

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
Der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Geschäftsführender Vorstand:
Univ.-Prof. Dr. H.-J. Gabius

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

**Untersuchung zur Resorption von emulgiertem Vitamin E
beim Ferkel**

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

von

Katharina Lutz
aus Karlsruhe

München 2006

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent: Prof. Dr. W. Rambeck
Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. M. Rinder

Tag der Promotion: 10.02.2006

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis:

Inhaltsverzeichnis.....	I
Verzeichnis der Abbildungen.....	III
Verzeichnis der Tabellen.....	V
Verzeichnis Abkürzungen.....	VI
1. Einleitung und Problemstellung.....	1
2. Literaturübersicht.....	3
2.1. Vitamin E.....	3
2.1.1. Vorkommen in der Natur.....	4
2.1.2. Chemische und physikalische Eigenschaften von Vitamin E.....	5
2.1.3. Biologische Funktion von Vitamin E.....	7
2.1.4. Die Bioverfügbarkeit.....	12
2.1.5. Stoffwechsel von Vitamin E bei Mensch und Tier.....	14
2.2. Alimentäre Einflussfaktoren beim Tier.....	25
2.2.1. Vitamin Bedeutung für den Organismus.....	25
2.2.2. Hypervitaminose E.....	27
2.2.3. Hypovitaminose.....	31
2.2.4. Interaktionen mit anderen Vitaminen.....	52
3. Material und Methoden.....	56
3.1. Tiermaterial.....	56
3.2. Versuchsgruppen.....	56
3.3. Tierhaltung.....	57
3.4. Futter.....	57
3.5. Versuchsablauf.....	60
3.6. Orale Verabreichung.....	61
3.7. Blutentnahmetechnik.....	61
3.8. Probenentnahme und Probenverarbeitung.....	62
3.9. Gewinnung und Aufbereitung von Histologiepräparaten.....	69
3.10. Statistik.....	72

4. Ergebnisse.....	73
4.1. Vitamin E Gehalt im Serum.....	73
4.2. Vitamin E Gehalt in den Organproben.....	76
4.2.1. Vitamin E Gehalt in der Leber.....	76
4.2.2. Vitamin E Gehalt in der Niere.....	78
4.2.3. Vitamin E Gehalt in der Lunge.....	79
4.2.4. Vitamin E Gehalt in den Darmlymphknoten.....	80
4.3. Histologieschnitte.....	81
4.3.1. Histologieschnitte vor oraler Applikation.....	82
4.3.2. Darmhistologieschnitte nach oraler Applikation der Emulsion...	82
4.3.3. Lymphknotengewebe aus dem Dünndarm.....	87
5. Diskussion.....	89
5.1. Methodik.....	89
5.1.1. Tiermodel.....	89
5.1.2. Ablauf der Studie.....	90
5.1.3. Fütterung der Tiere.....	91
5.2. Vitamin E Gehalt im Serum.....	92
5.2.1. Anflutung im Serum.....	94
5.2.2. Erreichen des Konzentrationsmaximums.....	97
5.2.3. Absinken des Vitamin E Gehaltes.....	97
5.3. Resorptionsweg und indirekte Nachweismethoden.....	99
5.4. Anreicherung von Vitamin E in den Organen.....	102
5.5. Vitamin A und Vitamin E Applikation in Kombination.....	110
6. Zusammenfassung.....	118
7. Summary.....	121
8. Literaturverzeichnis.....	123
9. Lebenslauf.....	141
10. Danksagung.....	142

Verzeichnis der Abbildungen:

Abbildung 1: Strukturformel des natürlichen α -Tocopherol.....	5
Abbildung 2: Natürlich vorkommende Formen von Vitamin E.....	6
Abbildung 3: Reaktion von α -Tocopherol mit Peroxylradikalen.....	10
Abbildung 4: Aufnahme des LDL in die Zielzelle	19
Abbildung 5: Oxidationsprodukte des α -Tocopherols	20
Abbildung 6: Schema des Tocopherol-Metabolismus und der zugehörigen CEHC- Formen	21
Abbildung 7: Degradation des α -Tocopherol.....	22
Abbildung 8: Stoffwechsel von Vitamin E.....	24
Abbildung 9: Zusammenspiel zwischen Vitamin E, Vitamin C und Thiolredoxcylen..	52
Abbildung 10: Chromatogramm Vitamin E	68
Abbildung 11: Einbettung des gefärbten Schnittes in Glyceringelatine.....	71
Abbildung 12: Dünndarmgewebe vor oraler Verabreichung der Sanovital AE Emulsion.....	82
Abbildung 13: Histologische Schnitte des Dünndarms 10 Minuten nach oraler Applikation von 4 ml Sanovital AE.....	83
Abbildung 14: Histologischer Schnitt des Dünndarms vom Schwein 40 Minuten nach oraler Applikation von 4ml Sanovital AE Emulsion.....	85
Abbildung 15: Histologischer Schnitt des Dünndarms 60 Minuten nach oraler Applikation von 4ml Sanovital AE, V10.....	86
Abbildung 16: Darmlymphknoten a) vor, b) 20 Minuten, und c) und d) 40 Minuten nach oraler Verabreichung von 4 ml Sanovital AE.....	87
Abbildung 17: Serumresponse Vitamin E (in $\mu\text{g/ml}$ Serum) in den 3 Versuchsgruppen (Kontrollgruppe; Sanovital-Gruppe und Vergleichspräparatgruppe); (Mittelwert \pm Standard-Abweichung) zum Zeitpunkt 0 (vor oraler Applikation) bis 7 Stunden post interventionem.....	95
Abbildung 18: Serumresponse Vitamin E (in $\mu\text{g/ml}$ Serum) in den 3 Versuchsgruppen (Kontrollgruppe; Sanovital- Gruppe und Vergleichspräparatgruppe); (Mittelwert \pm Standard-Abweichung) zum Zeitpunkt 24 Stunden post interventionem.....	98

Abbildung 19: Verschiedene Resorptionswege; trans- und perizellulär, von Vitamin E.....101

Abbildung 20: Vitamin E Gehalt in der Leber ($\mu\text{g/g uS}$) in den Versuchsgruppen (Sanovital und Vergleichspräparat), (Mittelwert \pm Standardabweichung) 24,48,72 Stunden nach Applikation des jeweiligen Vitaminpräparates; unterschiedliche Buchstaben (a, b) kennzeichnen Signifikanzen.....105

Abbildung 21: Vitamin E (in $\mu\text{g/g uS}$) Gehalte in der Niere in den beiden Versuchsgruppen (Sanovital und Vergleichspräparat) (Mittelwert \pm Standardabweichung).....107

Abbildung 22: Vitamin E Gehalte in der Lunge ($\mu\text{g/g uS}$) in den drei Versuchsgruppen (Kontrolle, Sanovital, Vergleichspräparat) (Mittelwert \pm Standardabweichung) nach Gabe der Vitaminpräparate.....108

Abbildung 23: Vitamin E Gehalt ($\mu\text{g/g uS}$) in den Darmlymphknoten in den drei Versuchsgruppen (Kontrolle, Sanovital, Vergleichspräparat) (Mittelwert \pm Standardabweichung).....109

Abbildung 24: Vitamin E ($\mu\text{g/g uS}$) in der Leber nach Applikation von 4ml Sanovital.....115

Abbildung 25: Vitamin A ($\mu\text{g/g uS}$) in der Leber nach 4 ml Sanovital (Ergebnisse aus Lambrecht 2006).....115

Abbildung 26: Mittels Öl in Rot gefärbte Fettemulsionströpfchen im Lymphplexus des Dünndarms, Vergrößerung V20, 40 Minuten nach oraler Applikation von 4ml Sanovital AE.....116

Verzeichnis der Tabellen:

Tabelle 1: Dosierungsempfehlung für Vitamin E beim Schwein.....26

Tabelle 2: Futtermittelzusammensetzung.....58

Tabelle 3: Inhaltsstoffe im verwendeten Ferkelaufzuchtsfutter.....59

Tabelle 4: Zusatzstoffe und Spurenelemente im verwendeten Ferkelfutter.....59

Tabelle 5: Serumresponse Vitamin E (in µg/ml Serum) in den drei Versuchsgruppen
(Kontrolle, Sanovital, Vergleichspräparat) (Mittelwert ±
Standardabweichung) nach der Gabe der Vitaminpräparate.....75

Tabelle 6: Vitamin E Gehalte in der Leber (µg/g uS) in den drei Versuchsgruppen
(Kontrolle, Sanovital, Vergleichspräparat) (Mittelwert ±
Standardabweichung) nach Gabe der Vitaminpräparate.....77

Tabelle 7: Vitamin E Gehalte in der Niere (µg/g uS) in den drei Versuchsgruppen
(Kontrolle, Sanovital, Vergleichspräparat) (Mittelwert ±
Standardabweichung) nach Gabe der Vitaminpräparate.....78

Tabelle 8: Vitamin E Gehalte in der Lunge (µg/g uS) in den drei Versuchsgruppen
(Kontrolle, Sanovital, Vergleichspräparat) (Mittelwert ±
Standardabweichung) Nach Gabe der Vitaminpräparate.....79

Tabelle 9: Vitamin E Gehalt in den Darmlymphknoten (µg/g uS) in den drei
Versuchsgruppen (Kontrolle, Sanovital, Vergleichspräparat) (Mittelwert ±
Standardabweichung) nach Gabe der Vitaminpräparate.....80

Verzeichnis der Abkürzungen:

AWT	Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe in der Tierernährung
CEHC	Carboxyethylhydroxychroman
DM	Diätetische Mikroangiopathie
GSH-Px	Glutathion Peroxidase
HDL	High Density Lipoprotein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IE	Internationale Einheit (1IE VitE = 1 mg DL- α -Tocopherol-acetat)
IMI	Intra Mammary Infection
LDL	Low Density Lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
LPR	Lipidperoxid-Radikal
MDT	Magen-Darm-Trakt
MHD	Mulberry heart disease / Maulbeer Herz Krankheit
MMA	Mastitis-Metritis-Agalaktiae
NMD	Nutritive Muskeldystrophie
O ₂ •	Superoxid-Radikal
OH•	Hydroxyl-Radikal
PUFA	Poly unsaturated fatty acid / mehrfach ungesättigte Fettsäuren
PNS	Peripheres Nervensystem
ROO•	Peroxyradikal
ROOH	Hydroperoxid
VitE-O•	Tocopheroxyl-Radikal
VLDL	Very Low Density Lipoproteins
ZNS	Zentrales Nervensystem
α - TTP	α - Tocopherol Transfer Protein
α - TBP	α - Tocopherol binding protein

1. Einleitung und Problemstellung

Vitamin E gehört zu den essentiellen Vitaminen im Organismus. Es ist Bestandteil aller biologischen Membranen und das wichtigste Antioxidans im Körper von Mensch und Tier. Eine Vitamin Unter- oder Überversorgung kann vor allem bei Jungtieren neben akuten Symptomen zu Langzeitschäden führen. Diese Folgeerkrankungen können sich in dystrophischen Erscheinungen (Muskeldystrophie), Lebernekrosen, Störungen im Immunsystem, im Wachstum und in Form von Fruchtbarkeitsstörungen äußern. Ebenfalls ist die adäquate Vitamin E Versorgung bei Schweinen im Hinblick auf die Schlachtkörperqualität von Bedeutung. Eine bedarfsgerechte Versorgung sorgt für eine ausreichende Vitamin E Konzentration im Speicherfett. Dort schützen die Tocopherole das Depotfett vor Oxidation. Dieser protektive Effekt hält auch noch nach der Schlachtung an und sichert eine gute Fleischqualität.

Aus diesen oben genannten Gründen ist eine optimale Versorgung mit Vitaminen, speziell mit Vitamin E in der Schweinehaltung von besonderer Bedeutung. Um diesen Zustand zu optimieren werden die Zusatz- und Vitamin-Wirkstoffformulierungen und Aufbereitungsform immer weiterentwickelt und modifiziert.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Resorption von emulgiertem und nicht-emulgiertem Vitamin E bei heranwachsenden Schweinen. Das Einsatzgebiet von Vitamin E bezieht sich vorwiegend auf den Zeitraum des Absetzens und Umstallens in der Schweinehaltung, da in diesen Phasen der Mast und Zucht eine enorme Stressbelastung für die Tiere besteht. In dieser Periode hat sich die zusätzliche Applikation von Vitamin E bewährt, um die oben erwähnten Gesundheitsprobleme zu minimieren oder sogar auszuschließen.

Das Ziel dieser Arbeit ist, quantitative Unterschiede im Resorptionsweg, der Resorptionsgeschwindigkeit, dem Resorptionsvolumen und im Speicherverhalten von Vitamin E bei der Anwendung von unterschiedlichen Wirkstoffformulierungen darzulegen.

Um mögliche Differenzen auszuwerten, wurde den Tieren, nach oraler Applikation einer Vitamin E -haltigen Emulsion, Sanovital AE, und einem konventionellen Vitamin-Vergleichspräparat innerhalb von vorher definierten Zeitintervallen Blut entnommen.

Nach Abschluss der Blutproben wurden die Tiere zur Entnahme von Organproben in unterschiedlichen Zeitintervallen getötet. Hierbei sollte der Konzentrationsanstieg und das Speicherverhalten in ausgewählten Organen (Leber, Niere, Lunge, Darmlymphknoten) überprüft werden. Die Tocopherolgehalte der Serum- und Organproben wurden mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatographie) bestimmt.

Mit Hilfe bildgebender Verfahren sollte die Resorption, bzw. der Übertritt von emulgiertem Vitamin E aus dem Dünndarmlumen in das Kapillarsystem dargestellt werden. Es wird vermutet, dass Emulsionen und darin enthaltene fettlöslichen Vitamine, anstatt auf dem transzellulären Weg, auf dem perizellulären Wege, analog der Resorption von Milchfetttröpfchen, vom Organismus aufgenommen werden können. Dieser Katabolismus sollte anhand der histologischen Schnitte des Dünndarms erörtert und belegt werden.

Durchgeführt wird diese Versuchsstudie, da sich die Formulierungsmethoden, bei der Herstellung konventionellen, nicht emulgierten Vitaminpräparaten in den letzten 45 Jahren bedeutend modifiziert und weiterentwickelt haben. Es sind neuartige Herstellungsverfahren hinzugekommen, die eine effektivere Resorption bedingen. Die meist synthetisch hergestellten Vitamine werden nicht nur chemisch modifiziert (z. Bsp. Vitamin E in Vitamin E Acetat, anstatt Vitamin E Alkohol), sondern auch Granulier- und Sprühverfahren unterzogen.

Angesichts dieser weiterentwickelten Verfahren stellt sich die Frage, ob die orale Verabreichung (hoher Arbeitsaufwand) von fettlöslichen Vitaminen in emulgierter Form gegenüber den herkömmlichen Verabreichungsformen als Beadlet, oder gecoatete Produkte (als Prämix) immer noch von Vorteil für Tier und Mensch ist.

2. Literaturübersicht

2.1. Vitamin E

Der Name „Vitamin“ wurde im Jahre 1913 von Casimir Funk geprägt. Das Wort VITAMIN ist ein zusammengesetztes Wort aus dem Lateinischen, es besteht aus „Vita“, welches Leben bedeutet und „Amin“, was für Stickstoffverbindung steht. Dieser Name ist bis heute geblieben, obwohl man schon seit langem erkannt hat, dass nicht alle Vitamine Stickstoffverbindungen enthalten. Vitamine sind Stoffe, die der Körper nicht, oder nicht in ausreichendem Maße selbst synthetisieren kann. Da sie für zahlreiche Stoffwechselfvorgänge benötigt werden, sind sie für den Körper essentiell und müssen kontinuierlich von außen über die Nahrung zugeführt werden.

