die Blutproben wurden aus der Vena jugularis externa nach Hautdesinfektion mit Kodan® Tinktur forte (100 mg Lösung enthalten 45,0 g 2-Propanol, 10,0 g 1-Propanol, 0,20 g Biphenyl-2-ol, Wasserstoffperoxidlösung 30 %, gereinigtes Wasser) entnommen. Die Venenpunktion erfolgte nach Stauung mittels Fingerdruck im kranialen Halsdrittel mit einer sterilen Einmal-Injektionskanüle. Die Blutentnahme erfolgte mit Vacutainer-Röhrchen (Sarstedt Monovette®) und Kanülen der Stärke 18G x 1,5'' (Henry Schein Inc., Melville, NY 11747 USA). Zur Gewinnung von Plasma und Erythrozyten wurden je 5 ml Vollblut in ein mit Antikoagulantien (-EDTA/Heparin-) beschichtetes Röhrchen gegeben. Für die Serumproben wurde das Vollblut in Serumröhrchen mit Zentrifugierhilfekügelchen überführt; das zugesetzte Plastikgranulat hat einen mechanischen Einfluss auf die Blutgerinnung und führt somit zu einer schnelleren Bildung des Blutkuchens und zur Serumgewinnung. Sämtliche Proben wurden bis zur Aufbereitung im Kühlschrank bei + 4 °C gelagert. Die Proben wurden direkt nach der Entnahme für 10 min bei 1350 G abzentrifugiert, das Plasma / Serum wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette abgehoben und in Eppendorf Gefäße bei – 80 °C eingefroren. Zur Gewinnung der Erythrozyten wurde das Plasma für 10 min bei 1350 G zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und der Buffy Coat verworfen. Die Proben wurden mit 4 ml 0,9 %-iger physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt, vorsichtig geschwenkt und für weitere 5 min bei 1350 G zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen; dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Die isolierten und gereinigten Erythrozyten wurden bei – 80 °C in Eppendorf Gefäßen eingefroren.

Aufbereitung für die Fettsäurenbestimmung:

Zur Beurteilung des Gesamtfettsäuremusters im Plasma erfolgte die Blutentnahme mit EDTA-Röhrchen (Sarstedt Monovette®); die Proben wurden direkt nach der Entnahme für 10 min bei 1350 G zentrifugiert, das Plasma abpipettiert, zur Stabilisierung mit 100 mmol/ l Butylhydroxytoluol versetzt und bei -80 °C in Eppendorf Gefäße bis zur Analyse eingefroren.

3.4 Untersuchungsmethoden

3.4.1 Zusammensetzung der Fettsäuren im Blutplasma

Nach einer modifizierten Methode von Lepage und Roy (1986) wurden die Fette extrahiert und transmethyliert. Es wurden 200 µl Blutplasma in ein verschließbares Glasröhrchen pipettiert und mit 4 ml Methanol:Toluol (4:1) mit internem Standard (Tridecansäure; C13:0; 0,1 mg/ ml) versetzt. Unter ständigem Mischen wurden unter einem Abzug langsam 200 µl Acetylchlorid hinzugegeben und die Proben anschließend für 2 min in einem Eisbad inkubiert. Es erfolgte eine weitere Zugabe von 200 µl Acetylchlorid. Die Röhrchen wurden fest verschlossen und im Sandbad transmethyliert (1 h, 100 °C). Nach Abkühlen der Röhrchen wurden die Proben mit 10 ml einer 6 %igen K₂CO₃-Lösung (6g K₂CO₃ mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 ml aufgefüllt) versetzt und für 4 min bei 200 G zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und in den Gaschromatographen injiziert. Der Gaschromatograph wurde zur Analyse der Plasmaproben mit einer Agilent 112-8867 HP-88-Säule bestückt.

Abbildung 1 zeigt ein beispielhaftes Chromatogramm zur Bestimmung der Fettsäuren im Blutplasma des Pferdes.

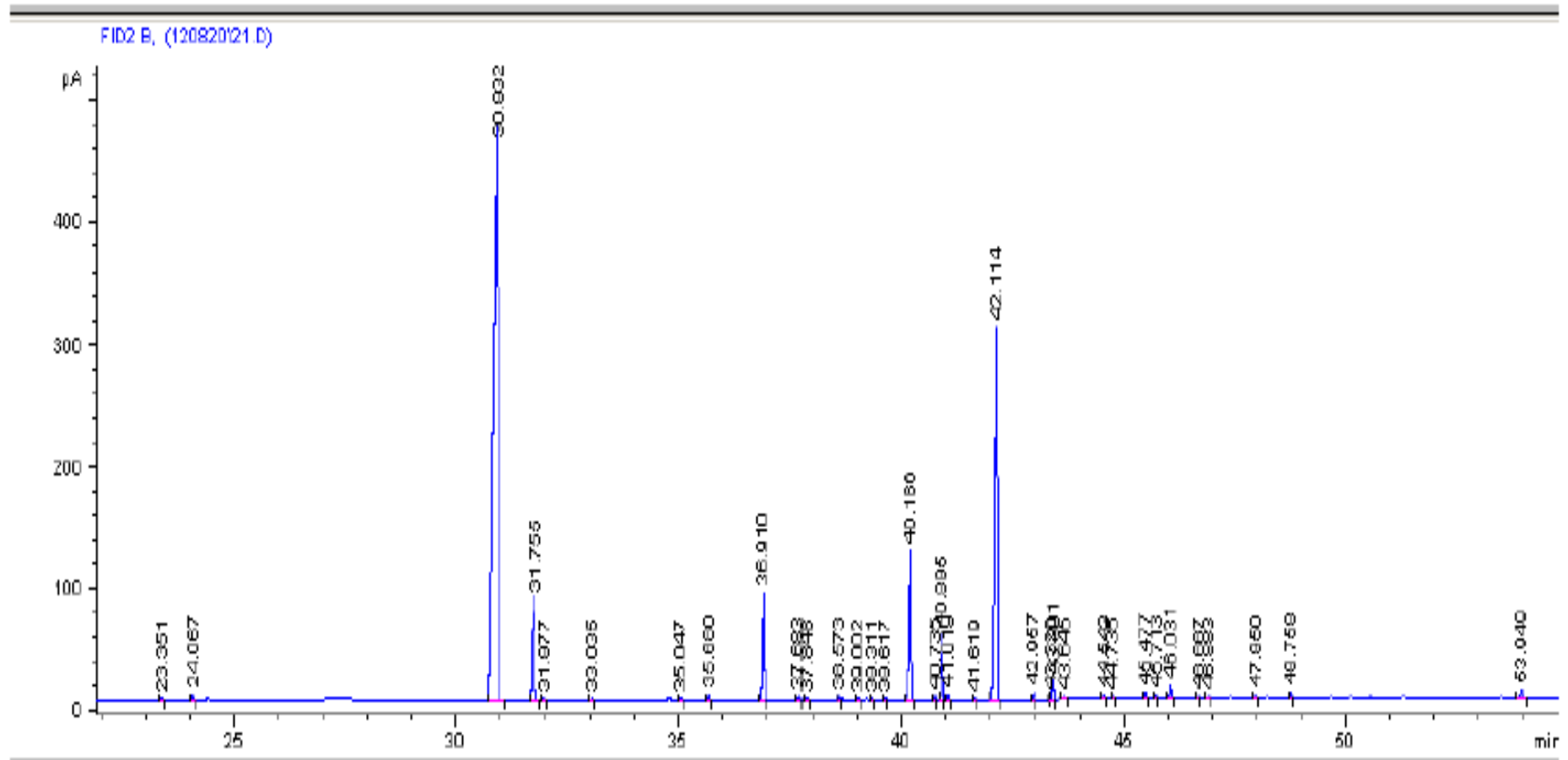


Abb.1: Beispiel eines Chromatogramms zur Bestimmung der Fettsäuren im Blutplasma des Pferdes

3.4.2 Selengehalte im Blutserum

Die Bestimmung des Selengehaltes im Blutserum erfolgte mittels Atomabsorptionsspektrometrie (Kalibrierung: 1,3,5,7 µg/ L). Eine Einwaage von 500 µL Blutserum wurde mit 3 mL HNO₃ und 500 µL HClO₄ versetzt und für 30 min in einen Heizblock verbracht (Heizrampe 100 °C → 140 °C). Nach anschließender Zugabe von 500 µL H₂SO₄ wurde die Temperatur schrittweise über 75 min auf 300 °C gesteigert. Die Quarzgefäße wurden zur Abkühlung dem Heizblock entnommen und die Blutproben mit 20 mL einer 6 molare HCl-Lösung aufgefüllt; es folgte eine weitere Temperaturpassage im Heizblock von 20 °C → 100 °C und eine Inkubation bei 100 °C über 30 min. Nach erneutem Abkühlen wurden die Quarzgefäße mit Reinstwasser auf 40 mL aufgefüllt, mit Parafilm bedeckt und vermischt.

3.4.3 Untersuchungen zur Beurteilung des antioxidativen Status

3.4.3.1 Messung der antioxidativen Kapazität (TEAC)

Die Bestimmung der antioxidativen Kapazität (TEAC) im Blutplasma erfolgte nach der Methode von Miller et al. (1996). Die TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) steht für die antioxidative Kapazität einer zu untersuchenden Probe. Der Test wird mittels Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) kalibriert und das Ergebnis als Trolox äquivalente antioxidative Kapazität ausgedrückt. In dem TEAC-Assay nach Miller et al. (1996) reagieren antioxidative Substanzen im Blutplasma mit ABTS-Kationen (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) und verhindern auf diese Weise die Bildung eines ABTS-Radikals. Die Reaktion wird photometrisch durch Extinktionsabnahme in Abhängigkeit der Konzentration der Antioxidantien bestimmt. Um Reaktionen mit anderen Komponenten als den ABTS-Radikalen zu vermeiden, wurde die Methode nach Re et al. (1999) modifiziert. Zur Herstellung des dunkelgrünen ABTS-Radikals wurde eine wässrige Lösung von 1,75 mM ABTS über Nacht bei Raumtemperatur mit einer 0,61 mM Lösung Kaliumperoxodisulfat inkubiert. Die Lösung sollte maximal sieben Tage nach der Herstellung verwendet werden und muss durch Verdünnung mit PBS täglich neu auf eine Extinktion von 0,70 (± 0,05) bei einer Wellenlänge von 734 nm kalibriert werden.

Die Reaktionsansätze wurden auf Mikrotiterplatten pipettiert und mit einem TECAN Infinite M200 Pro Photometer gemessen.

Der TEAC-Wert ist definiert als die Trolox-Konzentration (mmol/ l), die die äquivalente antioxidative Kapazität besitzt wie 1 mmol/ l der untersuchten Substanz (Miller et al.; 1996). Je größer der TEAC-Wert, desto höher ist die antioxidative Kapazität der Probe einzustufen. Zur Kalibrierung der Reaktion lief bei jeder durchgeführten Messung eine Trolox-Standardreihe (0-600 µmol/ l) mit. Zur Herstellung der Trolox-Standardstammlösung (2,5 mmol/ l) wurden 62,57 mg Trolox in 100 ml Ethanol gelöst; die Trolox-Standardreihe wurde durch Verdünnung der Trolox-Stammlösung mit entsprechenden Anteilen PBS angelegt und bei -20 °C gelagert.

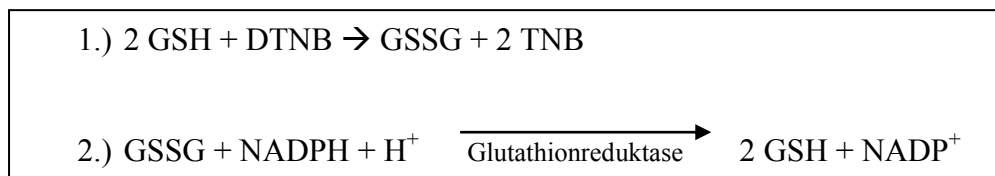
Zur Ermittlung des Nullwertes wurde reiner PBS-Puffer eingesetzt und zur Herstellung der Negativkontrolle wurden 5 µl PBS mit 5 µl Trichloressigsäure und 190 µl ABTS-Lösung vermischt.

Die Plasmaproben wurden mit Trichloressigsäure deproteiniert und abzentrifugiert (14.000, 5 min, 4 °C); 10 µl des Überstandes wurden jeweils in dreifacher Ausführung (Mittelwertbildung) auf einer Mikrotiterplatte vorgelegt; der Reaktionsstart erfolgt durch Zugabe von 190 µl ABTS-Lösung. Für eine vollständige Durchmischung wurden die Mikrotiterplatten 1 min geschüttelt und anschließend für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 734 nm.

3.4.3.2 Bestimmung von GSH und GSSG im Erythrozytenlysat

Die Analyse von Glutathion (GSH) und Glutathiondisulfid (GSSG) erfolgte photometrisch (Wellenlänge 412 nm) nach der Methode von Svardal et al. (1990) mit Hilfe des Glutathione Assay Kit der Firma SIGMA®.

Die Glutathionmessung basierte auf folgender Reaktion:



Ab einem Wert von 2 µM katalysiert GSH die kontinuierliche Reduktion von 5,5'-Dithiobis(2-nitobenoic acid) (DTNB) zu TNB und wird selbst zu GSSG oxidiert. Das oxidierte Glutathion (GSSG) wird durch NADPH und Glutathionreduktase wieder zum Ausgangsprodukt umgewandelt. Die Reaktionsrate ist proportional zu der Höhe der Glutathionwerte in der Probe.

Die photometrische Messung erfolgte über die gelbe 5-thio-2-nitrobenoic acid (TNB) bei einer Wellenlänge von 412 nm. Die Auswertung basierte auf einer GSH- Standardkurve.

3.4.3.3 Glutathionperoxidase

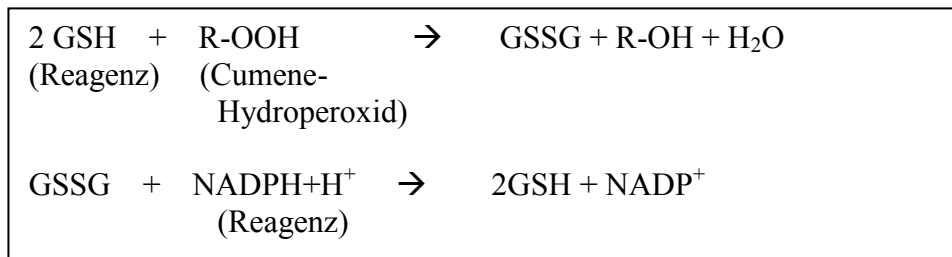
Die GPx-Analytik wurde nach der UV-Methode von Paglia und Valentine (1967) mit Hilfe des Glutathione Peroxidase Assay Kit der Firma Cayman Chemical Company durchgeführt.

Die Bestimmung der GPx-Aktivität im Erythrozytenpellet erfolgte über photometrische Messung der Absorptionsabnahme nach Zugabe von Cumenehydroperoxid an einem TECAN Infinite M200 bei einer Wellenlänge von 340 nm und einer Temperatur von 37 °C.

Durch Zugabe von Cumenehydroperoxid katalysiert GPx die Oxidation von Glutathion (GSH) durch Peroxide; es entsteht oxidiertes Glutathion (GSSG).

Unter Anwesenheit von Glutathionreduktase und Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) wird GSSG sofort wieder zu GSH reduziert und es entsteht NADP⁺.

Die Oxidation von NADPH zu NADP⁺ führt bei einer Wellenlänge von 340 nm zu einer verminderten Extinktion; der Verbrauch von NADPH und somit die Absorptionsabnahme sind direkt proportional zur GPX-Aktivität der Probe.



3.4.3.4 Bestimmung Hb-Gehalt

Zur Bestimmung der Hämoglobinwerte als Bezugsgröße für die Glutathionperoxidase Aktivität im Blut wurde die Alkine Hämatin D-Methode durchgeführt, modifiziert für die Anwendung auf einer Mikrotiterplatte (Lema *et al.*, 1994). Die Analyse erfolgte an Erythrozytenlysaten, die aus 2,7 ml EDTA Vollblut isoliert werden konnten; die Erythrozyten wurden für eine Doppelbestimmung mit HPLC-Wasser in einem Verhältnis von 1:4 und 1:8 vorverdünnt.

Für die AHD-Stammlösung wurden 25,0 g Triton X-100 in einem Liter Natriumhydroxid (0,1 mol/ l) gelöst. Zur Herstellung des AHD-Standards wurden 36 mg Chlorhaemin (M= 651,94) in 10 ml ADH-Stammlösung zugesetzt; die Kalibrierung der Standardreihe erfolgte anhand folgender Verdünnungsstufen: 1:1, 1:2, 1:4, 1:5, 1:8, 1:10, 1:15, 0. In einer Verdünnung von 1:151 zeigt der Kontrollstandard bei einer Wellenlänge von 575 nm eine Absorption von 0,26 welche einer Blutprobe mit einem Hämoglobingehalt von 90 g/ l entspricht.

Nach der Zugabe von 1,5 µl Blut bzw. Kontrollstandard zu 225 µl ADH-Stammlösung (1:151 Verdünnung) wurden die Proben für 1 min bei 900 G auf einem Microplate-Shaker geschüttelt und anschließen für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte mit einem Mikropplatten-Lesegerät (TECAN Infinite® 200 Pro) bei einer Wellenlänge von 575 nm.

3.4.5 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der erzielten Messwerte wurde mit dem Programm WinStat® (R. Fitch Software, Ohio, USA) für Microsoft® Excel (Microsoft®, Redmond, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (MW) mit den dazugehörigen Standardabweichungen (\pm SD) dargestellt; alle ermittelten Daten unterlagen nach Kolmogorov-Smirnov der Normalverteilung.

Für den Vergleich zwischen den Versuchsgruppen (Zwei-Gruppen-Vergleich) auf statistisch signifikante ($p < 0,05$) und hochsignifikante ($p < 0,01$) Unterschiede in Bezug auf die Supplementierung von Selen unterschiedlicher Quellen (Na-Selenit vs. Selenhefen; Dosierung 0,5 mg/kg TS) sowie die Zugabe von Fettsäuren in Form von Leinöl wurde der t-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Es wurde zum einen untersucht, wie sich die chemische Bindungsform des supplementierten Selen auf den Selenstatus im Blut auswirkt und ob die Supplementierung von Selen in einer Dosierung von 0,5 mg/kg TS zu einer Veränderung des antioxidativen Systems (TEAC, GSH, GPx) führt bzw. ob die Selenquelle diesbezüglich einen

Unterschied macht. Darüber hinaus sollte ermittelt werden, wie sich das Fettsäuremuster im Blutplasma des Pferdes durch Zugabe von Leinöl in einer Dosierung von 320 mg/kg KM verändert und ob die Supplementierung von Fettsäuren Parameter des antioxidativen Stoffwechsels beeinflusst sowie mögliche Interaktionen zwischen n-3-FS und Selen.

Mit Hilfe der Varianzanalyse für wiederholte Messungen wurden die jeweiligen Daten innerhalb der Gruppen zu den verschiedenen Messzeitpunkten auf signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) geprüft; die Vorphase ist in diesem Fall als Kontrollgruppe für die jeweilige Versuchsgruppe anzusehen. Es wurde ermittelt wie sich die Dosierung des supplementierten Selens auf die Anreicherung des Spurenelementes im Blut auswirkt sowie die dosisabhängige Beeinflussung des antioxidativen Stoffwechsels herausgestellt.

Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen werden in den Abbildungen mit * markiert, während mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Werte innerhalb einer Versuchsgruppe signifikant verschieden sind.

