

Aus dem Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik  
Veterinärwissenschaftliches Departement  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. W. A. Rambeck

## Einfluss von Omega-3-Fettsäuren aus Algen auf das Fettsäuremuster und auf Knochenparameter beim Pony

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

**Claudia Heckel**

aus Heilbronn

München 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun  
Berichterstatter: Prof.-Dr. Rambeck  
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Kölle

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>VERZEICHNIS DER IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN .....</b>   | <b>11</b> |
| <b>1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG .....</b>   | <b>14</b> |
| <b>2 LITERATURÜBERSICHT .....</b>   | <b>16</b> |
| 2.1 FETTSÄUREN .....  | 16        |
| 2.1.1 <i>Biosynthese der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) .....</i>  | 16        |
| 2.1.2 <i>PUFAs im Organismus .....</i>  | 19        |
| 2.1.3 <i>Veränderungen im Verhältnis von <math>\Omega</math>-3- und <math>\Omega</math>-6-Fettsäuren in der Ernährung.....</i>              | 20        |
| 2.1.4 <i>Zufuhr von PUFAs .....</i>   | 22        |
| 2.1.5 <i>Funktionen der PUFAs .....</i>   | 23        |
| 2.1.6 <i>Omega-Fettsäuren.....</i>  | 26        |
| 2.1.7 <i>Natürliche Quellen von <math>\Omega</math>-3-Fettsäuren in Nahrungsmitteln.....</i>  | 28        |
| 2.1.7.1 <i>Pflanzenöle als Quellen von <math>\Omega</math>-3-Fettsäuren.....</i>  | 28        |
| 2.1.7.2 <i>Fisch als Quelle von <math>\Omega</math>-3-Fettsäuren .....</i>  | 29        |
| 2.1.7.3 <i>Algen als Quelle von <math>\Omega</math>-3-Fettsäuren .....</i>  | 32        |
| 2.2 EINFLUSS VON FETTEN AUF DIE FUTTERAUFNAHME DES PFERDES.....   | 37        |
| 2.2.1 <i>Besonderheiten des Fettsäureumsatzes beim Pferd .....</i>  | 38        |
| 2.2.2 <i>Anwendung diätischer Verabreichungen von PUFAs beim Pferd .....</i>  | 38        |
| 2.2.3 <i>Fettsäuremuster des Pferdes nach Fütterung von <math>\Omega</math>-6 .....</i><br><i>und <math>\Omega</math>-3 Fettsäuren.....</i> | 40        |
| 2.2.4 <i>Aufnahme und Speicherung von <math>\Omega</math>-3 und <math>\Omega</math>-6 Fettsäuren beim Pferd....</i>                         | 40        |
| 2.3 EINFLUSS VON $\Omega$ -3-FETTSÄUREN AUF DEN KNOCHENSTOFFWECHSEL .....   | 41        |
| 2.3.1 <i>Physiologie des Knochens.....</i>  | 41        |
| 2.3.2 <i>Wirkung von <math>\Omega</math>-Fettsäuren auf den Knochen.....</i>  | 44        |
| 2.4 UNTERSUCHUNG DES KNOCHENSTOFFWECHSELS DURCH VERWENDUNG<br>VERSCHIEDENER KNOCHENMARKER.....  | 46        |
| 2.4.1 <i>Knochenmarker der Formation .....</i>  | 46        |
| 2.4.2 <i>Knochenmarker der Resorption .....</i>   | 49        |
| 2.4.3 <i>Calciumausscheidung im Urin .....</i>  | 50        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>3</b> | <b>MATERIAL UND METHODEN</b>  | <b>52</b> |
| 3.1      | VERSUCHSTIERE UND VERSUCHSTIERHALTUNG                                     | 52        |
| 3.2      | VERSUCHSFUTTER  | 53        |
| 3.3      | ENERGIEZUTEILUNG UND FUTTERZUTEILUNG                                      | 53        |
| 3.4      | DHA GOLD ALGE®  | 54        |
| 3.5      | FÜTTERUNG DER TIERE   | 56        |
| 3.6      | VERSUCHSAUFBAU  | 56        |
| 3.7      | PROBENNAHME   | 56        |
| 3.7.1    | <i>Blutgewinnung</i>  | 56        |
| 3.7.2    | <i>Uringewinnung</i>  | 57        |
| 3.8      | BESTIMMUNG DER URINPARAMETER  | 58        |
| 3.8.1    | <i>Collagen- Crosslinks Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD)</i> | 58        |
| 3.8.2    | <i>Creatinin</i>  | 60        |
| 3.8.3    | <i>Calcium</i>  | 61        |
| 3.8.3.1  | Berechnung zur Schätzung der Harnvolumina                                 | 61        |
| 3.9      | BESTIMMUNG DER SERUMPARAMETER   | 62        |
| 3.9.1    | <i>Gesamtalkalische Phosphatase</i>                                       | 62        |
| 3.9.2    | <i>Osteocalcin (OC)</i>   | 63        |
| 3.10     | FETTSÄURENANALYSE IM SERUM  | 63        |
| <b>4</b> | <b>ERGEBNISSE</b>   | <b>65</b> |
| 4.1      | KLINISCHE BEOBACHTUNG:  | 65        |
| 4.2      | WIRKSTOFFAUFNAHME (DHA-MENGE):  | 66        |
| 4.3      | SERUMANALYSEN   | 67        |
| 4.3.1    | <i>Ω-3-Fettsäuren</i>   | 67        |
| 4.3.2    | <i>Ω-6-Fettsäuren</i>   | 68        |
| 4.3.3    | <i>Gesamtalkalische Phosphatase (ALP) im Serum</i>                        | 70        |
| 4.3.4    | <i>Osteocalcin im Serum</i>   | 70        |
| 4.4      | URINANALYSEN  | 71        |
| 4.4.1    | <i>Collagen-Crosslinks</i>  | 71        |
| 4.4.2    | <i>Calcium im Urin</i>  | 72        |
| 4.5      | KORRELATIONEN   | 73        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| <b>5</b> | <b>DISKUSSION .....</b>                      | <b>77</b>  |
| 5.1      | VERSUCHSAUFBAU UND VERSUCHSDURCHFÜHRUNG..... | 77         |
| 5.2      | GEWICHTSENTWICKLUNG DER TIERE.....           | 78         |
| 5.3      | OMEGA-6-FETTSÄUREN.....                      | 79         |
| 5.4      | OMEGA-3-FETTSÄUREN.....                      | 81         |
| 5.5      | BESTIMMUNG DER KNOCHENPARAMETER .....        | 83         |
| 5.5.1    | <i>Gesamtalkalische Phosphatase.....</i>     | <i>84</i>  |
| 5.5.2    | <i>Osteocalcin.....</i>                      | <i>84</i>  |
| 5.5.3    | <i>Collagen-Crosslinks.....</i>              | <i>86</i>  |
| 5.5.4    | <i>Calcium im Urin .....</i>                 | <i>87</i>  |
| <b>6</b> | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>                 | <b>88</b>  |
| <b>7</b> | <b>SUMMARY .....</b>                         | <b>89</b>  |
| <b>8</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>            | <b>90</b>  |
| <b>9</b> | <b>DANKSAGUNG.....</b>                       | <b>111</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Struktur der Omega-Fettsäuren .....   | 17 |
| Abbildung 2: Syntheseschritte der mehrfach ungesättigten Fettsäuren.....   | 19 |
| Abbildung 3: Hypothetisches Schema zur Aufnahme von Fett und Fettsäuren in<br>Prozent der Kalorien an Fett sowie von Vitaminen E und C in mg/ Tag<br>(nach Simopoulos, 1999).....  | 22 |
| Abbildung 4: Protektive Wirkungen von $\Omega$ -3-Fettsäuren bei kardiovaskulären<br>Erkrankungen (nach Hahn et al., 2002).....  | 26 |
| Abbildung 5: Versuchsaufbau im zeitlichen Verlauf.....   | 65 |
| Abbildung 6: Verlauf der durchschnittlichen Gewichtsentwicklung der Ponies (in<br>kg) während der verschiedenen Versuchsperioden. Vorperiode (Woche 0-<br>6), Algenperiode (Woche 6-18) und Nachperiode (Woche 18-24).....                                       | 79 |
| Abbildung 7: Entwicklung der beiden $\Omega$ -6-Fettsäuren Arachidonsäure (ARA; C<br>20:4) und Linolsäure (LA; C 18:2) zum Ende der jeweiligen<br>Versuchsabschnitte Vorperiode, Algenperiode und Nachperiode in % der<br>Gesamtfettsäuren (GF).....             | 81 |
| Abbildung 8: Entwicklung der $\Omega$ -3-Fettsäure Docosahexaensäure (DHA; C 22:6)<br>zum Ende der Vorperiode, während der Algenperiode und zum Ende der<br>Nachperiode in % der Gesamtfettsäuren (GF) .....   | 82 |
| Abbildung 9: Entwicklung der beiden $\Omega$ -3-Fettsäuren Docosahexaensäure<br>(DHA; C 22:6) und Eicosapentaensäure (EPA; C 20:5) zum Ende der<br>jeweiligen Versuchsabschnitte Vorperiode, Algenperiode und Nachperiode<br>in % der Gesamtfettsäuren (GF)..... | 83 |
| Abbildung 10: Durchschnittliche Konzentration der beiden Crosslinks Pyridinolin<br>(PYD) und Desoxypyridinolin (DPD) in nmol/mmol Creatinin während der<br>Versuchsabschnitte Vorperiode, Algenperiode und Nachperiode .....                                     | 86 |

## Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1: PUFA-Gehalt verschiedener pflanzlicher Öle (modifiziert nach Singer, 1994).....  | 28 |
| Tabelle 2: Fettsäurezusammensetzung in der Nahrung der Inuit und der dänischen Bevölkerung (nach Bang et al., 1976). ....                 | 30 |
| Tabelle 3: Vergleichende Darstellung natürlicher Fettsäurezusammensetzungen (%) im Plankton, Süßwasserfisch und Meeresfisch .....         | 31 |
| Tabelle 4: Fettsäuremuster von Schizochytrium sp. nach dem Fermentationsverfahren (nach Barclay et al., 1994).....                        | 33 |
| Tabelle 5: Eigenschaften der verschiedenen $\Omega$ -3-Fettsäure Quellen am Beispiel der Legehennenfütterung (Barclay et al., 1998) ..... | 35 |
| Tabelle 6: Referenzbereiche der ALP in Abhängigkeit vom Alter modifiziert nach Price et al., (1995) .....                                 | 47 |
| Tabelle 7: Anzahl der Tiere, Geschlecht, Alter (in Jahren) und mittlere Körpergewichte (in kg) während des Versuchs .....                 | 52 |
| Tabelle 8: Nährstoffgehalt des Versuchsfutters nach institutseigener Weender Analyse.....   | 53 |
| Tabelle 9: Mittlere Energie- und Futterzuteilung der einzelnen Ponies.....  | 54 |
| Tabelle 10: Nährstoffgehalt der DHA Gold Algen® nach Angaben des Herstellers .....  | 54 |
| Tabelle 11: Mineralstoffgehalte der DHA GOLD Algen® nach Angaben des Herstellers .....  | 55 |
| Tabelle 12: Durchschnittliches Fettsäuremuster der DHA GOLD Algen® nach Angaben des Herstellers .....                                     | 55 |
| Tabelle 13: Mittleres Körpergewicht der Versuchstiere (in kg) während der Versuchsabschnitte .....  | 66 |
| Tabelle 14: Errechnete Wirkstoffaufnahme der Versuchstiere pro Tag in g Alge bzw. in g DHA während der Algenperiode.....                  | 66 |
| Tabelle 15: Wirkstoffaufnahme der einzelnen Pferde in g DHA während der Versuchsperioden.....   | 66 |



|  |    |
|--|----|
| Tabelle 16: Mittelwerte aus den Konzentrationen der $\Omega$ -3-Fettsäuren $\alpha$ -Linolensäure (ALA; C18:3); Eicosapentaensäure (EPA; C20:5) und Docosahexaensäure (DHA; C22:6) in % der Gesamtfettsäuren (TFA) im Serum der Versuchstiere während der Versuchsabschnitte Vorperiode, Algenperiode und Nachperiode .....  | 67 |
| Tabelle 17: Mittelwerte aus den Konzentrationen der $\Omega$ -6-Fettsäuren Arachidonsäure (ARA; C20:4); Linolsäure (LA; C18:2) und Docosapentaensäure (DPA; C22:5) in % der Gesamtfettsäuren (TFA) im Serum der Versuchstiere während der Versuchsabschnitte Vorperiode, der Algenperiode und Nachperiode .....  | 69 |
| Tabelle 18: Mittelwerte aus den Konzentrationen der Gesamtalkalischen Phosphatase in U/l im Serum der Versuchstiere während der Versuchsabschnitte Vorperiode, Algenperiode und Nachperiode .....  | 70 |
| Tabelle 19: Mittelwerte der Osteocalcinkonzentration in mg/ml im Serum der Versuchstiere während der Versuchsabschnitte Vorperiode, Algenperiode und Nachperiode .....   | 71 |
| Tabelle 20: Mittelwerte aus den Konzentrationen von Pyridinolin (PYD) im Urin der Versuchstiere gemessen in nmol/mmol Creatinin während der Versuchsabschnitte Vorperiode, Algenperiode und der Nachperiode .....  | 71 |
| Tabelle 21: Mittelwerte aus den Konzentrationen von Desoxypyridinolin (DPD) im Urin der Versuchstiere gemessen in nmol/mmol Creatinin während der Versuchsabschnitte Vorperiode, Algenperiode und der Nachperiode .....  | 72 |
| Tabelle 22: Mittelwerte der Calciumkonzentration in g/mmol Creatinin im 24 Std. Urin der Versuchstiere während der Versuchszeitpunkte Vorperiode, Algenperiode und der Nachperiode .....   | 72 |
| Tabelle 23: Korrelationen zwischen den Fettsäuren Linolensäure, Eicosapentaensäure (EPA), Docosapentaensäure (DPA), Docosahexaensäure (DHA), Arachidonsäure (ARA), Linolsäure (LA), den Knochenmarkern Osteocalcin (OC), Pyridinolin (PYD), Desoxypyridinolin (DPD), Gesamtalkalische Phosphatase (ALP) nach der „Pearson Product Moment Korrelation“ während der Vorperiode ..... | 74 |

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 24: Korrelationen zwischen den Fettsäuren Linolensäure, Eicosapentaensäure (EPA), Docosapentaensäure (DPA), Docosahexaensäure (DHA), Arachidonsäure (ARA), Linolsäure (LA), den Knochenmarkern Osteocalcin (OC), Pyridinolin (PYD), Desoxypyridinolin (DPD), Gesamtkalkalische Phosphatase (ALP) nach der „Pearson Product Moment Korrelation“ während der Algenperiode ..... | 75 |
| Tabelle 25: Korrelationen zwischen den Fettsäuren Linolensäure, Eicosapentaensäure (EPA), Docosapentaensäure (DPA), Docosahexaensäure (DHA), Arachidonsäure (ARA), Linolsäure (LA), den Knochenmarkern Osteocalcin (OC), Pyridinolin (PYD), Desoxypyridinolin (DPD), Gesamtkalkalische Phosphatase (ALP). Nach der „Pearson Product Moment Korrelation“ während der Nachperiode ..... | 76 |
| Tabelle 26: Osteocalcin-Konzentration in Abhängigkeit vom Alter .....   | 85 |
| Tabelle 27: Osteocalcin Konzentration der Versuchstiere .....   | 85 |

## Verzeichnis der in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| $\Omega$                    | Omega   |
| $^{\circ}\text{C}$          | Grad Celcius  |
| $\Delta\text{E}/\text{min}$ | Extinktionsdifferenzen pro Minute   |
| $\mu\text{m}$               | Mikrometer  |
| ALA                         | Alpha-Linolensäure  |
| ARA                         | Arachidonsäure  |
| C                           | Kohlenstoff   |
| Ca                          | Calcium   |
| $\text{CH}_3\text{OH}$      | Propanol  |
| cm                          | Zentimeter  |
| DGE                         | Deutsch Gesellschaft für Ernährung  |
| DHA                         | Docosahexaensäure   |
| DPA                         | Docosapentaensäure  |
| DPD                         | Desoxypyridinolin   |
| EDTA                        | Äthylendiamintetraessigsäure  |
| ELISA                       | Enzym linked immunosorbent Assay  |
| EPA                         | Eicosapentaensäure  |
| et al.                      | und andere  |
| FS                          | Fettsäure   |
| g                           | Gramm   |
| GLA                         | Glutaminsäureester  |
| h                           | Stunde  |
| $\text{H}_2\text{SO}_4$     | Schwefelsäure   |
| $\text{HClO}_4$             | Perchlorsäure   |
| HFBA                        | Hepta-Flour-Buttersäure   |
| HPLC                        | High Performance Liquid Chromatografie<br>(Hochleistungsflüssigkeitschromatografie) |
| IGF                         | Insulin-like-growth-factor  |
| Inc.                        | Incorporated, US-Amerikanische Unternehmensform                                     |
| K                           | Kalium  |
| kg                          | Kilogramm   |

|        |                                     |
|--------|-------------------------------------|
| KG     | Körpergewicht                       |
| KM     | Körpermasse                         |
| l      | Liter                               |
| LA     | Linolsäure                          |
| ME     | Umsetzbare Energie                  |
| mg     | Milligramm                          |
| Mg     | Magnesium                           |
| min    | Minute                              |
| MJ     | Megajoule                           |
| mm     | Millimeter                          |
| mmol   | Millimol                            |
| N      | Anzahl                              |
| Na     | Natrium                             |
| NaOH   | Natriumhydroxid                     |
| NfE    | N-freie Extraktstoffe               |
| nm     | Nanometer                           |
| nmol   | Nanomol                             |
| NO     | Stickstoffmonoxid                   |
| OC     | Osteocalcin                         |
| P      | Phosphor                            |
| PCB    | Polychlorierte Biphenyle            |
| PGE    | Prostaglandin E <sub>2</sub>        |
| PGI    | Prostaglandin                       |
| ppm    | Part per million = 10 <sup>-6</sup> |
| PUFA   | Polyunsaturated fatty acid          |
| PYD    | Pyridinolin                         |
| Ra     | Rohasche                            |
| Rfa    | Rohfaser                            |
| Rfe    | Rohfett                             |
| Rp     | Rohprotein                          |
| S-Abw. | Standardabweichung                  |
| sog.   | sogenannt                           |
| sp.    | Subspezies                          |

|       |                           |
|-------|---------------------------|
| Tab.  | Tabelle                   |
| TFA   | Totaly fatty acid         |
| TS    | Trockensubstanz           |
| u.a.  | unter anderem             |
| U/l   | Units (Einheit)/l         |
| U/min | Umdrehungen pro Minute    |
| uS    | Ursprüngliche Substanz    |
| WHO   | World Health Organisation |

## 1 Einleitung und Problemstellung

Zur Familie der Omega-3-Fettsäuren gehören u. a. die Alpha-Linolensäure (ALA), die Eicosapentaensäure (EPA) und die Docosahexaensäure (DHA). Da der menschliche und tierische Organismus diese bis auf wenige Ausnahmen nicht selbst synthetisieren kann, müssen sie mit der Nahrung aufgenommen werden. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) sind Bestandteile jeder Zellmembran, in der sie für deren Elastizität sorgen. Zudem sind sie Ausgangssubstanz für die Eicosanoide. Omega-3-Fettsäuren üben diverse positive Wirkungen auf den Organismus aus – sie beugen Herz-Kreislauf Problemen und Krebs vor und schützen den Organismus vor entzündlichen Erkrankungen. Auch ihre positiven Wirkungen auf den Knochenstoffwechsel werden diskutiert (Rambeck und Weber, 2001).

Eine wichtige Quelle der Omega-3-Fettsäuren ist das Fett von Makrele, Hering oder Lachs, das allerdings neben den mehrfach ungesättigten Fettsäuren auch giftige Schwermetalle wie Quecksilber, Blei oder Cadmium enthalten kann. Eine geschmacksfreie und relativ schadstoffarme Alternative stellen hier in Fermentern gezüchtete Algen dar, die äußerst effektiv Omega-3-Fettsäuren produzieren können. Die Firma Martek, vormals OmegaTec (USA) hat ein spezielles Extraktionsverfahren entwickelt, um aus der Mikroalge Schizochytrium, ein DHA reiches Öl und auch ein getrocknetes Biomasseprodukt herzustellen.

Während die extrahierten Öle zur Anreicherung verschiedenster Lebensmittel v. a. von Babynahrung mit DHA herangezogen werden, wird das Omega-3-fettsäurereiche Algenprodukt zur Fütterung von z. B. Hühnern eingesetzt, um eine Anreicherung der Eier und des Fleisches mit DHA zu erzielen. Auch bei Fischen wurde die Anreicherung von Omega-3-Fettsäuren durch Fütterung von Algen im Fischfutter untersucht.

In der Tierernährung macht man sich die positiven Wirkungen der Omega-3-Fettsäuren beispielsweise bei allergischen Haut- und Haarproblemen (Logas et al., 1999) und bei Gelenkerkrankungen (Marks et al., 1993) zunutze. Pferde zeigen allerdings bei der Aufnahme tierischer Fette erhebliche Akzeptanzprobleme (Flothow, 1994), ein Problem, das bei Gabe der Omega-3-fettsäurereichen Algen nicht auftritt.

In der vorliegenden Pilotstudie sollte nun überprüft werden, in welchem Maße sich die Zusammensetzung der Gesamtfettsäuren im Serum von Pferden nach Gabe der Algen verändert. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf der DHA, da der Anteil dieser Omega-3-Fettsäure am Gesamtfettsäuremuster der verwendeten Alge über 40% beträgt. Weiter sollte geprüft werden, ob trotz der relativ kurzen Verabreichungsdauer bereits ein Einfluss auf den Knochenstoffwechsel anhand der Knochenmarker zu beobachten ist. Für den Fütterungsversuch standen 4 institutseigene Ponies zur Verfügung. Den Tieren sollte während der Vor- und Nachperiode ein Grundfutter (Heu, Hafer, Weizenkleie und Mineralfutter) gefüttert werden. Während der Algenperiode sollte das Grundfutter durch die Zugabe der DHA-reichen Mikroalge ergänzt werden. Alle 14 Tage sollten Blut- und Urinproben genommen werden und darin, als Marker der Knochenformation, die alkalische Phosphatase und das Osteocalcin analysiert werden. Als Marker der Knochenresorption sollten die Collagen-Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin und Calcium im Urin bestimmt werden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Fettsäuren

Fettsäuren (FS) sind die nach ihrem Vorkommen in Fetten benannten Säuren. Sie besitzen eine zumeist gerade Anzahl an Kohlenstoffatomen, da sie aus  $C_2$  Einheiten, sog. Essigsäure-Resten aufgebaut sind. Die in tierischen Fetten vorkommenden Fettsäuren enthalten zwischen 2 und 26 C-Atome.

Im Depot- und im Milchfett von Wiederkäuern gibt es jedoch auch Fette mit einer ungeraden Anzahl an C-Atomen und verzweigten Kohlenstoffketten. Diese stammen vom Abbau der Mikroorganismen in den Vormägen.

Die Fettsäuren werden als gesättigte Fettsäuren bezeichnet, wenn sie aliphatische Monocarbonsäuren mit der allgemeinen Formel  $C_nH_{2n+1}-COOH$  sind ( $n$ = Anzahl der Kohlenstoffatome ohne das C der Carboxylgruppe); dazu zählen z. B. die Essig-, Butter-, Palmitin- und Stearinsäure.

Als ungesättigte Fettsäuren bezeichnet man Fettsäuren mit der allgemeinen Formel  $C_nH_{2n-1, 3, 5}-COOH$ . Sie unterscheiden sich in einfach, doppelt (= Diensäuren) dreifach (= Triensäuren) und mehrfach ungesättigte Fettsäuren und werden nach der Stellung und Anzahl ihrer Doppelbindungen benannt. Ihre Bezeichnung erhalten sie durch die Stellung des Kohlenstoffes der Methylgruppe, welche sich gegenüber der Carboxylgruppe am distalen Ende der Kette befindet. Man nennt es auch das Omega Kohlenstoffatom. Es wird durch den griechischen Buchstaben „ $\omega$ “ bzw. „ $\Omega$ “ oder nur mit „ $n$ “ abgekürzt (im Folgenden mit  $\Omega$  bezeichnet).

Bei der Angabe über die Stellung der Doppelbindung wird vom Omega-Kohlenstoffatom ausgehend gezählt. Dieses wird dabei mit der Nummer 1 versehen.

#### 2.1.1 Biosynthese der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs)

Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren, Polyenfettsäuren (PUFAs) sind von großer Wichtigkeit für die Entwicklung und die Gesundheit von Mensch und Tier. Die Doppelbindungen liegen fast immer in der cis-Konfiguration vor. Bei mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind die Doppelbindungen meist isoliert, also durch eine  $CH_2$  Gruppe getrennt.



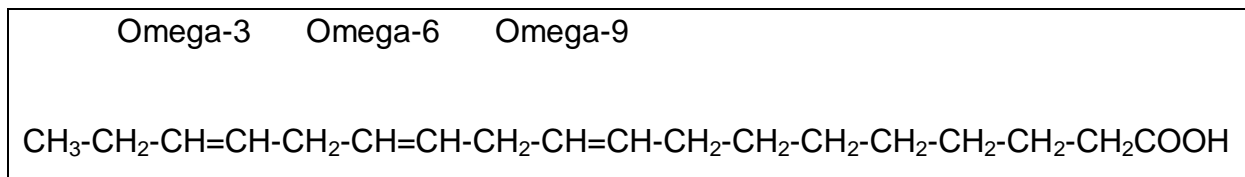
Fettsäuren mit Doppelbindungen an Position  $\Omega$ -3 und  $\Omega$ -6 gehören zu den essenziellen Fettsäuren, da Doppelbindungen an diesen Positionen nur von pflanzlichen Lebewesen eingefügt werden können. Die Ausgangsverbindungen der  $\Omega$ -6-Fettsäure (Linolsäure) und die der  $\Omega$ -3-Fettsäuren ( $\alpha$ -Linolensäure) gehören beispielsweise zu den essenziellen Fettsäuren.

#### **Omega-3-Fettsäuren :**

- $\alpha$ -Linolensäure (ALA) (C 18:3)
- Eicosapentaensäure (EPA) (C 20:5)
- Docosahexaensäure (DHA) (C 22:6)

#### **Omega-6-Fettsäuren :**

- Linolsäure (LA) (C 18:2)
- Arachidonsäure (ARA) (C 20:4)



**Abbildung 1: Struktur der Omega Fettsäuren**

Eine weitere Gruppe ungesättigter Fettsäuren kommt im Gewebe jedoch nur in geringen Spuren vor. Diese leiten sich von der Palmitolsäure (C 16:1  $\Omega$ -7) ab (Calder, 2001).