Das fettlösliche Vitamin E wurde 1922 von Bishop und Evans an der Universität von Californien in Berkeley entdeckt. Man stellte fest, dass ein Mangel einer bestimmten Futterkomponente bei Ratten zu Reproduktionsstörungen führte. Hieraus begründet sich historisch, weshalb dieses Vitamin E als Fruchtbarkeitsvitamin bezeichnet wird. Ein weiteres Synonym für Vitamin E ist Tocopherol, dies leitet sich aus dem griechischen *tókos*, Geburt und *phérein*, bringen, tragen ab.

Im Jahre 1991 wurden weitere Eigenschaften des Vitamin E, die nicht-antioxidativen Eigenschaften in Bezug auf Zellmechanismus entdeckt. Bewiesen wurde dies anhand der Protein Kinase C Aktivität, welche durch Vitamin E in glatten Muskelzellen reguliert wird (Boscoboinik et al. 1991). Auf der Ebene der Transkription steuert Vitamin E die Expression des alpha-Tocopherol Transport Proteins (alpha-TTP) in der Leber, sowie die Expression der Leber Kollagen alpha Gene, der Kollagenase Gene und der alpha-Tropomyosin Gene. Des Weiteren existiert ein alpha-Tocopherol abhängiger Transriptionsfaktor (tocopherol-associated Protein). In Zellkulturen konnte nachgewiesen werden, dass Vitamin E Entzündungsprozesse, Zelladhäsionen, Blutplättchenaggregation und die Proliferation glatter Muskelzellen zu hemmen vermag (Rimbach et al. 2002).

2.1.1. Vorkommen in der Natur

In der Natur kommen Tocopherole in Form gelblicher, öliger Flüssigkeiten vor. Es existieren verschiedene stereoisomere Formen. Das RRR- α -Tocopherol ist dabei das häufigste und biologisch aktivste Stereoisomer. Besonders reich an fettlöslichem Vitamin E sind Ölsaaten, Getreide- und Sojaprodukte, Nüsse, pflanzliche Keimöle, wie zum Beispiel Sonnenblumen- und Maiskeimöl. Geringe Mengen lassen sich auch in Obst und Gemüse nachweisen (Cabell und Ellis 1942).

In tierischen Produkten, wie Fleisch, Eier und Käse kommt vor allem α -Tocopherol vor, in pflanzlichen Lebensmitteln dominieren γ -, α - und δ -Tocopherol. Die Synthese der Tocopherole findet in den Samen und Blättern höherer Pflanzen statt. Mit dem Alter der Pflanzen nimmt der Gesamt-Tocopherolgehalt ab, der Anteil des α -Tocopherols bleibt prozentual aber konstant. Es spielt nicht der Gesamt-Tocopherolgehalt eine Rolle, sondern die Gewichtung der einzelnen Stereoisomere und deren biologische Aktivität. Sojaprodukte beinhalten hauptsächlich gamma-Tocopherol, dieses zeigt jedoch nur geringe biologische Aktivität. Der Gesamt-Tocopherolgehalt von Sojaöl liegt bei 920- 1800 ppm und mit diesen Werten im oberen Bereich. Einen hohen Gehalt an α -Tocopherol besitzen Sonnenblumenöl, Safloröl, Baumwollsaatöl, Olivenöl und Palmöl.

Tiere können aus Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) die Vorstufe des Vitamin E, das Farnesyl-diphosphat aufbauen. Sie sind jedoch nicht in der Lage Tocopherole zu synthetisieren.

In Futtermitteln hängt der Vitamin E Gehalt von der Art, der Sorte, dem Entwicklungsstadium der jeweiligen Grünpflanze, der Ernte- und der Lagerungsbedingungen, sowie der Aufbereitung des Futtermittels ab.

Bei der Trocknung von Grünpflanzen (Heugewinnung) kann es zu Verlusten von bis zu 90% kommen. Mit zunehmender Lagerungsdauer sinkt der Gehalt der Tocopherole. Bei der Herstellung von silierten Futtermitteln hingegen kommt es nur zu Verlusten von ca. 10 Prozent.

2.1.2. Chemische und physikalische Eigenschaften von Vitamin E

Vitamine können anhand ihrer Löslichkeit und Wirkungsweise unterschieden werden. Es existieren wasser- und fettlösliche Vitamine. Wasserlösliche Vitamine entfalten ihre Wirkung im gesamten Organismus, fettlösliche Vitamine benötigen spezielle Hüllproteine, sog. Micellen, um im Medium Blut transportiert zu werden und um an ihre Wirkungsorte zu gelangen.

Da Vitamin E zu den fettlöslichen Vitaminen, wie Vitamin A, D und K gehört ist es in Fetten, organischen Lösungsmitteln und in Chloroform gut lösbar, jedoch nicht in Wasser. In der Natur kommt es als ölige, gelblich-braune Flüssigkeit vor. Der Schmelzpunkt liegt bei 2,5-3,5 °C, der Siedepunkt liegt bei 235 °C. Da Tocopherole sehr reaktionsfreudige Antioxidanzien sind, müssen sie vor Luft- und Lichteinwirkung geschützt werden.

Vitamin E ist ein Sammelbegriff für alle Derivate der Tocopherole und Tocotrienole geworden, deren biologische Aktivität qualitativ der des α -Tocopherols entspricht. Tocopherole und Tocotrienole bestehen aus einem Chromanring und einer isoprenoiden Seitenkette mit 16 C-Atomen, siehe Abbildung 1. In Abhängigkeit von der Anzahl und der Stellung der Methylsubstituenten am Chromanring werden 4 verschiedene Tocopherole (α , β , γ , δ) unterschieden. Die 4 Tocopherole besitzen alle eine gesättigte Phytyl-Seitenkette und kommen in der Natur nur als freie Phenole vor. Im Gegensatz dazu können Tocotrienole auch in veresterter Form vorkommen.

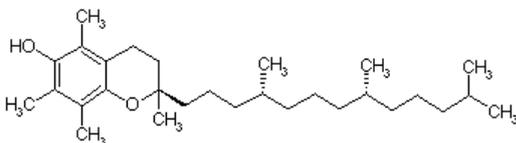


Abbildung 1: Strukturformel des natürlichen α -Tocopherol

Die natürlich vorkommenden Tocopherole haben alle die Konfiguration RRR. Das Tocopherolmolekül ist in der Lage 8 stereoisomere Formen zu bilden, da es 3 chirale Zentren (2', 4', 8') in der Seitenkette aufweist.

Das Hauptunterscheidungsmerkmal der vier Tocotrienole (α , β , γ , δ) sind die drei isolierten Doppelbindungen in der Phytyl- Seitenkette, siehe Abbildung 2. Die Tocotrienole weisen auch, im Gegensatz zu den Tocopherolen nur ein chirales Zentrum am C- Atom in zweiter Position auf, so dass nur 2R und 2S Stereoisomere möglich sind.

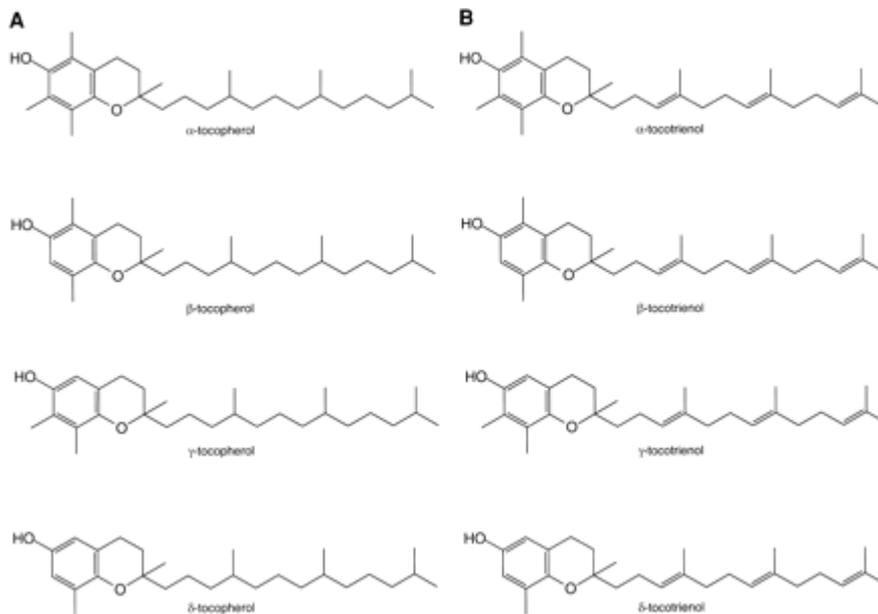


Abbildung 2: Natürlich vorkommende Formen von Vitamin E (nach Brigelius-Flohe und Traber 1999)

Durch die Doppelbindungen in der Phytylkette in Position 3`und 7` sind vier geometrische cis/ trans Isomere möglich. Für jedes Tocotrienol sind somit acht Isomere möglich.

- 2R und 2S: 3` cis 7` cis
- 3` cis 7` trans
- 3` trans 7` cis
- 3` trans 7` trans

2.1.3. Biologische Funktion von Vitamin E

Durch zunehmende Leistungssteigerung in der Tierhaltung und extreme Beanspruchung der Tiere steigt die Bildung von freien Radikalen, besonders von reaktiven Sauerstoffradikalen. Dies erhöht den Bedarf und Verbrauch von antioxidativ wirksamen Substanzen.

Um die Oxidation eines Substrates zu verhindern und damit die Bildung von Radikalen zu verringern, bzw. die Oxidationsschäden zu begrenzen, besitzt der Organismus enzymatische (Superoxydismutasen, Glutathionperoxidasen, Katalasen) und nicht enzymatische (Vitamin E, Ascorbat, β -Carotin, Glutathin, Harnsäure) Mechanismen.

Vitamin E ist das wichtigste lipidlösliche Antioxidans im menschlichen und tierischen Organismus. Es schützt vor allem, in seiner Funktion als Peroxylradikalfänger, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFA) in Plasmalipoproteinen und in Phospholipiden von biologischen Membranen vor Angriffen freier Radikale und der daraus resultierenden oxidativen Schädigung, (Stahl und Sies, 1997).

Bei einem Ungleichgewicht zwischen Radikalen und Schutzmechanismus zugunsten der Radikale gerät der Organismus in „oxidativen Stress“, in dessen Folge es zu Beeinträchtigung der Zellfunktion in Membranen, Störung der Membranfunktion, Verringerung der Membranfluidität, zur Inaktivierung von membrangebundenen Rezeptoren, Schädigung der Proteinstruktur und Erbgutschäden infolge von DNA-Strangbrüchen kommen kann, (Sies et al. 1992; Gutteridge und Halliwell, 1990; Gutteridge, 1995). Um diese Folgeschäden zu reduzieren ist eine Anreicherung des Futters mit Vitaminen sinnvoll.

Freie Radikale können sowohl endogenen, als auch exogenen Ursprungs sein. Diese kurzlebigen und hochreaktiven Zwischenprodukte entstehen bei oxidativen und reduktiven Vorgängen, bei denen es zur Umverlagerung von Elektronen kommt. Radikale weisen ein oder mehrere ungepaarte Elektronen auf und sind deshalb

besonders reaktionsfreudig und instabil. Am häufigsten dem Angriff von freien Radikalen sind Lipide (Peroxidation), Proteine (Denaturierung), Carbohydrasen und Nukleinsäuren ausgesetzt (Blokina et al. 2003).

Endogen entstehen sie zum Beispiel bei physiologischen Vorgängen, wie beim mitochondrialer Elektronentransport. Dieser spielt bei der Entstehung von Superoxidradikalen eine große Rolle. Bei starker Schädigung der Mitochondrien kann es zu einem sprunghaften Anstieg von freigesetzten Elektronen kommen. Die Folge ist eine übermäßige Bildung von Superoxidradikalen. Reaktive Sauerstoffspezies können ebenfalls von neutrophilen Granulozyten zur Abtötung von Bakterien bei der Phagozytose gebildet werden. Des Weiteren werden freie Radikale bei Enzymoxidation und Substratautoxidation gebildet, (Lechler, 1996; Girotti, 1998)

Es gibt jedoch nicht nur endogene Faktoren, die zur Radikalbildung führen, sondern auch exogene Faktoren. Zu den exogenen Einflussfaktoren zählen die ultraviolette, oder ionisierende Strahlung, Ozon und Stickoxide. Auch dem Tier von außen zugeführte, und damit beeinflussbare Faktoren, wie diverse Pharmaka und natürliche pflanzliche phenolische Verbindungen (Radikalbildung durch Redoxilierung) spielen eine Rolle, (Blokina et al. 2003).

2.1.3.1. Abbruch der Kettenreaktion durch Vitamin E

Bei der Lipidperoxidation wird ebenfalls durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms von der Methylgruppe eines Fettsäuremoleküls die Bildung von freien Radikalen initiiert. In einer Kettenreaktion können fortlaufend weitere Radikale entstehen, (Frankel 1991; Porter et al. 1995). Diese Kettenreaktion setzt sich so lange fort, bis entweder zwei Radikale miteinander reagieren, und eine stabile Verbindung bilden, oder die Kettenreaktion durch ein Antioxidans unterbrochen wird.

Tocopherole reagieren mit Alkoxy-Radikalen, Lipidperoxyl-Radikalen und mit Alkyl-Radikalen unter Bildung von Tocopheryl-Radikalen und unterbrechen so die Weitere entstehung von Radikalen (Blokina et al. 2003), siehe Abbildung 3.

Bei einem Kettenabbruch kommt es zu folgender Umverteilung der Elektronen. Die phenolische Hydroxylgruppe am aromatischen Chromanring des Tocopherols reagiert mit einem organischen Peroxylradikal unter Bildung eines Hydroperoxids (ROOH) und einem stabilen Tocopherol-Radikal (VitE- O •), siehe Reaktion (1). Es existieren 3 wesentliche Oxidationsprodukte von alpha-Tocopherol: das alpha-Tocopherolquinon, das 5,6-epoxy-alpha-tocopherolquinon und das 2,3-epoxy-alpha-Tocopherolquinon, siehe Abbildung 3. Das alpha-Tocopherolhydroquinon ist ein Reduktionsprodukt des alpha-Tocopherolquinons.

Diese Tocopherol-Radikale (VitE- O •) führen zum Kettenabbruch der Lipidperoxidation, (Buttriss und Diplock, 1988; Wang und Quinn 1999).



Das hierbei entstandene Tocopheryl-Radikal (VitE- O•) kann wieder seinerseits mit einem anderen Tocopheryl-Radikal, einem Wasserstoffdonator (AH), wie Ubiquinon (Coenzym Q), siehe Reaktion (2), oder einem Peroxyl-Radikal, zu einem nicht radikalischen Produkt reagieren, (Sies, 1989; Wang und Quinn, 1999).

Eine weitere Möglichkeit ist das sog. Recycling der Tocopheryl-Radikale mithilfe anderer Antioxidantien, wie Ascorbat (Vitamin C), siehe Reaktion (3), unter Bildung von Semidehydroascorbinsäure. Die Tocopheryl-Radikale sind auch in der Lage mit Thiolen, wie Gluthation zu reagieren. Hierbei werden sie ebenfalls reduziert und somit regeneriert, (Abbildung 9).