Tab.8: Geräte und Chemikalien zur Analytik der Futter- und Blutproben

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
ABTS	Sigma	St. Louis, USA
Aceton	Merck	Darmstadt, D
Acetylchlorid	Merck	Darmstadt, D
Ammoniak	Merck	Darmstadt, D
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat \geq 99% p.a.krist.	Carl Roth	Karlsruhe, D
Ammoniummonovanadat zur Analyse	Merck	Darmstadt, D
Analysewaage Typ Genius	Sartorius	Göttingen, D
Atomabsorptionsspektrometer vario 6	Analytik Jena	Jena, D
Bortrifluorid 14% in Methanol	Sigma	St. Louis, USA
Butylhydroxytoluol	Sigma	St. Louis, USA
Chlorhaemin \geq 98%	Sigma	St. Louis, USA
Chloroform/Trichlormethan 100%	Carl Roth	Karlsruhe, D
Contra 700 Atomabsorptionsspektrometer	Analytik Jena	Jena, D
Diethylether	Carl Roth	Karlsruhe, D
Essigsäure 96%	Merck	Darmstadt, D
Ethanol	Carl Roth	Karlsruhe, D
Exsikkator Typ Novus NS24/29	Schott/Duran	Mainz, D
F57 Filter Bags	Ankom Technology	Macedon, USA
H ₂ SO ₄	Merck, KGaA	Darmstadt, D
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco	Paisley, UK
HCl	J.T. Baker	Griesheim, D
HClO ₄	Merck	Darmstadt, D
Heraeus® Trockenschrank T5042	Heraeus electronic	Hanau, D
HNO ₃	Merck	Darmstadt, D
interner Standard (Tridecanoic Acid; C13)	Sigma	St. Louis, USA
I-Propanol	Braun	Rottweil, D
Isolute NH ₂ ® Festphasen Extraktionsröhrchen	Biotage	Schweden
K ₂ CO ₃	Merck	Darmstadt, D
K ₂ O ₈ S ₂	Sigma	St. Louis, USA

KH ₂ PO ₄	Merck	Darmstadt, D
Makro-Elementaranalysator vario max CN	Elementar Analysesystem	Hanau, D
Mathanol 99,9%	Sigma	St. Louis, USA
Mikrotiterplatten	Greiner bio-one	Orlando, USA
Monokaliumphosphat	Merck	Darmstadt, D
Muffelofen Heraeus® Thermicon® P	Thermo Scientific	Karlsruhe, D
NaOH ≥ 99%	Carl Roth	Karlsruhe, D
Natriumborhydroxid	Riedel de Haen	Hannover, D
Natriumhydroxid ≥ 99%	Carl Roth	Karlsruhe, D
Natriumsulfat	Merck	Darmstadt, D
n-Hexan	Carl Roth	Karlsruhe, D
PBS, Phosphate Buffered Saline	Gibco	Paisley, UK
Perchlorsäure (70%)	Carl Roth	Karlsruhe, D
Percoll®	Sigma	St. Louis, USA
Petroleumbenzin, reinst	Merck	Darmstadt, D
Photometer Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech	Freiburg, D
Rohfaser-Analysator Ankom 2000 Fibre Analysator	Ankom Technology	Macedon, USA
Salpetersäure (65%)	Merck	Darmstadt, D
Salzsäure (37%)	J.T. Baker	Griesheim, D
Schwefelsäure (98%)	J.T. Baker	Griesheim, D
Spektrometer		
TECAN Infinite M200 Pro Photometer	TECAN	Männedorf, CH
Tecon 501 Heizblock	Tecon	Oberuzwil, CH
TMSH (Trimethylsulfoniumhydroxid)	Sigma	St. Louis, USA
Toluol	Merck	Darmstadt, D
Tridecanoic Acid (interner Standard; C13)	Sigma	St. Louis, USA
Triton X 100b	Carl Roth	Karlsruhe, D
Trolox	Sigma	St. Louis, USA
Vortex		
XT4 Filter Bags	Ankom Technology	Macedon, USA
Zentrifugalmühle, Zm 100	Retsch GmbH	Haan, D

4 Ergebnisse

4.1 Fettsäuremuster im Blutplasma

Eine Übersicht über das Fettsäuremuster im Blutplasma zu den unterschiedlichen Versuchszeitpunkten fasst *Tab. 9* zusammen.

4.1.1 Gesättigte Fettsäuren des Plasmas

Die relativen Plasmakonzentrationen von C14:0 zeigten keine Veränderungen infolge einer Supplementierung mit Leinöl in einer Dosierung von 320 mg/ kg KM/ Tag; der Anteil an den Gesamtfettsäuren schwankte zwischen 0,41 – 0,51 %

C15:0 erreichte Werte zwischen 0,32 – 0,40 % der Gesamtfettsäuren im Plasma, wobei die Ergänzung mit Öl nicht zu Veränderungen führte.

C16:0 kam zu 13,5 – 14,4 % im Plasma der Pferde vor; die mit Öl substituierte Gruppe hob sich zu keinem Messzeitpunkt von der Kontrollgruppe ab.

Der Anteil der C17:0 an den Gesamtfettsäuren im Plasma betrug zwischen 0,44 – 0,70 %. Somit ergaben die vorliegenden Untersuchungen keinen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Die sechswöchige Supplementierung mit Leinöl führte zu höheren Werten der C18:0 (*Abb.2*) im Plasma der Versuchsgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe; die prozentualen Werte schwankten zwischen 18,3 – 20,4 % ($p=0,03$).

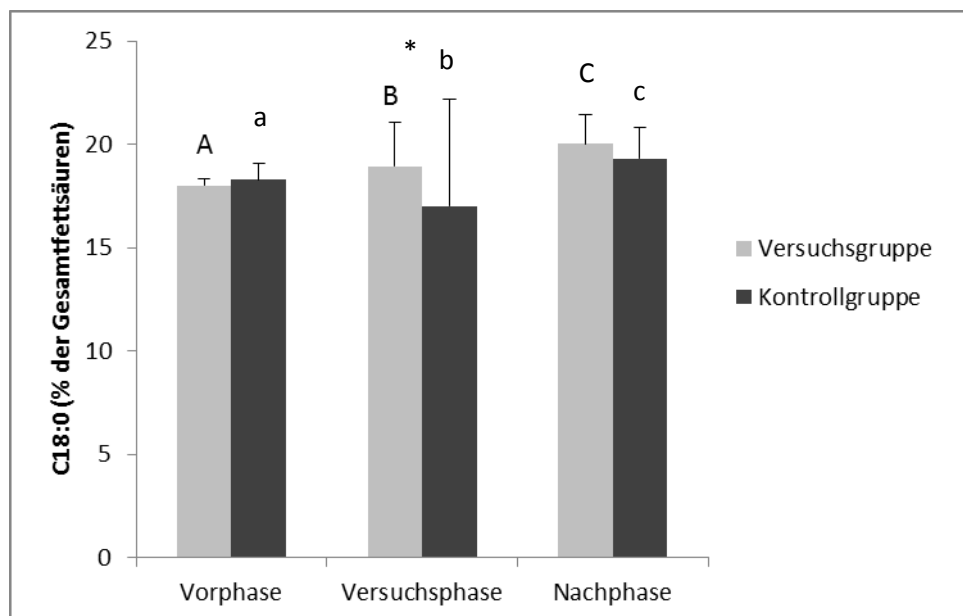


Abb.2: Stearinsäure (C18:0) im Blutplasma (% der Gesamtfettsäuren); Vorphase: vierwöchige Kontrollphase ohne Fettzulage; Versuchsphase: sechswöchige Supplementierung der Versuchsgruppe (Gruppe A und B; 10 Tiere) mit 320 mg Leinöl/ kg KM/ Tag; Nachphase: vierwöchige Kontrollphase ohne Fettzulage; signifikante Unterschiede ($p<0,05$) zwischen den Gruppen sind mit *, innerhalb einer Gruppe mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

C20:0 zeigte keine Veränderungen durch die Fettzulage und nahm Werte zwischen 0,57 % und 0,68 % ein.

Der Anteil der C22:0 an den Gesamtfettsäuren des Plasmas betrug ungefähr ein halbes Prozent; Veränderungen zwischen den Gruppen traten nicht auf.

C24:0 machte ebenfalls etwa ein halbes Prozent anteilig an dem Gesamtfettsäuremuster des Blutplasmas aus und blieb durch die Fütterungsvarianten unbeeinflusst.

4.1.2 Einfach ungesättigte Fettsäuren im Plasma

Der prozentuale Anteil der C16:1 schwankte ohne Veränderungen zwischen den beiden Gruppen um 0,47 – 0,60 %.

C18:1 n9 (**Abb.3**) zeigte infolge der sechswöchigen Supplementierung mit Leinöl im Blutplasma der Versuchsgruppe im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe eine Reduktion von 9,39 % auf 8,45 %. Dagegen blieben die Plasmakonzentrationen der Kontrollgruppe im Verlauf der Studie konstant.

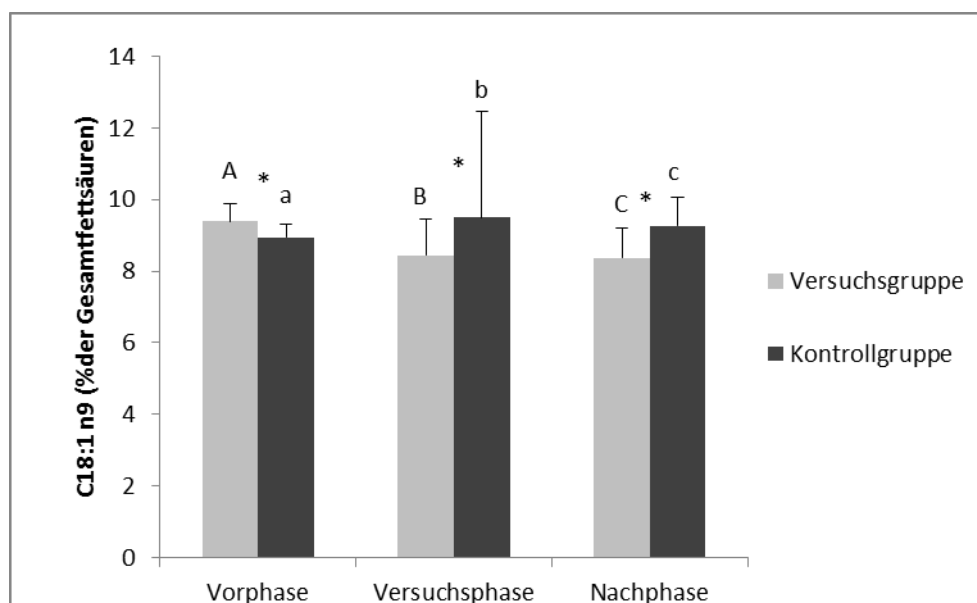


Abb.3: Ölsäure (C18:1n9) im Blutplasma (% der Gesamtfettsäuren); Vorphase: vierwöchige Kontrollphase ohne Fettzulage; Versuchsphase: sechswöchige Supplementierung der Versuchsgruppe (Gruppe A und B; 10 Tiere) mit 320 mg Leinöl/ kg KM/ Tag; Nachphase: vierwöchige Kontrollphase ohne Fettzulage; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen sind mit *, innerhalb einer Gruppe mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

4.1.3 Mehrfach ungesättigte Fettsäuren des Plasmas

4.1.3.1 n-6 Fettsäuren

Der Anteil der C18:2 n6 (**Abb.4**) am Gesamtfettsäuremuster erreichte Werte zwischen 50,4 und 53,0 %; es konnten weder zwischen den Gruppen noch im Verlauf des Versuches Veränderungen durch die Supplementierung mit Leinöl verzeichnet werden.

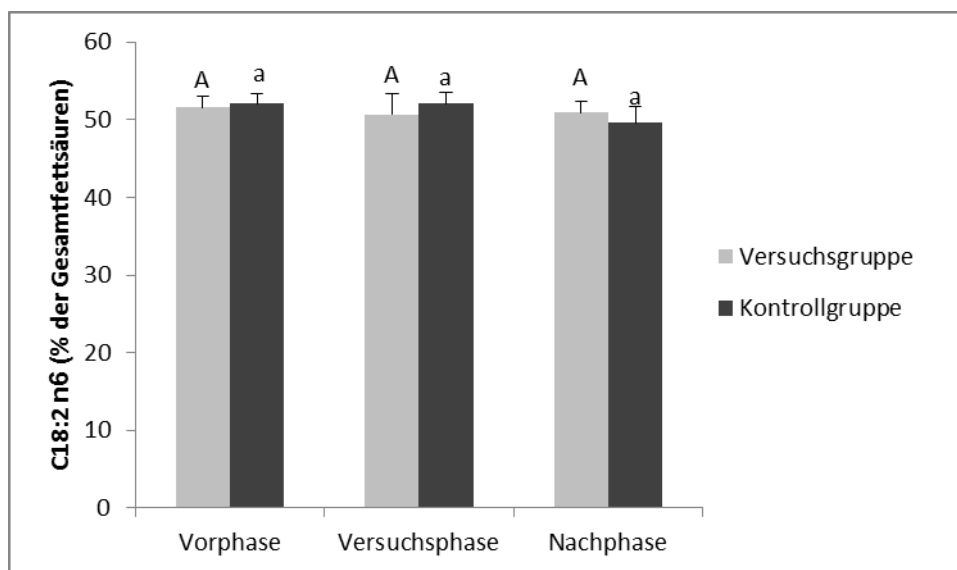


Abb.4: Linolsäure (C18:2n6) im Blutplasma (% der Gesamtfettsäuren)

Vorphase: vierwöchige Kontrollphase ohne Fettzulage; Versuchsphase: sechswöchige Supplementierung der Versuchsgruppe (Gruppe A und B; 10 Tiere) mit 320 mg Leinöl/ kg KM/ Tag; Nachphase: vierwöchige Kontrollphase ohne Fettzulage; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen sind mit *, innerhalb einer Gruppe mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

Die Fettsäuren C18:3 n6 und C20:3 n6 waren in den vorliegenden Untersuchungen zu keinem Zeitpunkt messbar.

Die Gehalte der Fettsäure C20:2 n6 (**Abb.5**) im Blutplasma zeigten durch die Zulage von Leinöl keine Veränderungen; der prozentuale Anteil am Gesamtfettsäuremuster belief sich auf 0,38 – 0,48 %.

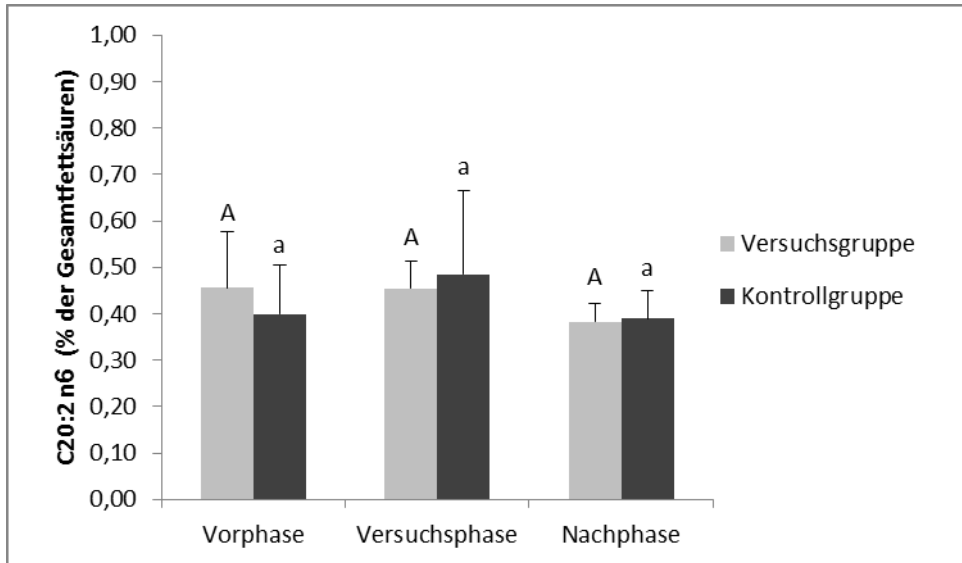


Abb.5: Eicosadiensäure (C20:2n6) im Blutplasma (% der Gesamtfettsäuren)

Vorphase: vierwöchige Kontrollphase ohne Fettzulage; Versuchsphase: sechswöchige Supplementierung der Versuchsgruppe (Gruppe A und B; 10 Tiere) mit 320 mg Leinöl/ kg KM/ Tag; Nachphase: vierwöchige Kontrollphase ohne Fettzulage; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen sind mit *, innerhalb einer Gruppe mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

In Folge der sechswöchigen Supplementierung mit Leinöl sanken die Werte der C20:4 n6 (**Abb.6**) im Blutplasma der Versuchsgruppe (Vorphase: 1,74 %; Versuchsphase: 1,60 %; $p = 0,01$), während die Gehalte der Kontrollgruppe einen leichten Anstieg verzeichneten.

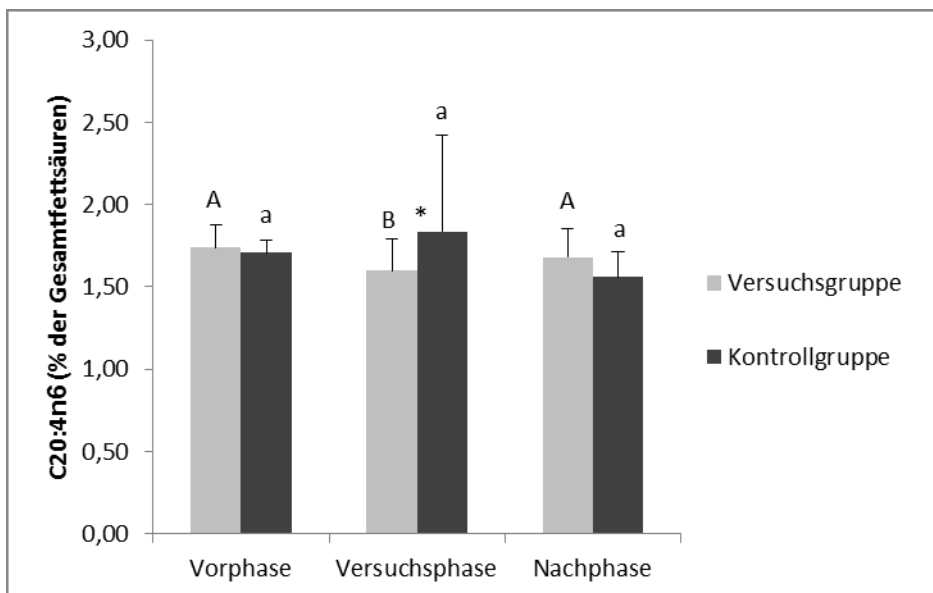


Abb.6: Arachidonsäure (C20:4n6) im Blutplasma (% der Gesamtfettsäuren);

Vorphase: vierwöchige Kontrollphase ohne Fettzulage; Versuchsphase: sechswöchige Supplementierung der Versuchsgruppe (Gruppe A und B; 10 Tiere) mit 320 mg Leinöl/ kg KM/ Tag; Nachphase: vierwöchige Kontrollphase ohne Fettzulage; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen sind mit *, innerhalb einer Gruppe mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

4.1.3.2 n- 3 Fettsäuren

Die n-3-Fettsäuren C20:3 n3, C20:5 n3, C22:5 n3 und C22:6 n3 konnten in den vorliegenden Untersuchungen nur bei wenigen Proben bestimmt werden; somit können keine Veränderungen dieser Fettsäuren bestimmt werden.

Der Anteil von C18:3 n3 (*Abb.7*) am Gesamtfettsäuremuster stieg bei den Tieren der Versuchsgruppe nach sechswöchiger Zulage von Leinöl von 1,64 % auf 2,93 % an und fiel im Verlauf der Nachphase wieder auf 1,46 % ab ($p < 0,01$). Die Plasmawerte der Kontrollgruppe schwankten zwischen 1,70 % und 2,29 %; die Werte zeigten keinen signifikanten Verlauf und wiesen eine hohe Standardabweichung auf.