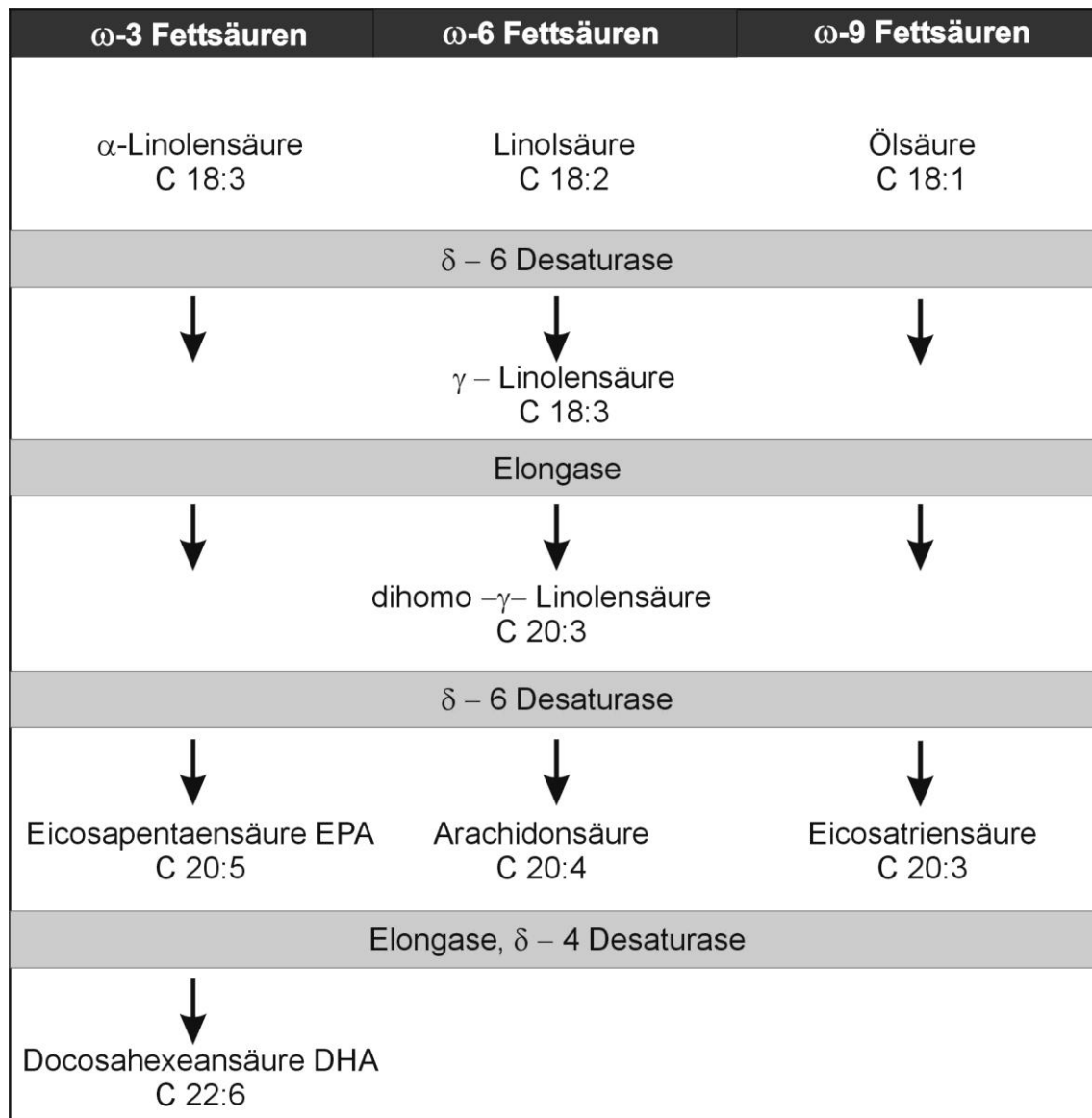
Durch die strukturellen Unterschiede ist die Umwandlung von  $\Omega$ -3- in  $\Omega$ -6-Fettsäuren und umgekehrt nicht möglich. Umwandlungen innerhalb der  $\Omega$ -3- und  $\Omega$ -6-Fettsäuren können jedoch durch Kettenverlängerung (Elongation) und durch die Einführung von zusätzlichen Doppelbindungen (Desaturierung) erfolgen. Diese Veränderungen finden zwischen dem Carboxylende und der bereits vorhandenen Doppelbindung statt (Ghirardi et al., 1973).

Fettsäuren konkurrieren bei der Synthese längerkettiger und stärker ungesättigter Metaboliten um ein gemeinsames Enzymsystem. Die Kettenverlängerung der Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure erfolgt durch eine Reihe verschiedener Desaturasen ( $\delta$ -6-,  $\delta$ -5- und  $\delta$ -4-Desaturase), durch die je eine neue Doppelbindung zwischen das

Carboxylende und die bereits existierenden Doppelbindungen eingeführt wird. Weiter folgen mehrere Elongationsschritte, wobei je zwei Kohlenstoffatome addiert werden (siehe Abbildung 2). Es spielt hierbei eine wichtige Rolle, dass sowohl die Linolsäure als auch die  $\alpha$ -Linolensäure um dieselben Desaturase-Enzyme konkurrieren, die  $\delta$ -4- und die  $\delta$ -6-Desaturase, die die  $\Omega$ -3-Fettsäuren den  $\Omega$ -6-Fettsäuren vorziehen.

So wird die Umwandlungsrate von  $\alpha$ -Linolensäure zu Eicosapentaensäure (EPA) auf 10 bis 15% geschätzt, die Umwandlungsrate zu Docosahexaensäure (DHA) auf ca. 4% (Trautwein, 1999).

Die Synthese von DHA und EPA läuft jedoch nicht nur in eine Richtung ab. Conquer und Holub (1997) sowie Nelson et al. (1997) konnten in voneinander unabhängigen Studien eine Retrokonversion von DHA zu EPA im menschlichen Organismus nachweisen. Auch im Fleisch von mit DHA-haltigen Mikroalgen gefütterten Mastrindern konnte neben der Erhöhung von DHA ebenfalls ein Anstieg der EPA-Konzentration festgestellt werden (Barclay et al., 1998).



**Abbildung 2: Syntheseschritte der mehrfach ungesättigten Fettsäuren**

### 2.1.2 PUFAs im Organismus

PUFAs sind Bestandteile des Organismus von Tieren und Pflanzen. Sie kommen in den Membranen der Zellen, der Kerne, der Mitochondrien und des endoplasmatischen sowie des sarkoplasmatischen Retikulums vor. Sie beeinflussen die Fluidität der Membranen und sind in Proteinen, Enzymen, Rezeptoren, Transportproteinen und den Ionenkanälen der Membranen vorhanden.

Zu einem geringen Teil kommen die PUFAs als freie Fettsäuren vor, zum großen Teil liegen sie aber in veresterter Form als Tryglyceriden, Cholesterinestern und Phospholipiden vor.

Zudem werden aus der Eicosapentaensäure (20:5,  $\Omega$ -3) verschiedene Prostaglandine gebildet. Die Docosahexaensäure findet man vor allem in Phospholipiden, sie macht den größten Anteil der Fettsäuren der grauen Substanz des Gehirns (O'Brien und Sampson, 1965), der Netzhaut (Anderson, 1970) und der Hoden und Spermien aus (Poulos et al., 1975).

### **2.1.3 Veränderungen im Verhältnis von $\Omega$ -3- und $\Omega$ -6-Fettsäuren in der Ernährung**

Sowohl genetische Faktoren wie auch Einflüsse der Umwelt spielen, wenn es um die Gesundheit des menschlichen Organismus geht, eine wichtige Rolle (Simopoulos, 1998). Seit dem Paläolithikum vor 40.000 Jahren sind die menschlichen Gene festgelegt (Eaton und Konner, 1985). Seither haben sie sich in ihrer Struktur fast nicht verändert. Die spontane Mutationsrate der DNA wird auf 0,5% pro Million Jahr geschätzt (Simopoulos, 1999). Hinsichtlich der Umwelt haben sich vor allem die Ernährungsgewohnheiten stark verändert. Ein entscheidender Faktor für die Gesundheit ist der Anteil an ungesättigten Fettsäuren in der Nahrung. Vor allem ein ausgeglichenes Verhältnis der  $\Omega$ -6- zu  $\Omega$ -3-Fettsäuren ist von großer Bedeutung.

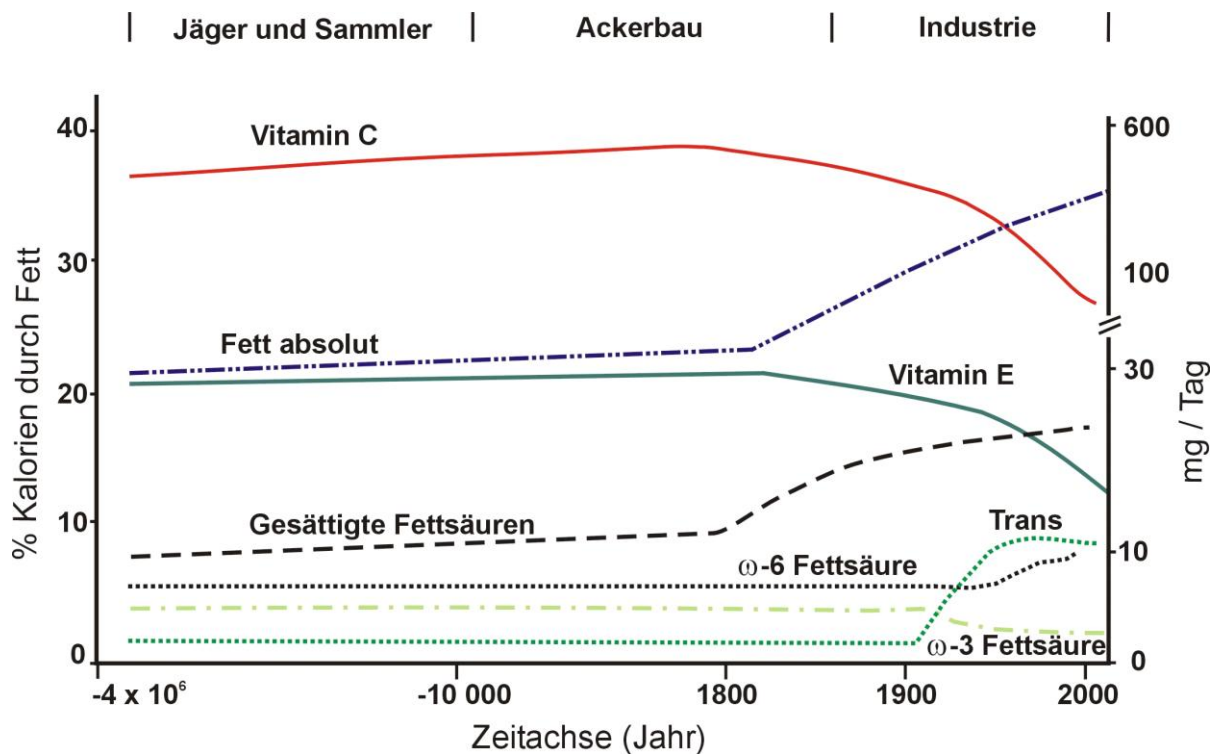
Die Nahrung der Menschen im Paläolithikum setzte sich zusammen aus dem Fleisch der Wildtiere, Fisch, wilden Pflanzen, Früchten und frischem Gemüse. Die Nahrung war kalorienarm und ballaststoffreich. Der Gehalt an Gesamtfett war gering, und das Verhältnis von ungesättigten  $\Omega$ -6- zu  $\Omega$ -3-Fettsäuren betrug 1:1 bis 1:2 (Eaton und Konner, 1985; Simopoulos et al., 1995).

Mit dem Beginn der Landwirtschaft vor etwa 10.000 Jahren veränderte sich die menschliche Ernährung. Getreide wurde nun zu einem wesentlichen Nahrungsbestandteil, vor allem Weizen, Mais und Reis. Getreide enthält besonders viele Kohlenhydrate und  $\Omega$ -6-Fettsäuren, der Anteil an  $\Omega$ -3-Fettsäuren und Antioxidantien ist dagegen gering (Simopoulos, 1999). Mitte des 19. Jahrhunderts begann das Zeitalter der Industrialisierung, die bald schon die Landwirtschaft erfasste. Mit ihr wurden neben dem Getreide nun auch Kraftfutter in der Tierernährung eingesetzt. Durch die Massentierhaltung in Ställen wurde zudem die Aufnahme von Wildpflanzen, die einen hohen  $\Omega$ -3-Fettsäuren Gehalt haben, stark

eingeschränkt. Dies hatte zur Folge, dass der Gehalt der  $\Omega$ -6-Fettsäuren im Fleisch zulasten der  $\Omega$ -3-Fettsäuren anstieg. Im Vergleich zu Masttieren und Tieren, die hauptsächlich in Ställen gehalten werden, weisen Wildtieren einen höheren Gehalt an  $\Omega$ -3-Fettsäuren im Fleisch auf, v. a. der Gehalt von  $\alpha$ -Linolensäure und Eicosapentaensäure steigt an (Simopoulos, 1999). Durch die Massentierhaltung der Hühner veränderte sich hier das Verhältnis der Fettsäuren im Eigelb zulasten der  $\Omega$ -3-Fettsäuren. So zeigt das Verhältnis der Fettsäuren von Eiern aus Legebatterien ( $\Omega$ -6: $\Omega$ -3) mit 19,9:1 einen deutlichen Unterschied zu Eiern aus Freilandhaltung, die ein ( $\Omega$ -6: $\Omega$ -3) Verhältnis von 1,3:1 aufweisen (Simopoulos und Salem, 1992). Denselben negativen Effekt, bezogen auf den Gehalt an  $\Omega$ -3-Fettsäuren, macht ein Vergleich von gezüchteten Fischen zu natürlich gewachsenen Fischen deutlich (van Vliet und Katan, 1990).

Mit der modernen Pflanzenölindustrie zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden nun auch vermehrt  $\Omega$ -6-Fettsäuren mit der Mahlzeit aufgenommen. Pflanzenöle wie z.B. Maiskeimöl, Sonnenblumenöl oder Färberdistelöl zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an  $\Omega$ -6-Fettsäuren und einen geringen Gehalt an  $\Omega$ -3-Fettsäuren aus. Das Verhältnis von  $\Omega$ -6: $\Omega$ -3-Fettsäuren beträgt beim Maiskeimöl 60:1 und beim Färberdistelöl sogar 77:1 (Simopoulos, 1999).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ernährung im Paläolithikum ein ausgeglichenes Verhältnis von  $\Omega$ -6- zu  $\Omega$ -3-Fettsäuren aufwies. Dieses Verhältnis wurde durch die moderne Landwirtschaft, Aquakultur und Industrialisierung zulasten der  $\Omega$ -3-Fettsäuren verschoben.



**Abbildung 3: Hypothetisches Schema zur Aufnahme von Fett und Fettsäuren in Prozent der Kalorien an Fett sowie von Vitaminen E und C in mg/ Tag (nach Simopoulos, 1999).**

#### 2.1.4 Zufuhr von PUFAs

##### Zufuhrempfehlung

Fette sind wichtige Energiespeicher für den menschlichen und tierischen Organismus und sie sollten bis zu 30% der täglichen Energiezufuhr ausmachen. In diesen 30% Fett sind verschiedene Fettsäuren enthalten, wobei der Anteil der gesättigten Fettsäuren maximal 10% der Gesamtenergie betragen sollte, die einfach ungesättigten Fettsäuren sollten einen Anteil von über 10% der Gesamtenergie betragen. Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren liefern den geringsten Anteil, der bei ca. 7% der aufgenommenen Nahrungsenergie liegt. Bei den mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist auf das Verhältnis von  $\Omega$ -6- zu  $\Omega$ -3-Fettsäuren zu achten. Dieses sollte 4:1 betragen. Das heutige Verhältnis zwischen  $\Omega$ -6- und  $\Omega$ -3-Fettsäuren in der Nahrung von 50:1 ist vom Idealwert 4:1 noch weit entfernt, da die in Westeuropa verzehrten Nahrungsmittel nur sehr wenige  $\Omega$ -3-Fettsäuren enthalten (vgl. Schweiz. Zschr. Ganzheitsmedizin, 2004).

Die maximale Zufuhr von  $\Omega$ -3-Fettsäuren sollte jedoch nicht mehr als 3% der Energie überschreiten, da sie in hohen Dosen zu Blutungen führen können und die Funktion von Leukozyten und das Immunsystem nachteilig beeinflussen (DGE, 2000). Die DGE empfiehlt eine Zufuhr von  $\Omega$ -3-Fettsäuren von 2,5-3% der Gesamtenergie. Ein erhöhter Bedarf besteht während der Schwangerschaft und Stillzeit, der Wachstumsphase, nach Stressphasen und im höheren Alter. Speziell gefährdet sind auch Föten und Neugeborene. Die World Health Organisation (WHO, 1996) empfiehlt für Säuglinge eine Aufnahme von 20mg/kg KM und für Frühgeborene von 40mg/kg KM.

### 2.1.5 Funktionen der PUFAs

Im menschlichen und tierischen Körper haben die  $\Omega$ -3- und die  $\Omega$ -6-Fettsäuren verschiedene Funktionen. Sie sind nicht nur für die Fluidität der Zellmembranen mitverantwortlich, sondern beeinflussen auch qualitativ deren Wirkungsweise. Zudem regulieren sie die Blutfettwerte und sind Ausgangssubstanzen für die Eicosanoidsynthese. Die aus ihnen entstehenden Eicosanoide beeinflussen die Wirkungsweise der glatten Muskulatur, der Endothelien, der Monozyten und der Thrombozyten und sind an Entzündungs- und Immunreaktionen beteiligt (DGE, 2000). Während der Eicosanoidsynthese werden aus der  $\alpha$ -Linolensäure und der Linolsäure die längerkettigen  $\Omega$ -3-Fettsäuren (die Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure) und  $\Omega$ -6-Fettsäuren (die Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure und die Arachidonsäure) gebildet. Dabei konkurrieren die jeweiligen  $\Omega$ -3- und  $\Omega$ -6-Fettsäuren um dieselben Enzyme, die  $\delta$ -4- und die  $\delta$ -6-Desaturase. Hierbei werden die  $\Omega$ -3-Fettsäuren bevorzugt oxidiert. Aus den verschiedenen  $\Omega$ -3- und  $\Omega$ -6-Fettsäuren werden dann die Eicosanoide synthetisiert. Es entstehen so aus der  $\Omega$ -6-Fettsäure Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure die Prostaglandine und Thromboxane der Serie eins und die Leukotriene der Serie drei. Aus der Arachidonsäure werden die Prostaglandine und Thromboxane der Serie zwei und Leukotriene der Serie vier synthetisiert. Aus den  $\Omega$ -3-Fettsäure Eicosapentaensäure werden die Prostaglandine und Thromboxane der Serie drei und die Leukotriene der Serie fünf. Werden mit der Nahrung nun verhältnismäßig mehr  $\Omega$ -6-Fettsäuren als  $\Omega$ -3-Fettsäuren aufgenommen, kommt es

durch die bestehende Konkurrenz um die Enzymsysteme zu einem Ungleichgewicht der Eicosanoide (Biesalski und Grimm, 1999).

Eicosanoide haben eine Kettenlänge von 20 C-Atomen. Unter den Eicosanoiden werden circa 20 hormonähnliche Substanzen zusammengefasst, hierzu zählt die Gruppe der Leukotriene, der Prostaglandine und der Thromboxane, mit unterschiedlichen Wirkungen. Sie haben unter anderem Einfluss auf die Blutaggregation und die Kontraktion der glatten Muskulatur, die Wirkungen der unterschiedlichen Eicosanoide haben häufig gegensätzliche Wirkungen. So fördern die einen die Blutgerinnung, während andere diese hemmen. Insgesamt haben die Eicosanoide der  $\Omega$ -3-Fettsäure eine eher entzündungshemmende (antiinflammatorische), die der  $\Omega$ -6-Fettsäuren eine entzündungsfördernde (proinflammatorische) Wirkung (Schauder und Ollenschläger, 2003).

Die Bildung der Eicosanoide aus Arachidonsäure kann unter anderem durch eine erhöhte Zufuhr von  $\Omega$ -3-Fettsäuren mit der Nahrung, hier insbesondere der EPA, gesenkt werden. Hier beeinflusst die EPA die Bildung und den Stoffwechsel der Arachidonsäure. Dabei hemmt die Eicosapentaensäure zunächst das Enzym, das für die Freisetzung der Arachidonsäure aus den Zellmembranen verantwortlich ist. Arachidonsäure und Eicosapentaensäure benötigen zur Bildung der Eicosanoide die gleichen Enzyme, wobei Eicosapentaensäure dabei die eicosanoidbildenden Enzyme blockiert, indem sie von ihnen gebunden, doch nur mäßig umgesetzt wird. Diese Effekte können durch eine gesteigerte Zufuhr von Arachidonsäure aufgehoben werden. Es wirkt sowohl die  $\alpha$ -Linolensäure wie auch EPA und DHA auf den Eicosanoidstoffwechsel ein, jedoch wird von der  $\alpha$ -Linolensäure die 10-fache Menge benötigt um dieselbe Wirkung zu erzielen wie durch EPA (Wolfram, 1995). Auch Antioxidantien hemmen die Eicosanoidsynthese aus Arachidonsäure. Jeder Entzündungsprozess hat die Bildung von Sauerstoffradikalen zur Folge, die wiederum die Freisetzung der Arachidonsäure aus den Zellmembranen fördert. In einer Studie von Hong et al. (2003) konnte festgestellt werden, dass DHA, das in Zellmembranen eingebaut und bei Bedarf freigesetzt wird, als eine endogene, also körpereigene Schutzantwort für Neuronen dient, die infolge eines Schlaganfalls unter Sauerstoffmangel leiden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass DHA eine zellschützende Wirkung entfaltet, gleich einem Antioxidans.



Bei der Synthese der Eicosanoide ist also nicht allein die absolute Menge an  $\Omega$ -3-Fettsäuren ausschlaggebend, sondern vor allem das Verhältnis von  $\Omega$ -6- zu  $\Omega$ -3-Fettsäuren. Werden mit der Nahrung vermehrt  $\Omega$ -3-Fettsäuren aufgenommen, verdrängen diese die Arachidonsäure zum Teil von der Zellmembran, vor allem der Thrombozyten, Leukozyten, Erythrozyten und Hepatozyten. Hierdurch werden weniger Eicosanoide produziert, deren Ursprung die  $\Omega$ -6-Fettsäuren sind.

### **Prostaglandine (PGI)**

Prostaglandine ( $\text{PGI}_3$ ) werden ausgehend von  $\Omega$ -3-Fettsäuren, die Prostaglandine ( $\text{PGI}_2$ ) von der Familie der  $\Omega$ -6-Fettsäuren gebildet. Sie wirken vasodilatatorisch und führen zur Hemmung der Thrombozytenaggregation.  $\text{PGE}_2$  wird aus Arachidonsäure gebildet und hat außerdem eine proinflammatorische Wirkung, z. B. das Auslösen von Fieber und die Erhöhung der Gefäßpermeabilität.

### **Thromboxan**

Aus  $\Omega$ -6-Fettsäuren wird Thromboxan  $A_2$  gebildet. Es hat gerinnungsfördernde und vasokonstriktorische Wirkung. Thromboxan  $A_3$ , das von der Familie der  $\Omega$ -3-Fettsäuren gebildet wird, hat eine geringe gerinnungsfördernde und gefäßverengende Wirkung.

### **Leukotriene**

Aus Arachidonsäure wird Leukotrien  $B_4$  gebildet. Es besitzt eine starke entzündungsfördernde Wirkung und ist außerdem chemotaktisch aktiv. Leukotrien  $B_5$  wird aus  $\Omega$ -3-Fettsäuren gebildet. Es ist sehr viel weniger entzündungsfördernd und hat nur geringe chemotaktische Eigenschaften. Zudem hemmt es die Bildung von Leukotrien  $B_4$ .

Die positiven Wirkungen der  $\Omega$ -3-Fettsäuren beruhen auf den vorwiegend vasodilatatorischen, antithrombogenen und entzündungshemmenden Wirkungen der von ihnen synthetisierten Eicosanoiden.

**Senkung von Risikofaktoren**

- Hypertriglyzeridämie
- Fibrinogenspiegel
- Arterielle Hypertonie

**Steigerung protektiver Faktoren**

- Synthese von Prostaglandinen I<sub>3</sub>, Thromboxan A<sub>3</sub> und Leukotrien B<sub>5</sub>
- Antiarrhythmische Effekte
- Synthese des Vasodilators Stickstoffmonoxid (NO)
- Fluidität der Zellmembran
- Deformierbarkeit von Erythrozyten

**Verminderung proathrogener und prothrombotischer Faktoren**

- Synthese von Thromboxan A<sub>2</sub> und Leukotrien B<sub>4</sub>
- Plättchenaggregation und-adhäsion
- Adhäsion von Monozyten und Granulozyten an das Endothel
- Bildung von Wachstumsfaktoren
- Wachstum von Zellen der glatten Gefäßmuskulatur und Fibroblasten

**Abbildung 4: Protektive Wirkungen von  $\Omega$ -3-Fettsäuren bei kardiovaskulären Erkrankungen (nach Hahn et al., 2002).**

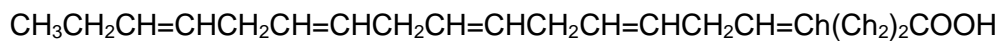
### 2.1.6 Omega-Fettsäuren

#### $\Omega$ -3- Fettsäuren

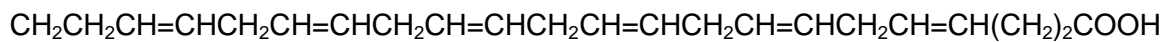
$\alpha$ -Linolensäure (ALA) (C 18:3)



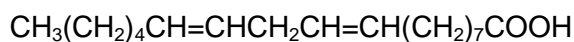
Wird über Dihomo- $\alpha$ -L., Eicosatetraen- und Eicosapentaensäure zu den Prostaglandinen E<sub>3</sub>, F<sub>3</sub> und D<sub>3</sub> sowie zu Prostacyclin I<sub>3</sub> und Thromboxan A<sub>3</sub> umgewandelt. Besonders reichhaltig an  $\alpha$ -Linolensäure sind Leinöl und Sojaöl.

**Eicosapentaensäure (EPA) (C 20:5)**

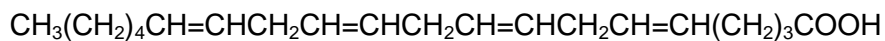
Aus ihr werden die Prostaglandine vom Typ  $F_{3\alpha}$ ,  $G_3$ ,  $H_3$ ,  $I_3$  und  $E_3$  gebildet. Sie kann in geringen Mengen aus der Linolensäure gebildet werden. Besonders reichhaltig an Eicosapentaensäure sind fette Seefische.

**Docosahexaensäure (DHA) (C 22:6)**

Ist wichtiger Bestandteil der Lipide der Nervenzellen, der Retina und der Spermien. Docosahexaensäure kommt in fetten Seefischen vor.

 **$\Omega$ -6-Fettsäuren****Linolsäure (LA) (C 18:2)**

Wird zu Dihomo- $\gamma$ -Linolen und dann zu Arachidonsäure umgesetzt. Distelöl hat den höchsten Linolsäuregehalt aller Pflanzenöle (ca. 75-80 %), Sonnenblumenöl (je nach Sorten bis zu 63 %) und Hanföl (50-70%).

**Arachidonsäure (ARA) (C 20:4)**

Bernsteinfarben, fischartig riechend. Arachidonsäure findet sich in zahlreichen Lebensmitteln. Besonders hoch ist ihr Anteil in Schweineschmalz (1700 mg pro 100 g), Schweineleber (870 mg pro 100 g), Eigelb (297 mg pro 100 g), Thunfisch (280 mg pro 100 g) und Leberwurst (230 mg pro 100 g). Sie dient dem Aufbau von Organlipiden und ist Vorläufermolekül für Prostaglandine und Leukotriene.

### 2.1.7 Natürliche Quellen von $\Omega$ -3-Fettsäuren in Nahrungsmitteln

Die vorherrschende Quelle der  $\Omega$ -3-Fettsäuren in der Nahrung sind Pflanzenöle und Fisch. Hierbei haben Fische die größte Bedeutung unter den Nahrungsmitteln in Bezug auf EPA und DHA und die Pflanzenöle in Bezug auf  $\alpha$ -Linolensäure.

Andere Quellen, die jedoch nur einen geringen Anteil an der Versorgung mit  $\Omega$ -3-Fettsäuren haben, sind Nüsse, Samen und Gemüse, einige Früchte, Eigelb, Geflügelfleisch und das Fleisch anderer Tiere.

Der Anteil der  $\Omega$ -3-Fettsäuren in Pflanzen ist abhängig von der Art der Pflanze, der Art der Frucht und der Anbauregion.