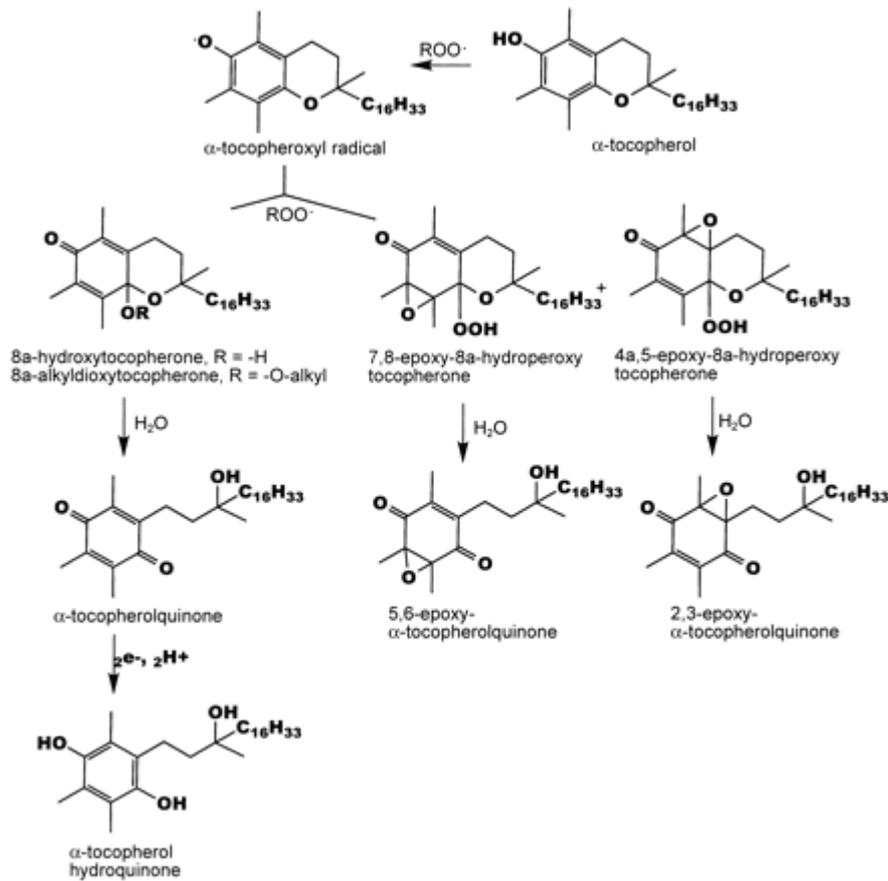
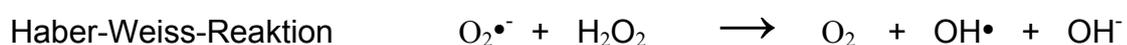
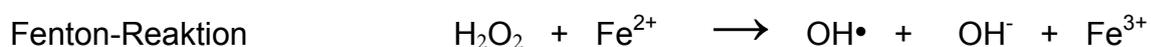
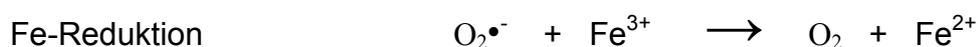


Abbildung 3: Reaktion von α -Tocopherol mit Peroxyl-Radikalen
(nach Liebler et al. 1996)

Den Sauerstoffradikalen kommt aufgrund ihrer hohen Toxizität eine besondere Bedeutung zu. Zu den wichtigsten Sauerstoffradikalen zählen das Superoxid-Radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$), das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxyl-Radikal ($\text{OH}\cdot$).

Reaktive Sauerstoffspezies, wie das Hydroxyl-Radikal ($\text{OH}\cdot$) und das Superoxid-Radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$) entstehen bei einer Reihe von zellulären Vorgängen. Zu diesen zählen verschiedene enzymatische Prozesse, bedingt durch die Enzyme Lipoygenase, Peroxidase, NADPH Oxidase und Xanthin Oxidase, sowie bei der Eisen-katalysierten Fenton Reaktion und der Haber-Weiss-Reaktion, (Blokhina et al. 2003).



2.1.3.2. Sekundär- und Tertiärprodukte der Lipidoxidation

Peroxy-Radikale ($\text{ROO}\bullet$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entstehen als Sekundärprodukte bei der Lipidperoxidation. Diese Sekundärprodukte können auf Membranen diffundieren, oder ins Zytosol freigesetzt werden. Hieraus resultieren die radikalinduzierten Schäden.

Zu den Tertiärprodukten der Lipidperoxidation zählen Malondialdehyd und 4-Hydroxynonenal. Diese beiden Reaktionsprodukte sind stark zytotoxisch und reagieren besonders mit membranständigen Proteinen, wie den Strukturproteinen, Enzymen und Rezeptoren. Die Folge können erhebliche Funktionsverluste sein. Speziell Malondialdehyd wird als Indikator der Auswirkungen der Lipidschädigung heran gezogen. Dies geschieht mittels der Reaktion von Malondialdehyd als Thiobarbitursäure- reaktive Substanzen (TBA-RS).

2.1.4. Die Bioverfügbarkeit

Die Bioverfügbarkeit ist ein Parameter, der die Menge und die Geschwindigkeit beschreibt mit der eine, durch die Nahrung aufgenommene Substanzen bzw. Wirkstoffe vom Organismus resorbiert werden, das Zielorgan, bzw. den Wirkort erreicht und dort zur Verfügung steht. Daher kann die Bioverfügbarkeit auch als Parameter für die Verwertung einer Substanz vom Körper herangezogen werden (Sauberlich 1985).

Das Vitamin E reichert sich in vielen Organen (Fettgewebe, Leber, Muskulatur, Membranen usw.) an. Um aufgenommene Tocopherolmengen zu definieren eignet sich der Gehalt im Serum. Diese resorbierte Menge an Tocopherolen ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Zum einen spielt die chemische Struktur (Anzahl und Verteilung der Methylgruppen) eine Rolle, zum anderen sind aber auch endogene und exogene Faktoren von Bedeutung. Zu diesen Faktoren zählen: der Ernährungszustand der Tiere, die Dosierung, die Art der Verabreichung, die Aufbereitung des Wirkstoffes, der Füllungsgrad des Magens, dem jeweiligen Gewebe und der Fettanteil des Futtermittels, diese können die Absorptionsrate und somit die Bioverfügbarkeit beeinflussen (Iulinano et al. 2001; Lodge et al. 2004; Blatt et al. 2004).

Leonard et al. (2004) untersuchten im Besonderen den Zusammenhang der Resorptionsmenge in Abhängigkeit vom Fettanteil der Ration. Sie stellten fest, dass die Bioverfügbarkeit des Vitamin E von der Zusammensetzung des Nahrungsmittels abhängt. In Futtermitteln mit geringem Fettanteil sinkt die biologische Verfügbarkeit des fettlöslichen Vitamin E.

Im Vergleich mit alpha-Tocopherol besitzt das dl-gamma-Tocopherol eine durchschnittliche Bioverfügbarkeit von 28 Prozent (Schafer und Elmadfa 1984). Dies hängt von der unterschiedlichen biologischen Wirksamkeit ab. Diese ist von der Anzahl und der Verteilung der Methylgruppen am Chromanring abhängig. Die biologischen Wirksamkeit nimmt mit Abnahme der CH₃ Gruppenanzahl ab (α β γ δ). Das häufigste und biologisch aktivste, daher auch das wichtigste Stereoisomer ist das D- α -Tocopherol.

Das zur Zeit von der USP akzeptierte Verhältnis von 1,36:1, von natürlichem zu synthetischem Vitamin E basiert auf dem Fötus-Resorptionstest, Hoppe und Kennrich (2000). Die National Academy of Sciences, Food and Nutrition Board in der USA spricht von einer Biopotenz von 2:1.

Lauridsen et al. (2002) kamen nach Versuchen mit Schweinen zu den Ergebnissen, dass bei dieser Tierart eine Unterscheidung zwischen dem natürlichen RRR- und dem synthetisch hergestellten all-rac-alpha-Tocopherol zu Gunsten des natürlichen Vitamin E statt findet. In seinen Versuchen zeichnete sich 12 Stunden post interventionem ein Maximum im Blutplasma bei Verabreichung des natürlichen Tocopherols und schon nach 9 Stunden bei Gabe des synthetisch hergestellten Tocopherols ab. Das Maximum der Gruppe, die das synthetische Vitamin E erhielt wurde früher erreicht, fiel jedoch nicht so groß aus.

Lauridsen et al. kamen zu dem Verhältnis bei natürlichem zu synthetischem Tocopherol von 2:1 beim Schwein. Dieses Verhältnis liegt hiermit über der von der USP akzeptierten Definition von 1,36:1,0.

Bei Versuchen mit Ferkeln und Muttersauen konnte Lauridsen (2002) ebenfalls dieses Ergebnis untermauern. Die Ferkel von Sauen, die während der Gravidität mit natürlichem Vitamin E versorgt wurden, zeigten 7 Tage post partum einen 10 fach so starken Anstieg der Tocopherolkonzentration, wie bei Ferkeln deren Muttertiere mit synthetischem Vitamin E versorgt wurden. Das Verhältnis von 2:1 von natürlichem zu synthetischem Vitamin E bei Sauen konnte auch auf deren Ferkel übertragen werden.

Weitere Autoren propagieren diese Meinung, dass das Verhältnis von natürlichem zu synthetischem Tocopherol größer als 1,36:1 ist (Acuff et al. 1994; Chopra und Bhagavan 1999; Burton et al. 1998; Hoppe und Kennrich 2000).

2.1.5. Stoffwechsel von Vitamin E bei Mensch und Tier

Resorption und Metabolismus von Vitamin E

Der tierische Organismus ist auf eine kontinuierliche Vitamin E Zufuhr über die Nahrung angewiesen.

Synthetisches und natürliches Vitamin E wird über stereospezifische und sättigungsabhängige Wege im Organismus verteilt und auch ausgeschieden (Blatt et al. 2004).

Die Resorption von Vitamin E ist eng mit der Resorption von Nahrungsfetten verknüpft. Tocopherole werden in gleicher Weise wie Lipide im Dünndarm absorbiert. Das Vitamin E ist während seines gesamten Metabolismus an Lipide gebunden. Dies betrifft die intestinalen Absorption, die Sekretion und den Transport im Plasma, sowie die Aufnahme ins Gewebe (Feki et al. 2001). Während des Transportes im Plasma ist das meiste α -Tocopherol mit Apolipoprotein B enthaltenden Lipoproteinen verbunden. Diese Apolipoproteine B (Apo B 48, 100) dienen einerseits als Strukturkomponenten, andererseits als Liganden für Rezeptoren oder als Aktivatoren für Enzyme, siehe Abbildung 4.

Da Vitamin E zur Gruppe der fettlöslichen Vitamine gehört benötigt es im wässrigen Milieu des Blutplasmas und der Zellen diverse Transportmechanismen, die die Kinetik und die Übertragung in das Zielgewebe und Zellen ermöglichen. Dieser Transport erfolgt durch unspezifische Lipoproteine, wie LDL, HDL und VLDL. In der Leber existieren spezifische Transportmechanismen, wie das α -Tocopherol-Transfer-Protein (α -TTP).

Absorption im Dünndarm:

Bevor die veresterten Tocopherole vom Körper aufgenommen werden, müssen sie im Darmlumen durch Pankreasesterasen und Gallensäuren gespalten werden. Ein Großteil des Tocopherylesters wird vor Aufnahme in die Darmmukosazellen durch Pankreasesterasen hydrolysiert. Einige Ester werden aber auch intraluminal durch Enzyme der Schleimhaut hydrolysiert, andere werden von der Schleimhaut des

Jejunums intakt aufgenommen und erst intrazellulär hydrolysiert. Bei Pankreasinsuffizienz spielt diese Esterase der Jejunummucosa eine wichtige Rolle (Mathias et al. 1981).

Die anschließende Absorption in die Darmepithelzellen und in die Lymphkapillaren ist ein passiver, energieunabhängiger Prozess (Muralidhara und Hollander 1977).

Die Forschungsgruppe von Kiyose (1995) konnten bei der Resorption eine Bevorzugung des all-rac-alpha-Tocopherols nachweisen. Die Bevorzugung einzelner Tocopherolisomere findet jedoch nicht bei der Aufnahme im Dünndarm, sondern erst in der Leber statt. Hier wird preferiert d6- RRR- alpha- Tocopherol in VLDL eingebaut, wobei das α -TBP eine Schlüsselrolle spielt (Burton et al. 1990; Traber et al. 1990; Traber et al. 1994; Kaneko et al. 2000).

Micellenbildung und Aufnahme in die Epithelzellen:

Die Resorption erfolgt über den Einbau in gemischte Micellen (sog. Mischmicellen) gemeinsam mit Cholesterol, Fettsäuren und Monoacylglycerinen. Mischmicellen sind fähig Tocopherole zu binden, da sie den größten Durchmesser besitzen (Cohn et al. 1992). Da alpha- Tocopherol ein polares Molekül ist wird es an die monomolekulare Schicht aus Proteinen, Fetten und Polysacchariden der Micelle angelagert (Traber 1994). Im proximalen Dünndarm werden so Vitamin E, Lipide und deren Hydrolysate in Form von Mizellen per diffusionem durch die Basalmembran in das Zottenepithel aufgenommen.

Bildung und Sekretion von Chylomikronen:

In den Intestinalzellen werden die Triglyceride resynthetisiert, dabei entstehen Lipoproteinpartikel, die sog. Chylomikronen. In den Enterozyten wird Vitamin E in die Chylomikronen eingebaut. Die Chylomikronen werden via Exozytose aus den Enterozyten ausgeschleust. Sie gelangen über den Interzellularraum in die Lymphkapillaren. Hier beinhalten die Chylomikronen noch 99% des α - Tocopherols und gelangen über den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf.

Durch die Lipoproteinlipase (LPL) in den Endothelzellen der Kapillaren und an den Plasmamembranen extrahepatischer Zellen kommt es zu einem partiellen Abbau der Chylomikronen (Burton und Traber 1990). Die Aktivierung der LPL erfolgt durch die Apoprotein C II, welche in den HDL vorkommt. Infolge der Hydrolyse der Chylomikronen werden Teile der Tocopherole ins extrahepatische Gewebe aufgenommen, ein kleiner Teil wird auch auf zirkulierende Lipoproteine, hauptsächlich auf HDL, übertragen. Der größte Teil der Tocopherole gelangt mit den Chylomikronen- Remnants in die Leber.

Chylomikronen, wie auch die anderen Plasmalipoproteine, enthalten gleich hohe Konzentrationen aller drei Tocopherol- Isomere (α -, β -, γ - Tocopherol). Dies deutet darauf hin, dass bis zu diesem Zeitpunkt der Resorption alle drei Tocopherole gleich behandelt und resorbiert werden.

Katabolismus der VLDL:

Die Chylomikronen- Remnants erhalten von den HDL das Apolipoprotein E (Apo E). Die Remnants werden zur Leber transportiert. Dort dient Apo E zur direkten Einschleusung in die Hepatozyten.

In den Hepatozyten existieren spezielle Tocopherol- Bindungs- Proteine (tocopherol-binding-proteins, TBP).

Im Zytoplasma der Leber ist ein 30 kDa α - Tocopherol- Binding-Protein (α - TBP) bekannt, das die Plasma Vitamin E- Konzentration reguliert. Das α - TBP bevorzugt beim Einbau in die wachsenden VLDL das α - Tocopherol.

Das 15 kDa α - TBP hingegen ist für die intrazelluläre Verteilung des α - Tocopherol verantwortlich. Die 30 kDa α - TBP kommen nur in den Hepatozyten vor, die 15 kDa α - TBP kommen in vielen Geweben vor (Duttay- Roy et al. 1993; Huang und Shaw 1994; Dutta- Roy 1999).

Des Weiteren existiert ein 46 kDa α - humanTBP. Es kommt überall im Organismus vor, bevorzugt ist es im Gehirn, der Leber und der Prostata zu finden (Zimmer et al. 2000). Diese Proteine, hTAP (human tocopherol associated protein) und TAP, gehören zur Gruppe der hydrophoben Liganden-Bindungs-Proteine, welchen allen eine CRAL (cis-retinal binding motif) Sequenz gemein ist.

Das 75 kDa Plasma- Phospholipid- Transfer- Protein, welches unter anderem den Austausch von Phospholipiden zwischen den Lipidstrukturen ermöglicht, bindet ebenfalls α - Tocopherol und erleichtert den Austausch von Tocopherolen zwischen HDL und LDL (Kostner et al. 1995).