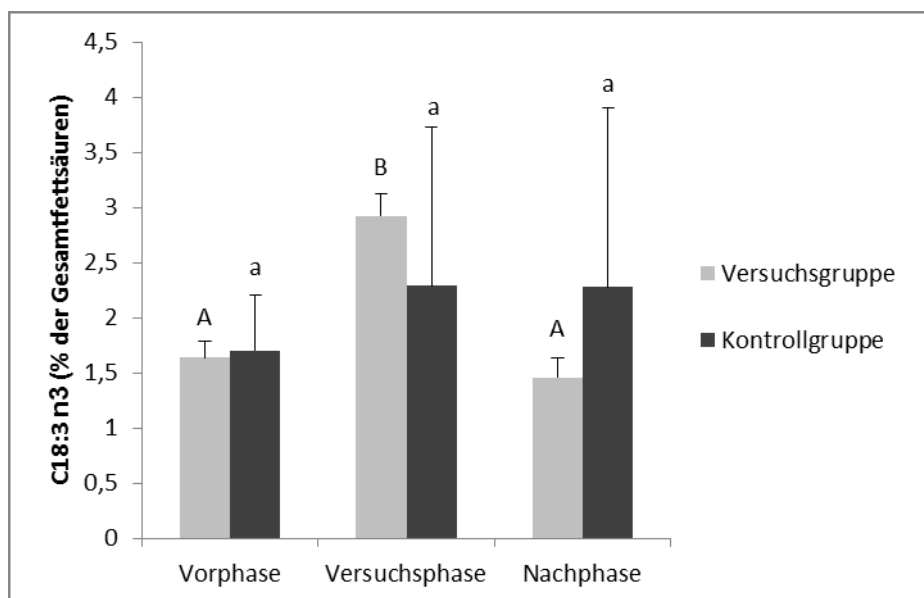


Abb.7: α -Linolensäure (C18:3n3) im Blutplasma der Versuchsgruppe (% der Gesamtfettsäuren);

Vorphase: vierwöchige Kontrollphase ohne Fettzulage, Versuchsphase: sechswöchige Supplementierung der Versuchsgruppe (Gruppe A und B; 10 Tiere) mit 320 mg Leinöl/ kg KM/ Tag; Nachphase: vierwöchige Kontrollphase ohne Fettzulage; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen sind mit *, innerhalb einer Gruppe mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

Tab 9: Fettsäuremuster (% Gesamtfettsäuren) im Blutplasma während der Vor-, Versuchs- und Nachphase

Diät	Vorphase		Versuchsphase				Nachphase					
	Versuchs- gruppe	Kontroll- gruppe	Versuchs- gruppe	Kontroll- gruppe	Versuchs- gruppe	Kontroll- gruppe						
FS	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
C14:0	0,49	0,04	0,50	0,06	0,45	0,26	0,46	0,16	0,41	0,05	0,45	0,08
C15:0	0,34	0,03	0,31	0,11	0,26	0,25	0,19	0,18	0,25	0,15	0,22	0,19
C16:0	13,68	0,74	13,68	0,49	13,49	1,21	13,54	4,15	13,87	0,74	14,39	0,99
C16:1	0,60	0,08	0,58	0,06	0,56	0,06	0,59	0,19	0,47	0,05	0,52	0,09
C17:0	0,48	0,03	0,45	0,04	0,50	0,11	0,70	0,48	0,44	0,05	0,47	0,06
C18:0	18,33	0,30	18,60	0,81	19,24	2,19	17,33	5,27	20,36	1,48	19,61	1,55
C18:1 n9t	0,31	0,13	0,23	0,23	0,12	0,19	0,04	0,11	0,04	0,12	0,00	0,00
C18:1 n9c	9,56	0,50	9,10	0,36	8,58	1,00	9,67	3,03	8,52	0,82	9,42	0,80
C18:2 n6	52,52	1,46	52,97	1,24	51,47	2,77	53,03	1,57	51,76	1,57	50,36	2,20
C18:3 n6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:0	0,66	0,05	0,65	0,14	0,68	0,11	0,56	0,19	0,65	0,09	0,65	0,07
C18:3 n3	1,64	0,49	1,70	0,52	2,93	2,06	2,29	1,55	1,46	0,31	2,28	1,64
C20:1	0,07	0,15	0,00	0,00	0,13	0,20	0,10	0,15	0,15	0,17	0,14	0,18
C20:2	0,21	0,26	0,12	0,20	0,46	0,06	0,49	0,18	0,39	0,04	0,40	0,06
C22:0	0,56	0,06	0,52	0,19	0,55	0,08	0,55	0,18	0,56	0,04	0,52	0,05
C20:4 n6	1,74	0,14	1,71	0,08	1,60	0,19	1,84	0,59	1,68	0,17	1,56	0,15
C24:0	0,49	0,06	0,52	0,05	0,46	0,28	0,40	0,24	0,56	0,08	0,56	0,09

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Vorphase: keine Ölfütterung; Versuchsphase: Supplementierung der Versuchsgruppe mit Leinöl in einer Dosierung von 320 mg/ kg KM/ Tag); Nachphase: keine Ölfütterung

4.3 Selengehalte im Blutserum

In der Studie sollte neben der Untersuchung der Effekte durch die Fettzulage geklärt werden, ob es nach einer oralen Supplementierung von Selen unterschiedlicher Quellen aus Na-Selenit bzw. über Selenhefe in einer vergleichbaren Dosis von 3 mg Selen/ Tag zu einer Veränderung der Selenkonzentration im Blutserum kommt (**Abb.9**). Die mittlere Selenkonzentration nach vierwöchiger Fütterung beider Gruppen mit bedarfsdeckenden Selengehalten in der Ration (0,15 mg/ kg TS) lag bei $0,14 \pm 0,04$ ppm (Vorphase), Unterschiede zwischen den Gruppen traten nicht auf. Infolge der sechswöchigen Ergänzung von Selen unterschiedlicher Quellen stiegen die Selenkonzentrationen in der mit Selenhefe supplementierten Versuchsgruppe hochsignifikant um 75 % von 0,14 ppm auf $0,25 \pm 0,04$ ppm ($p < 0,01$), in der mit Na-Selenit substituierten Gruppe um 44,5 % von 0,14 ppm auf $0,20 \pm 0,04$ ppm ($p < 0,01$) an; die Supplementierung mit Selenhefe führte zu signifikant höheren Selenkonzentrationen im Blut im Vergleich zu der mit der anorganischen Selenquelle versorgten Versuchsgruppe ($p < 0,05$). Nach weiteren vier Wochen ohne zusätzliche Selenquelle (Nachphase) in der Ration (0,15 mg Selen/ kg TS) sanken in der Versuchsgruppe, die mit Selenhefen supplementiert wurde, die Selenkonzentrationen im Serum hochsignifikant um 22,7 % ($0,19 \pm 0,06$ ppm; $p < 0,01$), in der mit Na-Selenit ergänzten Gruppe blieben die Werte konstant. Es zeigte sich zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied zwischen den Gruppen.

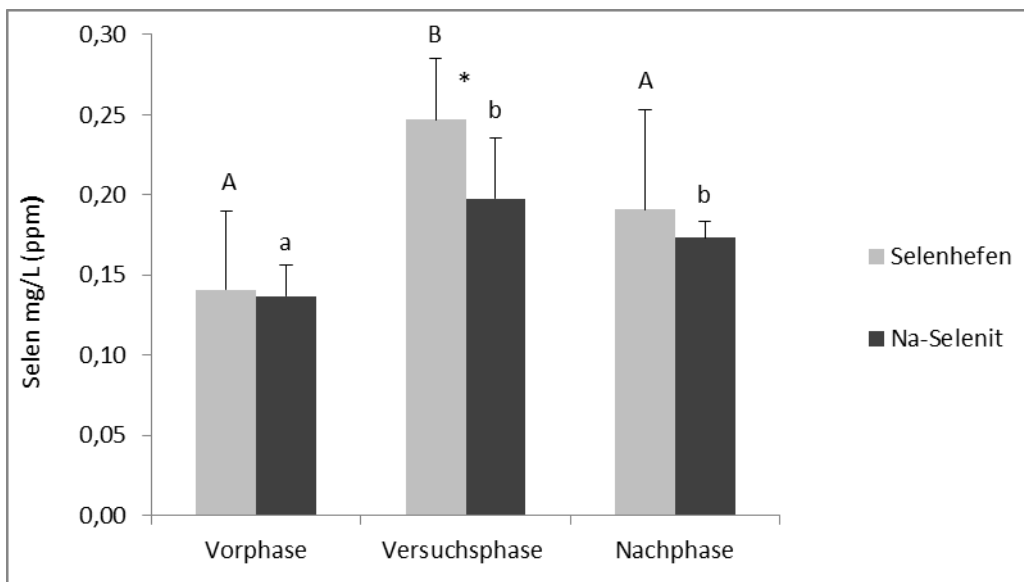


Abb.9: Selengehalte im Blutserum in Abhängigkeit von der gefütterten Selendosis und -quelle
 Vorphase: Kontrollwerte nach 4-wöchiger Fütterung minimalbedarfsdeckender Selendosen (0,15 mg Na-Selenit/ kg TS); Versuchsphase: 6-wöchige Selensupplementierung mit Selenhefen oder Na-Selenit (0,5 mg/ kg TS); Nachphase: Kontrollwerte nach 4 Wochen Fütterung mit Selengehalt 0,15 mg/ kg TS; Gruppen à 10 Tieren; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen sind mit *, innerhalb einer Gruppe mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

4.4 Antioxidativer Status

4.4.1 Totale antioxidative Kapazität (TEAC)

Infolge der sechswöchigen Zufütterung von Selen unterschiedlicher Quellen waren im Plasma beider Gruppen höhere Werte der gesamten antioxidativen Kapazität (TEAC) zu messen (**Abb.10**); die mittlere TEAC in der mit Selenhefe supplementierten Versuchsgruppe stieg signifikant um 12,4 % von $336 \pm 31,2 \mu\text{mol/l}$ auf $378 \pm 25,65 \mu\text{mol/l}$ ($p < 0,05$), die der mit der anorganischen Selenverbindung ergänzten Gruppe um 10,6 % von $327 \pm 28,1 \mu\text{mol/l}$ auf $362 \pm 45,6 \mu\text{mol/l}$ ($p < 0,05$). Resultierend aus den vorliegenden Untersuchungen ergab sich kein Unterschied zwischen beiden Fütterungsvarianten. Nach weiteren vier Wochen ohne zusätzlicher Selengabe fiel die mittlere TEAC der zuvor mit Selenhefe substituierten Versuchsgruppe auf $352 \pm 44,1 \mu\text{mol/l}$ ab, während die der zuvor mit Na-Selenit versorgten Gruppe auf $367,2 \pm 32 \mu\text{mol/l}$ anstieg ($p < 0,05$).

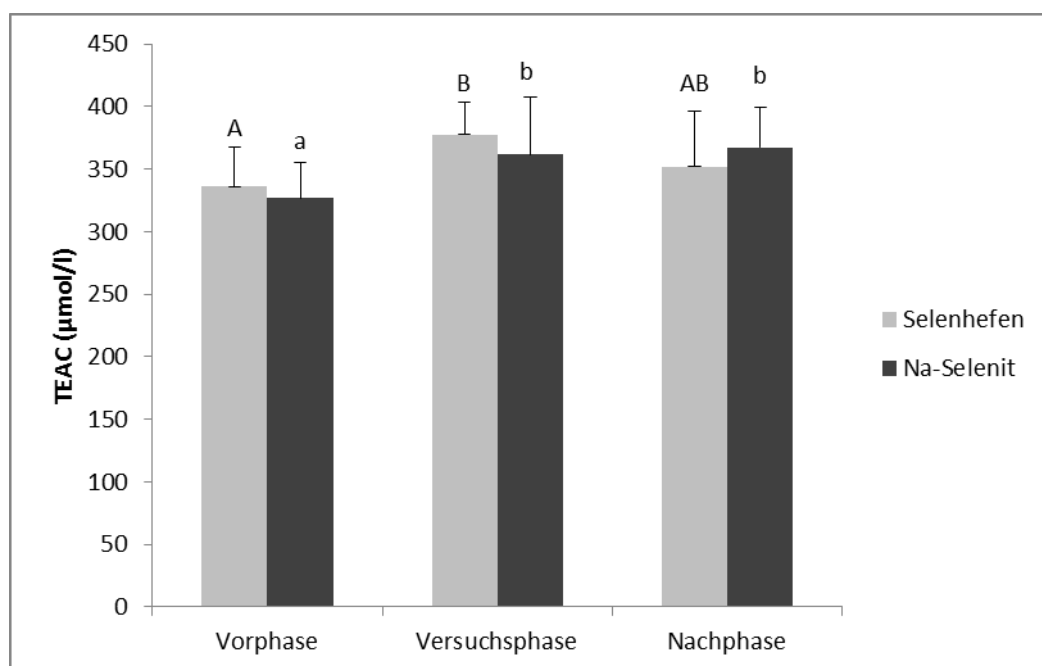


Abb.10: Mittlere TEAC Werte (\pm SD) im Blutplasma ($\mu\text{mol/l}$) in Abhängigkeit der supplementierten Selenmenge und -quelle

Vorphase: Kontrollwerte nach 4-wöchiger Fütterung minimalbedarfsdeckender Selendosen ($0,15 \text{ mg Na-Selenit/kg TS}$); Versuchsphase: 6-wöchige Supplementierung mit Selenhefen oder Na-Selenit ($0,5 \text{ mg/kg TS}$); Nachphase: Kontrollwerte nach 4-wöchiger Fütterung minimalbedarfsdeckender Selendosen ($0,15 \text{ mg Na-Selenit/kg TS}$); Gruppen à 10 Tieren; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen sind mit *, innerhalb einer Gruppe mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

Nach sechswöchiger Zulage von Leinöl stieg die mittlere TEAC der Versuchsgruppe um 14,1% von $324,9 \pm 17,8 \mu\text{mol/l}$ auf $370,7 \pm 37,7 \mu\text{mol/l}$ ($p < 0,05$) an (**Abb.11**). Auch die TEAC in der Kontrollgruppe verzeichnete einen Anstieg um 9,16% von $336,9 \pm 36,6 \mu\text{mol/l}$ auf $367,7 \pm 39,1 \mu\text{mol/l}$ ($p < 0,05$). Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen traten zu keinem Messzeitpunkt auf. Die anschließende vierwöchige Fütterung ohne Ölzulage führte nicht zu statistisch relevanten Veränderungen. Die TEAC der Versuchsgruppe fiel auf $358 \pm 48,7 \mu\text{mol/l}$ ab, die der Kontrollgruppe auf $362 \pm 27,6 \mu\text{mol/l}$.

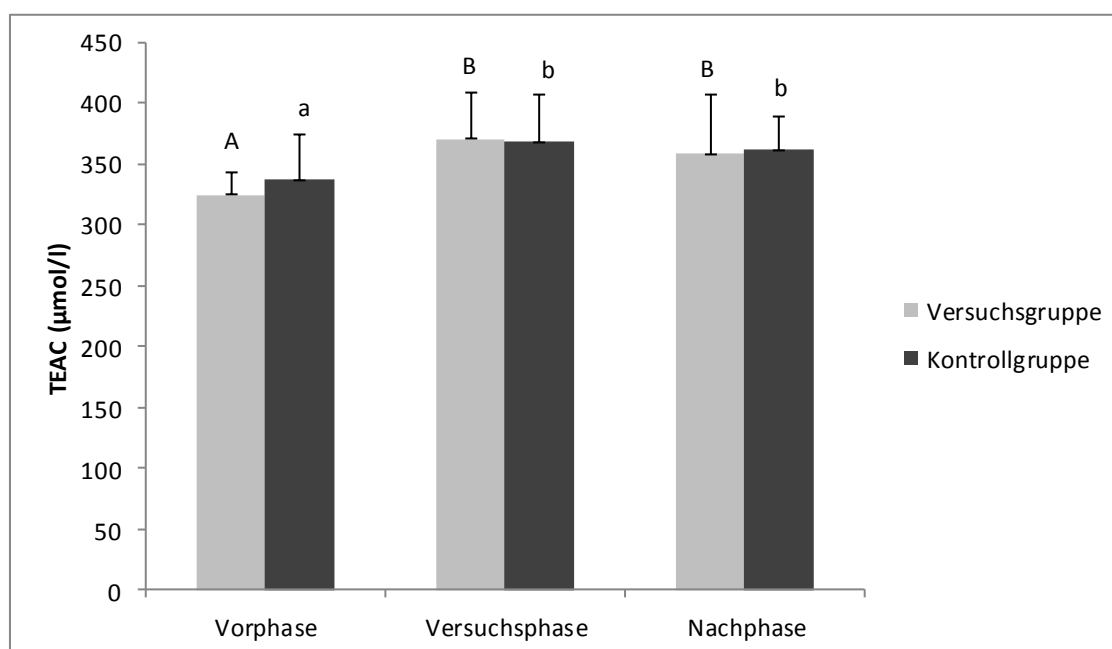


Abb.11: Mittlere TEAC-Werte (\pm SD) im Blutplasma ($\mu\text{mol/l}$) in Abhängigkeit einer zusätzlichen Supplementierung mit Leinöl

Vorphase: Ration ohne Fettzulage; Versuchsphase: Supplementierung der Versuchsgruppe (Gruppe A und B; 10 Tiere) mit Leinöl in einer Dosierung von 320 mg/ kg KM/ Tag; Nachphase: Ration ohne Fettzulage; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen sind mit *, innerhalb einer Gruppe mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

Aus den vorliegenden Daten lässt sich somit schlussfolgern, dass sich weder die Form der Selenquelle (Na-Selenit, Selenhefen) noch die zusätzliche Gabe von Fettsäuren auf die TEAC-Werte im Blutplasma auswirkt. Lediglich die Selensupplementierung in einer Dosierung von 3 mg/ Tag führte zu nachweislichen Veränderungen der gesamten antioxidativen Kapazität ($p < 0,01$). Nach vierwöchiger Fütterung einer Ration mit Selengehalten von 0,15 mg/ kg Futter-TS in der Ration war eine mittlere TEAC von $331 \pm 29,1 \mu\text{mol/l}$ messbar. Infolge der sechswöchigen Supplementierung von 3 mg Selen pro Tag stiegen die Werte um 11,45 % an auf $369 \pm 37,4 \mu\text{mol/l}$ an. Nach weiteren vier Wochen

minimalbedarfsdeckender Selengehalte in der Ration (0,15 mg/ kg Futter-TS) fiel die TEAC um 2,5% auf $360 \pm 37,9 \mu\text{mol/ l}$ ab.

4.4.2 Glutathion (GSH) im Erythrozytenlysat

Die mittleren GSH-Konzentrationen im Erythrozytenlysat lagen bei $1253 \mu\text{mol/ l}$. Weder die Selenquelle (Na-Selenit / Selenhefen) noch die Zulage von Leinöl führten zu Unterschieden (*Abb.12*).

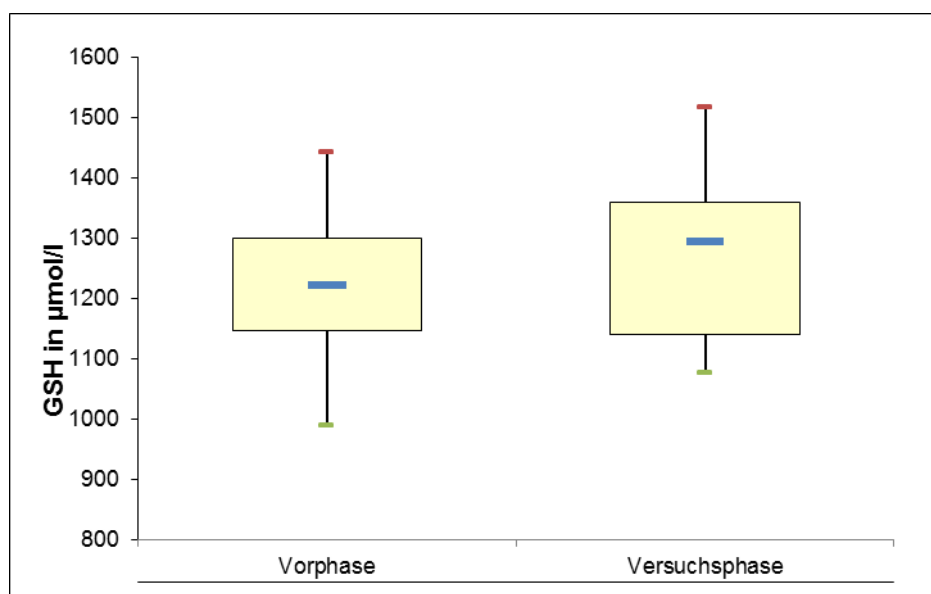


Abb.12: Mittlere Glutathionkonzentration (GSH) im Erythrozytenlysat ($\mu\text{mol/ l}$) vor und nach einer Supplementierung mit Selen und Leinöl; Median, Min, Max, 1. Und 3. Quartil
 Vorphase: minimalbedarfsdeckende Selenkonzentrationen in der Tagesration (0,15 mg Na-Selenit/ kg Futter-TS), keine Fettzulage; Versuchsphase: Supplementierung von Selen (3 mg/ Tag; Na-Selenit oder Selenhefen) und Supplementierung der Versuchsgruppe mit Leinöl in einer Dosierung von 320 mg/ kg KM/ Tag

Nach sechswöchiger Supplementierung mit Selenhefen waren die Glutathion-Werte im Erythrozytenlysat verglichen mit den Kontrollwerte höher (Vorphase: $1178 \pm 103 \mu\text{mol/ l}$; Versuchsphase: $1302 \pm 90,3 \mu\text{mol/ l}$; $p < 0,05$) (*Abb.13*); in der anorganisch ergänzten Gruppe fielen die Werte unwesentlich (Vorphase: $1283 \pm 172 \mu\text{mol/ l}$; Versuchsphase: $1252 \pm 177 \mu\text{mol/ l}$; $p > 0,05$).