#### 2.1.7.1 Pflanzenöle als Quellen von $\Omega$ -3-Fettsäuren

Pflanzen sind eine wichtige Quelle der  $\Omega$ -3-Fettsäuren. Einige Samenarten, wie z.B. Getreidesamen, Baumwollsamensamen, Färberdistelsamen und Sojabohnen, sind reich an Linolensäure. Eine wichtige Quelle für  $\gamma$ -Linolensäuren sind die Samen von Nachtkerzen, Borretsch und schwarzen Johannisbeeren. Einige Samen werden zur Herstellung verschiedener pflanzlicher Öle verwendet.

**Tabelle 1: PUFA-Gehalt verschiedener pflanzlicher Öle (modifiziert nach Singer, 1994).**

| Ölsorte in % | Ölsäure<br>(C 18:1)<br>Omega-9-FS | Linolsäure<br>(C 18:2)<br>Omega-6-FS | Linolensäure<br>(C 18:3)<br>Omega-3-FS | Eicosapenta<br>ensäure<br>(C 20:5)<br>Omega-3-FS | Docosahexa<br>ensäure<br>(C 22:6)<br>Omega-3-FS |
|--------------|-----------------------------------|--------------------------------------|--|--|---|
| Olivenöl     | 70                                | 10                                   | 0                                      | 0  | 0   |
| Maisöl       | 30                                | 60                                   | 1                                      | 0  | 0   |
| Leinöl       | 20                                | 20                                   | 60                                     | 0  | 0   |

Die Summen ergeben nicht immer 100%, da noch andere Fettsäuren in den Pflanzenölen enthalten sind, die hier nicht aufgelistet sind.

### **2.1.7.2 Fisch als Quelle von $\Omega$ -3-Fettsäuren**

Dyerberg et al (1978) stellten fest, dass die Eskimos an der Westküste Grönland sehr viel seltener an koronaren Herzerkrankungen, Arteriosklerose und Thrombosen erkrankten, als andere Bevölkerungsgruppen – und dies trotz ihrer fett- und cholesterinreichen Ernährung. Aufschluss über dieses Phänomen erbrachte eine Untersuchung über den Vergleich der von Inuits aufgenommenen Fettsäuren aus der Nahrung und ihrer Fettsäurezusammensetzung im Plasma. Bang et al. (1976) fanden heraus, dass Eskimos durchschnittlich 4,5% der Gesamtfettsäuren ihrer Nahrung, die überwiegend aus Fisch-, Robben- und Walfleisch bestand, in Form von Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure aufnahmen. Bei der Untersuchung der Plasmaproben auf ihre Fettsäurezusammensetzung durch Dyerberg et al. (1975) wurde, verglichen mit der dänischen Bevölkerung, ein hoher Anteil an langkettigen PUFAs, wie z.B. der Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure und ein nur geringer Gehalt an Arachidonsäure und Linolensäure festgestellt. Eine Untersuchung an in Dänemark lebenden Eskimos zeigt hingegen keinen Unterschied im Gehalt der langkettigen PUFAs zur dort lebenden dänischen Bevölkerung. Dadurch konnten genetische Faktoren für die Unterschiede ausgeschlossen werden, wodurch ein erster Hinweis auf die kardioprotektive Wirkung der  $\Omega$ -3-Fettsäuren erbracht war. Ein angestrebtes Idealverhältnis der beiden Fettsäuren wäre 1:1. Durch die Entwicklung der Essgewohnheiten und der modernen Tierhaltung und Fütterung hat sich das Verhältnis jedoch zuungunsten der  $\Omega$ -3-Fettsäuren geändert.

**Tabelle 2: Fettsäurezusammensetzung in der Nahrung der Inuit und der dänischen Bevölkerung (nach Bang et al., 1976).**

| <b>Fettsäure</b>                                    | <b>Grönland Inuit</b> | <b>Dänische Bevölkerung</b> |
|---|-----------------------|-----------------------------|
| 12:0  | 1,1                   | 5,9                         |
| 14:0  | 3,7                   | 7,5                         |
| 16:0  | 13,6                  | 25,5                        |
| 18:0  | 4,0                   | 9,5                         |
| 20:0  | 0,1                   | 4,3                         |
| 16:1  | 9,8                   | 3,8                         |
| 18:1  | 24,6                  | 29,2                        |
| 20:1  | 14,7                  | 0,4                         |
| 22:1  | 8,0                   | 1,2                         |
| 16:2  | 0,4                   | -                           |
| 18:2  | 5,0                   | 10,0                        |
| 20:4  | 0,4                   | -                           |
| 18:3  | 0,6                   | 2,0                         |
| 10:5  | 4,6                   | 0,5                         |
| 22:5  | 2,6                   | 0                           |
| 22:6  | 5,9                   | 0,3                         |
| Gesättigte FS                                       | 22,8                  | 52,7                        |
| Einfachungesättigt-FS                               | 57,3                  | 34,6                        |
| Mehrfachungesättigte-FS                             | 19,2                  | 12,7                        |
| Mehrfachungesättigte-FS :<br>Einfachungesättigte-FS | 0,84                  | 0,24                        |
| $\Omega$ -3: $\Omega$ -6 Gehalt                     | 2,53                  | 0,28                        |

Dabei sind nicht die Fische selbst die Produzenten der  $\Omega$ -3-Fettsäuren, sondern Phyto- und Zooplankton, das von den Fischen mit der Nahrung aufgenommen wird (Ackman et al., 1964). Pflanzen und Phytoplankton haben einen hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren aus der  $\Omega$ -6- und der  $\Omega$ -3-Fettsäure-Reihe. Es

erhöht die Membranfluidität und bietet einen natürlichen Kälteschutz (Metz, 2000). Über die Fische gelangen die  $\Omega$ -3-Fettsäuren schließlich in die Nahrungskette. Der Gehalt an  $\Omega$ -3-Fettsäuren im Fisch ist abhängig vom jeweiligen Fanggebiet und der Fangzeit (Rasoarahona et al., 2004). Während der Laichzeit sind Fische besonders fettreich und so auch reich an  $\Omega$ -3-Fettsäuren (Brand, 1997). Befindet sich das Fanggebiet in Regionen mit kalten Wassertemperaturen (Nordatlantik), enthalten die Fische mehr  $\Omega$ -3-Fettsäuren und Fette, als Fische aus der Ostsee oder tropischen Gewässern.

**Tabelle 3: Vergleichende Darstellung natürlicher Fettsäurezusammensetzungen (%) im Plankton, Süßwasserfisch und Meeresfisch**

| <b>Fettsäure</b>         | <b>Zooplankton aus Eutrophoemgewässer Oberle (1995)</b> | <b>Karpfenmuskulatur Steffens et al., (1993)</b> | <b>Oncorhynchus keta (Seefisch) Gruger et al., (1964)</b> |
|--------------------------|---|--|---|
| 18:2 $\Omega$ -6 (LA)    | 8,0   | 22,3   | 2,0   |
| 18:3 $\Omega$ -3 (ALA)   | 15,3  | 5,2  | 1,0   |
| 20:4 $\Omega$ -6 (ARA)   | 1,9   | 1,3  | 0,9   |
| 20:5 $\Omega$ -3 (EPA)   | 20,9  | 3,0  | 6,4   |
| 22:5 $\Omega$ -6 (DPA)   | Kein Angaben  | Keine Angaben                                    | Keine Angaben   |
| 22:6 $\Omega$ -3 (DHA)   | 2,1   | 7,0  | 16,1  |
| $\Omega$ -3              | 53,0  | 15,7   | 28,1  |
| $\Omega$ -6              | 11,5  | 23,6   | 4,2   |
| $\Omega$ -3: $\Omega$ -6 | 4,6   | 0,6  | 6,7   |

Seefisch zeichnet sich durch einen geringen Gehalt an Linolsäure (LA) und  $\alpha$ -Linolensäure (ALA) und einen hohen Gehalt an PUFA aus der  $\Omega$ -3-Reihe aus. Hier überwiegen EPA und DHA. Das Verhältnis von  $\Omega$ -3- zu  $\Omega$ -6-Fettsäuren ist hoch und schwankt zwischen 5 und mehr als 10. Süßwasserfische haben einen höheren Gehalt an mehrfach ungesättigten C-18-Fettsäuren. Bei Ihnen lässt sich eine erhebliche Menge an EPA und DHA feststellen. Doch durch den hohen Gehalt an  $\Omega$ -

6-Fettsäuren (vor allem Linol- und Arachidonsäure) liegt das Verhältnis der  $\Omega$ -3- zu  $\Omega$ -6-Fettsäuren niedriger, bei circa 1 bis 4.

### **2.1.7.3 Algen als Quelle von $\Omega$ -3-Fettsäuren**

Der hohe Gehalt an DHA und EPA im Fisch ist durch die Aufnahme der  $\Omega$ -3-Fettsäuren als Phytoplankton (Algen) und den sich von Algen ernährenden Zooplankton begründet (Ackmann et al., 1964). Darum galt ihnen das Hauptinteresse bei der Suche nach einem geeigneten  $\Omega$ -3-Fettsäure-Produzenten. Nach intensiven Bemühungen und aufwendiger Suche nach einem geeigneten  $\Omega$ -3-Fettsäuren-Lieferanten wurde man schließlich bei der Schizochytrium sp. fündig. In der Subspezies der Schizochytrium fand man einen potenziellen DHA Produzent, der in der Lage war, große Mengen an  $\Omega$ -3-Fettsäuren zu produzieren (Barclay et al., 1994). Es handelt sich dabei um einzellige, algenartige Meeresmikroorganismen, die zu den heterokont begeißelten Algen zählen.

Zur Züchtung dieser Mikroalge wurde ein Fermentationsprozess entwickelt, bei dem eine nur minimale Menge an Chlorid benötigt wurde. So konnte die Produktion in konventionellen Edelstahlfermentern durchgeführt werden (Barclay, 1994). Ein weitere Vorteil der Züchtung in Stahltanks anstelle der Züchtung in Teichanlagen oder offenen Gewässern ist, dass die Algen in Reinkultur erzeugt werden können, ohne dass Hemmstoffe zur Hemmung des unerwünschten Wachstums anderer Spezies nötig sind. Eine Kontamination durch Schadstoffe wie Organochlorpestiziden, polychlorierten Biphenylen und Schwermetalle kann damit ebenfalls ausgeschlossen werden.



**Tabelle 4: Fettsäuremuster von Schizochytrium sp. nach dem Fermentationsverfahren (nach Barclay et al., 1994)**

| Strukturformel       | Name der Fettsäure           | In % der Gesamtfettsäuren |
|----------------------|------------------------------|---------------------------|
| C18:2 ( $\Omega$ -6) | Linolensäure (LA)            | 1,9                       |
| C18:3 ( $\Omega$ -3) | $\alpha$ -Linolensäure (ALA) | 2,7                       |
| C20:4 ( $\Omega$ -6) | Arachidonsäure (ARA)         | Keine Angaben             |
| C20:5 ( $\Omega$ -3) | Eicosapentaensäure (EPA)     | 0,8                       |
| C22:5 ( $\Omega$ -6) | Docosapentaensäure (DPA)     | 12,0                      |
| C22:6 ( $\Omega$ -3) | Docosahexaensäure (DHA)      | 25,3                      |

#### **Die Omega-Alge der Schizochytrium sp.**

Die Produktion der Schizochytrium sp. findet in rostfreien, mehr als 100.000 Liter fassenden Edelstahlfermentern statt. Ihre Ernte erfolgt durch Zentrifugation. Danach werden die DHA-reichen Zellen trommelgetrocknet. Als Ergebnis erhält man goldgelbe Flocken. Diese haben einem Gehalt an DHA von mehr als 12% der Trockenmasse der ganzzelligen Mikroalge.

Inhaltstoffe der Omega-Alge:

Etwa 50% der getrockneten Mikroalgen bestehen aus Fett. Davon sind ca. 25% reines DHA. Cholesterin macht den größten Anteil der Sterole aus. Die Aminosäuren Glutamin, Arginin und Asparaginsäure sind die Hauptaminosäuren der Schizochytrium sp..

Natrium, Kalium und Sulfat stellen den größten Anteil der anorganischen Anteile mit 3%, 1%, und 0,9% der Trockenmasse. Die Gesamtkonzentration an Spurenelemente ist sehr gering. Die Spurenelemente mit dem größten Anteil sind Eisen und Zink.

### Stabilität der Omega-Alge:

Die Stabilität der DHA in den getrockneten Mikroalgen der sp. Schizochytrium ist sehr hoch, da das DHA-reiche Öl in den Zellwänden eingekapselt ist. Außerdem sind Canthaxanthin und  $\beta$ -Carotin als natürliche Antioxidantien in den Zellen vorhanden (die auch für die gelbe Farbe mitverantwortlich sind). So ergeben sich beim Pelletieren von Hühnerfutter bei Temperaturen von 160-190°C keine DHA-Verluste. Nach dem Pelletieren bleibt der DHA-Gehalt über einen Zeitraum von weiteren 30 Tagen stabil. Zu diesen natürlichen Antioxidantien können, um eine weitere Verbesserung der Produktstabilität zu erzielen, zudem noch andere Antioxidantien zugesetzt werden – beispielsweise Ethoxyquin während des Fermentationsprozesses. Getrocknete Schizochytrium sp. (mit zusätzlich 20 ppm Ethoxyquin) haben bei einer Temperatur von 38°C über einen Zeitraum von 6 Tagen keinen Verlust der Gesamtfette. Lyophilisierte Schizochytrium sp. (ohne Zugabe von Antioxidantien) ergaben einen nur geringen Verlust der Gesamtfette und DHA von 5 bis 9%. Die Haltbarkeit von getrockneten Schizochytrium sp., die durch Fermentation gewonnen wurden und mit 20ppm Ethoxyquin versetzt wurden, betrug etwa ein Jahr (Barclay, 1994).

### Die Bioverfügbarkeit der DHA in getrockneten Schizochytrium Algen:

Während die Bioverfügbarkeit der meisten Algen aufgrund ihrer aus Zellulose bestehender Zellwände stark eingeschränkt ist, bestehen die Zellwände von Schizochytrium zum Großteil aus Hemizellulose und sind deshalb für eine Vielzahl von Tieren gut verdaulich (Darley et al., 1973).

Auch bei Tieren mit einer kurzen Passagezeit wurde die Verdaulichkeit überprüft (bei *Artemia* sp. und Legehühnern), wobei sich diesbezüglich gute Werte und eine befriedigende Aufnahme von DHA ergaben.

### Toxizität von Omega-Algen Schizochytrium sp.:

Barclay et al (1998) konnten in Omega-Algen keine Toxine nachweisen. Auch Hammond et al. (2001 a,b) führten drei Studien zur Untersuchung der Toxizität bei

Schizochytrium sp. durch, bei der hohe Dosen bis 4000 mg/kg/Tag über 13 Tage an Ratten verfüttert wurden. Dabei konnte kein negativer Effekt der hohen Dosierungen festgestellt werden. In einer weiteren Untersuchung an Ratten und Kaninchen konnte ebenfalls keine maternale und embryonale Toxizität festgestellt werden. Auch auf die Reproduktion der Ratte ergaben sich keine negativen Effekte.

**Tabelle 5: Eigenschaften der verschiedenen  $\Omega$ -3-Fettsäure Quellen am Beispiel der Legehennenfütterung (Barclay et al., 1998)**

| Produktkriterien                 | Fischöl              | Fischmehl          | Leinsamen                                    | Omega-Alge<br>Schizochytrium |
|----------------------------------|----------------------|--------------------|--|------------------------------|
| Zugesetzte Menge                 | 90-120 mg<br>DHA-Ei  | 60-80 mg<br>DHA-Ei | 80 mg<br>DHA-Ei                              | >200 mg<br>DHA-Ei            |
| Geschmacks-/<br>Geruchsprobleme  | Hoch                 | Hoch               | Gering                                       | Keine                        |
| Spezielle<br>Technologien        | Nein                 | Nein               | Nein   | Ja                           |
| Preis                            | Gering               | Gering             | Gering                                       | Hoch                         |
| Effizienz des<br>DHA Einbaus (%) | 40                   | 40                 | 3-6  | 55-65                        |
| Stabilität                       | Gering               | Mittel             | Hoch   | Hoch                         |
| Handhabung<br>beim Gebrauch      | Schwer               | Einfach            | Einfach                                      | Einfach                      |
| Gesundheitlicher<br>Aspekt       | Fettleber<br>Syndrom | Keine              | Produktionsa<br>bfall<br>Doppeltes<br>Eigelb | Keine                        |
| Umweltgifte                      | PCB<br>Dioxin        | Keine              | Keine  | Keine                        |

Der DHA-Gehalt der Schizochytrium sp. kann durch Extraktion des Algenöls oder als getrocknete ganzzellige Mikroalgen genutzt werden, und so z.B. Hühnerfutter zugesetzt werden (vgl. Tab.: 5).

---

## Fütterung von DHA-haltigen Omega-Algen

Legehennen wurde DHA in Form von getrockneten Mikroalgen der Schizochytrium sp. gefüttert. Dazu wurden pro Kg Futter 165 mg DHA/ Tag zugesetzt und der Gehalt an PUFAs in den Eiern bestimmt. Im Vergleich zu Kontrolleiern bestand bei Verfütterung von Omega-Algen der wesentliche Unterschied im Gehalt der PUFAs und zweier Vitamine. Die  $\Omega$ -3-Fettsäuren,  $\alpha$ -Linolensäure (C18:3  $\Omega$ 3) und Docosahexaensäure (C22:6  $\Omega$ 3), stiegen in den Eiern an; entsprechend kam es zu einem Abfall der  $\Omega$ -6-Fettsäuren der Arachidonsäure (C 20:4  $\Omega$ 6). In Bezug auf die Vitamine kam es zu einem Anstieg von Vitamin E und Vitamin B<sub>12</sub> (Barclay et al., 1998). Frischknecht (2003) führte eine Fütterungsstudie mit DHA GOLD Algen™ der Firma OmegaTech, Inc., Colorado an Hunden durch. Im Serum der Hunde konnte nach der Algenfütterung ein deutlicher Anstieg der beiden  $\Omega$ -3-Fettsäuren EPA und DHA verzeichnet werden. Schmid (2003) verabreichte Fischen DHA GOLD Algen™, die in kommerzielles Fischfutter eingearbeitet wurden. Das Fettsäuremuster der Fische wurde durch die Algenfütterung insofern beeinflusst, als der Gehalt an Docosahexaensäure nach einer Fütterungsperiode von 16 Wochen rund 25% mehr Docosahexaensäure enthielt als die Kontrolltiere, bei denen das kommerzielle Alleinfutter für Forellen mit Fischöl versetzt wurde.

Kantoci (2008) untersuchte die Anreicherung von  $\Omega$ -3-Fettsäuren im Karpfen durch den Zusatz von Mikroalgen DHA-Gold® und fand bei den mit DHA-Gold® gefütterten Karpfen eine erhöhte Anzahl der Gesamtfettsäuren. Das Fettsäuremuster veränderte sich zugunsten der  $\Omega$ -3-Fettsäuren. Hier erhöhte sich insbesondere der Gehalt der Docosahexaensäure.

Eine weitere interessante Anwendung für die gezüchteten Mikroalgen wird in der Patentschrift US7.381.558 von Barclay (2008) beschrieben. Er verwendet die gezüchteten Algen als Aufzuchtfutter für die Larven von Zuchtgarnelen. Hierfür eignet sich die Mikroalge insbesondere durch ihre geringe Größe, die von den Larven gut aufgenommen werden kann, sowie durch den hohen Anteil an  $\Omega$ -3-Fettsäuren, insbesondere an DHA.

## 2.2 Einfluss von Fetten auf die Futteraufnahme des Pferdes

Nach den Untersuchungen von Flothow (1994) sowie Meyer und Landes (1998) kann die anfängliche Aversion von Pferden bei der Fütterung fettreichen Kraftfutters durch eine langsame Gewöhnung überwunden werden. In der Regel bleibt es aber bei einer verlangsamten Futteraufnahme. Die verzögerte Futteraufnahme von fettreichem Krippenfutter ist jedoch eher positiv zu bewerten, da der protrahierte Zufluss von leicht fermentierbaren Substanzen eine Entlastung von Magen und Dünndarm bedeuten und durch die spezifischen Wirkungen des Fettes das Risiko der Dysbiosen sinkt. Eine nachhaltige Störung der Dickdarmflora ist vermutlich zu erwarten, wenn je nach Fettart mehr als 75-100g Fett/100kg KM pro Futterration gefüttert werden (Meyer und Sallmann, 1996). Um einen Anstieg des DHA-Gehalts in tierischen Produkten zu erzielen, muss aufgrund des hohen DHA-Gehalts der *Schizochytrium sp.* nur eine geringe Menge (0,6-1,5%) dem Futter zugesetzt werden (Barclay et al., 1998).

Meyer und Landes untersuchten (1998) die Auswirkungen unterschiedlicher Fettzulagen zu einem stärkereichen Krippenfutter in Bezug auf die Akzeptanz und mikrobielle Aktivität im Darmtrakt bei 5 Ponies. Dabei konnten sie nach Zugabe verschiedener Fette zum Hafer z. T. deutliche Unterschiede in der Akzeptanz und der Futteraufnahmedauer feststellen.

So wurde die Kontrollration innerhalb von ca. 2 Stunden vollständig aufgenommen. Nach Zusatz von Sonnenblumenöl war bei allen Tieren die Fressdauer deutlich verlängert und nach 4 Stunden mussten Futterreste entfernt werden. Die Tiere, die Fette tierischer Herkunft erhielten, zeigten erhebliche Akzeptanzprobleme. Auch Flothow (1994) konnte einen deutlichen Einfluss der Futteraufnahmedauer nach Fütterung eines fettreichen Krippenfutters (von 60min auf ca. 130min) feststellen.

Bowmann et al. (1979) untersuchten die Akzeptanz von 10 verschiedenen Fettarten (mit einer Konzentration von 15% im Kraftfutter). Sie konnten dabei feststellen, dass Maiskeimöl bevorzugt gefressen wurde. Bei Mischungen aus pflanzlichen und tierischen Komponenten wurde die Ration mit dem höchsten Linolensäuregehalt gewählt (Pagan et al. 1993; Flothow 1994).

### **2.2.1 Besonderheiten des Fettsäureumsatzes beim Pferd**

Die Gabe von  $\Omega$ -3-PUFA über Fischöl bewirkt eine höhere Konzentration an diesen Fettsäuren in der Lipidfraktion der Faeces des Pferdes. Dies lässt auf eine quantitative Magen-Darm-Passage intakter Fettsäuren aus dem Futter schließen (Zeyner et al., 2003). Die mit der Nahrung zugeführten essenziellen Fettsäuren werden beim Pferd anscheinend auch intakt absorbiert, wie deren Präsenz in der Zirkulation (Grunwald, 1991; Parisini, 2004) und die Inkorporation in Fettgewebe und Milchlipide (Doreau et al., 1992; Salimei et al., 1996; Zeyner et al., 1996; Hoffman et al., 1998; Kny, 1998) nach hinreichender Aufnahme über das Futter zeigt. Trotz der nachgewiesenen Möglichkeit, die intermediäre Bereitstellung an PUFA diätetisch zu beeinflussen, ist im Gegensatz zu anderen Spezies, die Wirksamkeit von mit der Nahrung zugeführter  $\Omega$ -3-Fettsäuren bei ausgewachsenen Pferden zu hinterfragen, da für diese Tiere eine Schwäche der Elongation- und Desaturierungssysteme angenommen werden muss (Meyer und Sallmann 1996). Es lässt sich bei ausgewachsenen bzw. abgesetzten Pferden im Blutplasma bzw. in Blutlipiden nur ein sehr geringer Gehalt an Polyenfettsäuren im C20-Bereich nachweisen (Weik, 1969; Weik und Altmann; 1971, Yamamoto et al., 1979a und b; Luther et al. 1981; Bauer 1983; Snow et al., 1983; Stammers et al., 1987; Grunwald 1991; Sallmann et al., 1991,1992; Stammers et al. 1995; Taugbøl und Koene, 1996; Harris et al., 1999). Und auch nach linolsäurereicher Fütterung wurde trotz Zunahme dieser Fettsäure in den Plasmalipiden kein Anstieg ihrer längerkettigen, hochungesättigten Derivate gemessen (Hambleton et al., 1980; Rich et al. 1981; Grunwald, 1991).

### **2.2.2 Anwendung diätischer Verabreichungen von PUFAs beim Pferd**

Einige Untersuchungen deuten einen immunologischen Effekt oral verabreichter PUFA auch beim Pferd an, die bei Entzündungsreaktionen und Erkrankungen mit Beteiligung entzündlicher Prozess geprüft wurden.

Hansen et al. (2002) verabreichten über sechzehn Wochen ein Mischfutter mit 10% Leinöl an zwölf Pferde. Ihr Ergebnis waren höhere Konzentrationen an LA, ALA und EPA im Blutplasma, aber nicht an ARA oder DHA. Auch die Blutplättchenaggregation war unbeeinflusst.

Parisini (2004) fand nach 10-wöchiger Fütterung von Seehundöl an Pferde mit rekurrerender Bronchoobstruktion einen Rückgang des Anteils an LA im Blutplasma und in den Phospholipiden der Leukozyten zugunsten von EPA und DHA. Dies wurde begleitet von einer Verringerung der Leukozytenzahl in den Bronchalalveolarlavage, ohne dass die Lungenfunktion und klinische Parameter verändert waren.

McCann et al. (1998) verabreichten Pferden eine Infusion von  $\Omega$ -3- oder  $\Omega$ -6-PUFA. Sie zeigten daran, dass die Lipidfraktion von Monozyten mit den parenteral verabreichten Fettsäuren angereichert, und nach Stimulation mit bakteriellem Endotoxin, die Produktion inflammatorischer Mediatoren im erwarteten Sinn modifiziert wurden. In den Phospholipiden der Monozytenmembranen der Pferde die über 8 Wochen ein Mischfutter mit 8% Leinöl erhielten, wurden höhere Anteile an ALA, EPA und DHA, sowie nach Endotoxinstimulation in vivo ein Rückgang der Eicosanoide aus Fettsäuren der  $\Omega$ -6-Reihe nachgewiesen (Morris et al., 1989, 1991; Henry et al., 1990). Allerdings blieb die erhoffte Konsequenz bezüglich der Vermeidung von Hufrehe nach Endotoxininfusion in vivo aus (Henry et al., 1991). Herthel (1998) verabreichte 12 Pferden zu gleichen Teilen entweder herkömmliches, oder ein mit einem  $\Omega$ -3-PUFA angereichertes Futter. Nach vier Wochen wurde Pferden mittels einer Nasenschlundsonde 10 kg Maisstärke verabreicht. Hierbei erwies sich die  $\Omega$ -3-fettsäurereiche Fütterung als protektiv gegenüber stärkeinduzierter Hufrehe.

Bei einer 6-wöchigen Fütterung von täglich 200g Lein- oder Maisöl an Pferde mit Sommerexzem konnte keine Besserung der dermatologischen Probleme durch eine erhöhte Zufuhr an ALA sicher nachgewiesen werden (Fridberg und Logas, 1999). Trotz der Unsicherheit bezüglich der Lokalisation und Effizienz der Elongations- und Desaturierungssysteme scheint doch auch bei Pferden die Bereitstellung von Eicosanoiden über die orale Gabe essenzieller Fettsäuren zumindest prinzipiell beeinflussbar zu sein.

### **2.2.3 Fettsäuremuster des Pferdes nach Fütterung von $\Omega$ -6 und $\Omega$ -3 Fettsäuren**

Hall et al. (2004) untersuchten, ob sich das Plasma-Fettsäureprofil von Pferden mit der Zugabe von  $\Omega$ -6 und  $\Omega$ -3 Fettsäuren ebenso verändert, wie dies bei anderen Tierarten der Fall ist.