Das α - Tocopherol-Transfer-Protein und dessen Präferenz gegenüber α - Tocopherol:

Nachdem die Tocopherole die Leber passiert haben und in Form von VLDL sezerniert werden, hat eine Präferenz hinsichtlich d6-RRR-alpha-Tocopherol bei der Inkorporation und anschließender Ausschleußung ins Plasma statt gefunden. Die im Jahre 1990 durchgeführte Studie von Traber et al. zeigte, dass eine Diskriminierung von β -, γ - Tocopherol im Körper statt findet, diese jedoch nicht im Darm, sondern erst in der Leber, bzw. in den Hepatozyten lokalisiert ist (Traber et al. 1990). Stocker und Azzi (2000), Herrera und Barbas (2001) und Maier et al. (2003) erkannten ebenfalls die Präferenz des α - TTP, welches eine spezifische Selektion und Anreicherung des α - Tocopherols zur Folge hat.

Hierfür verantwortlich ist das alpha-TTP (Tocopherol-Transfer-Protein) in der Leber, welches bevorzugt α -Tocopherol, gegenüber den Isomeren γ - und β - Tocopherol, in VLDL einbaut (Brigelius-Flohe und Traber 1999; Meier et al. 2003). Traber et al. stellte im Jahre 2004 die Hypothese auf, dass alpha- TTP den Transport von alpha-Tocopherol zur Plasmamembran der Hepatozyten erleichtert, und somit bevorzugt alpha- Tocopherol in VLDL eingebaut wird.

Meier et al. machten für die selektive Retention von α -Tocopherol ebenfalls das α -TTP verantwortlich. Das TTP besitzen eine CRAL- Domäne (cis-retinal binding motif), die eine hydrophobe Tasche für den Transport lipophiler Moleküle besitzt.

Hiermit begründeten Sie die Selektivität des alpha-TTP gegenüber der natürlichen Form von Vitamin E, dem RRR-alpha-Tocopherol mittels der Van der Waals Kräfte der Lipid- bindenden Tasche.

Kaempf-Rotzoll et al. (2003) identifizierten ebenfalls in den Hepatozyten das alpha-Tocopherol-Transfer Protein (alpha- TTP), als eines der Haupttransportproteine für α -Tocopherol in der Zelle. Das alpha- TTP mediiert die Sekretion von α - Tocopherol ins Plasma mittels eines Golgi-unabhängigen Resorptionsweg. Der Rezeptor Klasse B

Typ I, ein Membran gebundenes Protein, ist fähig Vitamin E in die Zelle zu schleusen. Der ATP-binding cassette transporter A I hingegen kann Vitamin E aus der Zelle ausschleusen.

Zu den gleichen Versuchsergebnissen kamen Bjorneboe et al. im Jahre 1987. Auch sie konnten darlegen, dass der größte Anteil des alpha-Tocopherol in den Hepatozyten vermehrt in VLDL eingebaut wird und in Verbindung mit diesen neu gebildeten VLDL die Leber verlässt.

Obgleich sich gezeigt hat, dass nur das α -Tocopherol-Transfer-Protein die Gewebe- und Plasma- α -Tocopherol Konzentration beeinflusst, binden auch andere Proteine, wie das „tocopherol-associated-protein“ (α -TAP), welches die intrazelluläre Verteilung von Vitamin vermittelt, und das „tocopherol-binding- protein“ (α - TBP) Tocopherole (Stocker et al. 1999). Auch diese Proteine fungieren regulierend und beeinflussen die α -Tocopherol Konzentrationen (Blatt et al. 2001). Innerhalb der Zelle wird Vitamin E mittels Bindungsprotein (α -TBP) transportiert und in Membranen verschiedener Zellorganellen (Mitochondrien, Lysosomen und Retikulum) eingebaut.

Abbau der VLDL und Freisetzung von Tocopherol ins Gewebe:

Neben dem Mechanismus der LPL, die die Freisetzung des α - Tocopherol ins Gewebe ermöglicht, gibt es noch α - Tocopherol korrespondierende Rezeptoren in unterschiedlichen Geweben, die ebenfalls eine Absorption ermöglichen, hierdurch entstehen rezeptorabhängige und rezeptorunabhängiger Wege. Die Apolipoprotein B/E (Apo B/E) Rezeptoren, und deren hohe Affinität zu α - Tocopherol sind nicht notwendig für die Aufnahme von α - Tocopherol ins Gewebe. Das α - Tocopherol kann vom Gewebe in Kombination mit LDL, aber auch ohne aufgenommen werden (Cohn et al 1992). Hieraus schlussfolgerten Cohn et al., dass Vitamin E rezeptorabhängig, aber auch rezeptorunabhängig im Gewebe aufgenommen werden kann.

Mittels der Lipoproteinlipase können VLDL nach der Exkretion aus der Leber in IDL und LDL übergehen.

Der Abbau der VLDL im extrahepatischen Gewebe geschieht durch LPL und findet bevorzugt im Fett- und Muskelgewebe statt. Der Abbau vollzieht sich über IDL

(intermediate density lipoproteins) zu LDL. Viele Zellen im extrahepatischen Gewebe verfügen über Rezeptoren, die mit Hilfe ihres Apolipoprotein B (Apo B) zirkulierendes LDL binden und in die Zelle schleusen können, wie in Abbildung 4 dargestellt.

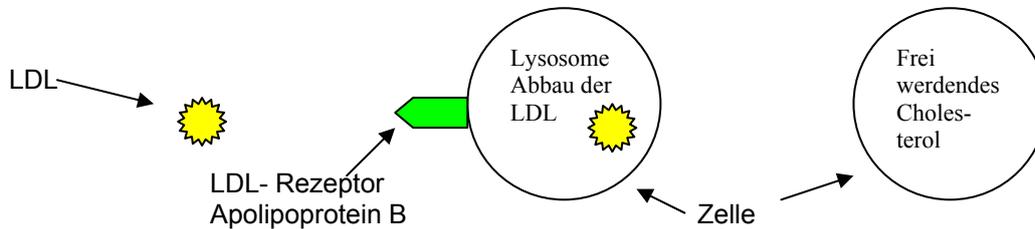


Abbildung 4 : Aufnahme des LDL in die Zielzelle (nach Herras und Barbas 2001)

In der Zelle erfolgt ein Abbau der LDL durch lysosomale Enzyme. Bei diesem Vorgang kommt es zu Freisetzung von Cholesterin (Herrera und Barbas 2001). Das frei gesetzte Cholesterin dient zur Versorgung der Zelle und wirkt zusätzlich als Repressor der β -Hydroxy- β -methylglutaryl-Reduktase und hemmt damit die Cholesterin-Synthese.

Ausscheidung von Tocopherol- Metaboliten:

Die fäkale Elimination ist der Hauptausscheidungsweg für α - Tocopherol, dies kann bis zu 75% der aufgenommenen Dosis betragen. Nur sehr geringe Dosen werden in der Niere verstoffwechselt und über den Urin ausgeschieden. In der Niere findet der Abbau von Chinon zu α - Tocopheronsäure und α - Tocopheronolacton statt, (Brigelius-Flohe R. und Traber MG. 1999).

In einer Studie von Kaneko et al. (2000) konnte ermittelt werden, dass 96 Stunden nach Verabreichung von natürlichem Vitamin E ungefähr 1,3% über den Urin ausgeschieden werden. Bei Verabreichung von synthetisch hergestelltem Vitamin E wird hingegen 7,8% über den Urin ausgeschieden.

Im Kot kam es zu einem ähnlichen Verhältnis. Hier wurden 83% des natürlichen Vitamin E und 87,6% des synthetisch hergestellten Tocopherols über den Kot ausgeschieden. Diese Ergebnisse ergeben sich aus der Diskriminierung des

synthetischen Vitamin E in der Leber und der hierdurch bedingten schnelleren Metabolisierung und Ausscheidung.

Durch Oxidation des α -Tocopherol entsteht das Hauptoxidationsprodukt, α -Tocopherylquinon (Stocker 2004), siehe Abbildung 5. Da dieses als Antioxidans gewirkt hat, liegt die Ringstruktur des Chromanrings in offener Form vor. Durch Reduktion der Tocopherylquinone wiederum entsteht das Tocopherylhydrochinon, welches nach Konjugation mit Glucuronsäure über das Gallensekret abgegeben und über den Kot ausgeschieden werden kann (Schultz et al. 1995; Herrera und Barbas 2001).

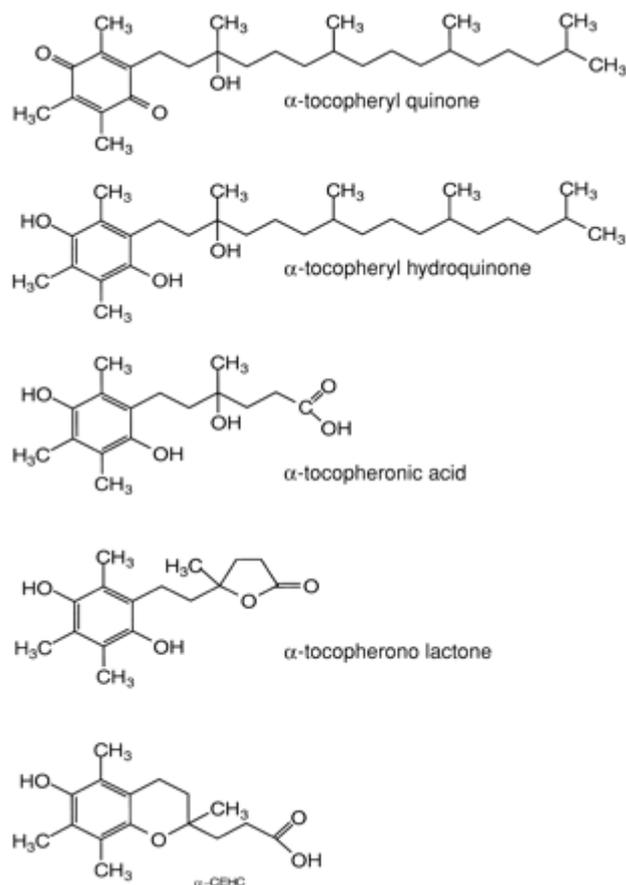


Abbildung 5: Oxidationsprodukte des α -Tocopherols (nach Brigelius-Flohe und Traber 1999)

Andererseits kann sich bei Überschreitung einer bestimmten Plasmaspiegelkonzentration das überschüssige α -Tocopherol in 2,5,7,8-Tetramethyl-2-(2'-Carboxyethyl)-6-Hydroxychroman, sog. alpha-CEHC umwandeln

und mit dem Urin ausgeschleust werden, siehe Abbildung 6. Gleiches geschieht mit den γ - und β - Tocopherolen, auch diese werden in ihre zugehörigen γ - und β - Tocopherol- Metabolite umgewandelt und ebenfalls mit dem Urin ausgeschieden (Brigelius-Flohe und Traber 1999; Herrera und Barbas 2001). Alpha- CEHC und gamma- CEHC entstehen durch einen Cytochrome p450 vermittelten Vorgang und können somit über die Galle ausgeschieden werden (Kaempf-Rotzoll et al. 2003). Es lassen sich jedoch kaum CEHCs im Urin nachweisen, falls die Tocopherolschwelle im Plasma nicht überschritten wird (Swanson et al. 1999). Nach exzessiver Supplementierung lassen sich α - CEHCs, welche direkt aus α -Tocopherol gebildet werden und daher einen geschlossenen Chromanring besitzen, im Urin nachweisen (Schultz et al. 1995). Daher wird von Schultz et al. angenommen, dass die α - CEHC- Ausscheidung den Sättigungsgrad, bzw. die Bindungskapazität im Plasma mit Vitamin E anzeigt. Aus diesem Grund postulieren Sie, dass die α - CEHC im Urin als Indikator für eine optimale Vitamin E Versorgung herangezogen werden könnte.

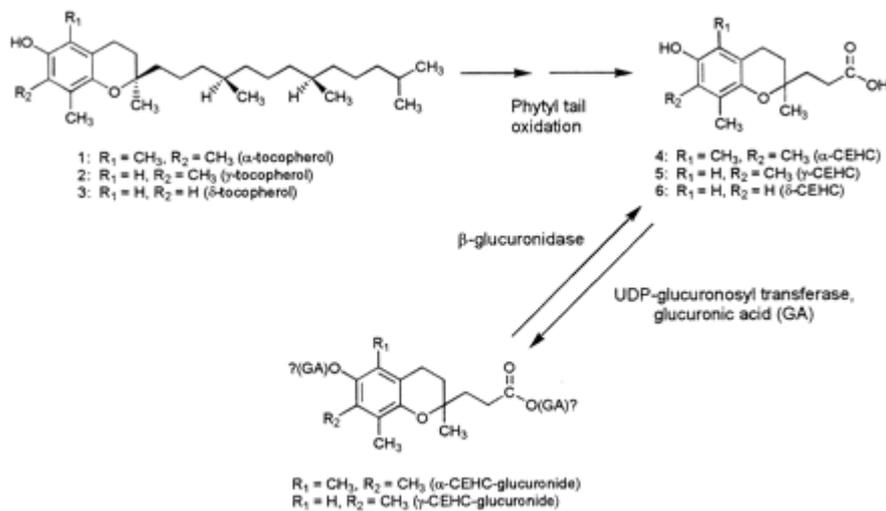


Abbildung 6: Schema des Tocopherol- Metabolismus und der zugehörigen CEHC- Formen (nach Swanson et al. 1999)

Das Plasma ist hauptsächlich mit d3-RRR- α -Tocopherol, dem natürlichen Tocopherol, angereichert, während sich im Urin vor allem α -CEHC, als Metabolit des d6-all rac- α -Tocopherol, dem synthetisch hergestellten Tocopherol wiederfinden

lässt. Dies zeigt, dass im Vergleich von synthetischem und natürlichem Tocopherol bevorzugt das synthetische Tocopherol zu α -CEHCs metabolisiert und ausgeschieden wird (Traber et al. 1998; Brigelius-Flohe und Traber 1999).

Eine weitere Möglichkeit der Elimination ist der oxidative Seitenkettenabbau der Tocopherole ohne vorherige Öffnung der Chromanringstruktur. Die geschlossene Form des Chromanringes deutet darauf hin, dass das Tocopherol vorher nicht als Antioxidans gewirkt hat (Schultz et al. 1995; Schuelke et al. 2000). Die Abbildung 7 zeigt die Oxidation der Seitenkette an Hand des Beispiels α -Tocopherol.

Gamma- Tocopherol wird zu 2,7,8-Trimethyl-2-(beta-Carboxyethyl)-6-Hydrochroman metabolisiert. Für γ - Tocopherol und δ - Tocopherol ist dies der wichtigste Ausscheidungsweg.

Der Metabolismus des α - Tocopherol findet nur in geringem Maße über den Abbau der Seitenkette statt, ähnliches gilt auch für β - Tocopherol (Schuelke et al. 2000).