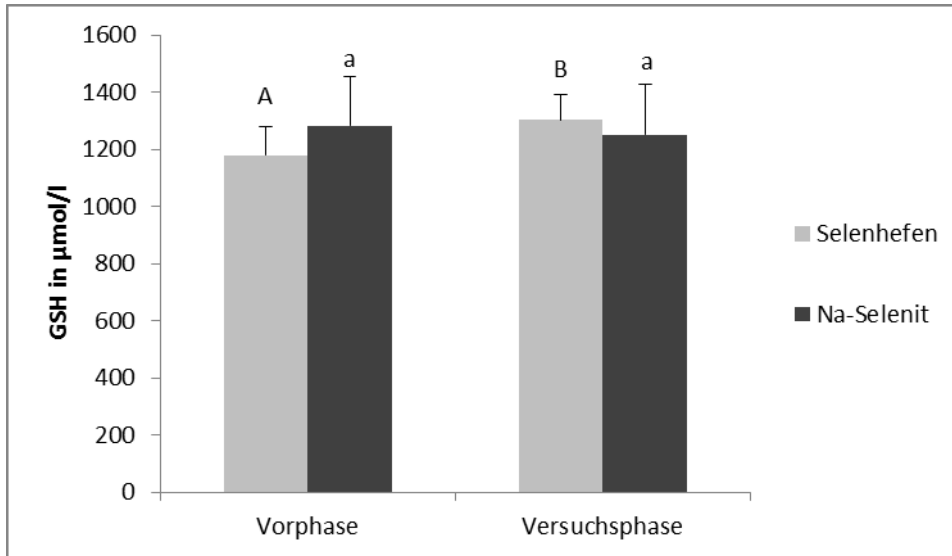


Abb.13: Mittlere Glutathionkonzentration (GSH) im Erythrozytenlysat ($\mu\text{mol/l}$) vor und nach einer Supplementierung mit Selen unterschiedlicher Quellen (Selenhefen, Na-Selenit)
 Vorphase: Kontrollwerte nach vierwöchiger minimalbedarfsdeckender Selengehalte in der Ration (0,15 mg Na-Selenit/ kg Futter-TS); Versuchsphase: sechswöchige Supplementierung von 3 mg Selen/ Tag; Gruppen à 10 Tieren; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen sind mit *, innerhalb einer Gruppe mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

Die zusätzliche Verabreichung von Fettsäuren führte nicht zu relevanten Veränderungen der Glutathion-Konzentration im Erythrozytenlysat (Vorphase: $1298 \pm 113 \mu\text{mol/l}$; Versuchsphase: $1283 \pm 161 \mu\text{mol/l}$; $p > 0,05$), während die Werte der Kontrollgruppe anstiegen (Vorphase: $1112 \pm 112 \mu\text{mol/l}$; Versuchsphase: $1246 \pm 124 \mu\text{mol/l}$; $p < 0,05$) (**Abb.14**).

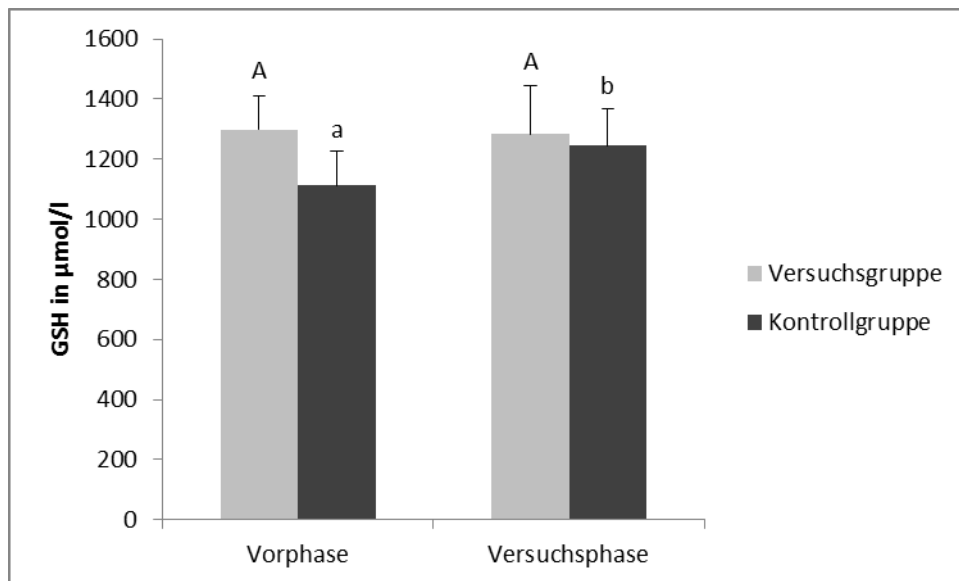


Abb.14: Mittlere Glutathion-Konzentration (GSH) im Erythrozytenlysat ($\mu\text{mol/l}$) vor und nach Supplementierung der Versuchsgruppe (Gruppe A und B; 10 Tiere) mit Leinöl in einer Dosierung von 320 mg/ kg KM/ Tag; Vorphase: Kontrollwerte nach vierwöchiger Fütterung ohne Fettzulage; Versuchsphase: sechswöchige Supplementierung der Versuchsgruppe mit Leinöl in einer Dosierung von 320 mg/ kg KM/ Tag; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen sind mit *, innerhalb einer Gruppe mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

4.4.3 Glutathionperoxidase

Infolge der sechswöchigen Supplementierung mit Selen unterschiedlicher Quellen (3 mg/ Tag) stieg die Glutathionperoxidase-Aktivität im Erythrozytenlysat beider Versuchsgruppen an (**Abb.15**). In der Gruppe, die Selenhefen erhielt, stiegen die GPx-Werte unmittelbar nach Selenzulage (Versuchsphase) um 10,0 % an und nach weiterer vierwöchiger Fütterung minimalbedarfsdeckender Selengehalte in der Ration (Nachphase) um erneute 17,83 % (Vorphase: $193 \pm 39,1$ U/ g Hb; Versuchsphase: $212 \pm 37,1$ U/ g Hb; Nachphase: $250 \pm 55,8$ U/ g Hb) an. Der Gesamtanstieg von 27,83% im Verlauf des Versuches wies statistische Signifikanz auf. Die Gruppe, die mit Na-Selenit zugefüttert wurde, verzeichnete unmittelbar nach Selenzulage (Versuchsphase) einen Anstieg der GPx um 9,35 % und nach weiteren vier Wochen minimalbedarfsdeckender Selengehalte in der Ration (Nachphase) um weitere 18,0 % (Vorphase: $192 \pm 25,6$ U/ g Hb; Versuchsphase: $210 \pm 33,4$ U/ g Hb; Nachphase: 247 U/ g Hb).

Die Art der Selensupplementierung (Selenhefen vs. Na-Selenit) führte nicht zu unterschiedlichen Zunahmen der GPx-Aktivitäten im Erythrozytenlysat.

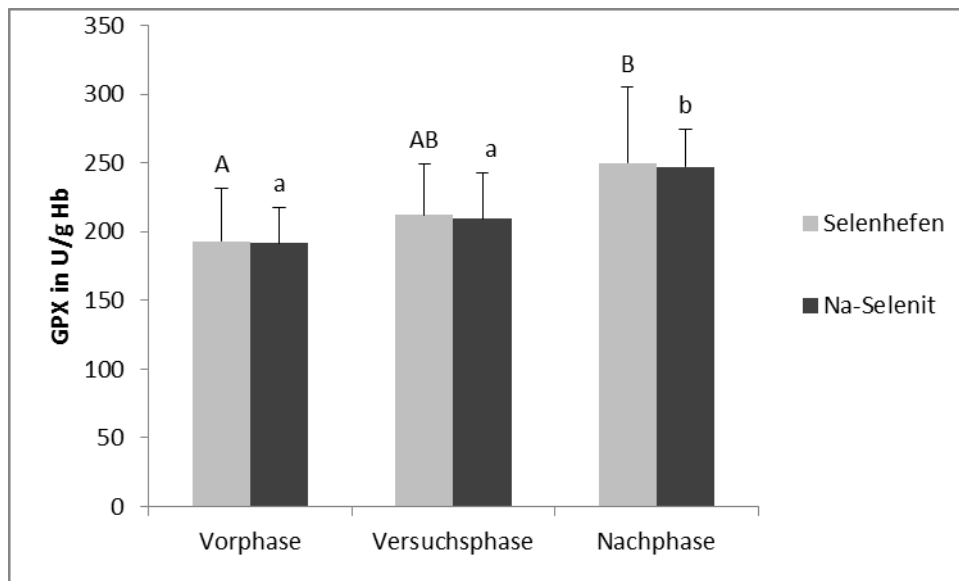


Abb.15: Mittlere Glutathionperoxidase-Aktivität im Erythrozytenlysat (U/ g Hb) in Abhängigkeit von der Selendosis und -quelle (Selenhefen vs. Na-Selenit)
 Vorphase: Selengehalt in der Ration 0,15 mg Na-Selenit/ kg Futter-TS; Versuchsphase: Supplementierung mit 3 mg Selen/ Tag; Nachphase: Selengehalt in der Ration 0,15 mg Na-Selenit/ kg Futter-TS; Gruppen à 10 Tieren; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen sind mit *, innerhalb einer Gruppe mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

Unmittelbar nach der sechswöchigen Zulage von Leinöl in einer Dosierung von 320 mg/ kg KM/ Tag stieg die GPx-Aktivität in der Versuchsgruppe hochsignifikant um 7,40 %, die Messung nach weiteren vier Wochen ohne Fettzulage (Nachphase) ergab nochmals einen Anstieg der Werte um 20,30 % (Vorphase: $192 \pm 23,9$ U/ g Hb; Versuchsphase: $206 \pm 31,8$ U/ g Hb; Nachphase: $247 \pm 32,4$ U/ g Hb; $p < 0,01$) (**Abb.16**). Die Kontrollgruppe ohne Fettzulage zeigte einen ähnlichen Verlauf; die GPx-Aktivität stieg zunächst um 11,71 % und bei der letzten Messung um weitere 15,89 % an (Vorphase: $193 \pm 38,8$ U/ g Hb; Versuchsphase: $216 \pm 37,3$ U/ g Hb; Nachphase: $250 \pm 50,6$ U/ g Hb; $p < 0,01$).

Es konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen ermittelt werden.

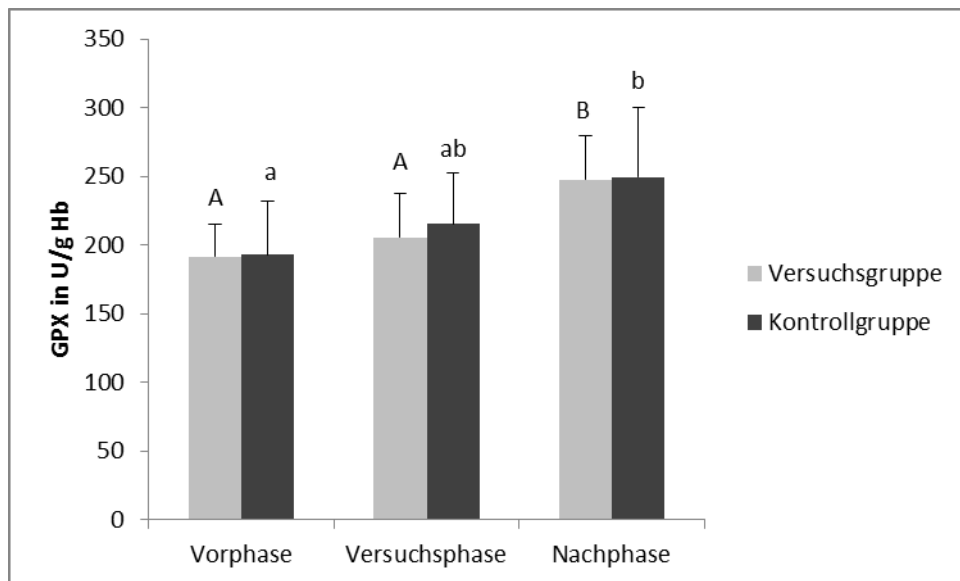


Abb.16: Mittlere Glutathionperoxidase-Aktivitäten im Erythrozytenlysat vor und nach Supplementierung der Versuchsgruppe (Gruppe A und B; 10 Tiere) mit Leinöl in einer Dosierung von 320 mg/ kg KM/ Tag

Vorphase: Kontrollphase ohne Fettzulage; Versuchsphase: sechswöchige Supplementierung der Versuchsgruppe mit Leinöl (320 mg/kg KM/ Tag); Nachphase: Kontrollphase ohne Fettzulage; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen sind mit *, innerhalb einer Gruppe mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass weder die Art der Selenquelle (Na-Selenit/ Selenhefen) noch die Zulage von Fettsäuren in Form von Leinöl Auswirkungen auf die Glutathionperoxidase-Aktivität im Erythrozytenlysat hatten.

Die Supplementierung von 3 mg Selen/ Tag – unabhängig der Selenquelle - über sechs Wochen führte unmittelbar im Anschluss an die Versuchsphase zu einem Anstieg der GPx-Aktivität um 9,67 %. Die Messungen nach der Kontrollphase (Nachphase) ergaben eine weitere Steigerung der Werte um 19,9 % (Vorphase: $192 \pm 31,8$ U/ g Hb; Versuchsphase: $211 \pm 34,2$ U/ g Hb; Nachphase: $249 \pm 41,8$ U/ g Hb; $p < 0,001$).

Insgesamt führte die Supplementierung von Selen in einer Dosierung von 3 mg/ Tag zu einer höheren Glutathionperoxidase-Aktivität im Erythrozytenlysat der Versuchspferde (**Abb.17**).

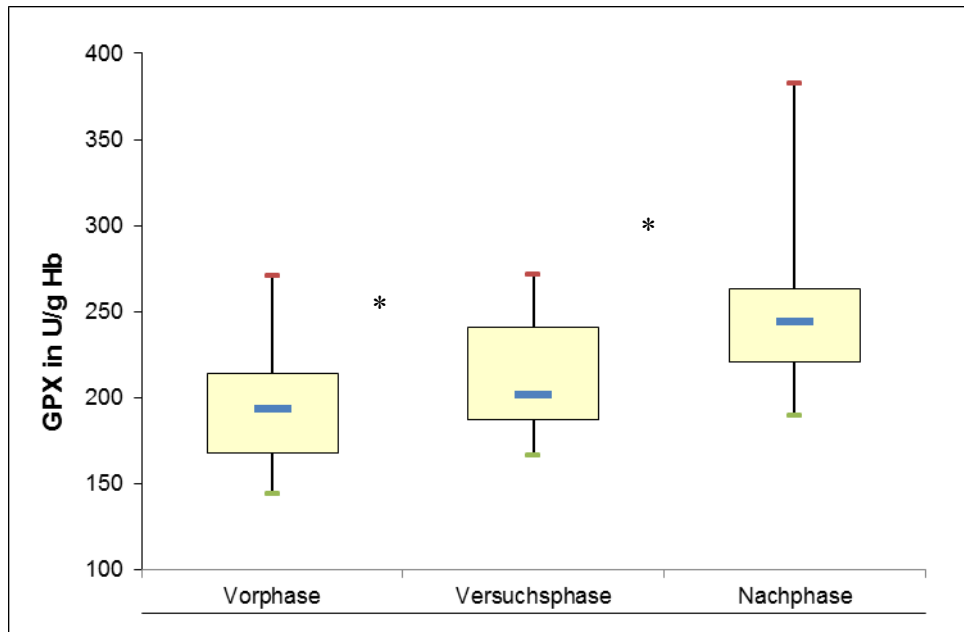


Abb.17: Gutathionperoxidase-Aktivität (Median, Min, Max, 1. Und 3. Quartil) im Erythrozytenlysat (U/ g Hb) in Abhängigkeit der supplementierten Selenmenge
Vorphase: Selengehalt 0,15 mg/ kg Futter-TS; Versuchsphase: Supplementierung von 3 mg Selen / Tag (Selenhefen / Na-Selenit); Nachphase: Selengehalt 0,15 mg/ kg Futter-TS; Gruppe à 20 Tiere; signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) zwischen den einzelnen Versuchsphasen sind mit * gekennzeichnet.

5 Diskussion

5.1 Kritik der verwendeten Methoden

5.1.1 Versuchstiere – Haltung – Fütterung

Die Zahl der zur Verfügung stehenden Tiere war limitiert, was unter dem Aspekt der statistischen Auswertbarkeit der Versuchsergebnisse sowie der individuellen Variabilität und der daraus resultierenden eingeschränkten Standardisierbarkeit kritisch zu bewerten ist. Da die Haltung von Pferden mit einem sehr großen räumlichen, personellen sowie finanziellen Aufwand verbunden ist, sind Studien mit ähnlichen Probandenzahlen im internationalen Vergleich durchaus üblich.

Bei den Versuchstieren handelte es sich ausschließlich um junge Vollblutpferde im Alter von einem Jahr, die im Privatbesitz eines Gestütes standen. Die Haltungs- und Fütterungsbedingungen ließen sich somit gut standardisieren.

Das Versuchsfutter wurde von allen Tieren gut aufgenommen, es traten keine Akzeptanzprobleme auf.

5.1.2 Studiendesign

Die Einteilung der Probanden zur Bestimmung der Interaktionen einer Supplementierung von Fettsäuren und Selen unterschiedlicher Quellen in vier Versuchsgruppen von maximal fünf Pferden beeinflusste die statistische Auswertbarkeit der Daten möglicherweise nachteilig.

Während der vierwöchigen Vor- und Nachphase der Studie wurde keine Differenzierung der gefütterten Selenquelle (Selenhefen vs. Na-Selenit) durchgeführt. Alle Tiere erhielten anorganisch gebundenes Selen (Na-Selenit) in einer bedarfsgerechten Dosierung von 0,15 mg/kg TS; lediglich in der sechswöchigen Versuchsphase wurden je zwei Gruppen mit Selenhefen und die anderen mit Na-Selenit in einer Dosierung von 0,5 mg/kg TS supplementiert.

Diverse Studien zeigten, dass Leinöl in der gewählten Dosierung nicht besonders gut geeignet war, um mehrfach ungesättigte Fettsäuren im Plasma und den Membran-Phospholipiden in Leukozyten anzureichern (Hansen *et al.*, 2002; Hess *et al.*, 2012). Die Verwendung von marinen Ölen würde vermutlich zu repräsentativeren Ergebnissen führen; aufgrund beim Pferd häufig auftretender Akzeptanzprobleme bei der Zulage von Tierfetten und des unverhältnismäßigen Kostenaufwandes wurde allerdings davon abgesehen.

Die Versuchsdauer ist sowohl für die Aufnahme und Anreicherung von Selen als auch für die Fettsäureanreicherung im Organismus des Pferdes als ausreichend anzusehen.

5.1.2 Probenentnahme, -analysen, Auswertung der Daten

Die Zeitpunkte und auch die Art und Anzahl der Blutprobenentnahmen schienen zweckmäßig zu sein.

Die Blutprobenentnahme erfolgte immer morgens zur gleichen Uhrzeit unmittelbar nach der Futteraufnahme. Orme et al. (1994) stellte eine erhöhte Konzentration freier Plasmafettsäuren in den frühen Morgenstunden fest und nur minimale Schwankungen im übrigen Tagesverlauf; postprandial konnte in dieser Untersuchung kein Fettsäurepeak dargestellt werden. Dagegen konnten Piccione et al. (2009) an Springpferden ein circadianes Muster der freien Fettsäuren im Plasma nachweisen mit einem Anstieg der Konzentrationen im Tagesverlauf, beeinflusst durch Springtraining sowie durch postprandiale Metabolismen. Es schien folglich sinnvoll zu sein, die Blutprobenentnahme immer zur gleichen Tageszeit durchzuführen, um möglichst vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme aufbereitet, gekühlt und anschließend bei -80° eingefroren. In Abhängigkeit vom Entnahmezeitpunkt wurden sie bis zu acht Monate tiefgefroren gelagert bevor sie alle zeitgleich analysiert wurden. Es liegen zwar bislang keine Studien vor zur Stabilität von Blutproben bei vergleichbaren Lagerungszeiten, es ist aber davon auszugehen, dass sich die Proben bei unmittelbarer Aufbereitung nach der Entnahme lange Zeit bei -80°C konservieren lassen.

Die Parameter des antioxidativen Stoffwechsels zeigen sich bei einer Aufbereitung der Proben innerhalb von sechs Stunden nach der Blutentnahme relativ stabil (Winter, 2009).

Es wurden ausschließlich bereits etablierte Analyseverfahren durchgeführt, die auch für Blutproben von Pferden geeignet sind.

5.2 Fettsäuremuster im Plasma des Pferdes

5.2.1 Dosierung der Fettsäuren

In der vorliegenden Studie wurden Fettsäuren in Form von Leinöl in einer Menge von 320 mg / kg KM/ Tag über sechs Wochen supplementiert.

Die Dosierung scheint im Vergleich mit diversen anderen Studien beim Pferd durchaus geeignet, um eine Veränderung des Fettsäuremusters im Blutplasma und in den Blutzellen zu erzielen.

Hansen et al. (2002) substituierte Leinöl in einer Menge von 10% der Kraftfuttermischung über achtzehn Wochen, während O'Connor (2007) und Khol-Parisini (2007) ebenfalls eine Dosierung von 320 mg/ kg KM und Tag über eine Versuchsdauer von neun bzw. zehn Wochen wählten und wie in der eigenen Arbeit eine signifikante Veränderung der n-3-Fettsäuren im Plasma der Probanden erzielen konnten.