Bei dieser Untersuchung wurden 10 Stuten im Alter zwischen 5 und 20 Jahren verwendet. Einer Gruppe (bestehend aus 5 Tieren) wurde Maiskeimöl, der anderen Gruppe wurde Fischöl als Futtermittelergänzung zugesetzt. Dabei ergab sich bei den Tieren, die Maiskeimöl als Ergänzung erhielten, eine Zunahme der Linolsäure, aber keine entsprechenden Zunahme der Arachidonsäure. Paradoxerweise wurde bei den Pferden, die die Fischölergänzung bekamen, eine Zunahme der ARA festgestellt, die anscheinend das Vorhandensein von ARA im Fischöl widerspiegelt. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Harris et al. (1999), bei denen Pferde eine Futtermittelergänzung mit  $\Omega$ -6-Fettsäuren erhielten. Diese Resultate deuten darauf hin, dass ARA bei Pferden nicht selbstverständlich aus Linolsäure synthetisiert wird.

### **2.2.4 Aufnahme und Speicherung von $\Omega$ -3 und $\Omega$ -6 Fettsäuren beim Pferd**

Die Untersuchungen von Hall et al. (2004) zeigen, dass, sich das Profil der Fettsäuren im Plasma nach 6-wöchiger Fütterung mit einer Futtermittelergänzung mit  $\Omega$ -3 und  $\Omega$ -6 Fettsäuren ändert und dass diese Veränderung bis zu 4 Wochen nach Beendigung der Futtermittelsupplementierung anhält.



## **2.3 Einfluss von $\Omega$ -3-Fettsäuren auf den Knochenstoffwechsel**

### **2.3.1 Physiologie des Knochens**

Da in der vorliegenden Untersuchung ein möglicher Einfluss auf den Knochen des Pferdes geprüft wird, soll hier die Literatur zur Physiologie des Knochens und die Bonemarker betrachtet werden.

Der Knochen ist ein einzigartiges und dynamisches Bindegewebe, das durch spezielle Zellen und Mineralisierung einer organischen Matrix gekennzeichnet ist. Dieses steife Gewebe übernimmt unter anderem die Stützfunktion des Körpers, dient den Muskeln als Ansatz und Hebel und schützt Organe und Knochenmark. Es ermöglicht Tier und Mensch sich zu bewegen und ist beteiligt an der Regelung des Flüssigkeits- und Ionenhaushalts im Körper.

Der Knochen kann histologisch in zwei Arten von Knochengewebe unterteilt werden: Man unterscheidet den Geflechts- oder Faserknochen (*Os membranaceum reticulofibrosus*) und den Lamellenknochen (*Os membranaceum lamellosum*).

Der kortikale Knochen ist eine feste Masse, während der trabekuläre Knochen eher wie eine Art gesponnenes Netz ineinander greift. Da der trabekuläre Knochen eine größere Fläche als der kortikale Knochen hat, werden Mineralien während einer kurzen Zeit des Calcium und Phosphormangels zunächst dem trabekulären Knochen entzogen, um ein Gleichgewicht innerhalb des Körpers aufrechtzuerhalten. Das menschliche Skelett des Erwachsenen besteht zu ca. 80% aus kortikalem Knochen. Den trabekulären Knochen findet man am Ende der langen Knochen und in den Wirbeln (Jee, 1988; Wasserman, 1984; Hays und Swenson, 1984).

Die langen Knochen bestehen aus der Diaphyse, dem sog. Schaft und der Epiphyse, dem Knochenende. Die Diaphyse und die Epiphyse werden durch die Metaphyse verbunden. Bei noch jungen Tieren werden Epiphyse und Metaphyse durch knorpeliges Gewebe getrennt, welches auch als Wachstumsfuge bezeichnet wird. Der lange Knochen verlängert sich über diese Wachstumsfuge, indem neuer Knochen an der Unterseite der Platte gebildet wird, von der aus Blutgefäße in die Knorpelmatrix entspringen. Bei wachsenden Tieren wird die Wachstumsfuge durch trabekulären Knochen ersetzt und der Knochen hört mit seinem Längenwachstum auf (Jee, 1988; Wasserman, 1984).

Beide, der kortikale und der trabekuläre Knochen, bestehen aus Lamellen, die aus kreisförmig angeordneten Kollagenfasern und Mineralien aufgebaut sind. Innerhalb dieser Kollagenschicht werden Vertiefungen oder Hohlräume durch ein Netz von Kanälen angeschlossen, die man als Canaliculi bezeichnet. Diese Hohlräume und Kanäle enthalten das Kommunikationssystem des Knochens. Eine konzentrische Einheit von Lamellen mit den dazugehörigen Vertiefungen und Kanälen ist bekannt als Osteon oder Havers-System. Jedes Osteon besteht aus einem Zentralkanal. Dieser ist mit mesenchymalem Bindegewebe gefüllt und einem kleinen Gefäß, das den vegetativen Nerven einschließt (Havers-Kanal).

Osteoblasten, die Knochen bildenden Zellen, werden in die Hohlräume und Kanäle geschwemmt und bilden die Knochenmatrix, die Osteoid genannt wird. Der Osteoblast umbaut sich dabei vollständig mit Osteoid, wird dadurch zum Osteozyten und verbleibt in dem Hohlraum (Jee, 1988; Lawrence and Fowler, 1997).

Der Knochen besteht aus einer organischen Matrix und aus anorganischen Salzen. Die organische Matrix besteht dabei aus Kollagenfasern von Typ I, die ungefähr 90% der extrazellulären Matrix ausmacht. Innerhalb der Matrix wird formlose Grundsubstanz freigesetzt, die die Kollagenfasern mit einer Art Kleber umgibt und auch die anorganischen Salze und Mineralien ansammelt. Sie dient bei der Mineralisierung des Knochens als Kristallisationskern für die Anlagerung der kristallinen Calciumphosphatverbindungen (Hydroxylapatit).

Das Knochenmineral liegt im Allgemeinen als kristallines Hydroxylapatit vor

$\text{Ca}_{10} (\text{PO}_4)_6 (\text{OH})_2$ . Dieses bildet etwa zwei Drittel der Trockensubstanz der Knochenmatrix. Apatit verleiht dem Skelett Starrheit und dient zudem auch als eine Art Vorratsbehälter von Calcium und Phosphor. Das Nettogewicht des Knochens besteht zu ungefähr 30% aus der organischen Matrix (meist Kollagen), zu 45% aus Mineral und zu 25% aus Wasser (Jee, 1988; Lawrence and Fowler, 1997; Wasserman, 1984; Hays and Swenson, 1984).

Lawrence et al (1994) beschrieben, dass der Mineralisierungsprozess des Pferdeknochens im 12ten Lebensmonat zu 76% erfolgt ist. Das Calcium:Phosphor-Verhältnis ist wichtig für die Knochenstabilität. Calcium und Phosphor werden im Dünndarm aufgenommen, die Absorptionsrate ist abhängig von der Form, in der der Nährstoff vorliegt, dem Ca:P-Verhältnis und der Konzentration von diesen und von mit ihnen in Verbindung stehenden Nährstoffen. Zusätzlich kann Vitamin D, Mangan,

Magnesium, Fluorid, Kupfer, Kalium, Natrium, Chlorverbindungen eine Rolle bei der Knochenanordnung und dem Metabolismus haben, indem sie die Struktur der organischen und anorganischen Bestandteile des Knochens ändern (Hays and Swanson, 1984; Wasserman, 1984).

Der Knochenmetabolismus wird von einer Vielzahl von Hormonen, von Cytokinen und anderen Faktoren reguliert, sowie auch durch das Wirken von verschiedenen Arten an Knochenzellen. Dies sind die Osteoprogenitorzellen, die Leitungszellen des Knochens, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten.

Die Osteoprogenitorzellen bestehen aus den Präosteoblasten (Vorläuferzellen der Osteoblasten), die während der Mitose eine Veränderung durchlaufen und zu Osteoblasten werden.

Leitungszellen des Knochens sind flache, nicht aktive und/oder stillgelegte Zellen, die die Oberfläche des Knochens umfassen. Sie dienen auch als Ionensperre zwischen den Canaliculi und der Flüssigkeit der Zwischenräume der Knochen.

Osteoblasten entstehen aus undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen und geben Mineralien, formlose Grundsubstanz, Osteocalcin, Osteonectin, Wasser und Kollagen Typ I an die Matrix ab.

Osteozyten sind reife Knochenzellen, die aus Osteoblasten hervorgehen. Sie sind vollständig von verkalkter Knochengrundsubstanz umgeben und dienen der Erhaltung des Knochens. Gehen Osteozyten zugrunde, geht auch die Matrix zugrunde. Osteozyten haben lange fingerähnliche Fortsätze, die vom Hauptkörper abgehen.

Osteoklasten sind vielkernige Riesenzellen und zu einem hohen Grad frei beweglich. Sie werden von den Präosteoklasten des Knochenmarks abgeleitet. Aktivierte Osteoklasten findet man normalerweise in den Aufnahmegruben und den Howship Lakunen. Die Verzweigungen von Osteoklasten mit dem Knochen bilden einen gekräuselten Rand, der ein undurchlässiges feines Netzwerk bildet und so die Aufnahme von Hormonen und Wachstumsfaktoren, die Ionenkonzentration und Nahrung aller Knochenzellen des Knochens reguliert. (Jee, 1988; Nejweide et al., 1986; Marks und Popoff, 1988; Wasserman, 1984; Lawrence und Fowler, 1997).

Osteoklasten bilden proteolytische Enzyme, die die Knochengrundsubstanz zersetzen. Teile der Knochenmatrix werden über Zellfortsätze ins Zytoplasma aufgenommen und dort weiter abgebaut (Knochenresorption).

### 2.3.2 Wirkung von $\Omega$ -Fettsäuren auf den Knochen

Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass Lipide eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und der Knochengesundheit spielen. In verschiedenen Studien wurde der positive Effekt der  $\Omega$ -3-Fettsäuren auf den Knochenstoffwechsel aufgezeigt. So konnte beispielsweise mit einer Supplementierung von 160 mg EPA/d/kg Futter über 35 Tage bei ovariectomierten Ratten bei gleichzeitiger calciumarmer Ernährung eine signifikante Erhöhung der Knochendichte von Tibia und Femur festgestellt werden (Sakaguchi et al., 1994). Auch die Verabreichung von Östrogenen oder  $\Omega$ -3-Fettsäuren an ovariectomierten Ratten führt zu einer Erhöhung des Calciumgehalts im Knochen und einer verringerten Ausscheidung von Knochenresorptionsmarkern. Werden die beiden Substanzen kombiniert verabreicht, potenzierten die Fettsäuren die protektive Wirkung des Östrogens (Schlemmer et al., 1998).

Untersuchungen bei Ratten und Hühnern zeigten, dass PUFAs und konjugierte Linolensäuren eine Auswirkung auf histomorphologische Werte bei der Knochenmodellierung haben (Watkins, 1996 und 1997,2000; Li et al, 1999). Mit der Nahrung zugeführte Fette beeinflussen den Knochenmetabolismus durch die Bildung von Prostaglandinen. Prostaglandine werden unter anderem in osteogenetischen Zellen gebildet und spielen sowohl beim Knochenaufbau als auch beim Knochenabbau eine Rolle (Marks et al., 1993).

Es sind verschiedene Möglichkeiten bekannt, in welcher Weise die PUFAs in den Knochenstoffwechsel eingreifen können. Das sind zum einen die Beeinflussung der Calciumexkretion und die Calciumresorption, um so die Knochenformation durch einen gesteigerten Calciumgehalt zu beeinflussen.

Kruger et al. (1995) führten eine Fütterungsstudie an Pferden durch, in der das ihnen verabreichte Futter mit Fischöl ( $\Omega$ -3) und auch mit Nachtkerzenöl ( $\Omega$ -6) angereichert wurde. Dabei konnte sie feststellen, dass beide Fettsäuren in der Lage sind, die Calciumexkretion über die Niere zu verringern. Zudem fördern die  $\Omega$ -Fettsäuren eine vermehrte Calciumresorption des Darmes in Verbindung mit einer gesteigerten Aktivität von Vitamin D3.

Watkins et al. (1996) berichten von einer Fütterungsstudie mit Hühnern, die mit einem durch Sojaöl angereichten Futter gefüttert wurden. Im Vergleich zu Tieren, die eine Diät mit geringerem  $\Omega$ 6: $\Omega$ 3 Verhältnis bekamen wurde in der Tibia dieser

Hühner eine vermehrte PGE<sub>2</sub>-Produktion gemessen Dies wurde mit einer geringeren Knochenformationsrate in Verbindung gebracht. Zudem sind die  $\Omega$ -3-Fettsäuren in der Lage, die Konzentration der Arachidonsäure im Knochen zu senken und in Knochenorgankulturen die ex vivo PGE<sub>2</sub>-Produktion zu senken. Im Vergleich zu Tieren, die nur mit Sojaöl gefüttert wurden, zeigen Hühner, deren Futter mit einer Mischung aus Herings- und Distelöl supplementiert wurde, eine niedrigere Konzentration an ARA, bei einem höheren Gehalt an EPA und DHA in den kortikalen Knochenlipiden (Watkins et al., 2000). Li et al. (1999) fanden ergänzend bei Ratten heraus, dass  $\Omega$ -6- und  $\Omega$ -3-Fettsäuren, zusätzlich zu PGE<sub>2</sub>, auch noch die Konzentration an IGF-1 beeinflussen. Ratten, die mit einer  $\Omega$ -6-Fettsäuren reichen Diät gefüttert wurden, zeigten eine erhöhte PGE<sub>2</sub>-Produktion. Die Serum IGF-1-Werte waren erniedrigt und das Aschegewicht pro mm Knochenlänge des Humerus war im Vergleich zu Ratten, die mit  $\Omega$ -3-Fettsäuren gefüttert wurden, vermindert. Bei einer weitem Fütterungsstudie an Ratten (Watkins et al. (2000)) war bei Tieren, die mit einer höheren  $\Omega$ -3-Fettsäurenration gefüttert wurden, die PGE<sub>2</sub>-Produktion in Knochenorgankulturen signifikant niedriger. Die Aktivität der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase im Serum war erhöht, was auf eine bessere Knochenformation schließen lässt.

Zur Wirkung der  $\Omega$ -3-Fettsäuren auf den Knochenstoffwechsel des Pferdes liegen derzeit keine Untersuchungen vor.

## **2.4 Untersuchung des Knochenstoffwechsels durch Verwendung verschiedener Knochenmarker**

Durch die Bestimmung biochemischer Parameter des Knochenstoffwechsels im Serum und Urin ist es möglich, Veränderungen ohne invasive Methoden (wie z.B. die Entnahme von Knochenbiopsien) Veränderungen des Knochens aufzuzeigen. Durch andere nicht-invasive Untersuchungsmethoden, wie Röntgen, Ultraschall Computertomografie und Magnetresonanztomografie, lassen sich zwar Veränderungen der Knochendichte und der Zubildung am Knochen treffen. Aber es können keine Aussagen über die enzymatische Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten getroffen werden. Die Bestimmung der Knochenmarker der Formation und Resorption bieten gute Dienste bei der Untersuchung von Krankheitsentstehung, bei der Behandlung und bei der Verlaufskontrolle. Allerdings sind Unterschiede zwischen kortikalem und spongiosen Knochen, sowie die Knochenabbaurate und die Anzahl der knochenauf- und knochenabbauenden Zellen nicht zu beurteilen (Withold, 1996).

### **2.4.1 Knochenmarker der Formation**

Zu den Formationsmarkern gehört u.a. die Gesamtalkalische Phosphatase (ALP).

#### **Gesamtalkalische Phosphatase (ALP)**

Die gesamtalkalische Phosphatase (ALP) besteht aus einer Reihe von Isoenzymen, die membrangebunden in zahlreichen Geweben zu finden sind, z.B. in Leber, Knochen, Plazenta, Darm, Niere und Lunge (Green et al., 1971).

Beim Pferd wird die Konzentration der ALP hauptsächlich von dem knochenspezifischen und dem leberspezifischen Isoenzym bestimmt. Hank et al., (1993) und Thoren-Trolling (1988) trennten die verschiedenen Isoenzyme der ALP bei Pferden (intestinalen, knochenspezifisches, leberspezifisches) auf. Dabei konnte keine Aktivität des intestinalen Enzyms festgestellt werden und beim plazentären nur während der Trächtigkeit. Die ALP-Aktivität von neugeborenen Pferden stammt zu 80-92% von der knochenspezifischen ALP. Während der ersten 21 Lebensmonate geht die Aktivität des knochenspezifischen Isoenzym stark zurück, so dass beim

ausgewachsenen Pony nur noch 18% der ALP-Aktivität auf den Knochen zurückzuführen sind.

Price et al. (1995) untersuchten in einer klinischen Studie die altersabhängige Konzentration der gesamtalkalischen Phosphatase im Serum. Untersucht wurden 60 klinisch gesunde Pferde im Alter von 3 Monaten bis 20 Jahre. Sie konnten feststellen, dass die Gesamtaktivität der ALP während der ersten Lebensjahre am höchsten ist und mit zunehmendem Alter abfällt (siehe **Tabelle 6**). Zu den selben Ergebnissen kamen auch Lepage et al. (1990), Hank et al. (1993) und Nitzschke und Fürll (1996).

**Tabelle 6: Referenzbereiche der ALP in Abhängigkeit vom Alter modifiziert nach Price et al., (1995)**

| Alter in Jahren | Gesamt-ALP U/L |
|-----------------|----------------|
| < 1             | 223-498        |
| 1-2             | 134-238        |
| 3-4             | 101-203        |
| 5-20            | 91-352         |

### **Osteocalcin (OC):**

Osteocalcin (OC, BGP= bone gla-protein) gilt als hochspezifischer Marker des Knochenanbaus. Es ist ein Vitamin-K-abhängiges und durch Vitamin D stimulierbares Hydroxyapatit bindendes Protein. Osteocalcin wird ausschließlich von Osteoblasten während der Phase der Matrixmineralisation synthetisiert (Lian und Friedmann 1978, Kannus et al., 1996) und kann daher als ein spezifischer Marker der Osteoblastenfunktion angesehen werden (Stracke et al., 1984). Es wird geschätzt, dass ca. 80% des neu synthetisierten Osteocalcins direkt nach der Freisetzung aus dem Osteoblasten in die Knochenmatrix inkorporiert werden. Hier macht das Peptid den größten Anteil der nicht kollagen Proteinfraktion aus. Der kleinere Anteil des neu gebildeten OC gelangt direkt in die Zirkulation, wo es immunoquantitativ nachweisbar ist. Allerdings unterliegt das Protein bereits im Serum einer raschen Biodegradation, so dass sowohl intaktes, als auch verschiedene OC-Fragmente zirkulieren (Fourier et al., 1989; Riggs et al., 1998).

Da das Osteocalcin im Serum sehr instabil ist, sollte dieses, falls ein Assay für intaktes Osteocalcin verwendet wird, sofort nach der Entnahme bei -80°C tief gefroren werden.

Osteocalcin besteht aus 49 Aminosäuren und enthält drei  $\gamma$ -carboxylierte Glutaminsäurereste (Fraher, 1993). Die GLA Überreste, die für OC spezifisch sind, werden nach der Umwandlung des Proteins durch ein Carboxylaseenzymssystem gebildet. Osteocalcin hat zudem eine hohe Affinität zu Hydroxylapatit (Price, 1982). In Anwesenheit von Calcium machen diese GLA-Überreste eine Konformationsänderung durch, die das Osteocalcin an Hydroxylapatit binden (Lian und Grundberg, 1988). Das Protein kommt in einem Verhältnis von 1:1 mit Kollagen im Knochen vor und ist proportional zur Konzentration von Hydroxylapatit (Lian und Grundberg, 1988).

Es wird angenommen, dass das Osteocalcin die Größe des Hydroxylapatit-Kristalls regulieren kann (Grundberg und Nishimoto, 1999). Osteocalcin wird durch Proteolyse gespalten und durch die Niere aus der Zirkulation gefiltert (Gomez et al., 1994). In der Zirkulation unterliegt es dann einer schnellen Biodegradation. Die Serumkonzentration von Osteocalcins ist vermutlich das Ergebnis aus der Abgabe an das zirkulierende System, bevor es zur Bindung an Hydroxylapatit kommt (Price, 1982).

Sind Pferde natürlichem Licht ausgesetzt, unterliegt das Osteocalcin einem zirkadianen Rhythmus. Die OC-Konzentration bei gesunden weiblichen Warmblütern zeigte während des Tages von 7.00-19.00 Uhr eine gleich bleibende Tendenz und fiel dann in den frühen Abendstunden (von 19.00-20.00 Uhr) ab. Nachts erhöht sich der Wert und erreichte seinen Höhepunkt um 5.00 Uhr morgens (Lepage et al., 1991). Bei Pferden, die nur Fluoreszenzbeleuchtung ausgesetzt waren, konnte ein zirkadianer Rhythmus dagegen nicht festgestellt werden (Hope et al., 1993). Eine Abnahme des Osteocalcins in Abhängigkeit vom Alter konnten Bell (2001) und Lepage et al. (1990, 1991) in einer Studie feststellen.

Ein signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Pferden konnte im Alter zwischen dem 24 und 36 Monat festgestellt werden. Zu dieser Zeit ist die durchschnittliche Osteocalcin Konzentration bei den weiblichen Tieren höher. Das ist erklärbar durch die Aktivität der Sexualhormone. Das Ziel von Testosteron ist



hauptsächlich der corticale Knochen, während Östrogen wichtig für trabekuläre Knochenstruktur ist (Seeman 1996).

## 2.4.2 Knochenmarker der Resorption

### Hydroxypyridiniumderivate (Crosslinks):

Nach Ablagerung der Knochenmatrix reifen die neu synthetisierten Kollagenfibrillen durch Ausbildung spezifischer Quervernetzungsbestandteile den sog. „Pyridinium-Crosslinks“. Im Rahmen des Knochenabbaus wird reifes Kollagen degradiert und die Pyridinium-Crosslinks werden als Degradationsprodukte mit dem Urin ausgeschieden. Da diese Verbindungen fast ausschließlich im Knochen vorkommen und ihre Ausscheidung nicht durch die Neosynthese von Kollagenen beeinflusst wird, gelten die Pyridinium-Crosslinks Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD) als spezifische Parameter der Knochenresorption.

Die 3-(OH)-Pyridinium-Derivate Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD) werden als Quervernetzungsprodukte („Crosslinks“) während der Kollagenreifung gebildet und sind für die Stabilität des extrazellulären Kollagens verantwortlich. Während der Knochenresorption werden diese ausgereiften Matrix-Kollagene proteolytisch abgebaut, was u.a. zur Freisetzung der darin enthaltenen Quervernetzungsbestandteile in die Zirkulation führt. Da für diese komplex aufgebauten Strukturen keine weiteren Utilisationmöglichkeiten im Körper bestehen, werden PYD und DPD mit dem Urin ausgeschieden. Da weder PYD noch DPD mit der Nahrung aufgenommen werden, kann die Bestimmung der Pyridinium-Crosslinks im Urin diätunabhängig erfolgen.

Während PYD in Knorpel, Knochen und Bändern vorkommt, findet sich DPD fast ausschließlich im Knochen. Beide Derivate fehlen in den Kollagenen der Haut (Robins, 1982; Eyre et. al., 1988).

Der quantitative Nachweis der Crosslinks kann durch HPLC erfolgen. Da ein Teil der Crosslinks in peptidgebundener Form im Urin vorliegt, müssen während der Probenaufbereitung durch einen Säurehydrolyseschritt die Bindungen zwischen den Peptidresten und Kollagen-Crosslinks gespalten werden, so dass alle Crosslinks in freier Form vorliegen (Black et al., 1988; Colwell et al., 1993).

Da die Ausscheidung der Crosslinks einem zirkadianen Rhythmus unterliegt, werden die gemessenen Werte auf die Creatininkonzentration des Urins bezogen.

### **2.4.3 Calciumausscheidung im Urin**

Der Serum-Calciumspiegel wird u.a. durch Veränderungen der Knochenresorptionsrate und der renalen Calciumausscheidung beeinflusst. Bei einem vermehrten Knochenabbau kommt es zu einem Anstieg der Calciumausscheidung über den Urin.

Die renale Ca-Ausscheidung ist wesentlich für die Ca-Homöostase beim Pferd. Das Pferd ist in der Lage, große Mengen Calcium und Phosphor über die Niere auszuscheiden. Whitlock (1970) führte eine Studie mit Jährlingen durch, die eine Ration mit 2% Calcium in der Trockensubstanz erhielten und daraufhin 13-20g Calcium in 6-8 l Urin/Tag ausschieden. Pferde mit Nierenversagen oder nach beidseitiger Nephrektomie zeigten einen Anstieg der Serum-Ca-Konzentration (Tennant et al., 1981 und 1982). Die Ca-Abgabe über den Kot beträgt bei jungen Pferden und Ponies, unabhängig von der Höhe der Ca-Aufnahme, etwa 20 mg Calcium/kg/KM (Schreyver et al., 1970; Whitlock, 1970).

Schreyver et al. (1970) verabreichten 6 bis 14 Monate alten Ponies Rationen mit verschiedenem Calcium-Gehalt. Die unterschiedlichen Ca-Aufnahmen bewirkten Veränderungen hinsichtlich der Exkretion und Retention. Der Plasmaspiegel und der endogene fäkale Ca-Verlust blieben unbeeinflusst. Die renale Ausscheidung und Ca-Mobilisierung aus dem Knochen passte sich der zugeführten Ca-Menge an, um die Ca-Homöostase aufrechtzuerhalten. Die renale Ca-Exkretion verhielt sich linear zur Ca-Aufnahme. Schnurpel (1991) beobachtete einen postprandialen Ausscheidungsrhythmus. Die Menge des renal ausgeschiedenen Calciums und der postprandiale Zeitpunkt der maximalen Ausscheidung waren abhängig von der Futterart. So wurde bei Luzernenfütterung mehr Calcium renal ausgeschieden als bei Mischfuttermitteln.

In der Humanmedizin wird die Bestimmung der Calciumausscheidung im morgendlichen Nüchternurin durchgeführt, da dieser weniger stark von der Nahrungszufuhr abhängig ist (Seibel, 1996). Wie beim Menschen unterliegt die

Calciumausscheidung im Urin auch beim Pferd deutlichen zeitlichen Schwankungen. Es sind zwei Tiefpunkte zu erkennen, der eine zwischen 14.00 und 16.00 Uhr, der andere zwischen Mitternacht und 2.00 Uhr. Ein Höhepunkt besteht gegen 7.00 Uhr morgens.

### 3 Material und Methoden

In der vorliegenden Pilotstudie wurde bei vier Ponies der Einfluss von mit dem Futter zugeführten  $\Omega$ -3-Fettsäuren auf das Fettsäuremuster im Serum untersucht. Gleichzeitig wurde mit Hilfe von im Blut und Urin messbaren biochemischen Parametern, die Wirkung der  $\Omega$ -3-Fettsäuren auf den Knochenstoffwechsel geprüft.

#### 3.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

**Tabelle 7: Anzahl der Tiere, Geschlecht, Alter (in Jahren) und mittlere Körpergewichte (in kg) während des Versuchs**

| <b>Tier-Nummer</b> | <b>Geschlecht</b>   | <b>Alter<br/>in Jahren</b> | <b>Durchschnittliches<br/>Körpergewicht während des<br/>Versuchs in kg</b> |
|--------------------|---------------------|----------------------------|--|
| 1                  | weiblich, intakt    | 10                         | 342 kg   |
| 2                  | weiblich, intakt    | 13                         | 257 kg   |
| 3                  | männlich, kastriert | 6                          | 209 kg   |
| 4                  | männlich, kastriert | 12                         | 250 kg   |

Die Haltung der Tiere erfolgte während der gesamten Versuchsdauer in Offenstallhaltung. Jedem Tier stand eine Box von etwa 10m<sup>2</sup> mit einem eigenen Futterplatz und einem Paddock von ca. 50m<sup>2</sup> zur Verfügung. Die Paddocks konnten durch Öffnen der Trenngatter miteinander verbunden werden, so dass die Tiere nur während der Futteraufnahme, der Probennahme und der Nachtruhe getrennt waren. Der Untergrund der Paddocks bestand aus Sand und Erde ohne Bewuchs. Als Boxeneinstreu wurden handelsübliche Hanfspäne (die holzigen Anteile der Pflanze, die sog. Hanfschäben) der Firma Scharrer verwendet. Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn geimpft und mit Ivomectin entwurmt.