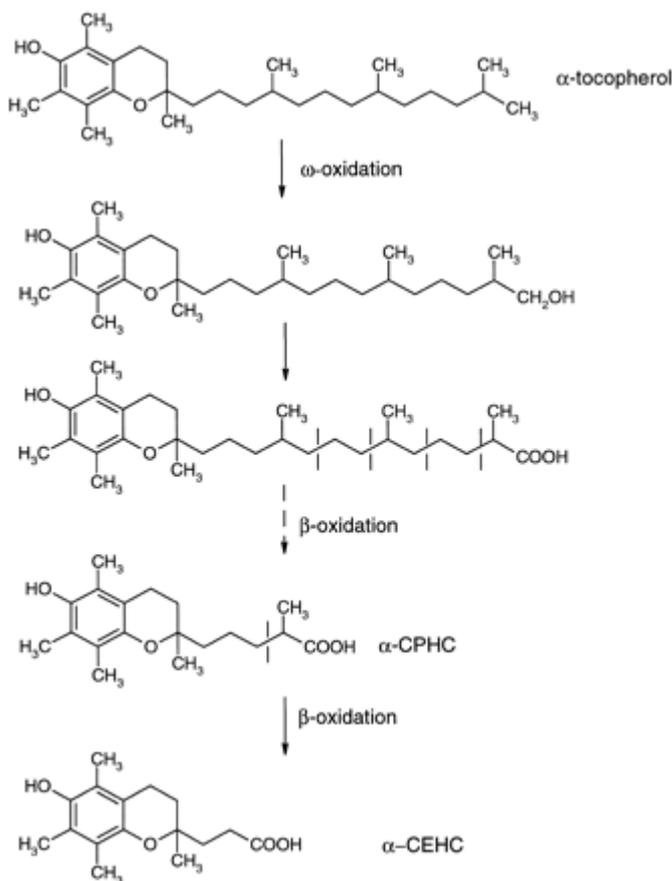


Abbildung 7: Degradation des α - Tocopherols (nach Schuelke et al. 2000)

Verteilungsmuster im Tierkörper

In nicht depletierten, adäquat mit Vitamin E ernährten Ratten ist 51% des, sich im Serum befindlichen α -Tocopherols in Chylomikronen und VLDL verpackt, weitere 47% in HDL. Drevon (1991) ermittelte eine Bindungsrate des α -Tocopherol von fast 50% an HDL. Im Plasma ist α -Tocopherol in allen Lipoproteinfraktionen zu finden, jedoch meistens in Lipoproteinen mit Apo B.

Ungefähr 90% des gesamten Vitamin E ist bei der Ratte in der Leber, der Skelettmuskulatur und im Fettgewebe wiederzufinden. In den Parenchymzellen der Leber sind 6-fach höhere Tocopherol-Konzentrationen wie in Nicht- Parenchymzellen zu messen (Bjorneboe et al. 1990).

Die Absorptionsrate und deren beeinflussende Faktoren:

Die Höhe der Absorptionsrate ist unter anderem abhängig von den im Futtermittel enthaltenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Gallo-Torres 1978). Eine Steigerung der Absorptionsrate kann durch eine erhöhte Zufuhr von mittelkettigen Triglyceriden erzielt werden.

Durch Zufuhr von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, (PUFA) erzielt man eine Hemmung der Resorptionsrate des Vitamin E. Eine Erklärung für die Schwankungen ist das Größenwachstum der Micellen durch die PUFAs und die hierdurch bedingte langsamere Resorption in die Mukosazellen.

Auch die Fettzulage im Futter spielt eine Rolle. Füttert man heranwachsenden Ferkeln ein Vitamin E angereichertes Futter mit Fettzulage kann man den α -Tocopherolspiegel im Serum der Tiere erhöhen. Der α -Tocopherol- Gehalt in der Leber und dem Fettgewebe waren bei Fettzulage ebenfalls höher. In der Aufzuchtphase reichte eine Vitamin E Supplementierung von 40-60 IU/ kg, wenn das Grundfutter mit Fett angereichert wurde um eine konstante Vitamin E-Konzentration in dieser Phase zu erhalten. Ohne Fettzulage war eine Dosis von 80-100 IU/kg VE notwendig, um die gleiche Vitamin E- Konzentration zu erreichen (Moreira und Mahan 2002).

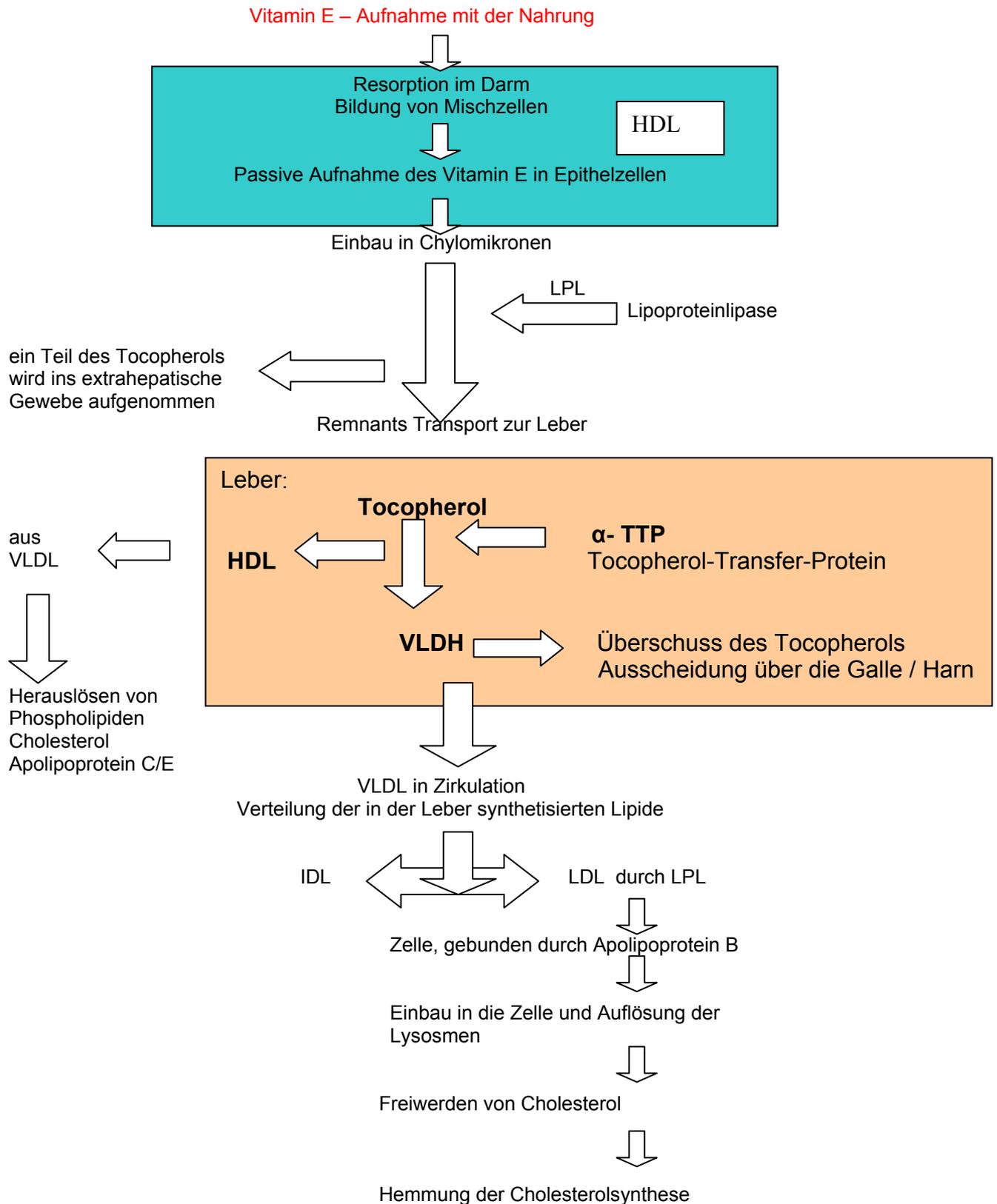


Abbildung 8: Stoffwechsel von Vitamin E (nach Herras und Barbas 2001)

2.2. Alimentäre Einflussfaktoren beim Tier

2.2.1. Vitamin E Bedeutung für den Organismus

Die optimale Versorgung mit Vitaminen ist vor allem in der heutigen exzessiven Tierhaltung von großer Bedeutung. Zu Beginn der Nutztierhaltung galt es Vitamin-Mangelsituationen durch marginale Supplementation zu beheben und zu verhindern. Dieser Zustand hat sich im Laufe der Zeit modifiziert. Anforderungen an die Tiergesundheit, an hochwertige Fleischqualität und die Leistungsfähigkeit der Tiere sind gestiegen und müssen durch die Ernährung ausgeglichen werden. Die hieraus profitablen wirtschaftlichen Aspekte sind in den Vordergrund getreten und von größter Bedeutung.

Um eine maximal Resorption der zu erzielen, müssen verschiedene Faktoren, wie Tierart, Nutzungsweise, Stressbelastung der Tiere (Aufzucht- Mast-Transport), gewünschte Qualität des Endproduktes und natürlich das Futter und dessen Zusammensetzung beachtet und berücksichtigt werden. Nur unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte ist eine höchstmögliche Effizienz für Tier und Landwirt zu erzielen.

Speziell bei Vitamin E spielt die Applikationsform, Wirkstoffformulierung, die Vergesellschaftung mit einem Vitaminantagonisten, wie Vitamin A, oder einem Synergisten, wie Vitamin C und Selen, sowie die Bioverfügbarkeit die Lagerungstechnik, Lagerungsbedingungen und Lagerungsdauer eine entscheidende Rolle in der Menge des zuzuführenden Vitamins und dessen Resorption.

Grundsätzlich muss man bei der Verabreichung von Vitamin E, bzw. generell bei der Vitamin- Zufuhr, die Wirkungsweise und den Nutzen für Tier und Tierhalter berücksichtigen und ausschöpfen. Hierbei lassen sich 3 Bedarfgrößen definieren: der Minimalbedarf, der Optimalbedarf und die Dosis in der sich spezielle Zusatzeffekte. Sie unterscheiden sich von der verabreichten Dosis im Futter.

- Die Menge der verabreichten Vitamine darf den Minimalbedarf nicht unterschreiten. In geringerer Dosis kann es sonst zu Mangelsymptomen, wie z. Bsp. Muskeldystrophien kommen. Eine Vitaminversorgung im Bereich des Minimalbedarfes hält den heutigen Anforderungen in der Massentierhaltung und Nutzung der Tiere hinsichtlich des schnellen Wachstums, guter Fleischqualität in möglichst kurzer Zeit nicht mehr stand.

- Der Optimalbedarf sichert nicht nur die marginale Vitamin- Versorgung und schützt somit vor dem Auftreten von Mangelsituationen, sondern schöpft das Tierpotential hinsichtlich Leistung, Gesundheit und Widerstandskraft der Tiere effektiver aus.

- Unter Zusatzeffekte versteht man den Einfluss auf die Fruchtbarkeit und die Qualität des Tierproduktes und dessen höchstmögliche Effizienz und Ausbeute, die sich durch höchstmögliche Vitamingabe heraus kristallisieren.

Aus verbrauchertechnischer Sicht sind, nach europäischem Futtermittelrecht nur, Höchstgehalte für die fettlöslichen Vitamine A und D festgelegt. Für das fettlösliche Vitamin E existieren Dosierungsvorschläge der AWT (Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe in der Tierernährung), siehe Tabelle 1.

Tabelle 1: Dosierungsempfehlung für Vitamin E nach der AWT beim Schwein

Futter der jeweiligen Mastperiode	Vitamin E Einheit	Dosierung pro kg Futter	Höhere Dosis pro kg Futter	Zusatzeffekte
Ferkel Prästarter	mg	80-120	200-250	Verbesserung der Immunität
Ferkel Aufzucht	mg	70-100	-	-
Vormast	mg	10-12 000	-	-
Endmast	mg	40-60	150-200	Verbesserung der Fleischqualität
Zuchttiere	mg	60-80	-	-

2.2.2. Hypervitaminose E

Eine Überdosierung mit Vitamin E tritt selten auf, da es auch noch in hoher Dosis, auf Grund der großen pharmakologischen Breite untoxisch ist. Bei erhöhter Zufuhr erhöht sich auch die Ausscheidungsrate. Versuche zur Überversorgung wurden unter anderem an Ratten, Hamstern, Hühnern und am Menschen (Corrigan 1979; Corrigan 1982; Sunder et al. 1999; Nockels et al. 1976; Frank et al. 1997) durchgeführt.

Bei Ratten sind Störungen der Fruchtbarkeit, Reduktion des Körpergewichtes, auch einzelner Organe, vor allem der Niere und dem Herz und eine verlängerte Prothrombinzeit die Folgen eines Vitamin E Exzesses (Yang et al. 1977).

Eine verlängerte Prothrombinzeit kann auch beim Menschen beobachtet werden. Dies tritt vor allem bei gleichzeitiger Gabe von Antikoagulantien auf.

Bei Hühnern äußert sich die Gabe von großen Mengen Vitamin E in der Entstehung einer Hepathomegalie, verminderte Hautpigmentierung, Reduktion des Körpergewichtes und dem Ausgehen der Federn. Sunder et al. (1995) verabreichte Legehennen Vitamin E in Konzentrationen 100, 1000, 10 000 und 20 000 mg Vitamin E/kg Futter über eine Zeitspanne von 20 Wochen. In den Konzentrationen bis 10 000 mg Vitamin E/kg Futter beeinflussten die hohen Konzentrationen weder die Gesundheit noch den Habitus negativ. Diese Konzentrationen ließen die Stabilität des Abdominalfettes gegenüber Oxidation deutlich sinken, ebenfalls sank auch der Vitamin A Gehalt der Leber sichtbar. Erst bei Konzentrationen von 10 000 und 20000mg Vitamin E/kg Futter äußerte sich die Überdosierung in einer geringeren Schlupfrate und in nicht überlebenden Küken.

Ebenfalls pathologische Veränderungen registrierten Nockels et al. (1976) in Versuchen mit Hühnern. In diesen Studien wurden Dosen in Höhe von 4,000 IU dl-alpha-tocopheryl acetat /kg an die Versuchstiere verfüttert. Äußerliche Anzeichen waren Pigmentverluste an Schnabel, Füßen und Unterschenkeln. Das Lebergewicht stieg prozentual zum Körpergewicht signifikant an, die Tiere entwickelten eine Hepatomegalie. Ab einem Zusatz von 8,000 IU Vitamin E/kg sank

das Körpergewicht, die Federn der Tiere hatten wachsartiges Aussehen und stellenweise kam es zum Federverlust.

2.2.2.1. Vitamin E- Exzess in Kombination mit Vitamin K- Mangel

Frank untersuchte im Jahre 1997 die Auswirkungen eines Vitamin E Exzesses, sowie die Wechselwirkungen von Vitamin E mit Vitamin K in unterschiedlicher Dosierung bei Hühnern.

Er stellte fest, dass eine Dosierung von 4000 mg all-rac-alpha-tocopheryl acetat/kg bei einer adäquaten Vitamin K Versorgung (0.14 mg Phylloquinone/ kg) zu einer um das 3-fache verlängerte Prothrombinzeit führt. Die Sterblichkeitsrate war durch die Blutungsneigung erheblich erhöht. Der hemmende Effekt von hohen Dosen Vitamin E auf die Vorstufen der Gerinnungsfaktoren kann durch eine erhöhte Zufuhr von Phylloquinon (Vitamin K) vermieden werden.

In Tieren, die adäquat mit Vitamin K versorgt sind, lässt sich dieses Phänomen nicht beobachten. Zu Störungen in der Gerinnungskaskade kommt es erst durch längere, hoch dosierte Gaben von Vitamin E, in Kombination mit einer mittel bis hochgradigen Unterversorgung an Vitamin K, dies ist beim Tier, aber auch beim Menschen zu beobachten.

In ausschließlich Vitamin E überdosierten Probanden ließen sich keine Koagulopathien hervorrufen (Corrigan 1979). Bei Erzeugung eines mittelgradigen Vitamin K-Defizits, induziert durch Warfarin, entstand schon eine schwerwiegende Gerinnungsstörung. Diese Koagulopathie ist durch eine Reduktion der Vitamin K abhängigen Gerinnungsfaktoren induziert.