Um eine Verschiebung der n3:n6-Ratio im Organismus zu bewirken, ist eine Ergänzung von EPA, DPA und DHA in einer Dosierung von mindestens 40 mg/ kg KM/ Tag empfehlenswert (Nagakura *et al.*, 2000).

5.2.2 Fettsäuremuster in Blutplasma

Analog zu vergleichbaren Arbeiten (Luther et al. (1981); Orme et al. (1994); Khol-Parisini et al. (2007)) beim Pferd konnten folgende, dominante Fettsäuren in abfallender Konzentration nachgewiesen werden: C18:2 n6, C18:0, C16:0, C18:1 n9. Im Blutplasma des Pferdes konnten C14:0, C15:0, C16:1, C17:0, C18:3 n3, C20:0, C20:1, C20:2, C22:0, C20:4 n6, C14:0 in geringer Menge ($\leq 1\%$) nachgewiesen werden.

C18:3 n6 ließ sich zu keinem Zeitpunkt des Versuches im Plasma nachweisen.

5.2.3 Einfluss einer Ölsupplementierung auf das Fettsäuremuster beim Pferd

Die in der vorliegenden Studie durchgeführte Supplementierung von Leinöl in einer Dosierung von 320 mg/ kg KM/ Tag über einen Versuchszeitraum von sechs Wochen führte im Plasma zu einer signifikanten Erhöhung der gesättigten Fettsäuren C18:0 und C20:0. Die Schwankungen der Gehalte von C18:0 bei der Kontrollgruppe sind auf die statistisch relativ kleine Gruppengröße zurückzuführen und nicht wissenschaftlich zu erklären.

Bei den einfach ungesättigten Fettsäuren konnte ein signifikanter Abfall von C18:1 n9 verzeichnet werden. Die mehrfach ungesättigte Fettsäure C18:3 n6 ließ sich im

durchgeführten Versuch gar nicht oder nur in wenigen Proben in sehr geringer Konzentration messen; die Ergebnisse sind somit nicht zu bewerten. C18:2 n6 zeigte keine Veränderung durch die Ergänzung mit Leinöl. Die Konzentrationen von C20:2 n6 fielen in der Versuchsgruppe nach Zulage von n-3-FS in Form von Leinöl signifikant ab. Erwartungsgemäß führte die Verabreichung von Leinöl zu einem Anstieg der Konzentration von C18:3 n3 im Plasma der Versuchsgruppe sowie zu einem Abfall der Gehalte an C20:4 n6.

Hansen et al. (2002) konnte nach einer Supplementierung von Leinöl in einer Menge von 10% der Ration über achtzehn Wochen einen Anstieg von C18:3 n3, C18:2 n6 und C20:5 n3 erzielen; die Konzentrationen von C20:4 n6 und C22:6 n3 blieben unbeeinflusst durch die Behandlung. Sie schlussfolgerten, dass Leinöl nicht potent genug sei, die n3:n6-Ratio signifikant zu erhöhen. Die eigenen Untersuchungen zeigten ebenfalls einen Anstieg der n3-Fettsäuren und einen Abfall der n6-Fraktion nach Supplementierung mit Leinöl. Es lässt sich jedoch auch in der vorliegenden Arbeit keine statistisch abgesicherte Aussage über eine mögliche Verschiebung der n3:n6-Ratio treffen, da C18:3 n6, C20:5 n3 und C22:6 n3 nur in sehr wenigen Proben messbar waren.

O'Connor et al. (2007) konnten durch eine Supplementierung von Fischöl (10,8 % C 20:5 n3; 8 % C 22:6 n3) über 63 Tage sowohl einen signifikanten Anstieg der n3-FS als auch einen Abfall der n6-FS im Plasma von Pferden erzielen. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Khol-Parisini et al. (2007) nach der Verabreichung von Seehundöl in einer Dosierung von 320 mg /kg KM /Tag über zehn Wochen; es konnte ein signifikanter Abfall der C18:2 n6 sowohl im Plasma als auch den Membranphospholipiden der Leukozyten sowie einen signifikanten Anstieg der C20:5 n3 und C22:6 n3 ermittelt werden. In den Untersuchungen von King et al. (2008) führte eine Supplementierung von Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure zu einem dosisabhängigen Anstieg dieser Fettsäuren im Plasma.

Um die Annahme zu stützen, dass Leinöl nicht potent genug sei, die n3:n6-Ratio im Plasma zu verschieben, führten Hess et al. (2009) eine Studie zum Vergleich der Effekte einer Ergänzung mit Leinöl vs. Fischöl in einer Menge von 38 g/ Tag über 90 Tage durch. Die Konzentrationen von Linolsäure und α -Linolensäure im Plasma blieben nach der Zulage von Fischöl zwar geringer als nach Leinöl-Gabe, ein messbarer Gehalt von C20:5 n3 und C 22:6 n3 konnte allerdings nur nach der Supplementierung von Fischöl erzielt werden. Mit diesen Ergebnissen konform gehen auch die eigenen Untersuchungen, die keinen messbaren Gehalt von C20:5 n3 und C22:6 n3 nach Supplementierung mit Leinöl herausstellen konnten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich eine nennenswerte Anreicherung von n3-FS und somit eine Verschiebung des n3:n6- Verhältnisses beim Pferd offenbar eher durch eine gezielte Supplementierung mit Ölen marinen Ursprungs erzielen lässt, während pflanzliche Öle zumindest in dem hier gewählten Dosierungsbereich weniger wirksam sind.

5.2.4 Beeinflussung des antioxidativen Stoffwechsels

Die in der Literatur mehrfach beschriebenen positiven Effekte einer fettreichen Diät auf Parameter des antioxidativen Stoffwechsels beim Pferd konnten in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Die Zulage von Leinöl in einer Dosierung von 320 mg/ kg KM/ Tag führte weder zu einer Veränderung der TEAC noch zu einer Beeinflussung von Glutathion und GPx.

In einer Studie von Orme et al. (1997) führte die Supplementierung von Fettsäuren zu einer Erhöhung der Plasmalipaseaktivität; dieses führt über eine Beeinflussung der Lipoproteinlipase der Muskulatur zu einer Verbesserung der Fettaufnahmekapazität der Muskulatur. Durch den signifikanten Anstieg der Muskel-Citrat-Synthase sowie der β -Hydroxyl CoA Dehydrogenase lässt sich eine verbesserte oxidative Kapazität der Muskulatur vermuten. Bei Rennpferden führte eine fettreiche Diät nicht zu veränderten Insulin- und Laktatwerten in Folge körperlicher Leistungen (Harris *et al.*, 1999). Eine proteinreduzierte Diät in Verbindung mit einer Ölsupplementierung schwächte die belastungsinduzierte Bildung von Säuren beim Hochleistungspferd ab und erhöhte den Blut-pH-Wert sowie den Bicarbonat-Wert (Graham-Thiers *et al.*, 2001). Auch Zeyner et al. (2002) erwähnen den positiven Effekt einer Supplementierung von Fettsäuren auf die pH-Homöostase des Plasmas. In einer Studie von deMoffarts (2007) konnte der belastungsinduzierte Abfall der GPx durch eine n3-FS –reiche Diät abgeschwächt werden.

Die Supplementierung mit Leinöl führte im vorliegenden Versuch zwar zu einer Anreicherung von n-3-FS, allerdings nicht zu einer Verschiebung der n3:n6-Ratio im Plasma. Ein Effekt auf Parameter des antioxidativen Stoffwechsels ließ sich somit ebenfalls nicht erwarten. Die aufgeführten Studien aus der Literatur untersuchten Parameter des antioxidativen Stoffwechsels beim Pferd ausschließlich unter körperlicher Belastung. Positive

Effekte einer n-3-FS angereicherten Diät auf das oxidativ-antioxidative Gleichgewicht des Körpers scheinen nur unter Leistungsbedingungen von Bedeutung zu sein.

5.3 Selengehalte im Blutserum

Für das Spurenelement Selen weist der tierische Organismus nur einen geringen homöostatischen Kontrollmechanismus auf (Wolffram, 2000; Jeroch *et al.*, 2008). Eine nutritive Versorgung mit Selen oberhalb der Bedarfswerte von 0,1 – 0,15 mg/ kg TS sollte folglich durch eine Erhöhung der Selenwerte im Blutplasma/ -serum nachweisbar sein (Meyer & Coenen, 2014). Referenzwerte für Selen im Blut belaufen sich beim Fohlen auf 0,07 – 0,09 mg/ l und beim erwachsenen Pferd auf 0,1 – 0,25 mg/ l (Meyer & Coenen, 2014). Die physiologisch niedrigeren Selengehalte im Blut des Fohlens verglichen mit ausgewachsenen Pferden zeigen sich auch bei Absetzern bis zu dem Alter von einem Jahr. Bauer *et al.* (2017) geben deutlich niedrigere Referenzwerte an (0,028 – 0,13 mg/ l).

In Studien mit bedarfsgerechten Selengehalten in der Ration bewegten sich die Selengehalte im Blut stets innerhalb der oben angegebenen Referenzwerte (Stowe, 1967; Shellow *et al.*, 1985; Podoll *et al.*, 1992; Richardson *et al.*, 2006). Bei Vollblutpferden wurden durchschnittlich geringere Selenwerte ermittelt als bei Warmblütern (Stowe, 1967; Hayes *et al.*, 1987). Steigende Selenzulagen in der Ration führten wie in den eigenen Untersuchungen erwartungsgemäß zu erhöhten Plasmaspiegeln.

Organisch gebundenes Selen (Selenhefe) lässt sich im Austausch mit Methionin unspezifisch in Gewebe inkorporieren (Mahan *et al.*, 1999; Schrauzer, 2000). Richardson *et al.* (2006) konnten keinen signifikanten Unterschied der zugeführten Selenquelle (Zink-L-Selenomethionin vs. Na-Selenat) auf die Bioverfügbarkeit von Selen im Organismus herausstellen, wohingegen aktuellere Studien die eigenen Ergebnisse stützten und durchaus die Vorteile einer Supplementierung mit organisch gebundenem Selen herauskristallisieren konnten (Calamari *et al.*, 2009; Montgomery *et al.*, 2012).

Die erzielten Ergebnisse der vorliegenden Studie bewegen sich innerhalb der oben aufgeführten Referenzwerte aus der Literatur. Die sechswöchige Supplementierung mit Selen in einer Dosierung von 0,5 mg/ kg TS führte erwartungsgemäß zu einem Anstieg der Selenspiegel im Blut; organische Selenhefe in der Ration erhöhte die Selengehalte im Serum um 75 %, während Na-Selenit nur zu einem Anstieg von 44,5 % führte. Dies deutet die

Vorteile einer Supplementierung mit Selenhefen beim Pferd an und entspricht den Beobachtungen von Calamari et al. (2009) und Montgomery et al. (2012).

In den Untersuchungen von Richardson et al. (2006) konnte dagegen nach einer Supplementierung von Selen über einen Zeitraum von 56 Tagen hinaus kein Unterschied hinsichtlich der chemischen Bindungsform (organisch / anorganisch) in den Selengehalten des Blutes aufgezeigt werden.

Es scheint somit auch der Dauer der Selensupplementierung eine Bedeutung zu zukommen.

5.4 Einfluss von n3-Fettsäuren und Selen auf den antioxidativen Status

Durch eine Supplementierung von antioxidativ wirkenden Substanzen wird in der Pferdefütterung nicht nur versucht, Mangelzustände auszugleichen, sondern insbesondere auch die Leistungs- und Regenerationsfähigkeit des Organismus zu steigern und positive Effekte auf das Immunsystem zu erzielen.

Die Zulage von Fetten wirkte sich in diversen Studien positiv auf die pH-Homöostase des Pferdes aus (Graham-Thiers *et al.*, 2001; Zeyner *et al.*, 2002).

Ein belastungsinduzierter Abfall der GPx-Aktivität konnte durch eine fettsäurereiche Diät abgeschwächt werden (de Moffarts *et al.*, 2007). Dem Spurenelement Selen wird als Bestandteil des antioxidativen Enzyms Glutathionperoxidase eine entscheidende Bedeutung bei der intrazellulären Regulation bzw. Inaktivierung von Hydroperoxiden beigemessen (Arthur, 1997; Ferguson & Karunasinghe, 2011).

Veränderungen des Selenstatus können sich folglich über eine Beeinflussung der GPx-Aktivität direkt auf das antioxidative System auswirken (Brummer, Hayes, Dawson, *et al.*, 2013).

In der vorliegenden Studie führte die Supplementierung mit Leinöl in einer Dosierung von 320 mg/ kg KM/ Tag nicht zu einer nennenswerten Anreicherung von n-3-FS im Blutplasma; es konnte somit auch kein Effekt auf den antioxidativen Status des Pferdes ermittelt werden.

Wie in der Literatur beschrieben, führte die Substituierung von Selen unabhängig von der verabreichten Quelle auch in der vorliegenden Untersuchung zu einer Anreicherung des Spurenelementes im Blutserum und zu Veränderungen im antioxidativen System des Pferdes.

5.4.1 Totale antioxidative Kapazität (TEAC)

Die TEAC im Blut setzt sich aus einer Vielzahl enzymatischer und nicht enzymatischer Antioxidantien, wie zum Beispiel GPx, SOD, Albumin, Bilirubin, Glutathion, Harnsäure und Vitamin C und E zusammen. Eine Veränderung eines oder mehrerer antioxidativ wirkender Komponenten kann folglich deutliche Konzentrationsunterschiede bewirken.

Die Ausgangswerte der TEAC in der vorliegenden Arbeit vor der Supplementierung mit Fettsäuren und Selen unterschiedlicher Bindungsformen entsprechen mit einer mittleren TEAC von $331,19 \pm 29,13 \mu\text{mol/l}$ den Referenzwerten für Pferde aus der Literatur (McMeniman & Hintz, 1992; White *et al.*, 2001; Stohrer *et al.*, 2002; Brincker, 2004). Nur Niedzwiedz *et al.* (2013) eruierten in ihren Untersuchungen niedrigere TEAC-Werte.

Die Werte der gesamten antioxidativen Kapazität scheinen tierartspezifisch zu variieren. In einer Studie an Schlittenhunden konnten beispielsweise TEAC-Werte von $800 \mu\text{mol/l}$ gemessen werden (Stohrer *et al.*, 2002). Bei gesunden Milchkühen lagen die gemessenen TEAC-Werte dagegen nur in einem Bereich von $200 - 300 \mu\text{mol/l}$ (Wilken & Fürll, 2002). Auch Sauen zeigten ähnliche Werte zwischen $246 \mu\text{mol/l}$ und $266 \mu\text{mol/l}$, gemessen im peripartalen Zeitraum (Derckx, 2009). In Blutproben des Menschen beliefen sich die TEAC-Konzentrationen auf $1460 \pm 140 \mu\text{mol/l}$ und sind somit im Speziesvergleich am höchsten (Miller *et al.*, 1993).

In Folge der sechswöchigen Supplementierung mit Selen in einer Dosierung von $0,5 \text{ mg/kg TS}$ waren unabhängig von der Selenquelle signifikant höhere Werte der gesamten antioxidativen Kapazität im Plasma zu messen. Erhöhte TEAC-Werte ließen sich auch noch vier Wochen nach Ende der forcierten Zufütterung von Selen nachweisen; die Ergebnisse lassen eine anhaltende Bioverfügbarkeit von Selen im Organismus vermuten.

Eine Zulage von Fettsäuren neben der Ergänzung mit Selen erhöhte die gesamte antioxidative Kapazität am deutlichsten; der Unterschied ließ sich allerdings nicht statistisch absichern.

Auch McMeniam *et al.* (1992) konnten nach Zulage von Vitamin E und Selen signifikant erhöhte TEAC-Werte im Plasma bei Rennpferden im Training erzielen. Durch intravenöse Verabreichung von antioxidativen Substanzen unmittelbar vor einem Rennen konnte dem belastungsinduzierten Abfall der TEAC entgegengewirkt werden (White *et al.*, 2001).

Die Gabe eines Vitamin- und Spurenelement-reichen Zusatzfutters an Rennpferde im Laufe der Trainingssaison konnte die lipophile antioxidative Kapazität der Pferde positiv beeinflussen (de Moffarts *et al.*, 2005). Demgegenüber konnte keine signifikante Veränderung der TEAC durch Supplementierung von Glutamin bei Rennpferden erzielt werden (Brincker, 2004).

5.4.2 Glutathion im Erythrozytenlysat

Die Glutathion-Analysen ergaben eine mittlere Konzentration der TGSH von 1252 $\mu\text{mol/l}$ im Erythrozytenlysat. Weder die Supplementierung von hochdosiertem Selen unterschiedlicher Quellen noch die Zulage von Fettsäuren führte zu statistisch signifikanten Veränderungen.

Die ermittelten Werte entsprechen den von Art et al. (1999) gemessenen Konzentrationen der TGSH bei gesunden jungen Pferden ($1104 \pm 55 \mu\text{mol/l}$) im Hämolysat. Infolge einer akut auftretenden und auch abheilenden RAO (recurrent airway obstruction) stiegen die Werte hier an.

Unabhängig von einer sechswöchigen Supplementierung mit Antioxidantien stiegen die GSH-Werte bei deMoffarts et al. (2007) im Verlauf der Studie von durchschnittlich 800 $\mu\text{mol/l}$ auf 1177 $\mu\text{mol/l}$ an; diese Ergebnisse suggerieren eine relativ große Schwankungsbreite zwischen unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten. Bei Pferden der Placebogruppe konnte ein signifikanter leistungsinduzierter Abfall der GSH verzeichnet werden. Chiardadia et al. (1998) ermittelten im Durchschnitt deutlich geringere GSH-Werte von 600 $\mu\text{mol/l}$.

In einer Studie an Rennpferden konnten durch eine Supplementierung von L-Glutamin erhöhte GSH-Werte und reduzierte GSSG-Werte im Vollblut ermittelt werden; die Ergebnisse wiesen allerdings keine statistische Signifikanz auf (Brincker, 2004). Auch bei Ratten führte eine Glutaminsupplementierung zu höheren GSH-Konzentrationen im Blut (Denno *et al.*, 1996).

5.4.3 Glutathionperoxidase

Bereits Roneus et al. (1983) stellten einen Zusammenhang zwischen der GPx-Aktivität im Blut gesunder Pferde und dem Selengehalt in der Futtermittelration her; auch führte eine Selensupplementierung trächtiger Stuten zu erhöhten GPx-Werten bei deren neugeborenen Saugfohlen. Diverse andere Studien konnten keinen signifikanten Effekt einer Supplementierung mit Selen auf die GPx-Aktivität bei Pferden eruieren. In einer Studie von Shellow et al. (1985) beispielsweise führte eine Substituierung mit Selen zwar zu veränderten Blutspiegeln, allerdings ließen sich keine Parallelen zur GPx-Aktivität herstellen. Karren et al. (2010) untersuchten die Auswirkungen einer Selengabe an trächtigen Stuten und konnten weder bei der Stute noch beim Fohlen Veränderungen der GPx verzeichnen; lediglich die Selengehalte in Plasma, Muskulatur und im Kolostrum stiegen deutlich an. Der Einsatz eines

vitamin- und spurenelementreichen Zusatzfutters während der Rennsaison beeinflusste die GPx-Aktivität und die lipophile antioxidative Kapazität von Vollblutpferden positiv (de Moffarts *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte bei gesunden Vollblut-Jährlingen bei bedarfsgerechter Selenversorgung (0,15 mg/ kg TS) in der Ration eine mittlere GPx-Aktivität von 192 U/ g Hb festgestellt werden. Die Supplementierung mit Selen (0,5 mg/ kg TS) über sechs Wochen führte unabhängig von der verwendeten Selenquelle zu einem signifikanten Anstieg der GPx auf 210 U/ g Hb; es konnte ein weiterer Anstieg auf 248 U/ g Hb nach weiteren vier Wochen bedarfsgerechter Selenversorgung ermittelt werden.

Die eigenen Werte der GPx-Aktivität beim Pferd gehen mit den Erkenntnissen von deMoffarts (2005) konform, die beim Rennpferd eine durchschnittliche GPx von 200 U/ g Hb ermittelten. Nach Verabreichung von antioxidativ wirkenden Substanzen erhöhte sich die GPx im Mittel sogar auf 300 U/ g Hb. Winter *et al.* (2009) erhielt bei zufällig ausgewählten Pferdepatienten unterschiedlicher Rassen im Alter von vier bis zwanzig Jahren hingegen deutlich geringere Werte der GPx-Aktivität von durchschnittlich 137 – 143 U/ g Hb.

Gorecka *et al.* (2002) untersuchten diverse antioxidative Parameter beim Pferd unter dem Einfluss variierender Umweltbedingungen, Alter, Geschlecht und Rasse; der antioxidative Status variierte signifikant bei Pferden unterschiedlichen Geschlechtes und Rassen und stand unter einem gewissen Umwelteinfluss. Das Alter der Pferde beeinflusste den antioxidativen Status nicht maßgeblich.