### 3.2 Versuchsfutter

Grundfutter:

Das Grundfutter bestand aus Heu, Hafer, Weizenkleie und einem Mineralfutter das jedem Tier gewichtsabhängig verabreicht wurde.

Während der  $\Omega$ -3-fettsäurearmen Fütterung (Vor- und Nachperiode) wurde ein  $\Omega$ -3-fettsäurearmes Pflanzenöl (Mazola® reines Maiskeimöl) zum Grundfutter zugegeben.

**Tabelle 8: Nährstoffgehalt des Versuchsfutters nach institutseigener Weender Analyse**

| Nährstoffe | Heu   |       | Hafer |       | Weizenkleie |       |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------------|-------|
|            | % uS  | % TS  | % uS  | % TS  | % uS        | % TS  |
| Rp         | 4.72  | 5.03  | 14.04 | 15.13 | 9.77        | 10.70 |
| Rfe        | 1.09  | 1.16  | 2.93  | 3.20  | 3.68        | 4.03  |
| Ra         | 5.70  | 6.15  | 5.87  | 6.40  | 3.05        | 3.34  |
| Rfa        | 32.02 | 34.13 | 10.02 | 10.93 | 10.80       | 11.86 |
| NfE        | 50.21 | 53.53 | 59.00 | 64.34 | 63.99       | 70.07 |
| TS         | 93.81 |       | 91.70 |       | 91.33       |       |

### 3.3 Energiezuteilung und Futterzuteilung

Ziel einer bedarfsgerechten Energiezuteilung ist die Konstanzhaltung des Gewichts der Tiere während der gesamten Versuchsdauer. Die Gewichtskontrolle erfolgte in regelmäßigen Abständen von 14 Tagen.

**Tabelle 9: Mittlere Energie- und Futterzuteilung der einzelnen Ponies**

| <b>Tier-Nummer</b> | <b>Mittlere Energiezuteilung MJ ME/kg KM/Tag</b> | <b>Mittleres Körpergewicht in kg</b> | <b>Mittlere Futterzuteilung in g/Tag</b> |
|--------------------|--|--------------------------------------|--|
| 1                  | 44,7   | 343                                  | 4630                                     |
| 2                  | 39,0   | 257                                  | 4008                                     |
| 3                  | 32,4   | 210                                  | 3370                                     |
| 4                  | 38,0   | 250                                  | 3970                                     |

### 3.4 DHA Gold Alge®

Als Quelle der  $\Omega$ -3-Fettsäure wurden Mikroalgen der Firma Martek Inc., Colorado, USA (ehemals Omega Tec) verwendet.

**Tabelle 10: Nährstoffgehalt der DHA Gold Algen® nach Angaben des Herstellers**

| <b>Nährstoffe</b> | <b>% uS</b> |
|-------------------|-------------|
| Rp                | 12,4        |
| Rfe               | 58,5        |
| Ra                | 8,1         |
| Rfa               | 3,5         |
| NfE               | 13,8        |
| Feuchte           | 3,7         |
| TS                | 96,3        |

**Tabelle 11: Mineralstoffgehalte der DHA GOLD Algen® nach Angaben des Herstellers**

| Mineralstoffe | % uS |
|---------------|------|
| Ca            | 0,03 |
| P             | 0,13 |
| Na            | 2,12 |
| K             | 0,41 |
| Mg            | 0,11 |

**Tabelle 12: Durchschnittliches Fettsäuremuster der DHA GOLD Algen® nach Angaben des Herstellers**

| Fettsäuren-<br>bezeichnung | Name                  | % der Gesamt-<br>fettsäuren | In g/100g<br>TS |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------|
| C 12:0                     | Laurinsäure           | 0,3                         | 0,1             |
| C 14:0                     | Myristinsäure         | 8,5                         | 4,5             |
| C 15:0                     | Pentadeconsäure       | 0,3                         | 0,2             |
| C 16:0                     | Palmitinsäure         | 23,2                        | 12,2            |
| C 18:0                     | Stearinsäure          | 0,5                         | 0,3             |
| C 18:3 (Ω-6)               | Gamma-Linolensäure    | 0,4                         | 0,2             |
| C 18:4 (Ω-3)               | Octadecatetraensäure  | 0,4                         | 0,2             |
| C 20:3 (Ω-6)               | Homogammalinolensäure | 1,6                         | 0,8             |
| C 20:4 (Ω-6)               | Arachidonsäure        | 0,8                         | 0,4             |
| C 20:4 (Ω-7)               | Eicosatetraensäure    | 0,9                         | 0,5             |
| C 20:5 (Ω-3)               | Eicosapentaensäure    | 1,9                         | 1,0             |
| C 22:1 (Ω-9)               | Docosaensäure         | 0,3                         | 0,1             |
| C 22:5 (Ω-6)               | Docosapentaensäure    | 18,3                        | 9,7             |
| C 22:6 (Ω-3)               | Docosahexaensäure     | 42,3                        | 22,8            |
| C 24:0                     | Lignocerinsäure       | 0,1                         | 0,1             |

### **3.5 Fütterung der Tiere**

Die Fütterung der Tiere erfolgte zweimal täglich (morgens und abends) in einem Abstand von 8 Stunden. Wasser stand über eine Selbsttränke ad libitum zur Verfügung. Um die vollständige Futteraufnahme jedes Ponies zu kontrollieren, wurden die Tiere während des Fütterns voneinander getrennt gehalten.

### **3.6 Versuchsaufbau**

Die Studie war in 3 Perioden untergliedert. Die Vor- und Nachperiode dauerten jeweils 6 Wochen, die Algenperiode betrug 12 Wochen.

Die Fütterung während der Vorperiode wurde mit dem Grundfutter plus Pflanzenöl durchgeführt. In der folgenden Algenperiode bekamen die Tiere das Grundfutter und eine für jedes Pony berechnete Algenmenge. In der 6 wöchigen Nachperiode erfolgte die Fütterung wieder mit dem Grundfutter und Pflanzenöl.

In der Algenperiode wurde das Pflanzenöl durch 0,07g DHA pro kg Körpergewicht ersetzt. Dies entspricht einer Algenmenge von 0,32g.

### **3.7 Probennahme**

#### **3.7.1 Blutgewinnung**

Die Blutentnahme erfolgte im Abstand von 14 Tagen aus der Vena jugularis. Um zeitlichen Schwankungen entgegenzuwirken, wurden die Probe rotierend entnommen, d.h., die erste Probennahme erfolgte um 9.00 Uhr von Tier Nr. 1, um 9.20 Uhr von Tier Nr. 2, um 9.40 Uhr von Tier Nr.3 und um 10.00 Uhr schließlich von Tier Nr. 4.

Bei der nächsten Probennahme wurde von Tier Nr. 2 um 9.00 Uhr die erste Probe entnommen, bei Tier Nr. 3 die zweite um 9.20Uhr, bei Tier Nr. 4 die dritte um 9.40 Uhr und bei Tier Nr. 1 die vierte Probe um 10.00 Uhr.

Bei den darauf folgenden Probenahmen wurde bei Tier Nr 3 mit der Probennahme begonnen, bei der nächsten dann mit Tier Nr. 4.



Zur Gewinnung von Plasma und Erythrozyten wurden 5 ml Vollblut in ein mit Kalium-EDTA beschichtetes Röhrchen gegeben. Für die Serumproben wurden zweimal 10 ml Vollblut in ein Serumröhrchen mit Zentrifugierhilfekügelchen überführt. Aus den Serumproben sollten Osteocalcin und Calcium, Gesamtalkalische Phosphatase und das Gesamtfettsäuremuster bestimmt werden. Das Blutplasma sowie die gewaschenen Erythrozyten wurden für weitere gaschromatografische Analysen (Fettsäuremuster der Triglyceride, Phospholipide und Erythrozytenmembran) verwendet. Das entnommene EDTA-Blut wurde sofort nach Entnahme für 10 min bei 3000 U/ min zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und bei -80°C in Eppendorf-Cups eingefroren. Nach der Verwerfung des Buffy Coats wurden die Erythrozyten mit 4 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt, vorsichtig geschwenkt und weitere 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt und die so gereinigten Erythrozyten ebenfalls bei -80°C in Eppendorf Cups eingefroren und gelagert.

Das Blut der Serumprobe wurde nach 10 min ebenfalls für 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert und zur Bestimmung des Osteocalcins und als Rückstellproben bei -80°C, das restliche Serum bei -20°C, tief gefroren gelagert.

### **3.7.2 Uringewinnung**

Die Uringewinnung erfolgte ebenfalls im Abstand von 14 Tagen nach der Fütterung um 11.00 Uhr. Die Uringewinnung erfolgte bei den Stuten mit einem sterilen, flexiblen Gummikatheter. Bei den beiden Wallachen wurden vom spontan abgesetzten Harn etwa 400 ml aufgefangen. Von dem gewonnenen Urin wurden pro Tier 40 ml in jeweils 10 ml Portionen bei -20°C eingefroren.

### 3.8 Bestimmung der Urinparameter

#### 3.8.1 Collagen- Crosslinks Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD)

Das Prinzip zur Bestimmung der Konzentrationen von Pyridinolin und Desoxypyridinolin wurde nach einem in unserem Institut eingeführten Verfahren durchgeführt (Wehr, 1998), dessen Entwicklung auf einer Methode nach Colwell et al. (1993) und Black et al. (1988) basiert.

Die Bestimmung von Pyridinolin und Desoxypyridinolin mittels Eigenfluoreszenz erfolgt nach saurer Hydrolyse und Vorreinigung über Cellulose-Chromatographiesäule in einer Ionenpaar-Reversed-Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC).

Reagenzien und Material:

- Salzsäure rauchend, 37% reinst, Merck-Nr. 100314
- Acetonitril, Merck-Nr. 46H3498
- Essigsäure 100%, pro analysi, Merck-Nr. 100063
- Reinstwasser für die Chromatografie, hauseigene Herstellung (Anlage Seralpur Delta, Seral Reinstwasser- Systeme)
- Fibrous Cellulose Powder CF 1, Whatman International Ltd., Maidstone England, Katalog-Nr. 4014050
- Poly-Prep® Chromatografie Columns (0,8 x 4 cm), Bio-Rad Laboratories, Katalog-Nr. 7311550
- Heptafluorobutyricacid (HFBA), Sigma Chemical Co., Katalog-Nr. 46H3498
- Acetonitril, Gradient grade für die Chromatografie, Merck-Nr.100030
- Pyridinolin- und Deoxypyridinolinkalibrator, PYD/DPD-HPLC-Calibrator, Metra Biosystems Inc., Mountain View, USA

## Apparate

### HPLC-Anlage:

- Chromatographie Laboratory Automated Software System „ Class-vp 2.1“ mit Computer Pentium I 90, 128 MB RAM, Shimadzu, Oberhaching/München
- Fluoreszenzdetektor, Shimadzu RF-551 S Spectrofluorometric Detector, Shimadzu, Oberhaching/München.
- Pumpe und Steuergerät, Waters Millipore S.A.
- Probengeber Shimadzu SIL 10 AD, mit integrierter Probenkühlung, Shimadzu, Oberhaching/ München
- Chromatographiesäule, Spherisorb ODS-2-C18-2 (5) 150 x 4 mit Vorsäule, Sph ODS-2,5 $\mu$  3000-10, Latek Labortechnik-Geräte GmbH, Eppenheim.

### Bestimmung der Collagen-Crosslinks:

- Vorbereitung der Cellulose-Chromatografie-Säule
- Herstellen der Waschlösung:
- Es wird ein Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril, Eisessig und Reinstwasser im Verhältnis 4:1:1 hergestellt.

### Reinigung der Cellulose:

50g Cellulose werden mit 1 l Reinstwasser in 4 Arbeitsgängen gewaschen. Der Überstand wird verworfen und damit die feinen Partikel entfernt. Die gereinigte Cellulose wird mit 400 ml der Waschlösung vermischt. Daraufhin wird jede der Chromatographiesäulen mit 8 ml Cellulose beschickt und 2 mal mit je 5 ml der Waschlösung gespült. Nach der zweiten Spülung werden die Cellulosesäulen verschlossen und für 60 bis 90 Minuten stehen gelassen, damit sich die Cellulose möglichst gleichmäßig absetzen kann.

### Aufschluss und Vorfraktionierung der Probe

Es werden jeweils 1 ml der Urinprobe mit 1 ml 37%iger rauchender Salzsäure versetzt und 24 Stunden bei 110°C im Trockenschrank sauer hydrolysiert. Nach der

Trocknung wird die Probe 10 Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert. Nach quantitativer Überführung von jeweils 1 ml aus den Überständen auf die vorbereitete Cellulosesäule werden diese 4 mal gewaschen. Dadurch wird ein Großteil der für die HPLC störenden Aminosäuren, Salze und Chromogene entfernt. Die Elution von Pyridinolin (PYD) und Desoxyypyridinolin (DPD) erfolgt anschließend mit 2x2 ml Reinstwasser. Zum Abschluss wird die Lösung mit Stickstoff bis zur Trocknung begast.

### Bestimmung von Pyridinolin und Desoxyypyridinolin mittels HPLC

Die mobile Phase besteht aus 85% Reinstwasser, 15% Acetonitril und 0,01 mol HFBA. Der pH-Wert von 1,9 wird mit 0,1n NaOH bzw. 1% HFBA-Lösung eingestellt. Die externen Standards eluieren reproduzierbar nach einer Retentionszeit von etwa 7 Minuten (Pyridinolin) und 8 Minuten (Desoxyypyridinolin). Die Flussrate der HPLC-Anlage beträgt 0,8 ml/min. Die Messung erfolgt bei der Extension 295 nm und der Emission von 400 nm. Die getrocknete Probe wird in 200 µl 1%iger HFBA-Lösung aufgenommen und davon 90 µl auf die Trennsäule aufgetragen. Während des gesamten Messvorgangs werden die Proben konstant auf einer Temperatur von 8°C gehalten.

### 3.8.2 Creatinin

Die Bestimmung des Creatinins im Urin basiert auf der modifizierten Jaffe Methode (1886).

Dabei erfolgt die Bildung eines gelben Farbkomplexes bei der Reaktion von alkalischer Pikrinsäure mit Creatinin. Die Intensität des Farbkomplexes ist direkt linear proportional zur Creatininkonzentration in der Probe und wird bei 490 nm fotometrisch gemessen.

Zur Probenanalyse wurde ein Creatinin-Assay der Firma Metra Biosystems, Inc., Mountain View, USA verwendet.

Zur Durchführung der Bestimmung wird eine Mikrotiterplatte mit den Urinproben belegt. Nach dem Auftragen der Pikrinsäure und einer Inkubationszeit von 30 min

wird die Mikrotiterplatte bei 490 nm in einem Plattenfotometer (Easy Reader EAR 400, SLT-Labinstruments, Crailsheim) gemessen.

### **3.8.3 Calcium**

Der Calciumwert des Urins wurde mittels eines Flammenfotometer (Elex 6361, Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 622 nm bestimmt. Dazu werden die einzelnen Urinproben zur Kristallauflösung mit Perchlorsäure ( $\text{HClO}_4$ ) versetzt, bis der Urin einen pH-Wert von  $< 2,0$  aufweist.

Die so vorbereiteten Urinproben werden bei der Messung mit einer 1%igen Lithiumchloridlösung mit Hilfe eines Dual Diluters (je nach Calciumgehalt im Urin 1:30 bis 1:50) verdünnt und entsprechende Aliquote mit Acetylen verbrannt. Dabei ist die Calciumkonzentration in der Probe der Intensität der entstehenden Flamme direkt proportional.

#### **3.8.3.1 Berechnung zur Schätzung der Harnvolumina**

Die tägliche Harnmenge der einzelnen Tiere wurde mit Hilfe der gemessenen Kreatininkonzentration des Harns berechnet. Nach Meyer und Stardermann, (1990) folgt die Beziehung zwischen Harnvolumen und Kreatininausscheidung einer hyperbolischen Funktion.

Durch die sich daraus ergebende Funktionsgleichung lässt sich bei gesunden Pferden aus der Kreatininkonzentration im Harn zu einem gegebenen Zeitpunkt das Gesamtharnvolumen pro Stunde nach folgender Formel abschätzen:

Funktionsgleichung:

$$Y=24,3+14067/X$$

Y= Harnvolumen (ml/ 100 kg KGxh)

X= Kreatininkonzentration (mg/dl)

h= Stunde

### **3.9 Bestimmung der Serumparameter**

#### **3.9.1 Gesamtalkalische Phosphatase**

Die Bestimmung der Konzentration der Gesamtalkalischen Phosphatase im Serum erfolgte unter der Verwendung eines ALP-Assays (MPR 2) der Firma Roche Diagnostik GmbH Mannheim, Deutschland.

Die Durchführung der Messung erfolgt fotometrisch nach der „optimierten Standard-Methode“ der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie.

Bei dem angewendeten Testprinzip werden durch die Gesamtalkalische Phosphatase p-Nitrophenolphosphat und H<sub>2</sub>O zu Phosphat und p-Nitrophenol umgesetzt. Die dabei entstehende Farbdifferenz ist dabei der Konzentration der gesamtalkalischen Phosphatase direkt proportional und wird fotometrisch gemessen. Zur Testdurchführung: Die Serumproben und die Reagenzlösung (Diäthanolamin-Puffer und p-Nitrophenylphosphat) wurden in eine auf 37°C vorgewärmte Küvette pipettiert, gemischt und die Extinktion bei 450 nm fotometrisch (Spektrofotometer Genesys Serie 10, Thermo Spectronic, Cambridge, UK.) gemessen. Weitere Ablesungen erfolgten genau nach 1, 2 und 3 Minuten. Aus den Extinktionsdifferenzen pro Minute wurde der Mittelwert bestimmt ( $\Delta E/\text{min}$ ) und die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in der Serumprobe nach folgender Formel berechnet:

$$U/L = 3300 \times \Delta E_{450} / \text{min}$$

### **3.9.2 Osteocalcin (OC)**

Das Osteocalcin wurde mit einem Enzym-linked immunosorbent assay (ELISA) (NovoCalcinO, Metra Biosystems, Inc. Mountain View, CA) durchgeführt. Ermittelt wird intaktes OC.

Testdurchführung:

Zunächst wird die Mikroplatte mit 25µl Standards, Kontrollen und Proben bestückt. Danach werden 125µl Anti-Osteocalcin Antikörper dazugegeben und das Ganze für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird das Ganze 3mal mit der Waschlösung gewaschen. Dann werden 150 µl des Enzymkonjugats zugegeben und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach 3mal mit der Waschlösung gespült. Nun wird 150 µl der Substrat-Lösung zugegeben und für 35 bis 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss werden 50 µl der Stopplösung zugegeben. Anschließend wird die optische Dichte bei 405 nm bestimmt.

### **3.10 Fettsäurenanalyse im Serum**

Die Fettsäurenanalyse im Serum wurde gaschromatografisch von der Firma OmegaTech, Inc., Wendelsheim, mit lyophilisierten Serumproben durchgeführt.

Probenvorbereitung:

Es wurden Serumproben von jeweils 1,5 ml lyophilisiert (Lyophilisator Typ Gamma 1-20, Christ®, Osterode). Die Durchführung der Probenanalyse wurde dann von der Firma OmegaTech, Inc., Wendelsheim, übernommen.

Geräte und Reagenzien:

- Gaschromatografie mit Flammenionisationsdetektor und automatischem Injektionssystem
- Kapillar Chromatografie Säulen, SP-2330 (30 mt x 25 mm, 0,25 µm), Supelco Park Bellefonte
- Methanol für die Chromatografie Merck-Nr. 106007
- Schwefelsäure 95-98%, reinst, Merck-Nr. 100713

- n-Hexan für die Chromatografie Merck-Nr. 104367
- Reinstwasser für die Chromatografie

Aufbereitung des Probenmaterials und Messprinzip:

Die freien und die veresterten Fettsäuren der lyophilisierten Serumproben werden mit einer 4%igen  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{CH}_3\text{OH}$  – Lösung methyliert. Danach werden die Fettsäuremethylester mit Hexan extrahiert und in den Gaschromatografen eingespritzt.

Die Fettsäureanalytik der  $\Omega$ -6-Fettsäuren EPA und DPA war in der Nachperiode aus technischen Gründen nicht möglich.



## 4 Ergebnisse

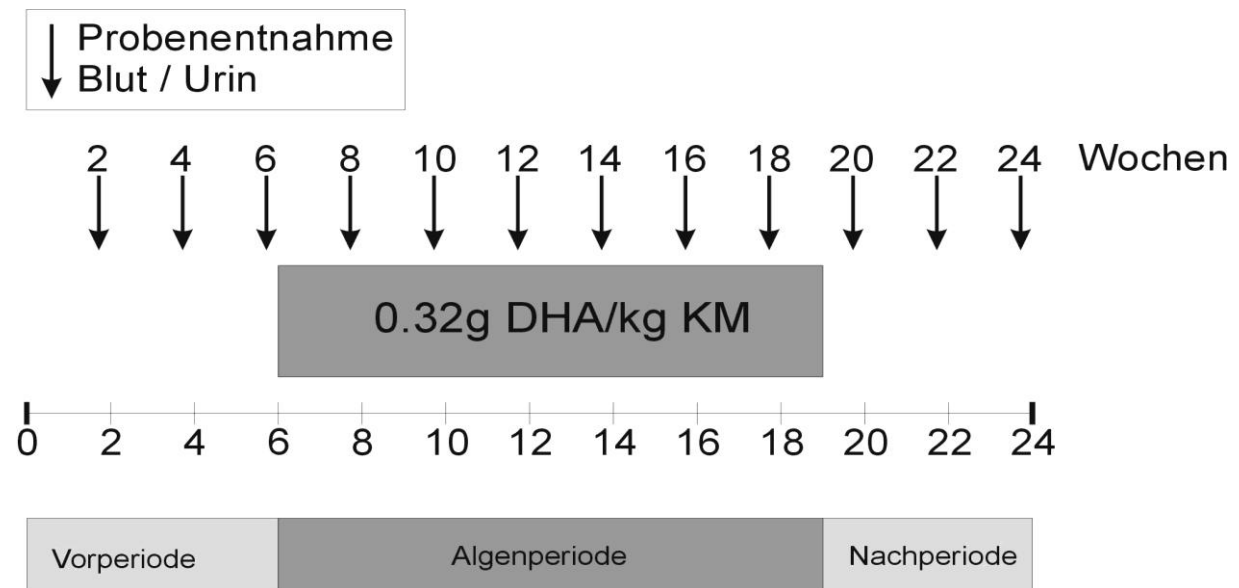


Abbildung 5: Versuchsaufbau im zeitlichen Verlauf

### 4.1 Klinische Beobachtung:

Das Allgemeinbefinden der Versuchstiere war während des gesamten Versuchszeitraums ungestört. Es wurde keine Beeinflussung durch die Versuchsration festgestellt.

Die Tiere nahmen das ihnen zugewiesene Futter stets vollständig auf. Die Futterration wurde auf zwei Tageszeitpunkte aufgeteilt, so dass die Tiere eine Vormittags- und eine Nachmittagsration erhielten.

Die Bestimmung des Körpergewichtes erfolgte im Abstand von 14 Tagen. Die Gewichtsentwicklung war anfänglich leicht rückläufig, blieb jedoch bei der verabreichten Futtermenge während der gesamten Versuchsdauer nahezu konstant.

**Tabelle 13: Mittleres Körpergewicht der Versuchstiere (in kg) während der Versuchsabschnitte**

| Körpergewichte [kg] | Vorperiode | Algenperiode | Nachperiode |
|---------------------|------------|--------------|-------------|
| Tier 1              | 344        | 341          | 345         |
| Tier 2              | 255        | 258          | 260         |
| Tier 3              | 213        | 207          | 210         |
| Tier 4              | 253        | 249          | 250         |

#### 4.2 Wirkstoffaufnahme (DHA-Menge):

Während der Vorperiode wurde den Tieren kein Wirkstoff gefüttert. Während der Algenperiode wurde die Versuchsfuttermittelsration mit 0,32g Algen / kg KM, die 0,07 g DHA enthielten ergänzt. In der Nachperiode wurde wie in der Vorperiode kein Wirkstoff zugesetzt. Die Differenz der enthaltenen Fettmenge während der Vor- und Nachperiode, verglichen zur Algenperiode, wurde durch den Zusatz eines handelsüblichen Pflanzenfettes ausgeglichen.

**Tabelle 14: Errechnete Wirkstoffaufnahme der Versuchstiere pro Tag in g Alge bzw. in g DHA während der Algenperiode**

|                    |                     |
|--------------------|---------------------|
| Algenmenge / kg KM | 0,32 g/KG KM        |
| TS Algen           | 96,3%               |
| Anteil DHA in TS   | 0,228 g DHA /g TS   |
| DHA / kg KM        | 0,070 g DHA / kg KM |

**Tabelle 15: Wirkstoffaufnahme der einzelnen Pferde in g DHA während der Versuchsperioden**

| Wirkstoffaufnahme [g DHA] | Vorperiode | Algenperiode | Nachperiode |
|---------------------------|------------|--------------|-------------|
| Pferd 1                   | 0,0        | 24,1         | 0,0         |
| Pferd 2                   | 0,0        | 18,1         | 0,0         |
| Pferd 3                   | 0,0        | 14,7         | 0,0         |
| Pferd 4                   | 0,0        | 17,6         | 0,0         |

### 4.3 Serumanalysen

#### 4.3.1 $\Omega$ -3-Fettsäuren

In Tabelle 16 sind die Werte der  $\Omega$ -3-Fettsäuren im Serum in Anteilen der Gesamtfettsäuren (TFA) dargestellt. Messzeitpunkte waren Vorperiode (Woche 0-6), Algenperiode (Woche 6-18) und Ende der Nachperiode (Woche 18-24).

Die Werte der  $\Omega$ -3-Fettsäure  $\alpha$ -Linolensäure (ALA) betrug im Mittel während der Vorperiode 3,77%, während der Algenperiode (Woche 6-18) 1,96% und während der Nachperiode 1,83% der Gesamtfettsäuren. Ihr Wert verringerte sich während der Algenperiode im Mittel um fast die Hälfte und sank während der Nachperiode noch einmal leicht ab.

Die Eicosapentaensäure (EPA) betrug im Mittel 0,12% der Gesamtfettsäuren während der Vorperiode und während der Algenperiode 1,5% der Gesamtfettsäuren. Ihr Wert stieg in der Algenperiode auf das 13-fache an. Der Wert der Nachperiode war aus technischen Gründen nicht auswertbar.

Der Gehalt der Docosahexaensäure (DHA) betrug im Mittel der Gesamtfettsäure während der Vorperiode 0,23%. Während der Algenperiode stieg der Wert auf durchschnittlich 5,27%. Bis zum Ende der Nachperiode fiel der Wert auf durchschnittlich 1,00% ab.

Damit ergab sich ein sehr starker Anstieg auf das 23-fache der Vorperiode. Während der Nachperiode fiel der Wert wieder ab.