Corrigan geht im Jahre 1982 noch einmal auf diesen Sachverhalt ein. Die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X werden als Vorläuferformen in der Leber gebildet. Die Umformung dieser Vorstufen erfolgt mittels einer Vitamin K-abhängigen Reaktion. Durch die mangelnde Synthese der Gerinnungsfaktoren kann es zur Störung der Hämostase kommen. Eine physiologische Blutstillung ist nicht mehr möglich, die betroffenen Tiere neigen zu Hämorrhagien, infolge deren die Tiere auch verenden können. Anhand der Versuche von Corrigan ließ sich ermitteln, dass Vitamin E auf die Vitamin K- Carboxylase, auf Höhe der Vorstufe

des Prothrombins in die Kaskade eingreift, und nicht direkt in die Synthese der Vorläuferproteine.

2.2.2.2. Auswirkungen eine Hypervitaminose E auf die Fruchtbarkeit

Bei Versuchen mit Hamstern konnte eine Störung der Hoden, Reduktion der Spermien (Czyba, 1966) und beim weiblichen Tier Reduktion der Wurfgröße nachgewiesen werden (Yang, 1977).

In einer Studie von Martin und Hurley (1977) ließen sich erst bei einer Überdosierung von 500 mg Vitamin E pro Tag, bzw. 2252 mg Vitamin E/kg/Tag Missbildungen an den Augen von Rattenwelpen erkennen. Ansonsten hatte die hohe Vitamin E Supplementation in diesem Versuch keine offensichtlichen teratogenen Auswirkungen.

Andererseits konnte Yang (1977) im gleichen Jahr sehr wohl Folgeschäden in der Reproduktion bei Ratten nach einer chronischen Überdosierung feststellen. Supplementiert wurden die Tiere mit 10.000 IU Vitamin E/ kg über einen Zeitraum von 3 Monaten. Infolge des Vitamin E Exzesses kam es zu Fruchtbarkeitsstörungen. Eine Reduktion der Wurfgröße konnte ebenfalls nachgewiesen werden.

Um möglichst effizient zu züchten und eine hohe Zahl an Nachkommen zu gewährleisten, sollte dieser Aspekt berücksichtigt werden. Weder ein Vitamin E Exzess, noch ein Mangel des Vitamins äußern sich günstig auf die Fruchtbarkeit, die Ergiebigkeit in der Anzahl der Nachkommen und auf die Ökonomie.

2.2.2.3. Auswirkungen einer Hypervitaminose E auf das Immunsystem

Vitamin E hat je nach Dosierung Auswirkungen auf das Immunsystem.

Tocopherole haben bei bedarfsgerechter Zufuhr einen positiven Effekt auf einige Parameter des Immunsystems beim Schwein. Die optimale Vitamin E Dosis lässt sich nicht ohne Berücksichtigung verschiedener Faktoren ermitteln. Zu diesen Faktoren zählen die Futterzusammensetzung, die Wachstumsrate der Tiere, die

Lebensbedingungen und der Stress, dem die Tiere in der jeweiligen Aufzuchtphase ausgesetzt.

Durch eine Vitamin E defizitäre Ernährung zeigen die meisten immunologischen Parameter eine Reduktion in ihrer Anzahl und Funktion. Dies bedingt ein Anstieg der Infektionsanfälligkeit und erhöhtes Risiko für Tumorerkrankungen.

Vitamin E ist ebenfalls an der Reifung, Spezialisierung und der Proliferation von T-Lymphozyten im Thymus beteiligt. Durch eine Erhöhung der Vitamin E Dosis, über den Optimalbedarf hinaus, kann die Proliferation der T-Lymphozyten gesteigert werden. Durch adäquate Vitamin E Versorgung kommt es zur Differenzierung unreifer T-Zellen in der Thymusdrüse. Infolge eines Vitamin E Defizits kann es unter anderem zu einer verminderten Ausreifung der Thymozyten kommen (Moriguchi und Muraga 2000).

Des Weiteren haben Tocopherole einen Einfluss auf Makrophagen. Hier unterstützen sie die Phagozytoseleistung und die Migrationsrate.

Brisson und Schultz untersuchten 1991 in einer Studie den Einfluß einer Vitamin E- und Selen- armen Diät auf das Immunsystem bei Schweinen. Als Parameter wurden die Lymphozytenproliferation, die Aktivität der Natürlichen Killerzellen, und die antikörperabhängige zellmedierte Cytotoxizität herangezogen. Nach einer Versuchsdauer von 25 Tagen, zeigten sich eine Hemmung der Lymphozytenproliferation bei Einwirkung der Mitogene und eine Abnahme von Antikörpern. Die defizitären Tiere bildeten im Serum einen Faktor aus, der die stimulierende Proliferation von Lymphozyten hemmt. Es kommt zum Anstieg der Granulozyten. Die Phagozytose Aktivität der neutrophilen Granulozyten ist auf grund der gesteigerten Lipid- Peroxyradikalbildung jedoch herabgesetzt.

Die Antikörperbildung gegenüber Noxen kann beim Ferkel, im Gegensatz zu defizitär gefütterten Ferkeln, durch eine optimale Vitamin E-Versorgung gesteigert werden (Hidiroglou et al. 1995). Ferkel, deren Muttertier während der Trächtigkeit optimal mit Vitamin E und Selen versorgt wurden, zeigten einen hohen Immunglobulinspiegel (Mavromatis et al. 1999).

2.2.3. Hypovitaminose E

Ein Vitaminmangel manifestiert sich durch eine deutliche Unterschreitung des Normalbereiches. Abhängig von der Tierspezies und dem Alter treten Minderleistung, Mangelsymptome und spezifische Ausfallerscheinungen auf, die die Tiergesundheit beeinträchtigen. Ein Vitaminmangel kann in unterschiedlichen Organsystemen zum Ausdruck kommen, abhängig davon variieren auch die damit verbundenen Symptome.

Ein isolierter Vitamin E- Mangel lässt sich nicht immer eindeutig diagnostizieren. In einigen Fällen tritt eine Kombination von Vitamin E- und Selen- Mangel auf. Vitamin E und Selen agieren synergistisch und sind im geringen Maße fähig sich, bei Mangel einer der Komponenten, gegenseitig zu kompensieren. Bei einer Minderversorgung der beiden Substanzen potenziert sich das Defizit. Eine Linderung des Krankheitsgeschehens kann durch die alleinige Gabe von Selen erreicht werden, eine vollständige Genesung, also ein Ersetzen des Vitamin E durch Selen ist nicht möglich. Zu diesen Krankheiten zählen die nutritive Muskeldystrophie und die Mulberry heart disease (MHD, Maulbeerherzkrankheit) der Schweine, die Exsudative Diathese des Geflügels und die Lebernekrose und die damit verbundene Verfärbung des Fetts bei der Ratte und beim Schwein.

Ausschließlich auf einen Vitamin E- Mangel sind folgenden Krankheiten zurückzuführen: das Absterben und die Resorption von Fetten zu Beginn der Gravidität (Resorptionssterilität), NMD (jedoch kann Selen den Schweregrad der Mangelerkrankung mildern), Kreatinurie bei Ratte und Meerschweinchen, die Nierendegeneration bei Ratte und Schwein, die Encephalomalazie der Hühner und Anämie bei Ratte, Schwein und Affe.

Eine unzureichende Vitamin E- Zufuhr in der Schweinehaltung kann auf die verschiedensten Ursachen zurückgeführt werden.

Früher traten Mangelsituationen gehäuft in den letzten Wintermonaten und zum Frühjahrsbeginn auf, dies deutete meist auf eine unsachgemäße Lagerung des Futtermittels hin. Heute liegen die Ursachen eher in der Futtermittelzusammensetzung, wie zum Beispiel ein zu hoher Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren und der Missachtung eines gesteigerten Bedarfes, wie in der Trächtigkeit und in verschiedenen Leistungs- und Mastphasen.

Bei den Mangelerkrankungen sind folgende zu nennen:

- Fruchtbarkeitsstörungen
- Ferkelsterben nach Eiseninjektion infolge Vitamin E Armut
- Myopathien, Bananenkrankheit, diätische Mikroangiopathie
- Weißmuskelkrankheit
- Hepatitis diätetica
- Verfärbung des Fettes (yellow fat disease)
- Einfluss auf das Immunsystem
- Einfluss auf das ZNS
- Dystrophien des Pigmentepithels der Retina
- Einfluss auf den Alterungsprozess
- Hautveränderungen

Vitamin E Mangelerkrankungen treten heutzutage nur noch selten auf. Die Futtermittel werden computergesteuert angemischt, so dass Fehlmischungen so gut wie ausgeschlossen sind. Die Futtermengen, Zusatzstoffe und Inhaltsstoffe sind den Leistungsphasen der Tiere angepasst und entsprechend deklariert.

2.2.3.1. Vitamin E- Mangel beim Ferkel

Beim Ferkel besteht die Gefahr, dass sie schon mit einem Vitamin E-Defizit geboren werden. Meist ist ein ganzer Wurf von dem Vitamin E-Mangel betroffen. Häufig sind es Ferkel, deren Muttertiere während der Gravidität an einer Unterversorgung mit Vitamin E gelitten haben. Diese Sauen müssen jedoch selbst keine erkennbaren Symptome zeigen (Tollerz und Lannek 1964). Die Jungtiere entwickeln innerhalb der ersten Wochen eine massive Muskeldystrophie, die mit Bewegungsunlust beginnt und bis hin zu Paresen führen kann. Dieses Phänomen trat früher meist in den letzten Wintermonaten oder zu Beginn des Frühjahrs auf, ist heute aber eher selten geworden.

Um eine Eisenmangelanämie vorzubeugen, werden Ferkel routinemäßig mit Eisen-Dextran versorgt. Hierbei kann es bei Vitamin E-verarmten Ferkeln zu Komplikation, im schlimmsten Fall zum Tod des Tieres kommen.

Die ersten Anzeichen können eine entzündlichen Schwellung an der Injektionsstelle sein. Das Ausmaß dieser Entzündungsreaktion ist abhängig von der Qualität des verabreichten Eisen-Produktes, vom Alter des Ferkels und dessen α -Tocopherol Spiegels, bzw. vom Vitamin E Gehalt der Zellmembranen und von der Menge der freigesetzten Fe-Ionen.

Schon nach wenigen Stunden zeigen die betroffenen Tiere Bewegungsunlust, Apathie und Muskelspasmen. Die Tiere können nach einiger Zeit nicht mehr stehen und bleiben je nach Schweregrad in unphysiologischer Stellung liegen.

Im Bereich der Injektionsstelle kann es zur Schwellung, Entzündungsreaktion mit Ödembildung, zu Einblutung in die Muskulatur, bis hin zu Degeneration einzelner Muskelfasern kommen. Dies kann so weit gehen, dass es zu einer Verminderung der Herzleistung kommen kann (Ueberschar, 1966).

Tollerz (1973) führte dieses Herzversagen auf ein Hyperkaliämie zurück, hervorgerufen durch übermäßiges Freisetzen von K-Ionen aus der geschädigten Muskulatur. Diese Anflutung von K-Ionen beeinträchtigt den Herzmuskel. Durch die unzureichende Vitamin E Versorgung des Ferkels kommt es zur Ausbildung von Lipid-Peroxid-Verbindungen in der Oberschenkelmuskulatur an der Injektionsstelle. Je größer die Bildung der Lipid-Peroxid-Verbindungen, umso größer ist der Kaliumgehalt im Blut und umso größer die Gefahr einer Schädigung des Herzmuskels (Tollerz 1973).

Um Komplikationen mit Todesfällen zu vermeiden, schlagen Kolb und Hoffmann (1989) vor, den Ferkeln erst am 3. Lebenstag eine i.m. Injektion mit Eisen-Dextran zu verabreichen. Zu diesem Zeitpunkt haben die Tiere ihren α -Tocopherol Plasmaspiegel über die Aufnahme von Kolostrum heben können.

Eine andere Vorgehensweise wäre eine orale Applikation von 150 mg Eisen bis 8 Stunden nach der Geburt zu verabreichen. Dies hätte den Vorteil, dass es zu einer zeitweisen Speicherung des Eisenpräparates in der Darmschleimhaut und den Lymphknoten kommt, welches von dort langsam abgegeben werden kann. Die gleiche Dosis sollte am 10. Tag nach der Geburt nochmals verabreicht werden. Dies kann nun mittels Injektion in die Oberschenkelmuskulatur erfolgen.

Neuere Studien propagieren eine Eisengabe innerhalb der ersten 6 Lebensstunden um einer Eisenmangelanämie entgegen zu wirken. Die erste Dosis sollte auch hier oral erfolgen.

Iben konnte bestätigen, dass prozentual gesehen eine Anämie deutlich weniger häufig vorkommt, wenn Eisen oral anstatt i.m. gegeben wird. Auch er weist auf eine 2. Verabreichung hin, diese kann ebenfalls mittels Injektion in die Muskulatur erfolgen (Iben 1998).

2.2.3.2. Beeinflussung der Fruchtbarkeit bei Muttersauen

Eine ausreichende Vitamin E-Versorgung der Muttertiere ist ausschlaggebend hinsichtlich der Fruchtbarkeit, Wurfgröße, Geburtsgewicht und α -Tocopherol- Werten im Blutplasma der Ferkel. Nicht nur die Ferkel haben von Geburt an eine bessere Ausgangssituation, hinsichtlich des Immunstatus, sondern auch die Muttersauen profitieren von einer adäquaten Vitamin E und Selen Versorgung (Mavromatis et al. 1999).

Bei säugenden Sauen kann das Risiko des Mastitis-Metritis-Agalaktiae (MMA)-Komplexes gesenkt werden (Trapp et al.1970; Mahan 1994).

Mahan verfütterte tragenden Sauen ein Futter, das mit unterschiedlichen Vitamin E-Konzentrationen (22, 44 und 66 IU α -Tocopherol / kg) angereichert war. Durch Erhöhung der verabreichten Vitamin E Dosis im Futter sanken die Anzeichen eines MMA-Komplexes. Diese Wechselwirkung zwischen Vitamin E Menge im Futter und Auftreten eines MMA- Komplexes ist auch umkehrbar. Mit sinkendem Vitamin E Level steigt die Anzahl der MMA Erkrankungen.

Smith et al. (1997) hatte die gleichen Erfolge wie Mahan mit einer Vitamin E- Zulage im Futter konnte das Risiko von Eutererkrankungen gesenkt werden. Sie untersuchten den Einfluss von Vitamin E und Selen bei Kühen. Das Résumé dieser Studie war, dass zusätzliches Vitamin E und Selen das Auftreten von IMI (intramammary infektions) bei Kühen zwei Wochen vor und nach der Geburt, sowie klinische Mastitiden deutlich reduzieren kann. Durch geringere Keimbelastung des Euters konnte auch die Milchqualität verbessert werden. Es ist fraglich, ob ein direkter Vergleich zwischen Schwein und Rind möglich ist, jedoch liegen dem Krankheitsbild der MMA ähnliche Ursachen wie der IMI zu Grunde.

Evans und Bishop entdeckten im Jahre 1922 bei Fütterungsversuchen, in denen Ratten Vitamin E depletiert wurden, dass die normale Reproduktionsfähigkeit gestört ist. Evans gab diesem Faktor X den Namen TOCOPHEROL (tocos = Geburt), um die Wirkungsweise des Vitamin E als sog. Fruchtbarkeitsvitamin zu unterstreichen, bei dessen Fehlen es bei Ratten zu Resorption der Embryonen kommt. Unter massivem Vitamin E Defizit kommt es schon zu Beginn der Gravidität zum Absterben und anschließender Resorption der Embryonen, bei marginaler Unterversorgung sterben die Föten meist zwischen dem 10. und 13. Tag ab. Ein lang anhaltender und massiver Tocopherol-Mangel kann bis hin zur Resorptionssterilität führen, diese Sterilität kann durch Aufhebung des Defizits wieder behoben werden.