Eine vergleichbare Studie von Richardson *et al.* (2006) über die Effekte einer Supplementierung von Selen unterschiedlicher Bindungsformen und Dosierungen zeigte im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen keinen Zusammenhang zwischen Selenspiegeln im Blut und der GPx-Aktivität. Unabhängig von der zugeführten Selenmenge und -quelle stieg die GPx im Verlauf der Studie bei allen Gruppen an. Die Supplementierung von Zink-L-Selenomethionin erzielte zwar die höchsten Selengehalte im Plasma, die Pferde zeigten aber die geringsten GPx-Werte.

Haggett *et al.* (2010) führten eine Studie über den Blutselenstatus bei Distanzpferden im Verlauf körperlicher Leistungen durch. Physische Belastung erhöhte den Gehalt an freien Sauerstoffradikalen im Blut. Als Bestandteil der antioxidativ wirkenden Glutathionperoxidase

vermag Selen dieses Ungleichgewicht nach Ansicht der Autoren positiv zu beeinflussen. Höhere Selengehalte im Blut führten allerdings nicht zu verbesserten Leistungen bei den untersuchten Distanzpferden. Pferde, die das Ziel erreichten, wiesen in der Blutuntersuchung aber im Mittel höhere Selengehalte auf als leistungsbedingt disqualifizierte Pferde.

Im Gegensatz zu diversen anderen Studien konnte in der vorliegenden Studie kein Effekt einer Supplementierung von n3-Fettsäuren in Form von Leinöl auf Parameter des antioxidativen Stoffwechsels dargestellt werden. Das verwendete Leinöl führte zwar zu einer nachweislichen Anreicherung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Organismus der jungen Vollblüter, nicht jedoch zu einer Verschiebung der n3:n6-Ratio; somit ließ sich vermutlich auch kein Einfluss auf den antioxidativen Status der Tiere ermitteln. Allerdings führte die Zulage von Maiskeimöl in einer Studie von McMeniman et al. (1992) bei Sportpferden zu erhöhten Aktivitäten der Glutathionperoxidase; dies lässt sich aber auf die sehr hohen Vitamin E – Gehalte des verwendeten Öles zurückführen.

5.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Verwendung von Leinöl in einer Dosierung von 320 mg/ kg KM/ Tag war nicht geeignet, um die n3:n6-Ratio im Organismus des Pferdes zu beeinflussen. Ob dieses bei längerer Versuchsdauer deutlich ausgeprägter gewesen wäre, kann aufgrund der eigenen Daten nicht belastbar eingeschätzt werden. Die Verfütterung von Öl über einen Zeitraum von sechs Wochen zeigte sich rückblickend als etwas kurz gewählt, dies ergibt sich zumindest als Hinweis aus der Untersuchung von Hansen et al. (2002). Um das Fettsäuremuster des Pferdes hinsichtlich der mehrfach ungesättigten n3-Fettsäuren zu beeinflussen, sollte somit besser auf Öle mariner Quellen (O'Connor, 2007; Khol-Parisini, 2007; King, 2008; Hess, 2012) oder evtl. auch Mikroalgen (Heckel, 2009) zurückgegriffen werden.

Zur besseren Beurteilbarkeit der Einflüsse einer n3-FS-reichen Diät auf Parameter des antioxidativen Stoffwechsels wären Untersuchungen unter Leistungsbedingungen empfehlenswert. Graham-Thiers et al. (2001) und deMoffarts et al. (2007) berichteten bereits über eine Abschwächung des belastungsinduzierten säurebildenden Effekts nach n3-FS-reicher Diät beim Leistungspferd.

Die Supplementierung von Selen in einer Dosierung von 0,5 mg /kg TS über sechs Wochen scheint beim Pferd durchaus geeignet, um – unabhängig von der verwendeten Selenquelle - den Selengehalt im Blut anzuheben. Dem Spurenelement Selen kommt als Bestandteil der GPx eine entscheidende Bedeutung bei der Regulation des oxidativen Status zu (Ferguson & Karunasinghe, 2011). Veränderungen im Selen-Status führen über die direkte Beeinflussung der GPx zu einer Modifizierung des antioxidativen Systems (Brummer, Hayes, Adams, *et al.*, 2013).

Die gesamte antioxidative Kapazität (TEAC) erhöhte sich unabhängig von der Selenquelle signifikant im Verlauf des Versuches. In Kombination mit der Verabreichung von Fettsäuren manifestierte sich der Anstieg am deutlichsten, wobei die Zulage von Leinöl allerdings nicht zu signifikanten Differenzen führte.

Diese Ergebnisse decken sich mit Erkenntnissen aus der Literatur (McMeniam, 1992; White, 2001; deMoffarts, 2005) und unterstreichen die Bedeutung einer mit Antioxidantien angereicherten Diät beim Hochleistungspferd.

Auch die Aktivität der Glutathionperoxidase verzeichnete nach Supplementierung mit Selen einen signifikanten Anstieg, welcher auch noch vier Wochen nach der Versuchsphase anhielt. Die eigenen Resultate bestätigen somit die Beobachtungen von deMoffarts (2005). Richardson et al. (2006) konnten zwar auch ansteigende GPx-Werte im Verlauf ihrer Studie ermitteln, allerdings schien dies unabhängig von einer Supplementierung mit Selen.

Für die Zukunft stellt sich die Aufgabe, noch einmal genau die Effekte einer mit Antioxidantien angereicherten Diät auf den oxidativen Status unter körperlichen Leistungen beim Pferd zu ermitteln sowie mögliche Parallelen zu vorliegenden Befunden bei Versuchstieren und auch beim Menschen zu ziehen.

Erste Studien (Haggett *et al.*, 2010) weisen zwar einen Zusammenhang höherer Selengehalte im Blut und einer positiven Beeinflussung des antioxidativen Systems während körperlicher Leistung nach, können aber keine statistisch belegte Auswirkung auf die tatsächliche Leistung der Pferde belegen. Dennoch ließen sich positive Effekte erkennen, da bei Distanzpferden welche das Ziel erreichten, sich durchschnittlich höhere Selengehalte im Blut zeigten als bei leistungsbedingt disqualifizierten Pferden.

6 Zusammenfassung

Auswirkungen einer Supplementierung von n-3-Fettsäuren und Selen unterschiedlicher Quellen auf Blutparameter des antioxidativen Stoffwechsels beim Pferd

Ziel der vorliegenden Studie war, die Auswirkungen einer Supplementierung von Fettsäuren aus Leinöl und Selen unterschiedlicher Quellen (Na-Selenit vs. Selenhefen) auf Parameter des antioxidativen Stoffwechsels bei jungen Vollblütern zu untersuchen. An 19 Vollblut-Jährlingen wurde ein randomisierter Fütterungsversuch mit Leinöl (320 mg / kg KM / Tag) und Selen unterschiedlicher Bindungsformen (Selenhefen, Na-Selenit; Dosierung: 0,5 mg / kg TS) über drei Versuchsphasen durchgeführt. Das Fettsäuremuster des Plasmas wurde mittels Gaschromatographie ermittelt, der Selengehalt des Blutserums wurde durch Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt. Die Parameter des antioxidativen Stoffwechsels (TEAC, GSH, GPx) wurden photometrisch gemessen. Nach Prüfung der Daten auf Normalverteilung wurde der t-Test für unabhängige Stichproben und die Varianzanalyse bei wiederholten Messungen abhängiger Stichproben zur statistischen Auswertung herangezogen. Die Supplementierung mit Leinöl führte zu nachweislichen Veränderungen der Konzentrationen von Fettsäuren im Plasma, allerdings nicht zu einer nennenswerten Anreicherung von n-3-FS. Die Supplementierung von Selen induzierte einen Anstieg der Selenkonzentration im Blut. Dabei führte Selenhefe zu einer Zunahme der Selenkonzentration um 75%, während die Blutwerte bei Tieren, die Na-Selenit erhielten, um 44,5% anstiegen. Die Zulage von Selen führte –unabhängig von der verabreichten Selenquelle- zu höheren TEAC-Werten im Blutplasma ($p < 0,01$). Die Konzentration von Glutathion im Erythrozytenlysat wurde im Verlauf des Versuches nicht beeinflusst. Die Aktivität der GPx stieg nach der Versuchsphase um 9,67% und nach weiteren vier Wochen um erneute 19,9% an ($p < 0,001$).

Die Verwendung von Leinöl in einer Dosierung von 320 mg /kg KM /Tag war nicht geeignet, die Konzentration der n-3-FS im Organismus des Pferdes deutlich zu beeinflussen. Im Gegensatz dazu führte die Gabe von Ölen marinen Ursprungs oder auch von Mikroalgen nach Literaturangaben zu einer effizienteren Anreicherung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Blutplasma und –zellen des Pferdes. Um die Effekte einer fettreichen Diät auf Parameter des antioxidativen Systems und in Folge auf das Leistungsvermögen besser beurteilen zu können, scheinen Studien unter Leistungsbedingungen sinnvoll.

7 Summary

Effects of supplementation with n-3-fatty-acids and selenium from different sources on blood parameters of the antioxidant metabolism in horses

The aim of the study was to examine how a supplementation of fatty-acids in linseed oil and selenium from different sources (Na-selenite vs. selenium yeast) on parameters of the antioxidant metabolism in young thoroughbred horses. A randomized feeding experiment on 19 thoroughbred yearlings with linseed oil (320 mg / kg BM / day) and selenium from different sources (selenium yeasts, Na-selenite; dosage: 0.5 mg / kg DM) was conducted throughout three experimental phases. The fatty acid pattern in the plasma was determined by gas chromatography. The concentration of selenium in the blood serum was investigated by atomic absorption spectrometry. The parameters of the antioxidant metabolism (TEAC, GSH, GPx) were measured photometrically. For a statistical evaluation, the data was tested for normal distribution, a t-test or analysis of variance was applied.

The supplementation with linseed oil has been proven to lead to a change of the concentration of fatty-acids in the plasma but did not cause an enrichment of n3:n6-ratio. The supplementation of selenium induced an increase of the selenium concentration in the blood; selenium yeast lead to an increase of 75% while the blood values of animals fed with Na-selenite showed an increase of 44.5%. Regardless of the selenium source, the addition of selenium caused higher TEAC values in the blood plasma ($p < 0.01$).

Throughout the experiment the concentration of glutathione in the erythrocytes lysate was not influenced. The activity of GPx increased after the supplemented period by 9.67% and after four more weeks again by 19.9% ($p < 0.001$).

Adding linseed oil to the feed in a dosage of 320 mg / kg BM / day seems not to be suitable to affect fatty acid metabolism in horses; according to literature references, feeding oils of marine origin or oils made of microalgae caused an efficient enrichment of polyunsaturated fatty acids in the blood plasma and blood cells of horses. Studies under performance condition seem to be useful for a better interpretation of the effects of a high-fat diet on the antioxidant system.

It would be interesting to find out how and in which way a diet with antioxidants given to sports horses could influence their performance capacity positively.

8. Literaturverzeichnis

Agarwal, A. & Allamaneni, S. S. (2004) Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*, **9**, 338-347.

Altmann, H. J. & Weik, H. (1971) Fettsäurenmuster der Phospholipidfraktionen im Plasma des Pferdes. *Z Tierphysiol Tierernähr Futtermittelk*, **28**, 285-288.

Ambrosio, G., Zweier, J. L. & Flaherty, J. T. (1991) The relationship between oxygen radical generation and impairment of myocardial energy metabolism following post-ischemic reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, **23**, 1359-1374.

Argenzio, R. A. & Hintz, H. F. (1970) Glucose tolerance and effect of volatile fatty acid on plasma glucose concentration in ponies. *J Anim Sci*, **30**, 514-518.

Art, T., Franck, T., Gangl, M., Votion, D., Kohnen, S., Deby-Dupont, G., *et al.* (2006) Plasma concentrations of myeloperoxidase in endurance and 3-day event horses after a competition. *Equine Vet J Suppl*, **36**, 298-302.

Art, T., Kirschvink, N., Smith, N. & Lekeux, P. (1999) Indices of oxidative stress in blood and pulmonary epithelium lining fluid in horses suffering from recurrent airway obstruction. *Equine Vet J*, **31**, 397-401.

Art, T. & Lekeux, P. (1993) Training-induced modifications in cardiorespiratory and ventilatory measurements in thoroughbred horses. *Equine Vet J*, **25**, 532-536.

Arthur, J. R. (1997) Selenium proteins. *J Equine Vet Sci*, **17**, 422-423.

Arthur, J. R. & Beckett, G. J. (1994) New metabolic roles for selenium. *Proc Nutr Soc*, **53**, 615-624.

Aurich, C. (2005) Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, **89**, 65-75.

Avellini, L., Chiaradia, E. & Gaiti, A. (1999) Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **123**, 147-154.

Avissar, N., Kerl, E. A., Baker, S. S. & Cohen, H. J. (1994) Extracellular glutathione peroxidase mRNA and protein in human cell lines. *Arch Biochem Biophys*, **309**, 239-246.

Baalsrud, K. J. & Overnes, G. (1986) Influence of vitamin E and selenium supplement on antibody production in horses. *Equine Vet J*, **18**, 472-474.

- Babcock, T., Helton, W. S. & Espat, N. J. Eicosapentaenoic acid (EPA): an antiinflammatory [omega]-3 fat with potential clinical applications. *Nutrition*, **16**, 1116-1118.
- Baldwin, S. R., Simon, R. H., Grum, C. M., Ketai, L. H., Boxer, L. A. & Devall, L. J. (1986) Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet*, **1**, 11-14.
- Balogh, N., Gaal, T., Ribiczeyne, P. S. & Petri, A. (2001) Biochemical and antioxidant changes in plasma and erythrocytes of pentathlon horses before and after exercise. *Vet Clin Pathol*, **30**, 214-218.
- Barceloux, D. G. (1999) Selenium. *J Toxicol Clin Toxicol*, **37**, 145-172.
- Barclay, W., Abril, R., Abril, P., Weaver, C. & Ashford, A. (1998) Production of docosahexaenoic acid from microalgae and its benefits for use in animal feeds. *World Rev Nutr Diet*, **83**, 61-76.
- Barnes, P. J. (1990) Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radic Biol Med*, **9**, 235-243.
- Baskurt, O. K. & Meiselman, H. J. (1999) Susceptibility of equine erythrocytes to oxidant-induced rheologic alterations. *Am J Vet Res*, **60**, 1301-1306.
- Bauer, C., Bauer, N., Feige, K., Cavalleri, C.-M., Drommer, W. & Keresztes, M. (2017) Labordiagnostische Untersuchungen. In *Handbuch Pferdepraxis* (ed. by W. Brem, H. Gehlen, B. Ohnesorge & A. Wehrend). Enke Verlag, Stuttgart.
- Baumber, J., Ball, B. A., Gravance, C. G., Medina, V. & Davies-Morel, M. C. (2000) The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J Androl*, **21**, 895-902.
- Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J. & Meyers, S. A. (2003) Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl*, **24**, 621-628.
- Baumber, J., Vo, A., Sabeur, K. & Ball, B. A. (2002) Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology*, **57**, 1025-1033.
- Beckett, G. J. & Arthur, J. R. (2005) Selenium and endocrine systems. *J Endocrinol*, **184**, 455-465.
- Behne, D., Gessner, H., Hilmert, H. & Scheid, S. (1988) Selenium and selenoproteins in tissues with endocrine functions. In *Trace elements in man and animals 6*, 55-57. Springer Verlag, Heidelberg.

- Behne, D., Gessner, H. & Kyriakopoulos, A. (1996) Information on the selenium status of several body compartments of rats from the selenium concentrations in blood fractions, hair and nails. *J Trace Elem Med Biol*, **10**, 174-179.
- Berdanier, C. d. (2000) *Fatty Acids and Membrane Function*. Marcel Dekker Verlag, New York.
- Bergsten, G., Holmback, R. & Lindberg, P. (1970) Blood selenium in naturally fed horses and the effect of selenium administration. *Acta Vet Scand*, **11**, 571-576.
- Blok, W. L., Katan, M. B. & van der Meer, J. W. (1996) Modulation of inflammation and cytokine production by dietary (n-3) fatty acids. *J Nutr*, **126**, 1515-1533.
- Blythe, L. L., Craig, A. M., Lassen, E. D., Rowe, K. E. & Appell, L. H. (1991) Serially determined plasma alpha-tocopherol concentrations and results of the oral vitamin E absorption test in clinically normal horses and in horses with degenerative myeloencephalopathy. *Am J Vet Res*, **52**, 908-911.
- Boissonneault, G. A. (2000) *Dietary fat, immunity and inflammatory disease*. Marcel Dekker, New York.
- Bostedt, H. (1977) Zur Klinik der ernährungsbedingten Muskeldegeneration bei Fohlen. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*, **8**, 293-332.
- Bostedt, H. (1979) Über die ernährungsbedingte Muskeldystrophie bei Jungtieren in den ersten Lebenstagen und-wochen. *Prakt Tierarzt, coll. vet*, **61**, 45-50.
- Brincker, B. (2004) Einsatz von L-Glutamin und seine Wirkung auf den antioxidativen Status bei Galopprennpferden. LMU München, Tierärztl Fakultät, Dissertation.
- Brown, D., Burk, R., Seely, R. & Kiker, K. (1971) Effect of dietary selenium on the gastrointestinal absorption of $(75 \text{ SeO}_3)_2$ in the rat. *Int J Vitamin Nutr Res*, **42**, 588-591.
- Brummer, M., Hayes, S., Adams, A. A., Horohov, D. W., Dawson, K. A. & Lawrence, L. M. (2013) The effect of selenium supplementation on vaccination response and immune function in adult horses. *J Anim Sci*, **91**, 3702-3715.
- Brummer, M., Hayes, S., Dawson, K. A. & Lawrence, L. M. (2013) Measures of antioxidant status of the horse in response to selenium depletion and repletion. *J Anim Sci*, **91**, 2158-2168.
- Burk, R. F. & Hill, K. E. (2005) Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu Rev Nutr*, **25**, 215-235.
- Burk, R. F. & Hill, K. E. (2009) Selenoprotein P—expression, functions, and roles in mammals. *Biochem Biophys Acta (BBA)-General Subjects*, **1790**, 1441-1447.

Bush, J. A., Freeman, D. E., Kline, K. H., Merchen, N. R. & Fahey, G. C., Jr. (2001) Dietary fat supplementation effects on in vitro nutrient disappearance and in vivo nutrient intake and total tract digestibility by horses. *J Anim Sci*, **79**, 232-239.

Butenandt, D., Rekitt, M., Sauerwein, H., Andersen, U., Gerhards, H. (2002) Orientierende Untersuchungen zum oxidativen Stress bei Trabrennpferden. In *12. Jahrestagung Fachgr Inn Med klin Labordiagn, DVG, 2003*.

Calamari, L., Abeni, F. & Bertin, G. (2010) Metabolic and hematological profiles in mature horses supplemented with different selenium sources and doses. *J Anim Sci*, **88**, 650-659.

Calamari, L., Ferrari, A. & Bertin, G. (2009) Effect of selenium source and dose on selenium status of mature horses. *J Anim Sci*, **87**, 167-178.

Calder, P. C. (1998) Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Braz J Med Biol Res*, **31**, 467-490.

Calder, P. C. (2008) Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res*, **52**, 885-897.

Calder, P. C., Yaqoob, P., Thies, F., Wallace, F. A. & Miles, E. A. (2002) Fatty acids and lymphocyte functions. *Br J Nutr*, **87** Suppl 1, 31-48.

Cantin, A. & Crystal, R. G. (1985) "Interstitial pathology": an overview of the chronic interstitial lung disorders. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, **76** Suppl 1, 83-91.

Canty, D. J. & Zeisel, S. H. (1994) Lecithin and choline in human health and disease. *Nutr Rev*, **52**, 327-339.

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

Caple, I. W., Edwards, S. J., Forsyth, W. M., Whiteley, P., Selth, R. H. & Fulton, L. J. (1978) Blood glutathione peroxidase activity in horses in relation to muscular dystrophy and selenium nutrition. *Aust Vet J*, **54**, 57-60.

Carmel, D. K., Crisman, M. V., Ley, W. B., Irby, M. H. & Edwards, G. H. (1990) A survey of whole blood selenium concentrations of horses in Maryland. *Cornell Vet*, **80**, 251-258.

Ceusters, J. D., Mouithys-Mickalad, A. A., Franck, T. J., Deby-Dupont, G. P., Derochette, S. & Serteyn, D. A. (2013) Effect of different kinds of anoxia/reoxygenation on the mitochondrial function and the free radicals production of cultured primary equine skeletal myoblasts. *Res Vet Sci*, **95**, 870-878.

Chapkin, R. S. (2000) Reappraisal of the essential fatty acids. Marcel Dekker Verlag, New York.