**Tabelle 16: Mittelwerte aus den Konzentrationen der  $\Omega$ -3-Fettsäuren  $\alpha$ -Linolensäure (ALA; C18:3); Eicosapentaensäure (EPA; C20:5) und Docosahexaensäure (DHA; C22:6) in % der Gesamtfettsäuren (TFA) im Serum der Versuchstiere während der Versuchsabschnitte Vorperiode, Algenperiode und Nachperiode**

| Linolensäure | Vorperiode | Algenperiode | Nachperiode |
|--------------|------------|--------------|-------------|
| Tier 1       | 4,84       | 2,42         | 2,10        |
| Tier 2       | 4,02       | 1,34         | 2,00        |
| Tier 3       | 2,13       | 2,09         | 1,40        |
| Tier 4       | 4,10       | 2,00         | 1,80        |
| Mittelwert   | 3,77       | 1,96         | 1,83        |
| S-Abw        | 1,15       | 0,45         | 0,31        |

| <b>EPA</b> | <b>Vorperiode</b> | <b>Algenperiode</b> | <b>Nachperiode</b> |
|------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| Tier 1     | 0,13              | 1,08                | Nicht auswertbar   |
| Tier 2     | 0,11              | 1,47                | Nicht auswertbar   |
| Tier 3     | 0,09              | 1,72                | Nicht auswertbar   |
| Tier 4     | 0,13              | 1,75                | Nicht auswertbar   |
| Mittelwert | 0,12              | 1,50                | -                  |
| S-Abw      | 0,02              | 0,31                | -                  |

| <b>DHA</b> | <b>Vorperiode</b> | <b>Algenperiode</b> | <b>Nachperiode</b> |
|------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| Tier 1     | 0,33              | 5,99                | 1,00               |
| Tier 2     | 0,20              | 5,92                | 1,20               |
| Tier 3     | 0,15              | 4,13                | 0,80               |
| Tier 4     | 0,24              | 5,05                | 1,00               |
| Mittelwert | 0,23              | 5,27                | 1,00               |
| S-Abw      | 0,08              | 0,87                | 0,16               |

#### 4.3.2 $\Omega$ -6-Fettsäuren

In Tabelle 17 sind die  $\Omega$ -6-Fettsäuren Arachidonsäure (ARA), Linolsäure (LA) und die Docosapentaensäure in % der Gesamtfettsäuren (TFA) dargestellt. Die Arachidonsäure (ARA) stieg vom Ausgangswert von durchschnittlich 1,15% an der Gesamtfettsäure auf durchschnittlich 5,82% während der Algenperiode und fiel bis zum Ende der Nachperiode auf durchschnittlich 1,55% ab. Damit stieg der Wert von der Vorperiode bis zum Ende der Algenperiode stark an und fiel bis zum Ende der Nachperiode wieder ab.

Der Anteil der Linolsäure (LA) betrug im Mittel zunächst 51,81% der Gesamtfettsäure und fiel während der Algenperiode auf 41,23% ab. Zum Ende der Nachperiode betrug er 52,55% an der Gesamtfettsäure. Damit sank der Anteil an der Gesamtfettsäure bis zum Ende der Algenperiode ab und stieg bis zum Ende der Nachperiode wieder an.

Der Anteil der Docosapentaensäure (DPA) an der Gesamtfettsäure betrug im Mittel 0,15% während der Vorperiode und 0,20% während der Algenperiode. Sie verzeichnete während des Versuchszeitraums einen leichten Anstieg. Die Werte der Nachperiode waren ebenfalls aus technischen Gründen nicht verfügbar.

**Tabelle 17: Mittelwerte aus den Konzentrationen der  $\Omega$ -6-Fettsäuren Arachidonsäure (ARA; C20:4); Linolsäure (LA; C18:2) und Docosapentaensäure (DPA; C22:5) in % der Gesamtfettsäuren (TFA) im Serum der Versuchstiere während der Versuchsabschnitte Vorperiode, der Algenperiode und Nachperiode**

| <b>ARA</b> | <b>Vorperiode</b> | <b>Algenperiode</b> | <b>Nachperiode</b> |
|------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| Tier 1     | 0,99              | 5,94                | 1,50               |
| Tier 2     | 1,32              | 5,13                | 1,70               |
| Tier 3     | 0,88              | 5,84                | 1,50               |
| Tier 4     | 1,41              | 6,40                | 1,50               |
| Mittelwert | 1,15              | 5,82                | 1,55               |
| S-Abw      | 0,25              | 0,52                | 0,10               |

| <b>Linolsäure</b> | <b>Vorperiode</b> | <b>Algenperiode</b> | <b>Nachperiode</b> |
|-------------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| Tier 1            | 51,67             | 42,62               | 52,00              |
| Tier 2            | 58,47             | 33,18               | 51,90              |
| Tier 3            | 39,64             | 45,00               | 54,60              |
| Tier 4            | 57,44             | 44,11               | 51,70              |
| Mittelwert        | 51,81             | 41,23               | 52,55              |
| S-Abw             | 8,64              | 5,45                | 1,37               |

| <b>DPA</b> | <b>Vorperiode</b> | <b>Algenperiode</b> | <b>Nachperiode</b> |
|------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| Tier 1     | 0,16              | 0,22                | Nicht auswertbar   |
| Tier 2     | 0,17              | 0,23                | Nicht auswertbar   |
| Tier 3     | 0,09              | 0,18                | Nicht auswertbar   |
| Tier 4     | 0,18              | 0,16                | Nicht auswertbar   |
| Mittelwert | 0,15              | 0,20                | Nicht auswertbar   |
| S-Abw      | 0,04              | 0,03                | -                  |

### 4.3.3 Gesamtalkalische Phosphatase (ALP) im Serum

Die Werte der ALP wurden in regelmäßigen Abständen von 14 Tagen ermittelt und daraus die Mittelwerte für die Vorperiode, die Algenperiode und die Nachperiode berechnet. Die Werte betragen durchschnittlich 107,6 U/l während der Vorperiode und fielen dann während der Algenperiode im Mittel auf 97,2U/l. In der Nachperiode erfolgte eine Zunahme auf 99,7U/l (vgl. Tab 18).

Damit ergibt sich ein Abfall um 10% von Vorperiode bis zur Algenperiode. In der Nachperiode stieg der Wert um durchschnittlich 3%.

**Tabelle 18: Mittelwerte aus den Konzentrationen der Gesamtalkalischen Phosphatase in U/l im Serum der Versuchstiere während der Versuchsabschnitte Vorperiode, Algenperiode und Nachperiode**

| ALP        | Vorperiode | Algenperiode | Nachperiode |
|------------|------------|--------------|-------------|
| Tier 1     | 106,7      | 81,2         | 107,6       |
| Tier 2     | 101,9      | 76,6         | 63,1        |
| Tier 3     | 102,5      | 108,4        | 104,1       |
| Tier 4     | 119,4      | 122,4        | 123,9       |
| Mittelwert | 107,6      | 97,2         | 99,7        |
| S-Abw      | 8,1        | 21,9         | 25,9        |

### 4.3.4 Osteocalcin im Serum

**Tabelle 19** zeigt die Mittelwerte des Osteocalcins im Serum der Versuchstiere gemessen in ng/ml. Die Mittelwerte wurden aus den Messzeitpunkten der Vorperiode, der Algenperiode und der Nachperiode ermittelt. Der Wert betrug während der Vorperiode durchschnittlich 14,82 ng/ml, fiel dann in der Algenperiode auf 10,92 ng/ml und fiel bis zum Ende der Nachperiode auf einen Wert von durchschnittlich 7,68 ng/ml ab. Das Osteocalcin fiel damit bis zum Ende der Algenperiode um durchschnittlich 26% ab und bis zum Ende der Nachperiode um weitere 30%.

**Tabelle 19: Mittelwerte der Osteocalcinkonzentration in mg/ml im Serum der Versuchstiere während der Versuchsabschnitte Vorperiode, Algenperiode und Nachperiode**

| Osteocalcin | Vorperiode | Algenperiode | Nachperiode |
|-------------|------------|--------------|-------------|
| Tier 1      | 14,4       | 13,1         | 7,1         |
| Tier 2      | 11,1       | 4,7          | 5,5         |
| Tier 3      | 22,5       | 15,7         | 12,4        |
| Tier 4      | 11,2       | 10,1         | 5,7         |
| Mittelwert  | 14,8       | 10,9         | 7,7         |
| S-Abw       | 5,4        | 4,7          | 3,2         |

#### 4.4 Urinalysen

##### 4.4.1 Collagen-Crosslinks

Im Urin können als Knochenmarker die Crosslinks Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD) gemessen werden (**Tabelle 20** und 21).

PYD stieg von der Vorperiode zur Algenperiode um durchschnittlich 18% an und fiel dann zum Ende der Nachperiode um 2% ab. DPD stieg vom Ende der Vorperiode bis zum Ende der Algenperiode um 12 % an, fiel bis zum Ende der Nachperiode um durchschnittlich 3% ab.

**Tabelle 20: Mittelwerte aus den Konzentrationen von Pyridinolin (PYD) im Urin der Versuchstiere gemessen in nmol/mmol Creatinin während der Versuchsabschnitte Vorperiode, Algenperiode und der Nachperiode**

| PYD        | Vorperiode | Algenperiode | Nachperiode |
|------------|------------|--------------|-------------|
| Tier 1     | 325,2      | 420,4        | 353,1       |
| Tier 2     | 478,4      | 476,9        | 504,9       |
| Tier 3     | 755,4      | 833,2        | 803,8       |
| Tier 4     | 433,4      | 629,0        | 644,8       |
| Mittelwert | 498,1      | 589,9        | 576,6       |
| S-Abw      | 183,2      | 184,6        | 192,7       |

**Tabelle 21: Mittelwerte aus den Konzentrationen von Desoxypyridinolin (DPD) im Urin der Versuchstiere gemessen in nmol/mmol Creatinin während der Versuchsabschnitte Vorperiode, Algenperiode und der Nachperiode**

| <b>DPD</b> | <b>Vorperiode</b> | <b>Algenperiode</b> | <b>Nachperiode</b> |
|------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| Tier 1     | 13,0              | 15,9                | 13,3               |
| Tier 2     | 52,0              | 44,0                | 40,3               |
| Tier 3     | 37,4              | 43,5                | 40,8               |
| Tier 4     | 39,7              | 55,4                | 60,5               |
| Mittelwert | 35,5              | 39,7                | 38,7               |
| S-Abw      | 16,3              | 16,8                | 19,4               |

#### 4.4.2 Calcium im Urin

In **Tabelle 22** wurden die mittleren Calciumkonzentrationen aus dem Urin der Versuchstiere gemessen. Die tägliche Harnmenge der einzelnen Tiere wurde mit Hilfe der gemessenen Creatininkonzentration des Harns berechnet.

Der Calciumgehalt fiel vom Ende der Vorperiode zum Ende der Algenperiode um durchschnittlich 38% ab und stieg um 6% bis zum Ende der Nachperiode an.

**Tabelle 22: Mittelwerte der Calciumkonzentration in g/mmol Creatinin im 24 Std. Urin der Versuchstiere während der Versuchszeitpunkte Vorperiode, Algenperiode und der Nachperiode**

| <b>Calcium pro 24h</b> | <b>Vorperiode</b> | <b>Algenperiode</b> | <b>Nachperiode</b> |
|------------------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| Tier 1                 | 0,5               | 0,3                 | 0,7                |
| Tier 2                 | 0,6               | 0,2                 | 0,1                |
| Tier 3                 | 0,1               | 0,1                 | 0,1                |
| Tier 4                 | 0,3               | 0,3                 | 0,1                |
| Mittelwert             | 0,4               | 0,2                 | 0,2                |
| S-Abw                  | 0,2               | 0,1                 | 0,3                |



## 4.5 Korrelationen

In den folgenden Tabellen (23, 24 und 25) sind die Korrelationen zwischen den Fettsäuren Linolensäure, Eicosapentaensäure (EPA), Docosapentaensäure (DPA), Docosahexaensäure (DHA), Arachidonsäure (ARA), Linolsäure, den Knochenmarkern Osteocalcin (OC), Pyridinolin (PYD), Desoxypyridinolin (DPD), Gesamtalkalische Phosphatase (ALP) dargestellt.

**Tabelle 23** zeigt die Korrelationen in der Vorperiode (Woche 0-6), **Tabelle 24** zeigt die Korrelationen der Algenperiode (Woche 6-18) und in **Tabelle 25** sind die Korrelationen der Nachperiode (Woche 18-24) zu sehen.

Während der Vorperiode bestand eine signifikante Korrelation zwischen der Linolensäure und EPA, sowie zwischen der Linolensäure und ARA. In der Algenperiode korrelierten DPA  $\Omega$ -3 mit ALP signifikant. Und während der Nachperiode zeigten sich wieder signifikante Korrelationen zwischen der Linolensäure und EPA und Linolensäure und ARA.

**Tabelle 23: Korrelationen zwischen den Fettsäuren Linolensäure, Eicosapentaensäure (EPA), Docosapentaensäure (DPA), Docosahexaensäure (DHA), Arachidonsäure (ARA), Linolsäure (LA), den Knochenmarkern Osteocalcin (OC), Pyridinolin (PYD), Desoxypyridinolin (DPD), Gesamtalkalische Phosphatase (ALP) nach der „Pearson Product Moment Korrelation“ während der Vorperiode**

| <b>Vorperiode n=4</b> | <b>EPA</b>                 | <b>DPA</b>    | <b>DHA</b>   | <b>ARA</b>                 | <b>LA</b>                  | <b>OC</b>     | <b>PYD</b>    | <b>DPD</b>    | <b>ALP</b>    |
|-----------------------|----------------------------|---------------|--------------|----------------------------|----------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Linolensäure          | <b>0,98</b><br><b>0,02</b> | -0,16<br>0,84 | 0,34<br>0,66 | <b>0,97</b><br><b>0,03</b> | 0,94<br>0,06               | 0,65<br>0,35  | 0,26<br>0,75  | -0,19<br>0,81 | 0,77<br>0,23  |
| EPA                   |                            | -0,02<br>0,98 | 0,51<br>0,49 | 0,93<br>0,07               | 0,86<br>0,14               | 0,50<br>0,50  | 0,07<br>0,93  | -0,34<br>0,66 | 0,71<br>0,29  |
| DPA                   |                            |               | 0,75<br>0,25 | -0,37<br>0,63              | -0,44<br>0,56              | -0,36<br>0,64 | -0,89<br>0,12 | -0,93<br>0,07 | -0,69<br>0,31 |
| DHA                   |                            |               |              | 0,20<br>0,80               | 0,01<br>0,99               | -0,33<br>0,67 | -0,82<br>0,18 | -0,91<br>0,09 | -0,07<br>0,93 |
| ARA                   |                            |               |              |                            | <b>0,96</b><br><b>0,04</b> | 0,61<br>0,39  | 0,39<br>0,61  | 0,02<br>0,98  | 0,90<br>0,10  |
| LA                    |                            |               |              |                            |                            | 0,80<br>0,20  | 0,56<br>0,44  | 0,12<br>0,88  | 0,85<br>0,15  |
| OC                    |                            |               |              |                            |                            |               | 0,71<br>0,29  | 0,20<br>0,80  | 0,44<br>0,56  |
| PYD                   |                            |               |              |                            |                            |               |               | 0,83<br>0,17  | 0,55<br>0,45  |
| DPD                   |                            |               |              |                            |                            |               |               |               | 0,38<br>0,62  |

**Tabelle 24: Korrelationen zwischen den Fettsäuren Linolensäure, Eicosapentaensäure (EPA), Docosapentaensäure (DPA), Docosahexaensäure (DHA), Arachidonsäure (ARA), Linolsäure (LA), den Knochenmarkern Osteocalcin (OC), Pyridinolin (PYD), Desoxypyridinolin (DPD), Gesamtalkalische Phosphatase (ALP) nach der „Pearson Product Moment Korrelation“ während der Algenperiode**

| <b>Algenperiode n=4</b> | <b>EPA</b>    | <b>DPA</b>    | <b>DHA</b>    | <b>ARA</b>    | <b>LA</b>     | <b>OC</b>     | <b>PYD</b>                  | <b>DPD</b>    | <b>ALP</b>                  |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|
| Linolensäure            | -0,32<br>0,68 | -0,20<br>0,80 | -0,20<br>0,80 | 0,71<br>0,29  | 0,84<br>0,16  | 0,85<br>0,15  | 0,11<br>0,90                | -0,55<br>0,45 | 0,26<br>0,74                |
| EPA                     |               | -0,81<br>0,19 | -0,78<br>0,22 | 0,24<br>0,76  | 0,24<br>0,76  | 0,03<br>0,97  | 0,81<br>0,19                | 0,94<br>0,06  | 0,79<br>0,21                |
| DPA                     |               |               | 0,72<br>0,28  | -0,76<br>0,24 | -0,67<br>0,33 | -0,33<br>0,67 | -0,69<br>0,31               | -0,71<br>0,29 | <b>-1,00</b><br><b>0,00</b> |
| DHA                     |               |               |               | -0,37<br>0,63 | -0,64<br>0,36 | -0,63<br>0,38 | <b>-1,00</b><br><b>0,00</b> | -0,50<br>0,50 | -0,75<br>0,25               |
| ARA                     |               |               |               |               | 0,87<br>0,13  | 0,56<br>0,44  | 0,29<br>0,71                | 0,12<br>0,88  | 0,78<br>0,22                |
| LA                      |               |               |               |               |               | 0,89<br>0,11  | 0,56<br>0,44                | -0,03<br>0,97 | 0,72<br>0,28                |
| OC                      |               |               |               |               |               |               | 0,56<br>0,44                | -0,31<br>0,69 | 0,41<br>0,59                |
| PYD                     |               |               |               |               |               |               |                             | 0,55<br>0,45  | 0,72<br>0,28                |
| DPD                     |               |               |               |               |               |               |                             |               | 0,66<br>0,34                |

**Tabelle 25: Korrelationen zwischen den Fettsäuren Linolensäure, Eicosapentaensäure (EPA), Docosapentaensäure (DPA), Docosahexaensäure (DHA), Arachidonsäure (ARA), Linolsäure (LA), den Knochenmarkern Osteocalcin (OC), Pyridinolin (PYD), Desoxypyridinolin (DPD), Gesamtalkalische Phosphatase (ALP). Nach der „Pearson Product Moment Korrelation“ während der Nachperiode**

| Nachperiode n=4 | EPA                        | DPA           | DHA          | ARA                        | LA                         | OC            | PYD           | DPD           | ALP           |
|-----------------|----------------------------|---------------|--------------|----------------------------|----------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Linolensäure    | <b>0,98</b><br><b>0,02</b> | -0,16<br>0,84 | 0,34<br>0,66 | <b>0,97</b><br><b>0,03</b> | 0,94<br>0,06               | 0,65<br>0,35  | 0,26<br>0,75  | -0,19<br>0,81 | 0,77<br>0,23  |
| EPA             |                            | -0,02<br>0,98 | 0,51<br>0,49 | 0,93<br>0,07               | 0,86<br>0,14               | 0,50<br>0,50  | 0,07<br>0,93  | -0,34<br>0,66 | 0,71<br>0,29  |
| DPA             |                            |               | 0,75<br>0,25 | -0,37<br>0,63              | -0,44<br>0,56              | -0,36<br>0,64 | -0,89<br>0,12 | -0,93<br>0,07 | -0,69<br>0,31 |
| DHA             |                            |               |              | 0,20<br>0,80               | 0,01<br>0,99               | -0,33<br>0,67 | -0,82<br>0,18 | -0,91<br>0,09 | -0,07<br>0,93 |
| ARA             |                            |               |              |                            | <b>0,96</b><br><b>0,04</b> | 0,61<br>0,39  | 0,39<br>0,61  | 0,02<br>0,98  | 0,90<br>0,10  |
| LA              |                            |               |              |                            |                            | 0,80<br>0,20  | 0,56<br>0,44  | 0,12<br>0,88  | 0,85<br>0,15  |
| OC              |                            |               |              |                            |                            |               | 0,71<br>0,29  | 0,20<br>0,80  | 0,44<br>0,56  |
| PYD             |                            |               |              |                            |                            |               |               | 0,83<br>0,17  | 0,55<br>0,45  |
| DPD             |                            |               |              |                            |                            |               |               |               | 0,38<br>0,62  |

## 5 Diskussion

Über einen Zeitraum von sechs Monaten wurde an vier institutseigenen Ponies untersucht, wie sich das Fettsäuremuster im Serum der Pferde durch den Zusatz von DHA Gold Algen® der Firma Martek nach 12-wöchiger Futtersupplementierung verändert. Dabei beträgt der Gehalt an DHA bei der verwendeten DHA-Gold® Mikroalge rund 42% der Gesamtfettsäuren. Weiterhin sollte geprüft werden, ob trotz des relativ kurzen Fütterungszeitraums ein positiver Effekt auf die Bonemarker erkennbar war.

### 5.1 Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung

Zu Versuchsbeginn war Tier 1 10 Jahre, Tier 2 13 Jahre, Tier 3 6 Jahre und Tier 4:12 Jahre alt. Die Gruppe bestand aus 2 Stuten und 2 Wallachen. Alle Tiere waren zu Versuchsbeginn und während der Versuchsdauer klinisch gesund.

Aufgrund der geringen Anzahl der Tiere ( $n=4$ ), die zur Verfügung standen, wurde eine Versuchsgruppe gebildet. Dabei fungierte jedes Tier als seine eigene Kontrolle.

Die Futterkombination der ersten 6 Wochen bestand zunächst aus Heu, Hafer, Weizenkleie, und jedes Tier erhielt eine vom Körpergewicht abhängige Menge an Mineralfutter und einem handelsüblichen Pflanzenöl (Vorperiode). Danach wurde das Pflanzenöl durch die DHA-haltigen Mikroalgen ersetzt (Woche 6-18, Algenperiode). In der darauf folgenden Nachperiode (Woche 18-24) bekamen die Tiere dann wieder dieselbe Futterkombination wie während der Vorperiode. Die Fütterung erfolgte am Morgen und späten Nachmittag. Die Tiere verzehrten täglich ihre komplette Ration.

Da die in diesem Versuch verwendeten Mikroalgen überwiegend DHA (42,3% der Gesamtfettsäuren) enthielten, wurde DHA als Wirkstoff berechnet.

Die verschiedenen Versuchsperioden erfolgten über einen Zeitraum von 24 Wochen. Die Vorperiode dauerte 6 Wochen. Im Anschluss erfolgte die 12-wöchige Algenperiode. Der Versuch endete mit der 6-wöchigen Nachperiode.

Da die Tiere schon mehrfach in Fütterungsstudien eingesetzt wurden, war die 14-tägige Blutentnahme kein Problem. Die Gewinnung der Blutproben wurde jeweils zur gleichen Uhrzeit gewonnen. Bei jeder Blutentnahme wurde die Reihenfolge der Tiere umgedreht, um eventuelle tageszeitliche Schwankungen auszugleichen. Die

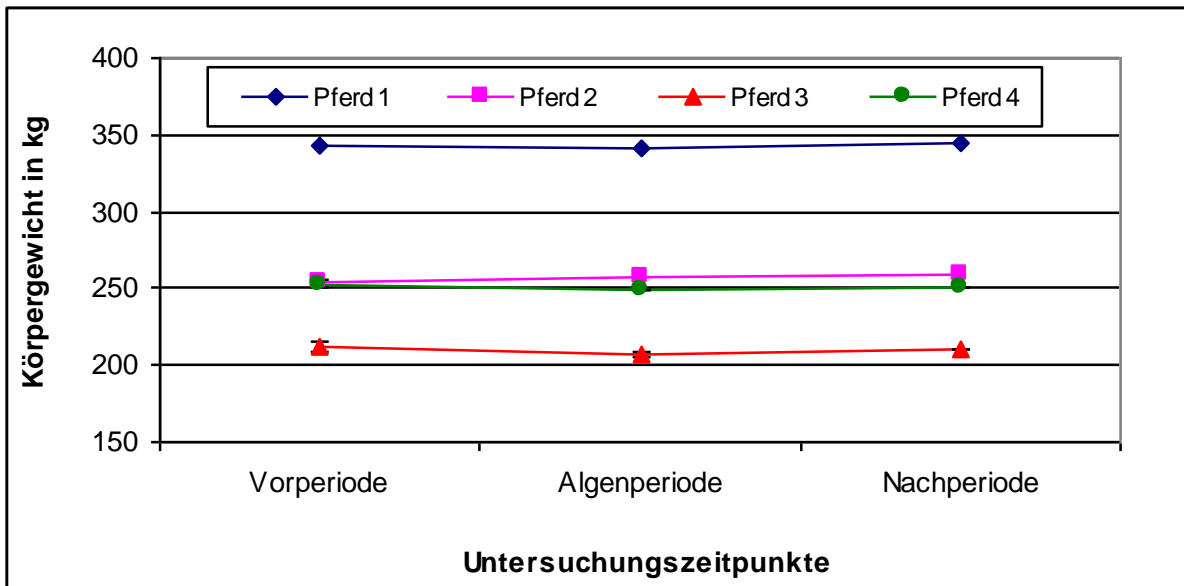
entnommenen Blutproben wurden unmittelbar nach der Entnahme zentrifugiert und innerhalb von 30 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  im Trockeneis eingefroren, um die Stabilität der Parameter sicher zu stellen. Der Urin wurde bei den Stuten mittels Gummikatheter entnommen. Bei den Wallachen wurde der spontan abgesetzte Harn aufgefangen. Der gewonnene Urin wurde in Aliquote von ca. 10 ml in Einmalreagenzgläser gefüllt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Ein großes Problem ist die exakte Bestimmung des Harnzeitvolumens. Fehler durch Harnverluste oder Harnrückstände in der Blase wirken sich u.a. auf das endogene Creatinin aus. Sie können auch mit Katheterspülverfahren nicht vollständig ausgeschlossen werden. Selbst beim Menschen wird die Präzision der Bestimmung des Harnzeitvolumens als problematisch angesehen (Schirmeister et al., 1964; Wüstenberg et al., 1984).

Für klinische Fragestellung ist die Schätzung der Creatinin-Exkretion eine ausreichend genaue Grundlage für die Bestimmung der Nierenfunktionsparameter. Die Schätzung der Creatinin-Exkretion aus dem Gewicht hat sich beim Menschen (Cockcroft u. Gault, 1976; Waller et al, 1991) und beim Schaf (Bickardt u. Düngelhoef, 1994) bewährt.

## **5.2 Gewichtsentwicklung der Tiere**

Die durchschnittlichen Gewichte der Tiere waren zu Versuchsbeginn und bei Versuchsende nahezu identisch (siehe Abbildung 6). Die leichten Schwankungen des Körpergewichts waren zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikant. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die kurzzeitige Algensupplementierung des Versuchsfutters erwartungsgemäß keinen negativen Effekt auf die Körpergewichte der Tiere hatte.



**Abbildung 6: Verlauf der durchschnittlichen Gewichtsentwicklung der Ponies (in kg) während der verschiedenen Versuchsperioden. Vorperiode (Woche 0-6), Algenperiode (Woche 6-18) und Nachperiode (Woche 18-24)**

### 5.3 Omega-6-Fettsäuren

Arachidonsäure:

Bei der Gesamtfettsäurezusammensetzung der  $\Omega$ -6-Fettsäuren war ein deutlicher Anstieg der Arachidonsäure (ARA, C20:4) zu erkennen. Der Wert erhöhte sich vom Ende der Vorperiode bis zum Ende der Algenperiode auf das 5-fache. Zum Ende der Nachperiode fiel der Gehalt fast auf den Ausgangswert der Vorperiode ab. (siehe Abbildung 7). Die deutliche Erhöhung der ARA zeigt eine gute Aufnahme der Mikroalgen durch den Organismus der Ponies. Die verwendeten Mikroalgen enthielten 0,8% ARA der Gesamtfettsäuren (siehe Tabelle 12). Aufgrund der geringen Probenzahl war keine Aussage über die Signifikanz möglich.