Vitamin E ist für die Bildung und den Erhalt der Plazentafunktion notwendig. Ein Vitamin E-Mangel führt zu pathologisch-anatomischen Veränderungen am Uterus und den Ovarien (Das und Chowdhury 1999). An 30 Tage alten weiblichen Ratten, die Vitamin E verarmt gefüttert wurden, konnten folgende Veränderungen festgestellt werden. Ein Absinken der Östrogenkonzentration im Blutplasma, der LH und Östrogen induzierten Uterusenzyme und der alkalischen Phosphatasen. Des Weiteren wiesen die Ratten ovarielle Dysfunktionen der sprungreifen Follikel auf, sowie eine Dilatation des Uterus. Die Uteruswand ist verdickt, gelblich verfärbt und die Muskulatur ist von fettiger Degeneration durchsetzt. Dieser Zustand ist mit Hilfe von α -Tocopherol-Gabe reversibel.

Ähnliche Ergebnisse erzielte auch Mahan im Jahre 1991 und 1994. Auch hier stieg die Konzentration der Tocopherole im Serum der Muttertiere deutlich durch Supplementierung mit Vitamin E an. Gleiches gilt auch für die Vitamin E-Konzentration im Kolostrum und der Milch, auch hier stieg der Gehalt des Vitamins entsprechen der Supplementierung an. Messungen der α -Tocopherol Konzentrationen im Kolostrum ergaben 3-4-fach höhere Werte, wie in der Muttermilch. Besonders für Ferkel ist eine optimale Vitaminversorgung in den ersten Lebenstagen über das Kolostrum wichtig, da das α -Tocopherol schlecht plazentagängig ist (Lauridsen et al. 2002). Die Ergebnisse von Mahan zeigten, dass eine Vitamin E-Versorgung von 16 IU Vitamin E/ kg für tragende Sauen nicht ausreichend ist.

In einer Studie von Miller (1986) wurden tragende Sauen mit 50 IU Vitamin E/kg und 1.ppm Selen supplementiert und anschließend die Auswirkung auf die Konzentrationen im Kolostrum und der Muttermilch, sowie die Plasma-Glutathion-Peroxidase (GSH-Px) überprüft. Die Muttertiere zeigten einen Anstieg der Vitamin E- und Selen-Konzentration im Plasma, jedoch kein Anstieg der GSH-Px.

Zum gleichen Ergebnis kamen auch Mahan, Kim und Stuart (2000). Eine Erhöhung der Vitamin E und Selen-Konzentration im Futter bewirkte einen proportionalen Anstieg in der Sauenmilch. Das Kolostrum dieser Tiere enthielt eine höhere Vitamin E- und Selen- Konzentration, besonderes an α -Tocopherol, als die anschließend gewonnene Muttermilch.

Der antioxidative Status dieser Sauen war niedrig. α -Tocopherol und GSH-Px stiegen bei den Ferkeln jedoch ab dem 2. Lebenstag auf das fast 20- fache der Normalwerte. Diese erhöhten Werte zogen sich durch die ganze Aufzuchtperiode.

Durch eine optimale Vitamin E Versorgung kann die Fruchtbarkeit von Muttersauen gesteigert werden. Dies geschieht, indem die Ovulation steigert und die embryonalen Verluste gesenkt werden, somit kann die Geburtenrate pro Tier erhöht werden (Mahan 1994).

Mavromatis et al. (1999) konnte in seinen Versuchen ebenfalls nachweisen, dass Vitamin E und Selen synergistisch zusammen arbeiten. Sämtliche Ferkel, die der Gruppe der Vitamin E und Selen supplementierten Gruppe angehörten, hatten vom ersten Tag an einen hohen Immunglobulinspiegel. Auch waren die Wurfgröße, das Geburtsgewicht, das Heranwachsen der Ferkel und das Gewicht der Ferkel beim Absetzen wesentlich größer und besser in der Gruppe, in der die Sauen Vitamin E und Selen erhalten haben. Die Muttertiere erhielten hierbei ein Standard- Grundfutter mit 20 mg α -Tocopherol /kg und 0,45 mg Selen /kg. Einer weiteren Versuchsgruppe wurde zusätzlich zum Grundfutter 30 mg α -Tocopherol dazu gefüttert. Diesen Tieren wurde zusätzlich noch 30 mg α -Tocopherol am Tag 30, 60 und 90 der Gravidität injiziert.

Histologisch sind im Uterusgewebe Pigmentgranula zu erkennen, die die Myofibrillen auseinander drücken. Diese Granula sind nur schwer von den mit Pigmenten angereicherten Makrophagen zu unterscheiden. Im intramuskulären Bindegewebe und in der äußeren Zone des Endometriums findet man verstärkt Ansammlungen von

Makrophagen. Folge dieses Geschehens ist eine fibrinöse Einschmelzung des Uterusgewebes.

Die Funktionen des Corpus luteum können durch Sauerstoffradikale, wie Superoxide, Wasserstoffperoxide und Lipidhydroperoxide gehindert werden. Zusätzlich bilden sich bei der Ausreifung zu Tertiärfollikeln und bei der Rückbildung des Gelbkörpers verstärkt Peroxylradikale. Hier spielt Vitamin E als Antioxidans eine entscheidende Rolle. Der Gehalt an α -Tocopherol steigt nach der Rückbildung des C. luteum in den Ovarien und auch im C. luteum.

Diese pathologischen Vorgänge sind letztlich für die Fruchtbarkeitsstörungen verantwortlich.

2.2.3.3. Beeinflussung der Fruchtbarkeit bei Ebern

Vitamin E ist nicht nur wichtig für eine normale Entwicklung der Hoden, sondern spielt auch eine wichtige Rolle in der Spermatogenese (Cooper et al. 1987). Eine Zyklusdauer der Spermatogenese beträgt beim Schwein durchschnittlich 34 Tage. Ein Vitamin E- Defizit führt bei männlichen Tieren zu Hodenatrophie, Degeneration und Nekrose des Keimepithels und zu einer verminderten Motilität der Spermien.

Marin-Gunzman et al. (1997) entdeckten bei Vitamin E und Selen verarmten Ebern nicht nur eine herabgesetzte Beweglichkeit der Spermien, sondern auch prozentual mehr Spermien mit Missbildungen, unter anderem in Form von gekrümmten Spermien. Die Veränderungen sind hauptsächlich vom Selengehalt der Futtermittel abhängig, weniger vom Vitamin E- Gehalt.

Nach einer 48- tägigen Vitamin E- Unterversorgung bei männlichen Ratten lassen sich schon deutliche Veränderungen dieses Mangels erkennen. Mit Hilfe des Licht-Elektronen-Mikroskopes wurde eine unvollständige Spermatogenese sichtbar gemacht. Bei gravierendem permanentem Defizit kann es zu Azoospermie und Atrophie der Samenkanälchen kommen.

Die Sertolizellen sind für die Reifung der Spermien unerlässlich, sie umschließen sie, schaffen ein richtiges Milieu und sorgen für den Transport ins Tubuslumen. In den Versuchen von Marin-Gunzman et al. (1997) sahen die Sertolizellen in Gestalt und

Größe physiologisch aus, jedoch war ihre Anzahl gegenüber der Kontrollgruppe deutlich erhöht. Zusätzlich enthielten sie in der Basalregion große Lipidtröpfchen. Diese Lipidtröpfchen stellten letztlich die Produkte des Zelluntergangs der Spermatiden dar, welche von den Sertolizellen zwischen dem 42 und 48. Tag phagozytiert wurden.

Schon nach einer 48 tägigen Vitamin E Depletionsphase wiesen die Hoden nachweisbare Abnormitäten, wie zu geringes Hodengewicht auf. Da die Kontrollgruppe eine normale, dem Alter entsprechende Hodenentwicklung zeigte, konnten diese Veränderungen auf den Tocopherol-Mangel, dem die Ratten ausgesetzt waren, zurückgeführt werden.

Marin-Gunzman et al. (2000) konnten diese Ergebnisse in einer Studie zur Auswirkung von Vitamin E und Selen Mangel beim Eber nicht bestätigen. Hier wiesen die Schweine keine Veränderungen der Hoden und Nebenhoden auf. Es konnte keine Einschränkung der Fruchtbarkeit oder Abnormalitäten der Spermiendichte durch eine Vitamin E- Delementierung nachgewiesen werden. Eventuell wurden die Tiere nicht lange genug zuvor delementiert, oder der Vitamin E-Gehalt im Versuchsfutter war noch zu hoch angesetzt, um dokumentierbare Schäden hervorzurufen.

Ein ausgeprägter Mangel an Vitamin E und Selen äußert sich beim Schwein in drei typischen Krankheitsbildern. Es ist die Skelettmuskulatur in Form der nutritiven Muskeldystrophie, das Herz in Form der Maulbeerherzkrankheit und die Leber in Form der diätetischen Hepatitis betroffen (Wallimann et al. 1984).

Für die Pathogenese des Vitamin E und Selen Mangels ist es wichtig zu wissen, dass die GSH-Px in Selen abhängiger und Selen unabhängiger Form im Körper vorkommt. Hieraus lässt sich auch die unterschiedliche Sensibilität der einzelnen Organe auf ein Defizit erklären. Im Herzen und der Muskulatur ist die gesamte GSH-Px Aktivität Selen abhängig. In der Leber hingegen kommen beide, Selen ab- und unabhängige Formen vor.

2.2.3.4. Veränderungen an der Skelettmuskulatur

Die gezielte Zucht auf mehr Fleisch-, bzw. Muskelmasse zieht vor allem beim Schwein Probleme nach sich. Zu diesem Nachteil der genetischen Selektion auf viel Muskelmasse kommen zusätzlich noch Fehler in der Ernährung hinzu. Durch einen Mangel an Selen, durch Selen antagonistisch reagierende Substanzen (Ag, Cu, Co, Cd, Te, Sb, Zn), wird der Verbrauch an Vitamin E erhöht. Zu einem gesteigerten Verbrauch von Vitamin E kann auch durch eine übermäßige Zufuhr an mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Futter kommen. Des Weiteren kann ein erhöhter Verbrauch von Vitamin E ebenfalls durch Medikamente, wie Doxorubicin, durch Substanzen, welche die Oxidation von Tocopherolen begünstigt (Toxizität von O₂, O₃, Fe) und durch Strahlung induziert werden (Ferrans und Van Fleet 1985).

Da nicht nur ein alleiniger Vitamin E-Mangel, sondern auch Selen eine Rolle beim Krankheitsgeschehen der ernährungsbedingten Muskeldystrophie spielt (Moir und Masters 1979), muss auch auf die Selenkonzentrationen im Futter geachtet werden. Ein Selenmangel tritt gehäuft bei Freilandhaltung, bei Zugriff und Verlass auf die natürlichen Selen Ressourcen in den Grünpflanzen und im Boden auf. In manchen Gebieten mit exzessiver Schweinehaltung ist dieser Selengehalt unzureichend.

Spontan an dystrophischer Myopathie erkrankte Schweine weisen in Herz- und Lebergewebe besonders geringe Konzentrationen an α -Tocopherol auf. Die Selenwerte in Herz und Niere und der Gehalt an PUFA's in Herz und Leber unterschieden sich jedoch bei Rice und Kennedy (1987) nicht von den Werten der Kontrollgruppe. Aufgrund ihrer Ergebnisse schließen die beiden Autoren auf eine Störung des Vitamin E- Metabolismus als Auslöser der DM.

Amemiya (1989) dokumentierte bei Vitamin E und Selen depletierten Ratten Veränderungen der Muskulatur. Bei einer reinen Selenverarmung ließen sich diese Ergebnisse nicht replizieren. Veränderungen der Muskulatur waren mikroskopisch nicht nachweisbar.

In eine Vitamin E Mangelsituation geraten Schweine aus verschiedenen Gründen. Der gesteigerte Verbrauch des Vitamins kann durch eine erhöhte Dosis im Futter kompensiert werden. Wenn dieser erhöhte Bedarf nicht ausgeglichen wird, entwickeln Läufer- und Mastschweine eine nutritive Muskeldystrophie.

Eine Degeneration der quergestreiften Muskulatur kann experimentell durch einen Vitamin E und Selen-Mangel ausgelöst werden. Dies konnten Wallimann et al. (1984), Van Fleet et al. (1976) und de Gritz (1995) am Tiermodell Schwein dokumentieren. Amemiya (1989), Bensoussan et al. (1998), Shakibi und Stone (1987) und Goss-Sampson et al. (1988) konnten dies am Tiermodell Ratte nachweisen.

Anhand der Studie von de Gritz (1995) an heranwachsenden Ferkeln lassen sich die Auswirkungen einer antioxidansarmen Ernährung dokumentieren. Nach 2-3 Monaten waren schon makroskopisch Veränderungen zu erkennen. Das Fleisch der Tiere war blass, ischämisch, feucht und durchscheinend. An einigen Stellen erscheint das Fleisch grau und grisselig infolge der Kalkeinlagerungen.

In der Muskulatur kommt es zu Verlust der Querstreifung, zur unregelmäßigen Anordnung der Z- Bande und die Anordnung zueinander wird insgesamt unregelmäßig. Des Weiteren nimmt die Anzahl der Muskelfasern ab. Im Endstadium kommt es zu hyaliner Nekrose der fibrillären Substanz, Kernzerfall und zum Zerreißen der Sarkolemmschläuche. Die hierbei entstehenden Trümmer werden von einwandernden Makrophagen beseitigt.

Van Vleet et al. untersuchten 1976 die Auswirkungen einer Vitamin E-Selen-Verarmung bei Schweinen. Auch hier ließen sich die typischen Veränderungen an der Muskulatur registrieren. Eine der ersten elektromikroskopisch sichtbaren Veränderungen ist das Zerreißen und die Auflösung der Muskelfibrillen. Die betroffenen Muskelfasern gehen an hyalinscholliger Degeneration (Zenker-Degeneration) zugrunde. Des Weiteren kommt es zur Invasion von Makrophagen und anschließender Phagozytose des zerstörten Sarkolemmes. Bei der Sektion zeigen sich grau-weiße, streifig-fleckige Areal. Neben Bereichen der Degeneration findet man auch Bereich der Regeneration. Die Regeneration der Muskelfasern vollzieht sich durch Proliferation der Myoblasten, Fusion und Differenzierung der Muskelfasern mit Myofibrillen.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Lin und Chen (1982) bei Ratten. Sie setzten diese einem 12 monatigem Tocopherol-Defizit aus. Auch hier traten die typischen Krankheitssymptome auf und Muskeldystrophie und Kardiomyopathie konnten ausgelöst werden. Die heranwachsenden Tiere wiesen verschiedene Grade an pathologischen Veränderungen auf. Diese definierten sich in geschädigten Muskelfasern, gerissenen Sarkolemma, Residualkörperchen, des Weiteren sammelten sich in den Zwischenräumen des Interstitiums vermehrt Makrophagen und Fibroblasten an. Phagozyten wandern infolge der geschädigten und hierdurch instabilen Zellmembran ein. Diese sind reich an lysosomalen Enzymen und bewirken eine Hydrolyse der Muskelfasern.

Anhand steigender Serum-Kreatin-Phosphokinase Aktivität lässt sich eine, sich langsam manifestierende, aber noch subklinische Muskeldystrophie diagnostizieren. Auf den Ausbruch der Krankheit haben vor allem der Selen und Vitamin E Gehalt Einfluss (Fontaine et al. 1977).

Primär werden Gewebe mit hohem Stoffumsatz und Gewebe, welche reich an oxidierbaren Substanzen sind, durch die Bildung von Peroxidradikalen geschädigt. Am häufigsten von diesem Phänomen betroffen sind die roten Muskelfasern. Die Mitochondrien degenerieren, die Anzahl der Muskelfasern nimmt ab und ihre Anordnung wird unregelmäßig.

Die hyalinschollige Degeneration, auch sog. Weißmuskelkrankheit bei Kälbern, Lämmern und Fohlen (Ronéus und Essén-Gustavsson 1986) ist ein Erscheinungsbild der ernährungsbedingten Muskeldystrophie.