Cheeseman, K. H. & Slater, T. F. (1993) An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, **49**, 481-493.

Cherubini, A., Ruggiero, C. & Lattanzio, F. (2009) Polyunsaturated fatty acids and human health: a critical appraisal of the evidence. *Curr Pharm Des*, **15**, 4085-4086.

Chiaradia, E., Avellini, L., Rueca, F., Spaterna, A., Porciello, F., Antonioni, M. T., *et al.* (1998) Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **119**, 833-836.

Chow, C. K. (1991) Vitamin E and oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, **11**, 215-232.

Chu, F. F., Doroshov, J. H. & Esworthy, R. S. (1993) Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem*, **268**, 2571-2576.

Combs, G. & Combs, S. B. (1986) The role of selenium in nutrition. Academic Press Inc, Elsevier Verlag, Amsterdam.

Contri, A., De Amicis, I., Molinari, A., Faustini, M., Gramenzi, A., Robbe, D., *et al.* (2011) Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. *Theriogenology*, **75**, 1319-1326.

Costa, L. R., Seahorn, T. L., Moore, R. M., Oliver, J. L. & Hosgood, G. L. (2001) Plasma and bronchoalveolar fluid concentrations of nitric oxide and localization of nitric oxide synthesis in the lungs of horses with summer pasture-associated obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res*, **62**, 1381-1386.

Crisman, M. V., Carmel, D. K., Lessard, P. & Ley, W. B. (1994) A survey of whole blood selenium concentrations of horses in Virginia and Maryland. *J Equine Vet Sci*, **14**, 256-261.

Daix, M., Antys-Becker, M., Gather, C., Wiggers, L., Bister, J.L., Weinberger, T., Kirschvink, N. (2007) Matrix metalloproteinase 2 and 9 activities and isoprostane concentration in equine synovial fluid: comparison between healthy horses and horses with articular disease. In *Proceedings of the ECVS*, Dublin, 267-269.

de la Rua-Domenech, R., Mohammed, H. O., Cummings, J. F., Divers, T. J., de Lahunta, A. & Summers, B. A. (1997) Intrinsic, management, and nutritional factors associated with equine motor neuron disease. *J Am Vet Med Assoc*, **211**, 1261-1267.

de Moffarts, B., Kirschvink, N., Art, T., Pincemail, J. & Lekeux, P. (2005) Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. *Vet J*, **169**, 65-74.

de Moffarts, B., Kirschvink, N., Art, T., Pincemail, J. & Lekeux, P. (2006) Effect of exercise on blood oxidant/antioxidant markers in standardbred horses: comparison between treadmill and race track tests. *Equine Vet J Suppl*, **36**, 254-257.

de Moffarts, B., Portier, K., Kirschvink, N., Coudert, J., Fellmann, N., van Erck, E., *et al.* (2007) Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (n-3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses. *Vet J*, **174**, 113-121.

Deaton, C. M. (2006) The role of oxidative stress in an equine model of human asthma. *Redox Rep*, **11**, 46-52.

Deaton, C. M., Marlin, D. J., Roberts, C. A., Smith, N., Harris, P. A., Kelly, F. J., *et al.* (2002) Antioxidant supplementation and pulmonary function at rest and exercise. *Equine Vet J Suppl*, **34**, 58-65.

Deaton, C. M., Marlin, D. J., Smith, N. C., Harris, P. A., Schroter, R. C. & Kelly, F. J. (2004) Antioxidant supplementation in horses affected by recurrent airway obstruction. *J Nutr*, **134**, 2065-2067.

Delguste, C., de Moffarts, B., Kirschvink, N., Art, T., Pincemail, J., Defraigne, J. O., *et al.* (2007) Change in blood antioxidant status of horses moved from a stable following diagnosis of equine motor neuron disease. *Can Vet J*, **48**, 1165-1167.

Denno, R., Rounds, J. D., Faris, R., Holejko, L. B. & Wilmore, D. W. (1996) Glutamine-enriched total parenteral nutrition enhances plasma glutathione in the resting state. *J Surg Res*, **61**, 35-38.

Derkx, S. (2009) Antioxidativer und Stoffwechselstatus bei Sauen im peripartalen Zeitraum unter Berücksichtigung des Mastitis-Metritis-Agalaktie-Komplexes. Universität Leipzig, Veterinärmed Fakultät, Dissertation.

Di Meo, S. & Venditti, P. (2001) Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept*, **10**, 125-140.

Dill, S. & Rebhun, W. (1985) White muscle disease in foals. *Comp Cont Educ pract Vet*, **7**, 627-635.

Dimock, A. N., Siciliano, P. D. & McIlwraith, C. W. (2000) Evidence supporting an increased presence of reactive oxygen species in the diseased equine joint. *Equine Vet J*, **32**, 439-443.

Divers, T. J., Cummings, J. E., de Lahunta, A., Hintz, H. F. & Mohammed, H. O. (2006) Evaluation of the risk of motor neuron disease in horses fed a diet low in vitamin E and high in copper and iron. *Am J Vet Res*, **67**, 120-126.

Ellis, R., Herdt, T. & Stowe, H. (1997) Physical, hematologic, biochemical, and immunologic effects of supranutritional supplementation with dietary selenium in Holstein cows. *Am J Vet Res*, **58**, 760-764.

Fazio, F., Casella, S., Giannetto, C., Caola, G. & Piccione, G. (2009) Serum homocysteine and oxidative stress evaluation during exercise in horse. *Pol J Vet Sci*, **12**, 169-174.

Ferguson, L. R. & Karunasinghe, N. (2011) Nutrigenetics, nutrigenomics, and selenium. *Front genet*, **2**, 15.

Fernandez, B. M. S., E. D. (1978) Alterations in response of rat white adipocytes to insulin, nor-adrenalin, corticotropin and glucagon after adrenalectomy. *Biochem J*, **174**, 111-118.

Finkel, T. & Holbrook, N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**, 239-247.

Finno, C. J., Valberg, S. J., Wunschmann, A. & Murphy, M. J. (2006) Seasonal pasture myopathy in horses in the midwestern United States: 14 cases (1998-2005). *J Am Vet Med Assoc*, **229**, 1134-1141.

Frape, D. (1998) Equine nutrition and feeding. Blackwell Science Ltd., Oxford.

Fridovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, **64**, 97-112.

Fürll, M., Sattler, T., Dabbagh, M. N., Spielmann, C. & Füll, B. (1999) Etiology and prophylaxis of reperfusion injuries. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*, **106**, 389-393.

Gallagher, K. & Stowe, H. D. (1980) Influence of exercise on serum selenium and peroxide reduction system of racing Standardbreds. *Am J Vet Res*, **41**, 1333-1335.

GfE. (2014) Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Pferde. *Energie- und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere*. DLG-Verlag, Frankfurt am Main.

Gorecka, R., Sitarska, E. & Klucinski, W. (2002) Antioxidant parameters of horses according to age, sex, breed and environment. *Pol J Vet Sci*, **5**, 209-216.

Graham-Thiers, P. M., Kronfeld, D. S., Kline, K. A. & Sklan, D. J. (2001) Dietary protein restriction and fat supplementation diminish the acidogenic effect of exercise during repeated sprints in horses. *J Nutr*, **131**, 1959-1964.

Gramzow, S. (2001) Effekte von Antioxidantien bei landwirtschaftlichen Nutztieren. *Lohmann Information*, **3**, 23-28.

Grandy, J. L., Steffey, E. P., Hodgson, D. S. & Woliner, M. J. (1987) Arterial hypotension and the development of postanesthetic myopathy in halothane-anesthetized horses. *Am J Vet Res*, **48**, 192-197.

Greiwe-Crandell, K., Kronfeld, G. M. U. D., Morrow, G. & Tiegs, W. (1992) Phosphorus and selenium depletion in Thoroughbred mares and weanlings. *Pferdeheilk, Sonderausgabe*, 96-98.

Grulke, S., Benbarek, H., Caudron, I., Deby-Dupont, G., Mathy-Hartert, M., Farnir, F., *et al.* (1999) Plasma myeloperoxidase level and polymorphonuclear leukocyte activation in horses suffering from large intestinal obstruction requiring surgery: preliminary results. *Can J Vet Res*, **63**, 142-147.

Guarente, L. & Kenyon, C. (2000) Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature*, **408**, 255-262.

Haggett, E., Magdesian, K. G., Maas, J., Puschner, B., Higgins, J. & Fiack, C. (2010) Whole blood selenium concentrations in endurance horses. *Vet J*, **186**, 192-196.

Hahn, C. N. & Mayhew, I. G. (1997) Equine neurodegenerative diseases--stressed neurons and other radical ideas. *Vet J*, **154**, 173-174.

Hall, J. A., Van Saun, R. J., Tornquist, S. J., Gradin, J. L., Pearson, E. G. & Wander, R. C. (2004) Effect of type of dietary polyunsaturated fatty acid supplement (corn oil or fish oil) on immune responses in healthy horses. *J Vet Intern Med*, **18**, 880-886.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., (1999) Free Radicals in Biology and Medicine. In 3rd. Ed Oxford University Press, New York.

Hambleton, P. L., Slade, L. M., Hamar, D. W., Kienholz, E. W. & Lewis, L. D. (1980) Dietary fat and exercise conditioning effect on metabolic parameters in the horse. *J Anim Sci*, **51**, 1330-1339.

Hansen, R. A., Savage, C. J., Reidlinger, K., Traub-Dargatz, J. L., Ogilvie, G. K., Mitchell, D., *et al.* (2002) Effects of Dietary Flaxseed Oil Supplementation on Equine Plasma Fatty Acid Concentrations and Whole Blood Platelet Aggregation. *J Vet Int Med*, **16**, 457-463.

Harris, P. A., Pagan, J. D., Crandell, K. G. & Davidson, N. (1999) Effect of feeding Thoroughbred horses a high unsaturated or saturated vegetable oil supplemented diet for 6 months following a 10 month fat acclimation. *Equine Vet J*, **31**, 468-474.

Hayes, J., Stiner, C., Holmes, M. & Mackenzie, S. (1987) Comparison of selenium blood levels and dietary selenium in three breeds of horses. *Equine Pract*, **9**, 25-29.

Heckel, C. (2009) Einfluss von Omega-3-Fettsäuren aus Algen auf das Fettsäurenmuster und auf Knochenparameter beim Pony. In. Lehrstuhl für Tierernährung und Diätik der Tierärztlichen Fakultät der LMU München.

Heffner, J. E. & Repine, J. E. (1989) Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis*, **140**, 531-554.

Heikens, A. (1992) Untersuchungen zum Selengehalt in wirtschaftseigenen Futtermitteln und zur Selenversorgung von Pferden und Wiederkäuern in Ostfriesland. Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation.

Henry, M. M., Moore, J. N., Feldman, E. B., Fischer, J. K. & Russell, B. (1990) Effect of dietary alpha-linolenic acid on equine monocyte procoagulant activity and eicosanoid synthesis. *Circ Shock*, **32**, 173-188.

Hess, T. M., Rexford, J. K., Hansen, D. K., Harris, M., Schauermaun, N., Ross, T., *et al.* (2012) Effects of two different dietary sources of long chain omega-3 highly unsaturated fatty acids on incorporation into the plasma, red blood cell, and skeletal muscle in horses². *J Anim Sci*, **90**, 3023-3031.

Higuchi, T., Ichijo, S., Osame, S. & Ohishi, H. (1989) Studies on serum selenium and tocopherol in white muscle disease of foal. *Nihon Juigaku Zasshi*, **51**, 52-59.

Hill, K. E., Xia, Y., Akesson, B., Boeglin, M. E. & Burk, R. F. (1996) Selenoprotein P concentration in plasma is an index of selenium status in selenium-deficient and selenium-supplemented Chinese subjects. *J Nutr*, **126**, 138-145.

Hoffman, R. M., Kronfeld, D. S., Herbein, J. H., Swecker, W. S., Cooper, W. L. & Harris, P. A. (1998) Dietary carbohydrates and fat influence milk composition and fatty acid profile of Mare's milk. *J Nutr*, **128**, 2708-2711.

Holland, J. L., Kronfeld, D. S. & Meacham, T. N. (1996) Behavior of horses is affected by soy lecithin and corn oil in the diet. *J Anim Sci*, **74**, 1252-1255.

Hospes, R. & Bostedt, K. H. U. (1996) Die Korrelationen zwischen Stute und Fohlen bezüglich der Selen-und Vitamin E-Versorgung im perinatalen Zeitraum. *Pferdeheilk*, **12**, 194-196.

Ivancic, J., Jr. & Weiss, W. P. (2001) Effect of dietary sulfur and selenium concentrations on selenium balance of lactating Holstein cows. *J Dairy Sci*, **84**, 225-232.

Janiak, M., Suska, M., Dudzinska, W. & Skotnicka, E. (2010) Blood glutathione status and activity of glutathione-metabolizing antioxidant enzymes in erythrocytes of young trotters in basic training. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, **94**, 137-145.

Jansen, W. L., Geelen, S. N., van der Kuilen, J. & Beynen, A. C. (2002) Dietary soyabean oil depresses the apparent digestibility of fibre in trotters when substituted for an iso-energetic amount of corn starch or glucose. *Equine Vet J*, **34**, 302-305.

Jansen, W. L., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M., Cone, J. W., De Vries, H. T., Hallebeek, J. M., Hovenier, R., *et al.* (2007) Studies on the mechanism by which a high intake of soybean oil depresses the apparent digestibility of fibre in horses. *Anim Feed Sci Technol*, **138**, 298-308.

Jansen, W. L., van der Kuilen, J., Geelen, S. N. & Beynen, A. C. (2000) The effect of replacing nonstructural carbohydrates with soybean oil on the digestibility of fibre in trotting horses. *Equine Vet J*, **32**, 27-30.

Jansen, W. L., van der Kuilen, J., Geelen, S. N. & Beynen, A. C. (2001) The apparent digestibility of fibre in trotters when dietary soybean oil is substituted for an iso-energetic amount of glucose. *Arch Tierernähr*, **54**, 297-304.

Jeroch, H., Drochner, W. & Simon, O. (2008) Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere; Ernährungsphysiologie, Futtermittelkunde, Fütterung, 2. überarbeitete Auflage. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart.

Juniper, D. T., Phipps, R. H., Ramos-Morales, E. & Bertin, G. (2008) Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in beef cattle. *J Anim Sci*, **86**, 3100-3109.

Kaminski, K. A., Bonda, T. A., Korecki, J. & Musial, W. J. (2002) Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol*, **86**, 41-59.

Karren, B. J., Thorson, J. F., Cavinder, C. A., Hammer, C. J. & Coverdale, J. A. (2010) Effect of selenium supplementation and plane of nutrition on mares and their foals: selenium concentrations and glutathione peroxidase. *J Anim Sci*, **88**, 991-997.

Keen, J. A., McLaren, M., Chandler, K. J. & McGorum, B. C. (2004) Biochemical indices of vascular function, glucose metabolism and oxidative stress in horses with equine Cushing's disease. *Equine Vet J*, **36**, 226-229.

Khol-Parisini, A., van den Hoven, R., Leinker, S., Hulan, H. W. & Zentek, J. (2007) Effects of feeding sunflower oil or seal blubber oil to horses with recurrent airway obstruction. *Can J Vet Res*, **71**, 59-65.

Kiem, J. (1988) Selenium in platelets. *Biol Trace Elem Res*, **15**, 83-88.

Kienzle, E., Freismuth, A. & Reusch, A. (2006) Double-blind placebo-controlled vitamin E or selenium supplementation of sport horses with unspecified muscle problems. An example of the potential of placebos. *J Nutr*, **136**, 2045-2047.

King, S. S., Abughazaleh, A. A., Webel, S. K. & Jones, K. L. (2008) Circulating fatty acid profiles in response to three levels of dietary omega-3 fatty acid supplementation in horses. *J Anim Sci*, **86**, 1114-1123.

Kirschvink, N., Art, T., de Moffarts, B., Smith, N., Marlin, D., Roberts, C., *et al.* (2002) Relationship between markers of blood oxidant status and physiological variables in healthy and heaves-affected horses after exercise. *Equine Vet J Suppl*, **34**, 159-164.

Kirschvink, N., Art, T., Smith, N. & Lekeux, P. (1999) Effect of exercise and COPD crisis on isoprostane concentration in plasma and bronchoalveolar lavage fluid in horses. *Equine Vet J Suppl*, **30**, 88-91.

Kirschvink, N., de Moffarts, B. & Lekeux, P. (2008) The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *Vet J*, **177**, 178-191.

Kirschvink, N., Fievez, L., Bougnet, V., Art, T., Degand, G., Smith, N., *et al.* (2002) Effect of nutritional antioxidant supplementation on systemic and pulmonary antioxidant status, airway inflammation and lung function in heaves-affected horses. *Equine Vet J*, **34**, 705-712.

Kleczkowski, M., Klucinski, W., Sikora, J. & Zdanowicz, M. (2004) Role of antioxidants in the protection against oxidative stress in cattle--trace elements and enzymatic mechanisms (Part 3). *Pol J Vet Sci*, **7**, 233-240.

Kleene, K. C. (1994) The mitochondrial capsule selenoprotein—a structural protein in the mitochondrial capsule of mammalian sperm. In *Selenium in Biology and Human Health* (ed. by F. R., Burk), 133-149. Springer Verlag, Heidelberg.

Kobayashi, T., Tsunawaki, S. & Seguchi, H. (2001) Evaluation of the process for superoxide production by NADPH oxidase in human neutrophils: evidence for cytoplasmic origin of superoxide. *Redox Rep*, **6**, 27-36.

Koenig, K. M., Rode, L. M., Cohen, R. D. & Buckley, W. T. (1997) Effects of diet and chemical form of selenium on selenium metabolism in sheep. *J Anim Sci*, **75**, 817-827.

Koller, L. D. & Exon, J. H. (1986) The two faces of selenium-deficiency and toxicity--are similar in animals and man. *Can J Vet Res*, **50**, 297.

Koller, L. D., Whitbeck, G. A. & South, P. J. (1984) Transplacental transfer and colostrum concentrations of selenium in beef cattle. *Am J Vet Res*, **45**, 2507-2510.

Kooreman, K., Babbs, C. & Fessler, J. (1998) Effect of ischemia and reperfusion on oxidative processes in the large colon and jejunum of horses. *Am J Vet Res*, **59**, 340-346.

Kowaltowski, A. J. & Vercesi, A. E. (1999) Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, **26**, 463-471.

Kupper, J. N., H.; Eser, M.W. (2010) Praxisrelevante Vergiftungen bei Pferden. *Prakt Tierarzt* **91**, 492-498.

Lema, O. E., Carter, J. Y., Arube, P. A., Munafu, C. G., Wangai, M. W. & Rees, P. H. (1994) Evaluation of the alkaline haematin D-575 method for haemoglobin estimation in east Africa. *Bull World Health Organ*, **72**, 937-941.

Lepage, G. & Roy, C. C. (1986) Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res*, **27**, 114-120.

Levander, O. A. (1985) Considerations on the assessment of selenium status. *Fed Proc*, **44**, 2579-2583.

- Levander, O. A., Alfthan, G., Arvilommi, H., Gref, C. G., Huttunen, J. K., Kataja, M., *et al.* (1983) Bioavailability of selenium to Finnish men as assessed by platelet glutathione peroxidase activity and other blood parameters. *Am J Clin Nutr*, **37**, 887-897.
- Lewis, L. D. (1995) Equine clinical nutrition: feeding and care. 119-120, Williams & Wikings, London.
- Lindsay, W. A., McDonell, W. & Bignell, W. (1980) Equine postanesthetic forelimb lameness: intracompartmental muscle pressure changes and biochemical patterns. *Am J Vet Res*, **41**, 1919-1924.
- Lofstedt, J. (1997) White muscle disease of foals. *Vet Clin North Am Equine Pract*, **13**, 169-185.
- Loftus, J. P., Belknap, J. K., Stankiewicz, K. M. & Black, S. J. (2007) Laminar xanthine oxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the prodromal stage of black-walnut induced equine laminitis. *Equine Vet J*, **39**, 48-53.
- Luther, D. G., Cox, H. U. & Dimopoulos, G. T. (1982) Fatty acid composition of equine erythrocytes. *Am J Vet Res*, **43**, 1006-1008.
- Luther, D. G., Cox, H. U. & Dimopoulos, G. T. (1981) Fatty acid composition of equine plasma. *Am J Vet Res*, **42**, 91-93.
- Lykkesfeldt, J. & Svendsen, O. (2007) Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J*, **173**, 502-511.
- Mahan, D. C., Cline, T. R. & Richert, B. (1999) Effects of dietary levels of selenium-enriched yeast and sodium selenite as selenium sources fed to growing-finishing pigs on performance, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity, carcass characteristics, and loin quality. *J Anim Sci*, **77**, 2172-2179.
- Mahan, D. C. & Parrett, N. A. (1996) Evaluating the efficacy of selenium-enriched yeast and sodium selenite on tissue selenium retention and serum glutathione peroxidase activity in grower and finisher swine. *J Anim Sci*, **74**, 2967-2974.
- Marlin, D. J., Fenn, K., Smith, N., Deaton, C. D., Roberts, C. A., Harris, P. A., *et al.* (2002) Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. *J Nutr*, **132**, 1622-1627.
- Martin, G. M., Austad, S. N. & Johnson, T. E. (1996) Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nat Genet*, **13**, 25-34.
- Mates, J. M. (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicol*, **153**, 83-104.