Hall et al. (2004) konnte nach Fütterung von Maiskeimöl eine Zunahme der Linolsäure, aber keine entsprechende Zunahme der Arachidonsäure verzeichnen. Bei den Pferden, denen sie Fischöl zum Futter zusetzten, konnten sie eine Zunahme der Arachidonsäure feststellen, welches das Vorhandensein von ARA im Fischöl und die Aufnahme durch die Pferde widerspiegelte. Harris et al. (1999) kamen zur selben Schlussfolgerung. Sie verabreichten Pferden einen Futtermittelergänzung mit  $\Omega$ -6-

---

Fettsäuren. Es kam zu einem starken Anstieg der ARA, nicht aber der LA. Diese Resultate deuten darauf hin, dass bei Pferden die ARA nicht selbstverständlich aus Linolsäure synthetisiert wird.

#### Linolsäure:

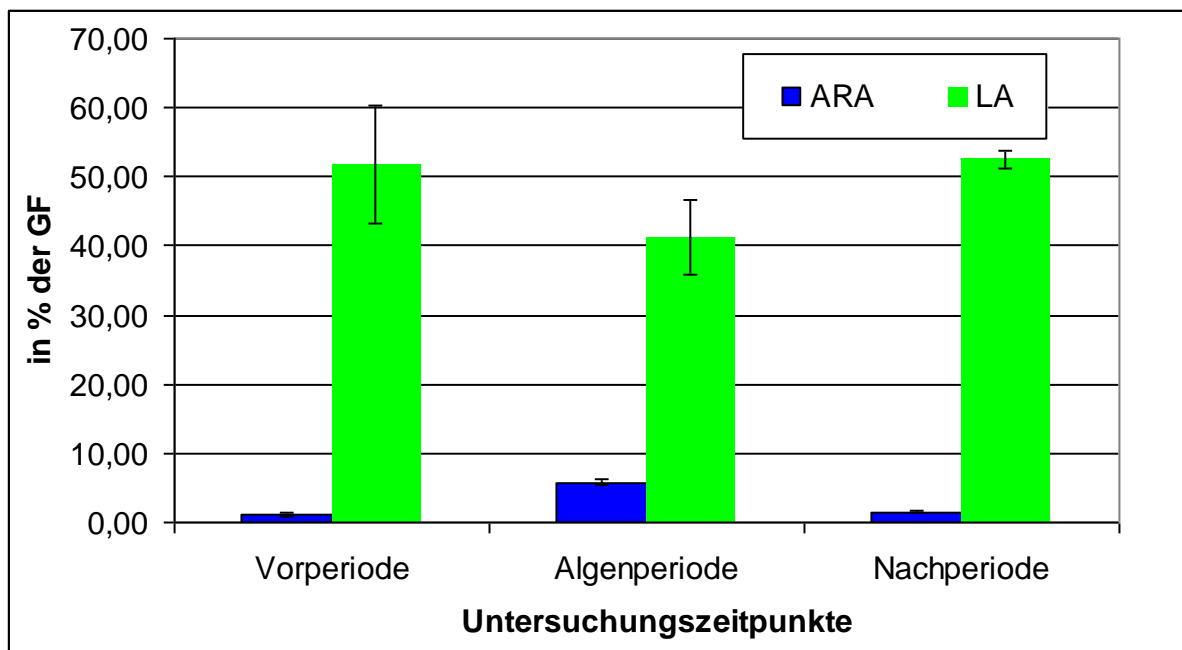
Die Linolsäure war nach Angaben des Herstellers nicht in den DHA GOLD Algen® enthalten (siehe Tab. 12). Sie wurde somit nicht mit den Algen zugeführt. Maiskeimöl hat einen Linolsäure-Gehalt von ca. 60%. Da das Maiskeimöl während der Algenperiode nicht verabreicht wurde, erhielten die Pferde während der Algenperiode eine linolsäurearme Ernährung. Dies zeigt sich im Abfall der Linolsäure während der Algenperiode und der Zunahme während der Nachperiode.

Der Anteil der Linolsäure sank während der Algenperiode um 20% ab und stieg zum Ende der Nachperiode um 27% an. Bei der Linolsäure wurde also der Wert der zum Ende der Vorperiode vorlag, verglichen mit dem Wert der Nachperiode, minimal überschritten (siehe Abbildung 7).

#### Docosapentaensäure:

DPA steigt in dieser Studie in der Algenfütterungsphase nicht an. Die Werte waren so gering, dass sie in Abb. 7 mit der verwendeten Skalierung nicht darstellbar waren.



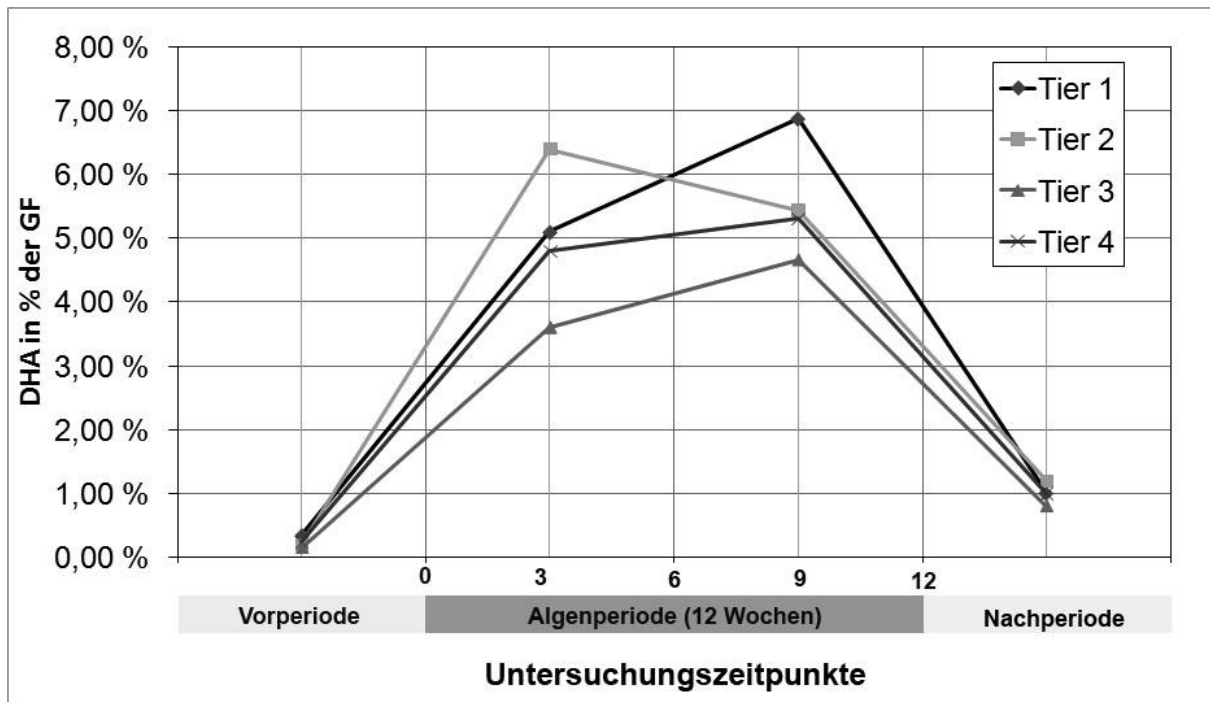


**Abbildung 7: Entwicklung der beiden  $\Omega$ -6-Fettsäuren Arachidonsäure (ARA; C 20:4) und Linolsäure (LA; C 18:2) zum Ende der jeweiligen Versuchsabschnitte Vorperiode, Algenperiode und Nachperiode in % der Gesamtfettsäuren (GF)**

#### 5.4 Omega-3-Fettsäuren

Docosahexaensäure:

Der Anteil von DHA am Gesamtfett der verwendeten Mikroalgen beträgt 42% (siehe Tabelle 12). Deshalb galt ihr das Hauptinteresse. Es war zu erwarten, dass der DHA-Gehalt im Serum der Versuchstiere anstieg. Vom Ende der Vorperiode bis zum Ende der Algenperiode erhöhte sich ihr Wert auf mehr als das 20-fache und fiel bis zum Ende der Nachperiode wieder stark ab (siehe Abb. 8). Damit hatten die Tiere den DHA-Ausgangswert nach 6 Wochen fast wieder erreicht und das aufgenommene DHA wieder verbraucht. Auch in der Studie von Hall et al. (2004) zeigte sich, dass es nach einer 6 wöchigen Futtermittelergänzung mit  $\Omega$ -6- und  $\Omega$ -3-Fettsäuren zu einem Anstieg dieser Fettsäuren im Plasma der Pferde kam und dass dieser Anstieg bis 4 Wochen über diese Futtermittelsupplementierung hinaus festzustellen war.

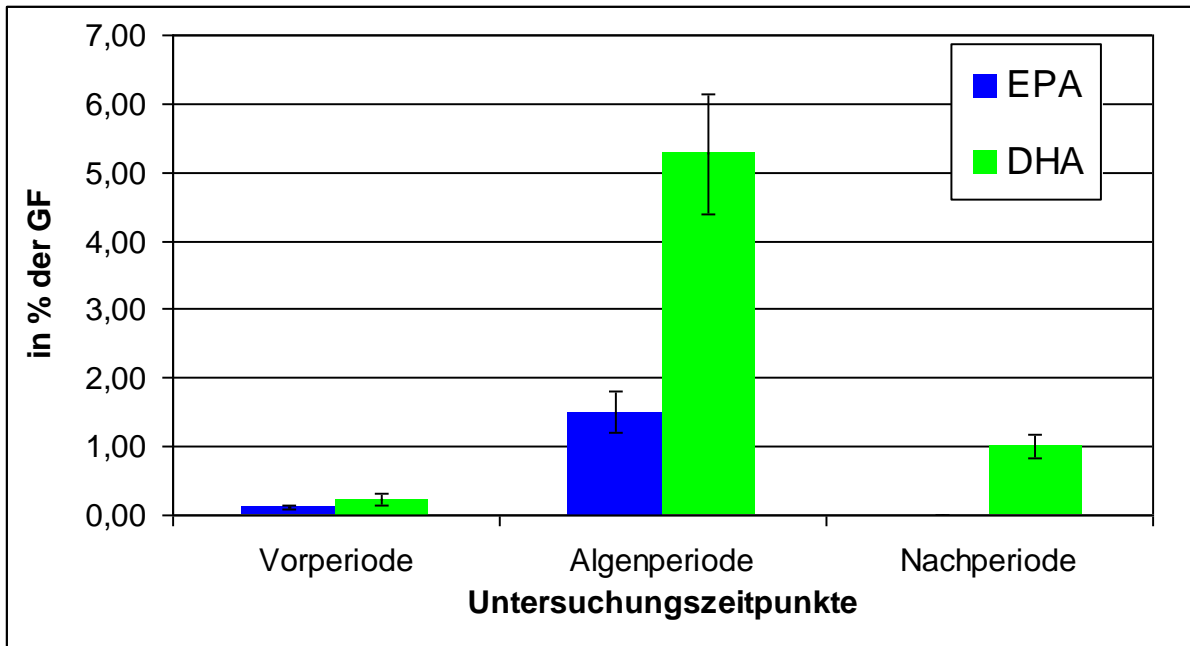


**Abbildung 8: Entwicklung der  $\Omega$ -3-Fettsäure Docosahexaensäure (DHA; C 22:6) zum Ende der Vorperiode, während der Algenperiode und zum Ende der Nachperiode in % der Gesamtfettsäuren (GF)**

Eicosapentaensäure:

Auch bei EPA kam es zu einem deutlichen Anstieg im Serum, obwohl EPA nur 1,9% der Gesamtfettsäure der verwendeten Mikroalgen ausmacht. Der Anstieg fand während der 12-wöchigen Algenperiode statt. EPA stieg vom Ende der Vorperiode bis zum Ende der Algenperiode um das 13-fache an.

Daraus lässt sich schließen, dass der Organismus des Ponies in der Lage ist, längerkettiger Fettsäuren (z.B. DHA) in eine Fettsäure mit geringerer Kettenlänge (z.B. EPA) umzuwandeln. Von dieser Möglichkeit der Retrokonversion berichten Barclay und Zeller (1996) sowie Barclay et al. (1998) im Zusammenhang mit Ratten und Schweinen. Auch bei Menschen und Ratten ist diese Umwandlung von DHA zu EPA und zu DPA bekannt (Conquer und Holub, 1997; Conquer und Holub, 1996; Grønn et al., 1991).



**Abbildung 9: Entwicklung der beiden  $\Omega$ -3-Fettsäuren Docosahexaensäure (DHA; C 22:6) und Eicosapentaensäure (EPA; C 20:5) zum Ende der jeweiligen Versuchsabschnitte Vorperiode, Algenperiode und Nachperiode in % der Gesamtfettsäuren (GF)**

Im Serum der Pferde konnte nach der 12-wöchigen Algenfütterung ein deutlicher Anstieg der  $\Omega$ -3-Fettsäuren EPA und DHA registriert werden. Dies bedeutet, dass die Algen vom Organismus der Pferde aufgenommen wurden.

### 5.5 Bestimmung der Knochenparameter

Da positive Effekte von  $\Omega$ -3-Fettsäuren auf den Knochenstoffwechsel diskutiert werden, wurde in der Studie geprüft, ob trotz der relativ kurzen Verabreichungszeit der Alge bereits Effekte auf Knochenmarker der Resorption und Formation erkennbar waren. In diesem Zusammenhang wurde unter anderem die folgende Studie durchgeführt.

In der Literatur wird beschrieben (Högström, 2007), dass ein Zusammenhang zwischen der Knochendichte und der Konzentration der  $\Omega$ -3-Fettsäuren in der Nahrung besteht. Besonders die Docosahexaensäure hatte einen positiven Effekt auf die Knochendichte.

Maurin et al. (2002) konnten in in vitro Versuchen den Einfluss der Arachidonsäure und Docosahexaensäure auf die Osteoblastenproliferation nachweisen. Eine Senkung der  $\Omega$ -6-Fettsäuren könnte zu einer relativen Steigerung der  $\Omega$ -3-Fettsäuren und somit möglicherweise zu einer Knochenneubildung und zu reparativen Prozessen führen (Watkins et al., 2000).

### **5.5.1 Gesamtalkalische Phosphatase**

Die gesamtalkalische Phosphatase im Serum wurde alle 2 Wochen bestimmt. Während der Versuchsperioden waren die gemessenen ALP-Werte relativ konstant. Die gesamtalkalische Phosphatase ist jedoch auch beim Pferd nicht knochenspezifisch. Sie wird hauptsächlich von dem knochenspezifischen und dem leberspezifischen Isoenzym bestimmt. Hank et al. (1993) untersuchten die altersabhängige Aktivität des knochenspezifischen Isoenzym und konnten dabei feststellen, dass beim ausgewachsenen Pony nur noch 18% der ALP-Aktivität auf den Knochen zurückzuführen ist. Da die Ponys zum Versuchszeitpunkt zwischen 6 und 13 Jahre alt waren, konnte durch die Messung der gesamtalkalischen Phosphatase keine Aussage bezüglich des Knochenstoffwechsels getroffen werden – die Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren waren höher als zwischen den verschiedenen Fütterungsperioden.

### **5.5.2 Osteocalcin**

Zur Bestimmung des Osteocalcins aus dem Serum der Ponies wurde ein Enzym-linked immunosorbent assay (ELISA) verwendet. Gemessen wurde intaktes OC. Die Probenentnahme erfolgte jeweils zu Anfang und Ende der Vor- und Nachperiode und während der Algenperiode alle 14 Tage. Während der Vor- und der Nachperiode blieben die Werte nahezu konstant. Während der Algenperiode kam es zu einem kontinuierlichen Abfall der Werte. Die Konzentration sank vom Ende der Vorperiode bis zum Ende der Algenperiode im Mittel um 26% und um 39% vom Ende der Algenperiode bis zum Ende der Nachperiode (siehe Tabelle 19). Es kam hier während der kurzen Zeit der Algenfütterung zu keinem positiven Effekt. Die Messung

der Osteocalcin-Konzentration muss kritisch betrachtet werden, da eine hohe Schwankungsbreite der ermittelten Werte vorliegt. Besonders in den ersten 48 Lebensmonaten zeigt die Osteocalcinkonzentration beim Pferd eine sehr große Variationsbreite, die die gesteigerte Knochenbildungsrate ausdrückt (Lepage et al., 1990). Insgesamt zeigt sich eine tendenzielle Abnahme der Osteocalcin Werte , die jedoch keinesfalls überbewertet werden sollte.

**Tabelle 26: Osteocalcin-Konzentration in Abhängigkeit vom Alter**

| Autor/ en             | Altersangabe | Osteocalcinkonzentration (ng/ml) |
|-----------------------|--------------|----------------------------------|
| Black et al. (1999)   | Fohlen       | 40,6±5,9                         |
|                       | Adult        | 12,8±2,0                         |
| Davicco et al. (1994) | <1/5 Jahren  | 44,3±2,2                         |
|                       | 7-14 Jahre   | 4,9±2,1                          |

Die Abhängigkeit der Osteocalcin Konzentration vom Alter ist in Tabelle 26 noch einmal zusehen. Bei Fohlen wurde dreimal so viel OC nachgewiesen wie bei erwachsenen Pferden. Erst ab etwa fünf Jahren bleibt der Osteocalcin-Gehalt konstant (Lepage et al., 1990).

Auch in der vorliegenden Untersuchung wies der Osteocalcin Spiegel mit Werten zwischen 11,1 und 22,5 ng/ml eine hohe Variationsbreite auf (vgl. Tabelle 27). Die Werte lagen aber insgesamt im Bereich, den andere Autoren für die entsprechende Altersstufe angeben.

**Tabelle 27: Osteocalcin Konzentration der Versuchstiere**

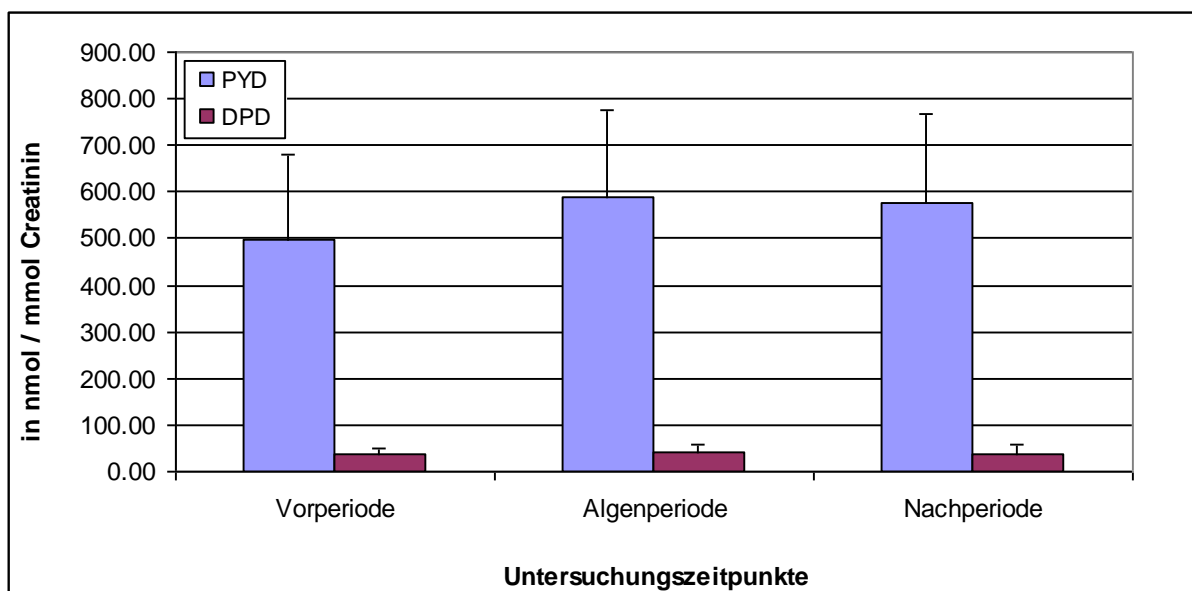
| Tier-Nr. und Alter | Vorperiode | Algenperiode | Nachperiode |
|--------------------|------------|--------------|-------------|
| Tier 1 (10 Jahre)  | 14,4       | 13,1         | 7,1         |
| Tier 2 (13 Jahre)  | 11,1       | 4,7          | 5,5         |
| Tier 3 (6 Jahre)   | 22,5       | 15,7         | 12,4        |
| Tier 4 (12 Jahre)  | 11,2       | 10,1         | 5,7         |
| Mittelwert         | 14,8       | 10,9         | 7,7         |
| S-Abw              | 5,36       | 4,71         | 3,23        |

### 5.5.3 Collagen-Crosslinks

Zunächst stiegen die gemessene Werte beider Crosslinks vom Ende der Vorperiode bis zum Ende der Algenperiode im Mittel um 12% (DPD) bzw. 18% (PYD) an. Danach fielen sie zum Ende der Nachperiode wieder ab, im Mittel um 3% (DPD) bzw. 2% (PYD). Die höchsten Werte wurden jeweils gegen Ende der Algenperiode erreicht und fielen dann beide wieder ab (siehe Tabelle 20 und 21 und Abb. 10).

Dieser Abfall von PYD und DPD könnte für eine Beeinflussung des Knochenstoffwechsels durch die Wirkstoffaufnahme sprechen. Der Abfall der Crosslinks PYD und DPD könnte darauf hindeuten, dass es eine Zeit dauerte, bis die Wirkung der DHA-haltigen Mikroalgen auf den Knochenstoffwechsel einsetzte.

Da besonders Pyridinolin nicht ausschließlich knochenspezifisch ist, sondern zu einem geringen Teil auch in Sehnen enthalten ist, kann nicht davon ausgegangen werden, dass die gesamte Pyridinolin-Konzentration aus dem Urin ossären Ursprungs ist. Da der Bewegungsapparat des Pferdes zu einem großen Teil aus sehnigen Anteilen besteht, ist eine nicht geringfügige Beteiligung am Pyridinolin-Harnspiegel denkbar. Die sehr hohe Streuung zeigt jedoch, dass die gemessenen Crosslinks keine Aussage über einen veränderten Knochenstoffwechsel zulassen.



**Abbildung 10: Durchschnittliche Konzentration der beiden Crosslinks Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD) in nmol/mmol Creatinin während der Versuchsabschnitte Vorperiode, Algenperiode und Nachperiode**

#### 5.5.4 Calcium im Urin

Die Ca-Ausscheidung nahm vom Ende der Vorperiode bis zum Ende Algenperiode um 38% ab und stieg bis zum Ende der Nachperiode wieder um 6% an. Buck et al. (1991) beschreiben, dass supplementiertes EPA in der Nahrung in der Lage ist, die Calciumausscheidung im Urin beim Tier genau wie beim Mensch abzusenkten. Die in der vorliegenden Studie verwendeten Mikroalgen enthielten zwar nur einen geringen Anteil an EPA (1,9% der Gesamtfettsäuren). Doch durch den Vorgang der Retrokonversion wurde aus DHA EPA gebildet. Möglicherweise war es auch hier EPA, welche für die verminderte Calciumausscheidung mitverantwortlich war. Diese Verringerung der Ca-Ausscheidung über den Urin während der Algenperiode, kann für eine positive Beeinflussung des Knochenstoffwechsels sprechen. Allerdings konnte in der durchgeführten Studie nicht überprüft werden ob der Calciumgehalt des Knochens zugenommen hat.

Bei den Ca-Werten im Urin stellt sich die Frage, inwieweit die punktuelle Probennahme eine eventuelle Verfälschung als Folge haben kann, da die Ca-Konzentration im Harn postprandialen variieren kann. (Schnurpel, 1991). Da die Probennahme jedoch entweder aus spontan abgesetztem Harn bzw. mittels Katheter erfolgte, handelte es sich in jedem Fall um einen Sammelprobe über mehrere Stunden.

Bei der Betrachtung der Parameter des Knochenstoffwechsels muss festgestellt werden, dass möglicherweise auf Grund der relativ kurzen Dauer der Algenperiode keinerlei klare Wirkungen erkennbar werden konnten. Tendenziell lassen sich jedoch gewisse positive Einflüsse der  $\Omega$ -Fettsäuren in den Algen annehmen.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, wie sich der Anteil an  $\Omega$ -3-Fettsäuren im Gesamtfettsäuremuster von Pferden nach Fütterung von Algen, die reich an  $\Omega$ -3-Fettsäuren sind, verändert.

Neben Fischöl gelten Mikroalgen als Quelle für die beiden  $\Omega$ -3-Fettsäuren Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA). Positive Effekte von  $\Omega$ -3-Fettsäuren auf den Knochen werden diskutiert. Aufgrund dessen wurde in der hier durchgeführten Studie erstmals die Wirkung von  $\Omega$ -3-Fettsäuren auf den Knochenstoffwechsel des Pferdes untersucht. Während des insgesamt 24-wöchigen Versuchs wurden dem Futter von 4 Ponies über einen Zeitraum von 12 Wochen DHA-reiche Mikroalgen (0.32g/kg KM) zugesetzt.

Im Serum wurden das Gesamtfettsäuremuster und die Knochenformationsmarker, gesamtalkalische Phosphatase und Osteocalcin bestimmt. Im Urin wurden die Knochenresorptionsmarker Collagen-Crosslinks (Pyridinolin und Desoxypyridinolin) und der Calciumgehalt untersucht.

Im Serum der Tiere konnte nach Zusatz der Algen zum Futter ein deutlicher Anstieg der beiden  $\Omega$ -3-Fettsäuren EPA und DHA auf das 13-fache bzw. das 23-fache nachgewiesen werden. 6 Wochen nach Absetzen der Algensupplementierung wurde die DHA-Konzentration des Ausgangswertes fast wieder erreicht.

Die Verabreichung der Omega-Algen führte weder bei den Markern der Knochenformation noch bei den Markern der Knochenresorption zu signifikanten Veränderungen. Es lassen sich lediglich Tendenzen feststellen. Eventuell ist eine längere Verabreichung oder eine höhere Dosierung nötig, um eine Veränderung des Knochenstoffwechsels zu erzielen.



## 7 Summary

Claudia Heckel

The influence of omega-3-fatty acids from algae on the fatty acid pattern and the bone metabolism of ponies

The focus of this study is to examine in which way feeding horses algae with a high content of omega-3-fatty acids is influencing the proportion of omega-3-fatty acids in the total fatty acid pattern.

In addition to fish oil, microalgae are known as a source for the two omega-3-fatty acids eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). Positive effects of omega-3-fatty acids on bone metabolism is discussed. In the present study we investigated for the first time the effect of omega-3-fatty acids on the bone metabolism of horses. During a 24-week trial period, 4 ponies were fed DHA rich microalgae with a dosing of 0.32 g/kg body weight over 12 weeks.

In the blood serum, the total fatty acid pattern and the bone formation markers alkaline phosphatase and osteocalcin were identified. Additionally, the markers of bone resorption collagen cross links (pyridinolin and deoxypyridinoline) as well as calcium were determined in the urine.

After the feeding of the algae, a significant increase of the omega-3-fatty acids EPA and DHA – 13-fold and 23-fold respectively – could be determined. 6 weeks after finishing the feeding of the algae the DHA concentration was almost as before the feeding period.

The feeding of the omega-algae did not result in a significant change in the absorption- and the formation bone markers. Only tendencies could be detected. A longer feeding period or a higher dosing may be necessary to achieve a significant shifting of the bone markers.

## 8 Literaturverzeichnis

Ackmann RG, Jangaard PM, Hoyle RJ, Brockerhoff H (1964)

Origin of marine fatty acids. I. Analysis of the fatty acids produced by the diatom *Skeletonema costatum*.

J Fish Res Bd Can 21: 747 - 756

Bang HO, Dyerberg J, Hjerne N (1976)

The composition of food consumed by Greenland Eskimos.

Acta Med Skand 200: 69-73

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

Barclay W and Zeller S (1996)

Nutritional Enhancement of  $\Omega$ -3 and  $\Omega$ -6 Fatty Acids in Rotifers and *Artemia Nauplii* by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp..

J World Aqua Soc 27: 314-322

Barclay WR, Meager KM, Abril JR (1994)

Heterotrophic production of long chain omega-3-fatty acids utilizing algae and algae-like microorganism.