- Matsuki, N., Tamura, S., Ono, K., Watari, T., Goitsuka, R., Yamanobe, A., *et al.* (1991) Exercise-induced phospholipid degradation in the equine skeletal muscle and erythrocytes. *J Vet Med Sci*, **53**, 1001-1007.
- Maughan, R. J. (1999) Role of micronutrients in sport and physical activity. *Br Med Bull*, **55**, 683-690.
- Mauron, J. L., P. (1987) Dietary phosphatidylcholine as a precursor of brain acetylcholine. Vevy/Raven Press, New York.
- Maylin, G. A., Rubin, D. S. & Lein, D. H. (1980) Selenium and vitamin E in horses. *Cornell Vet*, **70**, 272-289.
- McCann, M. E., Moore, J. N., Carrick, J. B. & Barton, M. H. (2000) Effect of intravenous infusion of omega-3 and omega-6 lipid emulsions on equine monocyte fatty acid composition and inflammatory mediator production in vitro. *Shock*, **14**, 222-228.
- McFarlane, D. & Cribb, A. E. (2005) Systemic and pituitary pars intermedia antioxidant capacity associated with pars intermedia oxidative stress and dysfunction in horses. *Am J Vet Res*, **66**, 2065-2072.
- McGorum, B. C., Fry, S. C., Wallace, G., Coenen, K., Robb, J., Williamson, G., *et al.* (2000) Properties of herbage in relation to equine dysautonomia: biochemical composition and antioxidant and prooxidant actions. *J Agric Food Chem*, **48**, 2346-2352.
- McGorum, B. C., Mayhew, I. G., Amory, H., Deprez, P., Gillies, L., Green, K., *et al.* (2006) Horses on pasture may be affected by equine motor neuron disease. *Equine Vet J*, **38**, 47-51.
- McGorum, B. C., Wilson, R., Pirie, R. S., Mayhew, I. G., Kaur, H. & Aruoma, O. I. (2003) Systemic concentrations of antioxidants and biomarkers of macromolecular oxidative damage in horses with grass sickness. *Equine Vet J*, **35**, 121-126.
- McMeniman, N. P. & Hintz, H. F. (1992) Effect of vitamin E status on lipid peroxidation in exercised horses. *Equine Vet J*, **24**, 482-484.
- McPherson, A., Garnsworthy, P. & Cole, D. (1994) Selenium, vitamin E and biological oxidation. In *Proceedings of the Recent Adv Anim Nutr*, 3-30. Nottingham University Press.
- Meijer, A. E. & van den Hoven, R. (1990) [Histochemical and biochemical changes in skeletal muscles of rhabdomyolysis-sensitive racehorses following exertion. III: Elevated activity of various antioxidant enzymes]. *Acta Histochem*, **89**, 113-119.
- Menn, M. (2006) Auswirkungen des Hypoxietrainings von Maultieren und Haflingern auf den oxidativen Stress und die Leistungsfähigkeit. LMU München, Tierärztl Fakultät, Dissertation.
- Meyer, H. & Coenen, M. (2014) *Pferdefütterung*. Thieme Verlag, Stuttgart.

- Miller, Brzezinska-Slebodzinska, E. & Madsen, F. C. (1993) Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J Dairy Sci*, **76**, 2812-2823.
- Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M. & Rice-Evans, C. A. (1996) Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett*, **384**, 240-242.
- Mills, P. C. & Higgins, A. J. (1997) Oxidant injury, nitric oxide and pulmonary vascular function: implications for the exercising horse. *Vet J*, **153**, 125-148.
- Mills, P. C., Smith, N. C., Casas, I., Harris, P., Harris, R. C. & Marlin, D. J. (1996) Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, **74**, 60-66.
- Montgomery, J. B., Wichtel, J. J., Wichtel, M. G., McNiven, M. A., McClure, J. T., Markham, F., *et al.* (2012) Effects of selenium source on measures of selenium status and immune function in horses. *Can J Vet Res*, **76**, 281-291.
- Müller-Peddinghaus, R. (1987) Pathophysiologie und Pharmakologie reaktiver Sauerstoffspezies bei der Entzündung. *Arzneim.-Forsch/Drug*, **37(I)a**, 589-600.
- Muller, A., Bertram, A. & Moschos, A. (2012) Differences in the selenium supply of horses across Europe. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, **40**, 157-166.
- Munsterman, A. S., Bertone, A. L., Zachos, T. A. & Weisbrode, S. E. (2005) Effects of the omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid, on lipopolysaccharide-challenged synovial explants from horses. *Am J Vet Res*, **66**, 1503-1508.
- Nagakura, T., Matsuda, S., Shichijyo, K., Sugimoto, H. & Hata, K. (2000) Dietary supplementation with fish oil rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids in children with bronchial asthma. *Eur Respir J*, **16**, 861-865.
- Newsholme, E. A. L., A. R. (1983) Integration of carbohydrate and lipid metabolism. John Wiley & Sons Ltd, Hoboken.
- Niedzwiedz, A., Kubiak, K. & Nicpon, J. (2013) Plasma total antioxidant status in horses after 8-hours of road transportation. *Acta Vet Scand*, **55**, 58.
- Niedzwiedz, A., Nicpon, J., Zawadzki, M., Sluzewska-Niedzwiedz, M. & Januszewska, L. (2012) The influence of road transport on the activities of glutathione reductase, glutathione peroxidase, and glutathione-S-transferase in equine erythrocytes. *Vet Clin Pathol*, **41**, 123-126.
- Nieß, A. M., Striegel, H., Hipp, A., Hansel, J., Simon, P. (2008) Antioxidant supplementation in sports - sense or non-sense? *Deutsch Zeitschr Sportmed*, **59**, 55-61.

- Nivière, V., Fontecave, M. (1995) Biological sources of reduced oxygen species. In *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. (ed. by A. E. Favier, Cadet, J., Kalyanaraman, B., Fontecave, M., Pierre, J.L.), 11-19. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Nogradi, N., Couetil, L. L., Messick, J., Stochelski, M. A. & Burgess, J. R. (2015) Omega-3 fatty acid supplementation provides an additional benefit to a low-dust diet in the management of horses with chronic lower airway inflammatory disease. *J Vet Intern Med*, **29**, 299-306.
- Noguchi, N., Niki, E. (1999) Chemistry of active oxygen species and antioxidants. In *Papas, A.M. (Ed.), Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*. CRC Press LLC, London.
- Notin, C., Vallon, L., Desbordes, F. & Leleu, C. (2010) Oral supplementation with superoxide dismutase in Standardbred trotters in training: a double-blind placebo-controlled study. *Equine Vet J Suppl*, **38**, 375-381.
- O'Connor, C. I., Lawrence, L. M. & Hayes, S. H. (2007) Dietary fish oil supplementation affects serum fatty acid concentrations in horses. *J Anim Sci*, **85**, 2183-2189.
- O'Connor, C. I., Lawrence, L. M., Lawrence, A. C., Janicki, K. M., Warren, L. K. & Hayes, S. (2004) The effect of dietary fish oil supplementation on exercising horses. *J Anim Sci*, **82**, 2978-2984.
- O'Neill, W., McKee, S. & Clarke, A. F. (2002) Flaxseed (*Linum usitatissimum*) supplementation associated with reduced skin test lesional area in horses with *Culicoides* hypersensitivity. *Can J Vet Res*, **66**, 272-277.
- Ohlenschläger, G. (1995) Was sind freie Radikale? *GIT-Labormedizin*, **18**, 337-349.
- Orme, C. E., Dunnett, M. & Harris, R. C. (1994) Variation in the concentration of long chain free fatty acids in equine plasma over 24 hours. *Br Vet J*, **150**, 339-347.
- Orme, C. E., Harris, R. C., Marlin, D. J. & Hurley, J. (1997) Metabolic adaptation to fat-supplemented diet by the thoroughbred horse. *Br J Nutr*, **78**, 443-458.
- Owen, R. a. R., Moore, J., Hopkins, J. & Arthur, D. (1977) Dystrophic myodegeneration in adult horses. *J Am Vet Med Assoc*, **171**, 343-349.
- Pagan, J. D. (1998) *Advances in equine nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham.
- Paglia, D. E. & Valentine, W. N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, **70**, 158-169.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Di Venosa, N., Serena, D. & Ruggiero, F. M. (1999) Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med*, **27**, 42-50.

- Parks, D. A., Shah, A. K. & Granger, D. N. (1984) Oxygen radicals: effects on intestinal vascular permeability. *Am J Physiol*, **247**, 167-170.
- Piccione, G., Assenza, A., Borruso, M., Fazio, F. & Caola, G. (2009) Daily pattern of some fatty acids in the athletic horse. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, **93**, 7-14.
- Po, E., Williams, C., Muscatello, G. & Celi, P. (2013) Assessment of oxidative stress biomarkers in exhaled breath condensate and blood of Thoroughbred foals. *Vet J*, **196**, 269-271.
- Podoll, K. L., Bernard, J. B., Ullrey, D. E., DeBar, S. R., Ku, P. K. & Magee, W. T. (1992) Dietary selenate versus selenite for cattle, sheep, and horses. *J Anim Sci*, **70**, 1965-1970.
- Portier, K., de Moffarts, B., Fellman, N., Kirschvink, N., Motta, C., Letellierw, C., *et al.* (2006) The effects of dietary N-3 and antioxidant supplementation on erythrocyte membrane fatty acid composition and fluidity in exercising horses. *Equine Vet J Suppl*, 279-284.
- Puls, R. (1994) Vitamin levels in animal health. Sherpa International, Clearbrook.
- Richardson, S., Siciliano, P., Engle, T., Larson, C. & Ward, T. (2006) Effect of selenium supplementation and source on the selenium status of horses. *J Anim Sci*, **84**, 1742-1748.
- Roneus, B. & Lindholm, A. (1983) Glutathione peroxidase activity in the blood of healthy horses given different selenium supplementation. *Nord Vet Med*, **35**, 337-345.
- Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G. & Hoekstra, W. G. (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, **179**, 588-590.
- Ruggiero, C., Lattanzio, F., Lauretani, F., Gasperini, B., Andres-Lacueva, C. & Cherubini, A. (2009) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and immune-mediated diseases: inflammatory bowel disease and rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des*, **15**, 4135-4148.
- Schmidt, K. & Bayer, W. (1988) Selen-aktueller wissenschaftlicher Erkenntnisstand. *Vit Min Spur*, **3**, 1-20.
- Schneider, N., Mouithys-Mickalad, A. L., Lejeune, J. P., Deby-Dupont, G. P., Hoebeke, M. & Serteyn, D. A. (2005) Synoviocytes, not chondrocytes, release free radicals after cycles of anoxia/re-oxygenation. *Biochem Biophys Res Commun*, **334**, 669-673.
- Schrauzer, G. N. (2000) Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *J Nutr*, **130**, 1653-1656.
- Schwarz, F. & Kirchgessner, M. (1979) Spurenelementbedarf und-Versorgung in der Pferdefütterung. *Übers Tierernährg*, **7**, 257.

Seidel, A. (2004) Der Einfluss langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren auf die Fettsäurezusammensetzung einer caninen Mastocytomzelllinie. Universität Leipzig, Veterinärmed Fakultät, Dissertation.

Sertejn, D., Mottart, E., Deby, C., Deby-Dupont, G., Pincemail, J., Philipart, C., *et al.* (1990) Equine postanaesthetic myositis: a possible role for free radical generation and membrane lipoperoxidation. *Res Vet Sci*, **48**, 42-46.

Shellow, J. S., Jackson, S. G., Baker, J. P. & Cantor, A. H. (1985) The influence of dietary selenium levels on blood levels of selenium and glutathione peroxidase activity in the horse. *J Anim Sci*, **61**, 590-594.

Sies, H. & Cadenas, E. (1985) Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **311**, 617-631.

Simopoulos, A. P. (1999) Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr*, **70**, 560-569.

Simopoulos, A. P. (2002) Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr*, **21**, 495-505.

Sipka, S., Dey, I., Buda, C., Csongor, J., Szegedi, G. & Farkas, T. (1996) The mechanism of inhibitory effect of eicosapentaenoic acid on phagocytic activity and chemotaxis of human neutrophil granulocytes. *Clin Immunol Immunopathol*, **79**, 224-228.

Smarsch, D. N., Liburt, N., Streltsova, J., McKeever, K. & Williams, C. A. (2010) Oxidative stress and antioxidant status in intensely exercising horses administered nutraceutical extracts. *Equine Vet J*, **42**, 317-322.

Snyder, J. R. (1989) The pathophysiology of intestinal damage: effects of luminal distention and ischemia. *Vet Clin North Am Equine Pract*, **5**, 247-270.

Spencer, J. P., Jenner, A., Butler, J., Aruoma, O. I., Dexter, D. T., Jenner, P., *et al.* (1996) Evaluation of the pro-oxidant and antioxidant actions of L-DOPA and dopamine in vitro: implications for Parkinson's disease. *Free Radic Res*, **24**, 95-105.

Stashak, T. S. (2008) Adams' lameness in horses. Verlag M. & H. Schaper, Hannover.

Step, D., Divers, T., Cooper, B., Kallfelz, F., Karcher, L. & Rebhun, W. (1991) Severe masseter myonecrosis in a horse. *J Am Vet Med Assoc*, **198**, 117-119.

Stohrer, Hammer, B., Hammer, R., Brincker, B. & Stangassinger, M. (2002) Oxidativer Stress infolge extremer physischer Belastung. *Tierärztl. Praxis*, **30**, 266-270.

Stowe, H. D. (1967) Serum selenium and related parameters of naturally and experimentally fed horses. *J Nutr*, **93**, 60-64.

Streeter, R. M., Divers, T. J., Mittel, L., Korn, A. E. & Wakshlag, J. J. (2012) Selenium deficiency associations with gender, breed, serum vitamin E and creatine kinase, clinical signs and diagnoses in horses of different age groups: a retrospective examination 1996-2011. *Equine Vet J Suppl*, **43**, 31-35.

Sunde, R. A. & Hoekstra, W. G. (1980) Structure, synthesis and function of glutathione peroxidase. *Nutr Rev*, **38**, 265-273.

Svardal, A. M., Mansoor, M. A. & Ueland, P. M. (1990) Determination of reduced, oxidized, and protein-bound glutathione in human plasma with precolumn derivatization with monobromobimane and liquid chromatography. *Anal Biochem*, **184**, 338-346.

Tan, R. H., Thatcher, C. D., Buechner-Maxwell, V., Christmann, U., Crisman, M. V. & Werre, S. R. (2010) Measurement of ascorbic acid concentration and glutathione peroxidase activity in biological samples collected from horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res*, **71**, 1500-1507.

Thorson, J. F., Karren, B. J., Bauer, M. L., Cavinder, C. A., Coverdale, J. A. & Hammer, C. J. (2010) Effect of selenium supplementation and plane of nutrition on mares and their foals: foaling data. *J Anim Sci*, **88**, 982-990.

Ullrey, D. E. (1987) Biochemical and physiological indicators of selenium status in animals. *J Anim Sci*, **65**, 1712-1726.

van der Harst, M., Bull, S., Brama, P. A., Barneveld, A. B., van Weeren, P. R. & van de Lest, C. (2006) Nitrite and nitrotyrosine concentrations in articular cartilage, subchondral bone, and trabecular bone of normal juvenile, normal adult, and osteoarthritic adult equine metacarpophalangeal joints. *J Rheumatol*, **33**, 1662-1667.

Vineyard, K. R., Warren, L. K. & Kivipelto, J. (2010) Effect of dietary omega-3 fatty acid source on plasma and red blood cell membrane composition and immune function in yearling horses. *J Anim Sci*, **88**, 248-257.

Westermann, C. M., Dorland, B., de Sain-van der Velden, M. G., Wijnberg, I. D., van Breda, E., de Graaf-Roelfsema, E., *et al.* (2008) Plasma acylcarnitine and fatty acid profiles during exercise and training in Standardbreds. *Am J Vet Res*, **69**, 1469-1475.

White, A., Estrada, M., Walker, K., Wisnia, P., Filgueira, G., Valdes, F., *et al.* (2001) Role of exercise and ascorbate on plasma antioxidant capacity in thoroughbred race horses. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, **128**, 99-104.

Wiesner, E., Berschneider, F., Neuffer, K. & Menzel, M. (1974) Selenwerte in Futtermitteln. *Archives Anim Nutr*, **24**, 601-609.

Wilken, H. & Füll, M. (2002) Antioxidativer (TEAC) und Endotoxin-Status bei gesunden Kühen unterschiedlicher Leistungsebenen. *11. Jahrestagung Dtsch Vet Med Ges, Fachg Innere Med und Klin Lab Diag*, 34-35.

- Williams, C. A. & Carlucci, S. A. (2006) Oral vitamin E supplementation on oxidative stress, vitamin and antioxidant status in intensely exercised horses. *Equine Vet J Suppl*, **36**, 617-621.
- Williams, C. A., Kronfeldt, D. S., Hess, T. M., Saker, K. E., Waldron, J. N., Crandell, K. M., *et al.* (2004) Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. *J Anim Sci*, **82**, 588-594.
- Winnefeld, K. (1996) Antioxidantien und Radikale: Analytik und klinische Bedeutung. In *J Lab Med.*, pp. 199-204.
- Winter, N., A. (2009) Untersuchung des antioxidativen Status des Pferdes bei unterschiedlichen Fütterungsprotokollen. In: Universität Leipzig, Veterinärmed Fakultät, Dissertation.
- Wolffram, S. (1995) Mechanisms of intestinal absorption of selenium. *Med Klin (Munich)*, **90** Suppl 1, 1-5.
- Wolffram, S. (2000) Metabolism of nutritionally relevant inorganic and organic forms of selenium. *Übers Tierernährg*, **28**, 65-94.
- Wolffram, S. & Scharrer, E. (1988) Bioverfügbarkeit und intestinale Absorption des Spurenelements Selen. *Übers. Tierernährung*, **16**, 247-264.
- Wright, P. & Bell, M. (1964) Selenium-75 metabolism in the gestating ewe and fetal lamb: effects of dietary α -tocopherol and selenium. *J Nutr*, **84**, 49-57.
- Young, I. S. & Woodside, J. V. (2001) Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, **54**, 176-186.
- Youssef, M. A., El-Khodery, S. A. & Ibrahim, H. M. (2012) Antioxidant Trace Elements in Serum of Draft Horses with Acute and Chronic Lower Airway Disease. *Biol Trace Elem Res*.
- Zentek, J. (1991) Myopathien in einem Reitpferdebestand. *Tierärztl. Prax*, **19**, 167-169.
- Zeyner, A. (2002) Ernährungsphysiologische Wirkung eines Austausches von stärkereichen Komponenten durch Sojaöl in der Reitpferdeernährung. Georg-August-Universität Göttingen, Habilitationsschrift.
- Zeyner, A., Kirbach, H. & Füll, M. (2002) Effects of substituting starch with fat on the acid-base and mineral status of female horses. *Equine Vet J Suppl*, **34**, 85-91.
- Ziboh, V. A., Miller, C. C. & Cho, Y. (2000) Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. *Am J Clin Nutr*, **71**, 361-366.

Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jürgen Zentek für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit bedanken. Er hat mit großem Einsatz die Entstehung meiner Dissertation konstruktiv gefördert und hatte immer ein offenes Ohr für meine Probleme und Anliegen.

Des Weiteren danke ich der Firma „Lexa Pferdefutter“, im Besonderen Herrn Reinhard Rauch, die die Rezeptur Ihrer Mineralfuttermischung entsprechend den Anforderungen der vorliegenden Studie modifizierten.

Meinen besonderen Dank richte ich an Herrn Dr. Dietrich von Boetticher, der mir die Jährlinge seines Gestütes für diese Untersuchung zur Verfügung stellte.

Für die tatkräftige Unterstützung bei den Blutprobenentnahmen danke ich Herrn Dr. Thomas Möllmann und seinem Team.

Mein innigster Dank sei meinen Eltern, Adalbert und Eva Rauch, ausgesprochen, die meinen beruflichen Weg zu jeder Zeit sowohl emotional als auch finanziell unterstützten und es mir somit ermöglichten meine Passion zum Beruf zu machen!

Selbstständigkeitserklärung

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

Berlin, 25.04.2018

Dominique Rauch



9 783863 878917

mbvberlin | mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-891-7