J Appl Phycol 6: 123-129

Bauer JE (1983)

Plasma lipids and lipoproteins of fasted ponies.

Am J Vet Res 44: 379-384.

Bell RA, Nielsen BD, Wait K, Rosenstein D, Oeth (2001)

Daily access to pasture prevents loss of mineral in the third metacarpus of Arabian weanlings.

J Anim Sci 79: 1142-1150

Bickardt K und Düngelhoef R (1994)

Klinische Nierenfunktionsuntersuchungen bei Schafen

I. Methodik und Referenzwerte gesunder Tiere.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 101: 463 – 466

Biesalski HK und Grimm P (1999)

Taschenatlas der Ernährung, Stuttgart (Thieme)

Black D, Duncan A, Robins SP (1988)

Quantitativ analysis of the pyridinium crosslinks of collagen in urin using ion-paired reversed-phase high-performance liquid chromatography.

Anal Biochem 169: 197-203

Black A, Schoknecht PA, Ralston SL, Shapses SA (1999)

Diurnal variation and age differences in the biochemical markers of bone turnover in horses.

J Anim Sci 77: 75-83

Bowmann VA, Fontenot JP, Meacham TN, Webb KE (1979)

Acceptability and digestibility of animal, vegetable fats by equine.

Proc 6th Equi Nutr Physiol Symp, 74

Brand G (1997)

$\Omega$ -3-Fettsäuren.

Ernährungs-Umschau 44 (Sonderheft): 50-54

Buck AC, Davies RL, Harrison T (1991)

The protective role of eicosapentaenoic acid [EPA] in the pathogenesis of nephrolithiasis.

J Urol 146: 188-194

Calder PC (2001)

N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: Pouring oil on troubled waters or another fishy tale?

Nutr Res 21: 309-341

Cockcroft DW and Gault MH (1976)

Prediction of creatinine clearance from serum creatinine.

Nephron 16: 31-41

Colwell A, Russel RG, Eastell R (1993)

Factors affecting the assay of urinary 3-hydroxy pyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption.

Eur J Clin Invest 23:341-349

Conquer JA and Holub BJ (1996)

Supplementation with an algae source of docosahexaenoic acid increases (n-3) fatty acid status and alters selected risk factors for heart disease in vegetarian subjects.

J Nutr 126: 3032-3089

Conquer JA and Holub BJ (1997)

Dietary docosahexanoic acid as a source of eicosapentaenoic acid in vegetarians and omnivores.

Lipids 32: 341-345

Darley MW, Porter D, Fuller MS (1973)

Cell wall composition and synthesis via golgiddirected scale formation in the marine eucaryote, *Schizochytrium aggregatum*, with a note on *Thraustochytrium* sp..

Arch Microbiol 90: 89-106.

Davicco MJY, Fakonnier V, Coxam H, Dugroeuq H, Martin-Rosset W,  
Barclay JP (1994)

Systemic bone growth factors in light bread mares and their foals.  
Arch Int Physiol Biochem Boiphys 12: 115-119

Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) (2000)

Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, Frankfurt am Main (Umschau/ Braus)

Doreau M, Boulot S, Bauchart D, Barlet JP, Martin-Rosset W (1992)

Voluntary intake, milk production and plasma metabolites in nursing mares fed two  
different diets.

J Nutr 122: 992-999

Dyerberg J, Bang HO, Hjerne N (1975)

Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos.

Am J Clin Nutr 28: 958-966

Dyerberg J, Bang HO, Stoffersen E, Moncada S, Vane JR (1978)

Eicosapentaenoic acid and prevention of trombosis and atherosclerosis?

Lancet 2: 117-119

Eaton SB and Konner M (1985)

Paleolithic nutrition. A consideration and its regulation.

New Engl J Med 312: 283-289

Eyre DR, Dickson IR, Van Ness K (1988)

Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage.

Biochem J 252: 495-500

Flothow C (1994)

Einfluss von Kokosfett und Sojaöl auf praeileale Verdauungsvorgänge beim Pferd.

Vet Diss Hannover

Fourier B, Gineyts, Delmas (1989)

Evidence that free gamma carboxyglutamic acid circulates in serum.

Clin Chem Acta 182: 173-182

Fraher L (1993)

Biochemical markers of bone turnover.

Clin Biochem 26: 431-432

Friberg CA and Logas D (1999)

Treatment of culicoides hypersensitive horses with high-dose n-3 fatty acids:  
a double-blinded crossover study.

Vet Dermatol 10: 117-122

Frischknecht Y (2003)

Wirkung von omega-3-fettsäurehaltigen Mikroalgen auf den Knochenstoffwechsel  
des Hundes.

Vet Diss München

Ghirardi P, Marzo A, Zambotti V (1973)

Biogenesis of saturated, mono- and poly-unsaturated fatty acids.

Ital J Biochem 22: 74-91

Gomez B, Bally CA, Jenkins DK., Kelm RJ, Seyedin S (1994)

An enzyme immunoassay for intact, newly synthesized osteocalcin.

A marker of bone formation.

Int Conf Progress Bone Min Res October 14-16

Green S, Anstiss CL, Fishman WH (1971)

Automated differential isoenzyme analysis. II. The fraction of serum alkaline  
phosphatase into "liver" and "other" components.

Enzymologia 41: 9-26

Grønn M, Christensen E, Hagve TA, Christophersen BO (1991)

Peroxisomal retroconversion of docosahexaenoic acid (22:6( $\Omega$ -3)) to eicosapentaenoic acid (20:5( $\Omega$ -3)) studied in isolated rat liver cells.

Biochem Biophys Acta 1081: 85-91

Gruger EH, Nelson RW, Stansby ME (1964)

Fatty acid composition of oils from 21 species of marine fish, freshwater fish and shellfish.

J Am Oil Chem Soc 41: 424-428

Grunwald D (1991)

Marginale Linolsäureversorgung und Parameter des Lipidstoffwechsels in Plasma und Organen beim adulten Pony.

Vet Diss Hannover

Gundberg CM, Nishimoto SK (1999)

Vitamin K-dependant proteins of bone and cartilage.

Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism.

Academic Press New York 43-57

Hahn A, Ströhle A, Schmitt B, Watkinson BM (2002)

Wirkstoffe funktioneller Lebensmittel in der Prävention der Arteriosklerose

Teil 1. Physiologische Grundlagen der Wirkung von  $\Omega$ -3-Fettsäuren

Ernährungs-Umschau 44: 172-177

Hall JA, Van Saun RJ, Wander RC (2004)

Dietary (n-3) fatty acids from menhaden fish oil alter plasma fatty acids and leukotriene B synthesis in healthy horses.

J Vet Intern Med 18: 871-9

Hambleton PL, Slade LM, Hamar DW, Kienholz EW, Lewis LD (1980)

Dietary fat and exercise conditioning effect on metabolic parameters in the horse.

J Anim Sci 51: 1330-1339

Hammond BG, Mayhew DA, Holson JF, Nemec MD, Mast RW, Sander WJ (2001b)  
Safty assesment of DHA-rich microalgae from Schizochytrium sp. II.  
Developmental toxicity evaluation in rats and rabbits.  
Regul Toxicol Pharmacol 33: 205-217

Hammond BG, Mayhew DA, Naylor MW, Ruecker FA, Mast RW Sander WJ (2001a)  
Safty Assesment of DHA-rich microalgae from Schizochytrium sp. I.  
Subchronic rat feeding study.  
Regul Toxicol Pharmacol 33: 192-204

Hank AM, Hoffmann ,Sanecki RK, Schaeffer DJ, Dorner JL (1993)  
Quantitative determination of equine alkaline phosphatase isoenzymes in foal and  
adult serum.  
J Vet Intern Med 7: 20-24

Hansen RA, Savage CJ, Reidlinger K, Traub-Dargatz JL, Ogilvie GK, Mitchell D,  
Fettman MJ (2002)  
Effects of dietary flaxseed oil supplementation on equine plasma fatty acid  
concentrations and whole blood platedlet aggregation.  
J Vet Intern Med 16: 457-463

Harris PA, Pagan JD, Crandell KG, Davidson N (1999)  
Effect of feeding thoroughbred horses a high unsaturated or saturated vegetable oil  
supplemented diet for 6 months fol-lowing a 10 month fat acclimation.  
Equine Vet J (Suppl) 30: 468-474

Hays VW and Swenson M J (1984)  
Minerals.  
Physiology of Domestic Animals 449-485.



Henry MM, Moor JN, Feldmann EB, Fischer JK, Russel B (1990)

Effect of dietary alpha-linolenic acid on equine monocyte procoagulant activity and eicosanoid synthesis.

Circulatory Shock 32: 173-88

Henry MM, Moor JN, Fischer JK (1991)

Influence of an omega-3 fatty acid-enriched ration on in vivo responses of horses to endotoxin.

Am J Vet Res 52: 523-7

Herthel DJ (1998)

Prevention of carbohydrate induced laminitis by bioactive lipid supplementation.

Proc 6th Equine Colic Res Symp, 15.

Hoffman RM, Kronfeld DS, Herbein JH, Swecker WS, Cooper WL, Harris PA (1998)

Dietary carbohydrates and fat influence milk composition and fatty acid profile of mare`s milk.

J Nutr 128: 2708S-2711S.

Högström M, Nordström P, Nordström A (2007)

N-3 fatty acids are positively associated with peak bone mineral density and bone accrual in healthy men.

The NO2 Study.

Am J Clin Nutr 85: 803-807

Hong S and Gronert K (2003)

Novel docosatirienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood and glial cells.

J Biol Chem 278: 14677-14687

Hope, E, Johnston SD, Hegstad RL, Geor RJ Murphy MJ (1993)  
Effects of sample collection and handling on concentration of osteocalcin in equine serum.  
Am J Vet Res 54: 1017-1019.

Jaffe M (1886)  
Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und ueber eine neue Reaction des Kreatinins.  
Hoppe Seylers Z Physiol Chem 10: 391-400

Jee WSS (1988)  
The skeletal tissues.  
In: Cell and Tissue Biology: Textbook of histology 6<sup>th</sup> edition. (ed: Weiss L.)  
Urban & Schwarzenberg, Baltimore, Munich: 212-254

Kannus P, Jozsa L, Kvist M, Jarvinen TLN, Maunu V, Hurme T, Jarvinen M (1996)  
Expression of osteocalcin in the patella of experimentally immobilized and remobilized rats.  
J Bone Min Res 11: 79-87.

Kantoci S (2008)  
Anreicherung von Jod und Omega-3-Fettsäuren in der Karpfenproduktion durch Algen im Fischfutter.  
Vet Diss München

Kny G (1998)  
Untersuchungen zur Qualität von frischer und gefriergetrockneter Stutenmilch.  
Vet Diss Leipzig

Kruger MC, Coetzer H, De Winter R, Claassen N (1995)  
Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid supplementation increases calcium balance.  
Nutr Res 15: 211-219

Lawrence LA, Ott EA, Miller GJ, Poulos PW, Piotrowski G, Asquith RL (1994)  
The mechanical properties of equine third metacarpals as affected by age.  
J Anim Sci 72: 2617-2623

Lawrence TLJ and Fowler VR (1997)  
Growth of farm animals.  
CAB Int, New York

Lepage OM, DesCoteaux L, Marcoux M, Tremblay A (1991)  
Circadian rhythms of osteocalcin in equine serum. Correlation with alkaline phosphatase, calcium, phosphate and total protein levels.  
Can J Vet Res 55: 5-10

Lepage OM, Marcoux M, Tremblay A, Dumas G (1992)  
Sex does not influence serum osteocalcin levels in Standardbred horses of different ages.  
Can J Vet Res 56: 379-381

Lepage OM, Marcoux M, Tremblay A (1990)  
Serum osteocalcin or bone Gla-protein, a biochemical marker for bone metabolism in horses: Differences in serum levels with age.  
Can J Vet Res 54: 223-226

Li Y, Siefert MF, Ney DM, Grahn M, Grant AL, Allen KG, Watkins BA (1999)  
Dietary conjugated linoleic acids alter serum IGF-I and IGF binding protein concentrations and reduce bone formation in rats fed (n-6) or (n-3) fatty acids.  
J Bone Miner Res 14: 1153-1162 FTXT: Journals@OVID

Lian JB and Friedman PA (1978)  
The vitamin K-dependent synthesis of gamma-carboxyglutamic acid by bone microsomes.  
J Biol Chem 253: 6623-6626

Lian JB and Gundberg CM (1988)

Osteocalcin: Biochemical considerations and clinical applications.

Clin Orthop 226: 267-291

Logas D and Friedberg CA (1999)

Treatment of Culicoides hypersensitive horses with high dose n-3 fatty acids. A double-blind crossover study.

Vet Dermatol 10: 117-122

Luther DG, Cox HU, Dimopoulos GT (1981)

Fatty acid composition of equine plasma.

Am J Vet Res 42: 91-93.

Marks SC and Miller SC (1993)

Prostaglandins and the skeleton: The legacy and challenges of two decades of research.

Endocr J 1: 337-344

Marks SC and Popoff SN (1988)

Bone cell biology: The regulation of development, structure, and function in the skeleton.

Am J Anat 183: 1-44.

Maurin AC, Chavassieux PM, Vericel E, Meunier PJ (2002)

Role of polyunsaturated fatty acids in the inhibitory effect of human adipocytes on osteoblastic proliferation.

Bone, Volume 31: 260-266

McCann ME, Moore J, Norton NA, Carrick JB, Barton MH (1998)

Effect of intravenous infusion of omega-3 and omega-6 lipid emulsions on equine endotoxemia.

Proc 6th Equine Colic Res Symp, 44

Metz G (2000)

Omega-3-Fettsäuren: Eine Standortbestimmung zum Millenium.

Stockdorf, Forum-Medizin-Verl-Ges

Meyer H und Landes E (1998)

Einfluss von Fetten auf die Futteraufnahme sowie mikrobielle Umsetzungen im Magen und Dünndarm des Pferdes.

Pferdeheild 14: 51-58

Meyer H, Sallmann H.-P. (1996)

Fütterung beim Pferd.

Übers Tierernährung 24: 199-227

Meyer H und Stadermann B (1990)

Möglichkeiten zur Bestimmung der Mineralstoffversorgung des Pferdes durch Harnanalysen.

Fortschr. Tierphysiol. Tierernährg. 21: 86-97

Morris DD, Henry MH, Moore JN, Fischer JK (1991)

Dietary alpha linolenic acid reduces endotoxin induced production of tumor necrosis factor activity by equine peritoneal macrophages.

Am J Vet Res 52: 528-532

Morris DD, Henry MM, Moore JN, Fischer JK (1989)

Effect of dietary linolenic acid on endotoxin-induced thromboxane and prostacyclin production by equine peritoneal macrophages.

Circ Shock 29: 311-318

Nejweide PJ, Burger EH, Feyen JHM (1986)

Cells of bone: Proliferation, differentiation, and hormonal regulation.

Phys Rev 66: 855-886

Nelson GJ, Schmidt PC, Bartolini GL, Kelly DS, Kyle D (1997)

The effect of dietary docosahexaenoic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans

Lipids 32: 1137-1146

Nitzschke F und Früll M (1996)

Untersuchungen zum Knochen-Isoenzym der Alkalischen Phosphatase im Serum von gesunden Pferden.

Pferdeheilkunde 12: 355-359

O'Brien JS and Sampson EL (1965)

Fatty acid and aldehyde composition of the major brain lipids in normal gray matter, white matter and myelin.

J Lipid Res 6: 545-551

Oberle MJ (1995)

Einfluß von Fütterungsmaßnahmen auf Fettgehalt und Fettsäuremuster und deren Auswirkungen auf die Schlachtqualität- und Fleischqualität von Karpfen (*Cyprinus carpio* L.).

Agr. Wiss. Diss, Technische Universität, München

Pagan JD, Tiegs W, Jackson SG, Murphy HQ (1993)

The effect of different fat source on exercise performance in thoroughbred racehorse.

Proc 13th Equi Nutr Physiol Symp, 125-129

Parisini A (2004)

Effekte langkettiger  $\Omega$ -3-Fettsäuren auf Fettsäuremuster und Lungenfunktion von Pferden mit RAO (Recurrent airway obstruction).

Vet Diss, Universität Wien

Poulos A, Darin-Bennett A, White IG (1975)

The phospholipid bound fatty acids and aldehyd of mammalian spermatozoa.

Comp Biochem Physiol 46B: 541-549

Price JS, Jackson B, Eastell R, Goodship AE, Blumsohn A, Wriht I, Stoneham S, Lanyon LE, Russel RGG (1995a)

Age related changes in biochemical markers of bone metabolism in horses.

Equine Vet J 27: 201-207

Price PA, Willson MK, Haba T, Dell RB, Jee WSS (1982)

Proc Nat Acad Sci 79: 7734

Rambeck WA und Weber P (2001)

Neue Entwicklung bei der Osteoporoseprävention Phytoöstrogene, Vitamin K, Omega-3-Fettsäuren.

Praxishandbuch Funktional Food, 3 Akt-Lfg :1-32

Rasoarahona JR, Barnathan G, Bianchini JP, Gavdou EM (2004)

Annual evolution of fatty acid profil from muscle lipids of the common carp (*Cyprinus carpio*) in Madagascar inland waters.

J Agric Food Chem 52 : 7339-7344

Rich GA, Fontenot JP, Meacham TN (1981)

Digestibility of animal, vegetable and blended fats by equines.

Proc 7th Equine Nutr Physiol Symp, 30-36

Riggs BL, Kohsal S, Melton LJ (1998)

A unitary model for involutional osteoporosis: strogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal woman and contributes to bone loss in aging men.

J Bone Miner Res 13: 171-173

Robins SP (1982)

Turnover and crosslinking of collagen.

Collagen in helth and disease.

Edinburgh, Churchill- Livingstone., 160-178

Sakagucchi K, Morita I, Murota S (1994)

Eicosapentaenic acid inhibits bone loss due to ovariectomy in rats.

Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 50: 81-84

Salimei E, Bontempo V, Dell'Orto V (1996)

Nutritional status of the foals related to the age and to mares` feeding.

Pferdeheilkd 12: 245-248

Sallmann HP, Kienzle E, Fuhrmann H, Grunwald D, Eilmans I, Meyer H (1992)

Einfluß einer marginalen Fettversorgung auf Fettverdaulichkeit, Lipidgehalt und –  
zusammen-setzung von Chymus, Gewebe und Blut.

Pferdeheilkd (Sonderausgabe), 124-127

Sallmann HP, Kienzle E, Fuhrmann H, Grunwald D, Eilmans I, Meyer H (1991)

Metabolic consequences of feeding ponies with marginal amounts of fat.

Equine Nutr Physiol Symp: 81-82

Schauder P und Ollenschläger G (2003)

Ernährungsmedizin, Prävention und Therapie, München (Urban & Fischer)

Schlemmer CK, Coetzer H, Claassen N, Kruger MC, Rademeyer C, van JL, Smuts  
CM (1998)

Etopic calcification of rat aortas and kidneys is reduced with  $\Omega$ -3 fatty acid  
supplementation.

Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 59: 221-227

Schmid S (2003)

Fütterungsversuch mit Jod- und Omega-3-Fettsäurehaltigen Algen an  
Süßwasserfischen.

Vet Diss, München



Schnurpel B (1991)

Einfluß von Futterart und Höhe der Ca-Aufnahme auf Ca-Blutspiegel und renale Ca-Exkretion beim Pferd.

Vet Diss, Hannover

Schreyver HF, Craig PH, Hintz HF (1970a)

Calcium metabolism in ponies fed varying levels of calcium.

J Nutr 100: 955-964

Schweiz. Zschr. Ganzheitsmedizin Jg. 16, Heft 4, Mai 2004

Seeman E (1996)

Parathyroid hormone in age related bone loss "Osteoporosis and Parathormone Symposium Abstracts"

Eds Gramon Laboratory, Buenos Aires, 6.

Seibel MJ (1996)

Biochemische marker of bone metabolism in the diagnosis and follow-up of post-transplantation osteopathies.

Klin Lab 42: 135-140

Simopoulos AP (1998)

Overview of evolutionary aspects of omega-3 acids in diet.

World Rev Nutr Diet 811-831

Simopoulos AP (1999)

Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply.

Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 60: 421-429 FTXT: Information Quest

Simopoulos AP and Salem N, Jr (1992)

Egg yolk as a source of long-chain polyunsaturated fatty acids in infant feeding.

Am J Clin Nutr 55: 411-414

Simopoulos AP, Norman HA, Gillaspay JE (1995)

Pursulan in human nutrition and its potential for world agriculture.

Plants in Human Nutrition. World Rev Nutr Diet 77: 47-74

Singer P (1994)

Was sind Omega-3-Fettsäuren.

Umschau Zeitschriftenverlag, Frankfurt

Snow DH, Fixter LM, Kerr MG, Cutmore CM (1983)

Alterations in composition of venous plasma FFA pool during prolonged and sprint exercise in the horse.

Biochemistry 7 of Exercise Int Series of Sports Sciences (Eds: Knuttgen EG, Vogel JA, Poortmans J). Vol. 13: 336-350

Stammers JP, Hull D, Silver M, Fowden AL (1995)

Fetal and maternal plasma lipids in chronically catheterized mares in late gestation: effects of different nutritional states.

Reprod Fertil Dev 7: 1275-1284

Stammers JP, Leadon DP, Hull D (1987)

Fatty acid composition of the plasma lipids of the maternal and newborn horse.

J Reprod Fertil 35: 615-622

Steffens W (1993)

Energieanreicherung von Karpfenfutter durch Zusatz unterschiedlicher Öle

Fischer und Teichwirt 44: 74-77

Stracke H, Schulz A Moeller D, Rossol S, Schatz H (1984)

Effect of growth hormone on osteoblasts and demonstration of somatomedin-C/IGF I in bone organ culture.

Acta Endocrinol (Copenh).107: 16–24.

Taugbøl O and Koene M (1996)

The composition of polyunsaturated fatty acids in mare`s blood and foal`s blood plasma at birth and the first days after parturition.

Pferdeheilkd 12: 223-226.

Tennant B, Bettelheim P, Kaneko JJ (1982)

Paradoxic hypercalcemia and hypophosphatemia associated with chronic renal failure in horses.

J Am Vet Med Ass 180: 630-634

Tennant B, Lowe JE, Tasker JB (1981)

Hypercalcemia and hypophosphatemia in ponies following bilateral nephrectomie.

Proc Soc Exp Biol Med 167: 365-368

Thoren-Tolling K (1988)

Serum alkaline phosphatase isoenzym in the horse variation with age, training and different pathological conditions.

J Vet Med 35: 12-23

Trautwein EA (1999)

Fette und Fettbegleitstoffe.

Praxishandbuch Functional Food, Grundwerk 12/99

Patentschrift US7.381.558, Barclay et al (2008)

Van Vliet T and Katan MB (1990)

Lower ration of  $\Omega$ -3 to  $\Omega$ -6 fatty acids in cultured than in wild fish.

Am J Clin Nutr 51: 1-2

Waller DG, Flemimg JS, Ramsey B, Gray J (1991)

The accuracy of creatinine clearance with and without urine collection as a measure of glomerular filtration rate.

Postgraduate Med J; 67: 42-6

Wasserman RH (1984)

Bones.

JM Swenson (Ed.) Dukes' Physiology of Domestic Animals 467-485

Watkins BA, Li Y, Allen KGD, Hoffmann WE, Siefert MF (2000)

Dietary ratio of ( $\Omega$ -6)/( $\Omega$ -3) polyunsaturated fatty acids alter the fatty acid composition of bone biomarkers of bone formation in rats.

J Nutr 130: 2274-2284

Watkins BA, Shen CL, Allen KG, Seifert MF (1996)

Dietary ( $\Omega$ -3) and ( $\Omega$ -6) polyunsaturated and acetylsalicylic acid alter ex vivo PGE<sub>2</sub> biosynthesis, tissue IGF-I levels, and bone morphometry in chicks.

J Bone Miner Res 11: 1321-1332

Watkins BA, Shen CL, McMurtry JP, Xu H, Bain SD, Allen KG, Seifert MF (1997)

Dietary lipids modulate bone prostaglandin E<sub>2</sub> production, insulin -like growth factor-I concentration and formation rate in chicks.

J Nutr 127: 1084-1091

Wehr UA (1998)

Diagnose, Prävention und Therapie von Knochenstoffwechselerkrankungen in der Humanmedizin: Möglichkeiten und Grenzen von biochemischen Knochenmarkern.

Vet Diss, München

Weik H (1969)

Ein Vergleich der freien Fettsäuren im Blutplasma des Pferdes mit den Fettsäuren im Depotfett.

Tierphysiol Tierernährg Futtermittelkd 25: 65-68

Weik H und Altmann HJ (1971)

Das Verhalten einiger Blutlipide während des Hungerns beim Pferd.

Zbl Vet Med A 18: 131-138

Whitlock RH (1970)

The effects of high dietary calcium in horses: A metabolic, radiological, morphological and biological study.

Ph D Thesis Cornell Univ, Ithaca

Withold W (1996)

Monitoring of bone turnover biological, preanalytical and technical criteria in the assessment of biochemical markers.

Eur J Clin Chem Clin Biochem 34: 785-799

Wolfram G (1995)

$\Omega$ -3-Fettsäuren ihr Stoffwechsel und ihre Wirkung auf vaskuläres System, Fettstoffwechsel und Immunsystem.

Aktuelle Ernährungs-Med 20: 173-179

World Health Organisation (1996)

Trace elements in human nutrition and health.

Chapter 4: Iodine: 49-71

Wüstenberg PW, Dörp E, Sinn W (1984)

Methodic references for clinical diagnosis of glomerular permeability selectivity by molecular weight related protein analysis and additional para- aminohippuric acid load.

Z Urol Nephrol, 77: 605-16

Yamamoto M, Tanaka Y. and Sugano M. (1979a)

Serum and liver lipid composition and lecithin: cholesterol acyltransferase in horses, *Equus caballus*.

Comp Biochem Physiol 62: 185-193

Yamamoto M, Tanaka Y, Sugano M (1979b)

Lipid composition and cholesterol esterification in serum lipoprotein fraction of the horse, *Equus caballus*.

Comp Biochem Physiol 62: 441-449

Zeyner A, Behnisch C, Gropp J (2003)

Investigations on the palatability and digestibility of fish oil containing diets in adult riding horses.

Proc 7th Conf Europ Soc Vet Comp Nutr, 75

Zeyner A, Geissler C, Peschke I, Kny G, Jope R (1996)

Beitrag zum Fettsäurenmuster in der Stutenmilch.

Pferdeheilkd 12: 213-219

---

## 9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. W. A. Rambeck für die Überlassung der Arbeit sowie seine hervorragende Beratung und Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Dr. Ulrich Wehr für die Unterstützung bei der Versuchsvorbereitung, bei der Datenanalyse und für seine zahlreichen guten Ratschläge die mir sehr zur Fertigstellung dieser Arbeit geholfen haben.

Frau E. Kleiner, Fr. Wetzel und Hrn. W. Hesselbach für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei den Analysen im Labor.

Fr. Gabi Reder für die Unterstützung bei der Betreuung der Ponies während der Fütterungsphase.

Der Firma Martek Inc., Colorado für die Analyse und Bestimmung der Fettsäuremuster sowie für die Bereitstellung der DHA GOLD Algen™ die bei dieser Arbeit eingesetzt wurden.

Fr. Andrea Backes und Rolf Neumeister für die Unterstützung bei der Korrektur dieser Arbeit. Erika Burk für die Optimierung der englischen Übersetzung des Summaries.

Einen ganz besonderen Dank meinen beiden Kindern Jan und Jonas, die vor allem in der Endphase dieser Arbeit nicht immer die Zeit bekommen haben, die sie gerne mit mir gehabt hätten.

Meinem Mann Jochen für die Unterstützung bei allen Fragen zu Datenanalyse und ECXEL.

Meinen Eltern dafür, dass sie mir dieses Studium ermöglicht und mich immer unterstützt haben.