2.2.3.5. Veränderungen an den Gefäßen:

Eine unzureichende Vitamin E- Zufuhr bei Ratten führte schon nach kurzer Zeit zu krankhaften Veränderungen an den Gefäßen. Die Basalmembranen der Endothelien wurden mit fortschreitendem Versuch dicker. Wurde dieser Mangelzustand nicht behoben, kamen weitere pathologische Veränderungen, wie Pigmentablagerung und Degeneration der Mitochondrien hinzu (Amemiya 1987).

- Eine Vitamin E- Verarmung bei Ratten hat auch Auswirkungen auf die Gefäße der Retina. Es führt zu einer Verdickung der Basalmembranen an den Endothelzellen und zu einem Anschwellen dieser Strukturen. Durch ausschließliche Selenverarmung ließ sich diese Krankheitsbild nicht hervorrufen (Amemiya, 1989).
- Auch die Gefäße der Muskulatur sind von dieser Mangelsituation betroffen. Im Gegensatz zu den Gefäßen in der Retina werden hier die Basalmembranen der Gefäße in der Muskulatur dünner. Hierdurch kann es vereinzelt zu Blutungen, durch den Untergang der Endothelzellen an dieser Stelle kommen (Amemiya 1989).
- Die Gefäßveränderungen am Herzen sind definiert durch fibrinoide Nekrose der kleinen Arterien und Arteriolen. Es entstehen Fibrinmikrothromben in den Kapillaren (Ferrans und van Vleet 1985).
- Ralevic et al. (1995) stellten in einer Studie fest, dass der Mangel an Vitamin E die Endothelfunktion der Mesenterilaarterien von Ratten beeinträchtigt.
- Die Veränderungen an den Membranen der Kapillaren variieren von Gewebe zu Gewebe (Amemiya 1989).

2.2.3.6. Akute Rückelmuskelnekrose – Bananenkrankheit

Ein Problem in der Schweinemast, insbesondere bei Tieren mit einem Gewicht über 60 kg, sind stressbedingte Verluste vor allem in der letzten Mastperiode. Betroffen sind am häufigsten Hybriden der Kreuzung Deutsche Landrasse und Pietrain.

Nach Stresssituationen, wie Transport und Rankämpfe kann es bei anfälligen Schweinen zu umfangreichen Degenerations- und Nekroseherden in der Rückenmuskulatur kommen. Dies zeigt sich klinisch durch eine ein- bzw. beidseitige Schwellung und Verhärtung der Rückenmuskulatur. Der Rücken der Tiere wölbt sich auf und zusätzlich entsteht eine Krümmung zur Seite, hieraus leitet sich der Name Bananenkrankheit ab. Die betroffenen Tiere zeigen Muskeltremor, Bewegungsstörungen und äußern Schmerzlaute bei körperlicher Anstrengung.

Durch erhöhte Stoffwechselabläufe entsteht eine Hyperthermie. Auf Grund der dekompensierten metabolischen Azidose und der hieraus resultierenden Herz-Kreislaufstörung, haben die Tiere eine zyanotische Rüsselscheibe, gestaute Ohrvenen, blasse Haut und eine beschleunigte Atmung. Die akute Rückenmuskelnekrose wird in den meisten Fällen überlebt, jedoch sind Rezidiven nicht ausgeschlossen.

In Schweinebetrieben werden häufig Vitamin E und Selenpräparate bei Verdacht stressbedingter Myopathien verabreicht. Diese Medikation kann jedoch weder die Entstehung verhindern, noch die Heilung begünstigen. Durch die erhöhte Zufuhr erhofft man sich eine Stabilisierung der zellulären Membranen und eine bessere Regenerationsfähigkeit der Skelettmuskulatur, (Hänichen et al. 1988).

2.2.3.7. Veränderungen am Herzmuskel

Eine Vitamin E- Avitaminose in Kombination mit Selenmangel äußert sich bei verschiedenen Tierarten in Form von degenerativen Veränderungen an der Herzmuskulatur. Diese Defekte sind meist irreversibel, führen aber in spätem, bzw. unerkanntem Zustand durch die starke Schädigung der Muskelfaserung und hierdurch bedingte Funktionseinschränkung des Herzens zum Tod des betroffenen Tieres. Heutzutage tritt dieser Zustand so gut wie nicht mehr auf, da jedes kommerzielle Allein- und Grundfutter mit Vitaminen und Spurenelementen angereichert ist.

Lamont et al. beschrieb im Jahre 1950 das Krankheitsbild und prägte, auf Grund des Sektionbildes und dem Vergleich mit einer Maulbeere, den Begriff der Maulbeer-

Herz-Krankheit, Mulberry Heart Disease (MHD). 1961 beschrieb Grant diese Krankheit erneut und gab ihr den Namen diätische Mikroangiopathie (DM). Die MHD ist eine Stoffwechselkrankheit des Schweins, die sich primär am Herzen manifestiert und zum plötzlichen Tod der Tiere führen kann.

Beim Schwein sind vor allem junge Tiere im Alter von 3-5 Monaten betroffen. Selten sind schwache Tiere betroffen, meist befinden sie sich in guter Kondition. Auffällig ist auch, dass es meist nur einen Wurf betrifft (Schlotke et al. 1975; Seffner et al. 1967).

Im Fall der MDH wird hauptsächlich ein Mangel an Vitamin E verantwortlich gemacht. Selenmangel spielt hier, wenn überhaupt nur eine untergeordnete Rolle. In den Versuchen von Moir und Masters (1979) bewegten sich die Selenkonzentrationen im Normalbereich. Zum gleichen Ergebnis kamen auch Wallimann und Mitarbeiter im Jahre 1984, die den Selengehalt als ausreichend einstufen.

Zu Beginn des Krankheitsgeschehens steht oft nur die Teilnahmslosigkeit der Tiere. Der Krankheitsverlauf kann so schnell von statten gehen, dass die Symptome unbemerkt bleiben (Plonait et al. 1970; Seffner et al. 1967). Das Krankheitsgeschehen kann innerhalb von 12 Stunden zum Tod führen. Der Tod tritt durch Herzstillstand infolge der Herztamponade ein (Schlotke et al. 1975). Es sind aber auch Spontanheilungen möglich und von Seffner et al. (1967) beschrieben worden.

Der Teilnahmslosigkeit folgen Bewegungsunlust, herabgesetzter Muskeltonus, schwankender Gang bis hin zur völligen Unfähigkeit sich fortzubewegen. Gelegentlich verharren die Tiere in hundesitzartiger Stellung. Die erkrankten Schweine zeigen abdominale Atmung mit erhöhter Atemfrequenz. Die Korneagefäße sind injiziert, es besteht ein- bzw. beidseitiger Augenausfluss, ein Lidödem und ein deutlicher Exophthalmus. Die Herztöne sind auskultatorisch nur schwach zu hören, Nebengeräusche, wie ein Knistern und Rascheln sind wahrzunehmen.

Eine ausreichende Vitamin E- Versorgung ist vor allem für das Herzgewebe von großer Wichtigkeit. Das Herz hat einen großen Gehalt an Herzlipiden und mehrfach ungesättigten Fettsäuren und ist daher besonders empfindlich gegenüber Defiziten.

Die entstandenen Schäden sind in Form einer fleckig streifigen Verfärbung an der Herzoberfläche dieser Tiere deutlich zu erkennen. Die Blutungen ziehen sich durch das ganze Myokard. Der Herzbeutel ist mit geleeartiger Flüssigkeit, die mit weißlichen Flocken und Fibrinfäden durchsetzt ist, gefüllt und macht eine physiologische Herztätigkeit unmöglich. Es kommt zur Ausbildung einer Herztamponade (Plonait et al. 1970).

Untersuchungen des Herzen ernährungsbedingt erkrankter Schweine ergaben deutlich pathologische Veränderungen. Bei der Sektion ist als erstes der prall mit strohgelber gallertiger Flüssigkeit gefüllte Herzbeutel zu erkennen. Die Tiere leiden an einem Hydroperikard. Ebenfalls betroffen ist das Myokard, das von kleinen weißlich fahlen Streifen und Flecken übersät ist. Neben diesen Bereichen kommen auch rot-braun bis schwärzliche Areale vor, die zum Teil nekrotisch verändert aussahen. Die nekrotischen Bereiche kommen mit und ohne Kalzifizierung vor (Ferrans und van Vleet 1985). Die punktförmigen bis flächenhaften subepikardialen Blutungen strahlen bis tief ins Myokard ein. Von diesem Geschehen ist besonders der linke Ventrikel betroffen. Histologisch lassen sich über das gesamte Herz Schäden erkennen, gehäuft treten sie im linken Vorhof auf. Final kommt es zum Niedergang der Mitochondrien. Dieser Prozess beginnt durch Schwellung und Mineralisation der Mitochondrien (Van Vleet et al. 1977).

Fällt im Körper der Schutz durch Antioxidantien weg, werden vor allem die Membranen im Körper geschädigt. Infolge des Vitamin E und Selen Mangels fällt für die Membranen deren schützende Wirkung vor Lipidhydroperoxide weg (Shakibi und Stone 1987). Durch die Lipidperoxidation werden die Zellmembranen wie in der Skelettmuskulatur instabil. Auch im Herzgewebe wird vermutet, dass die lysosomalen Enzyme eine große Rolle spielen. Dies wird durch den Anstieg von Kathepsin und beta-glucuronidase Aktivität im Zytosol deutlich (Lin und Chen 1982).

Die Auswirkungen des Defizits sind vielfältig und betreffen mehrere Organsysteme (Shakibi und Stone 1987). Generell lassen sich gesteigerte Permeabilität der Gefäße, Infiltration von Makrophagen und Zerstörung des Myokards durch Pyknose und Koagulationsnekrose feststellen.

An der quergestreiften Muskulatur erkennt man eine hyalinschollige Degeneration, ein interstitielles Ödem, sowie eine leukozytäre Infiltration mit Zerreißen der einzelnen Muskelfasern auch unter Pigmenteinlagerungen. Vor allem im Herzen

findet man histologisch Tröpfchen aus Ceroid und Lipofuszinähnlichen Pigmenten in den Purkinje Fasern (de Gritz 1995).

Schlotke et al. beschreiben im Jahre 1957 nicht nur die direkten Folgen, welche am Herzen entstehen, sondern gehen auch auf die indirekten Folgen, bedingt durch die eingeschränkte Herzfunktion ein. Zu diesen indirekten Schäden zählen die Autoren das alveoläre Lungenödem, die hyperämisierte Leber, die Entstehung eines Ödems des Gallenblasenbettes und die histologisch sichtbare zentrolobuläre Läppchennekrose, welche kreislauf- und hypoxisch bedingt ist. Auch Wallimann et al. (1984) propagieren, dass sich die MHD primär auf das Herz beschränkt, aber auch Alterationen der Leber, infolge der akuten kardialen Insuffizienz hervorrufen werden können. Diese Veränderungen entstehen sekundär, und sind nicht primär auf den Vitamin E-Selen-Mangel zurückzuführen.

2.2.3.8. Veränderungen des Gastrointestinaltraktes

Des Weiteren geht Schlotke et al. (1975) davon aus, dass die kleinen herdförmigen Blutungen der Magen- und Darmschleimhaut, die auf Grund der Veränderungen der kleinen Gefäße entstehen, ebenfalls auf das Defizit an Vitamin E und Selen zurückzuführen sind. Auch Wallimann et al. (1984) konnte das Auftreten von Magenulcera, vor allem im Bereich der Pars proventricularis in Vitamin E und Selen defizienten Schwein feststellen.

Lannek N. und Lindberg P. beobachteten im Jahre 1975 ebenfalls hyper- und parakeratotische Veränderungen der Magenschleimhaut bei unzureichenden Vitamin E und Selen versorgten Schweinen. Diese geschwulstartigen Veränderungen werden auch in dieser Studie gehäuft in der Pars proventricularis beobachtet.

Hong und Chow (1988) konnten bei Ratten innerhalb 9 Wochen mittels unzulänglicher Vitamin E- Versorgung eine eosinophile Enteritis auslösen. Innerhalb des Magen-Darm-Traktes (MDT) waren bei den Versuchstieren das Zäkum und das Ileum von den pathologischen Vorgängen am häufigsten und am stärksten betroffen. Bedingt durch den Vitamin E- Selen- Mangel kommt es im gesamten MDT zur

ausgedehnten Infiltration der Muskelschichten und der Submucosa (Tela submucosa) mit eosinophilen Granulozyten. Ansammlungen von eosinophilen Granulozyten sind ebenfalls in der Niere, der Leber, der Milz, dem Magen und der Skelettmuskulatur zu finden. Im histologischen Bild ist die Leber durch massive Nekrose der Hepatozyten gekennzeichnet. Auch in dieser Studie war der degenerative Prozess an den verschiedenen Organen durch Vitamin E- Selen- Gabe reversibel.

2.2.3.9. Leberveränderungen:

Die Leber ist eines der Organsysteme, das bei einem Defizit an Vitamin E und Selen betroffen ist. Dass nicht nur Vitamin E, sondern auch Selen in diesem Krankheitsgeschehen von großer Bedeutung ist, verdeutlichen Moir und Masters (1979). Veränderungen an der Leber können parallel zum Geschehen am Herzen und der Skelettmuskulatur auftreten.

Auffällig an der Leber sind eine hochgradige Stauung, eine eingedickte Gallenblasenflüssigkeit und ein Ödem der Gallenblasenwand, sowie des Gallenblasenbettes. Charakteristisch sind auch die Dissoziation der Leberzellbalken und das zentrolobuläre Ödem. Histologisch zeigen sich diffus verteilte Bereiche mit zentrolobulärer Hyperämie und zentrolobulärer Nekrose, vor allem im Bereich der Leberpforte. Die, den Nekroseherden angrenzenden Leberzellen weisen oft degenerative Leberzellverfettung auf.

Diese pathologischen Veränderungen sind primär als Stauungsfolge des, in seiner Funktion eingeschränkten Herzens zu interpretieren (Plonait et al. 1970).

2.2.3.10. Veränderungen der Nerven:

Vitamin E bewirkt eine Stabilisierung der Membranen, indem es PUFA's durch Bildung von trägen Tocopheryl- Radikalen vor der Oxidation schützt. Fehlt dieser antioxidative Schutz durch Vitamin E und andere Antioxidantien kommt es zu

neurologischen Störungen und Ausfallerscheinungen. Im Nervengewebe spielt Vitamin E deshalb eine besonders wichtige Rolle.

Es wird vermutet, dass die neurologischen Ausfallerscheinungen, die durch eine Vitamin E- Defizit entstehen, das Resultat der Schädigung der Mitochondrien und anderen membranösen Strukturen der Axone ist. Das Nervenmark (Myelin) besteht aus verschiedenen Lipiden und Eiweißen. Das Myelin wird von der Myelinscheide umgeben. Sie dient der elektrischen Isolierung und erhöht die Impulsleitungsgeschwindigkeit. Die Membranen der Myelinscheide haben einen besonders hohen Anteil an Lipiden (75% der TS). Vom Ausmaß der Myelinisierung der Nerven und von der Dicke ist die Erregungsleitungsgeschwindigkeit abhängig. Bei der Dystrophie und Degeneration der Axone kommt es zu fokaler Axonverdickung und zum Zerfall der Myelinscheide. Hierdurch wird die Reizleitungsgeschwindigkeit der Nerven reduziert (Southam et al. 1991).

Goss-Sampson et al. setzten Ratten einem 40 wöchigen Vitamin E- Mangel aus. Schon nach dieser Zeitspanne konnte nachgewiesen werden, dass das Nervengewebe (Gehirn, Nerven und Rückenmark), im Gegensatz zu anderen Geweben, bei Mangelsituationen einen höheren Prozentsatz an α - Tocopherol zurückbehalten kann als anderes Gewebe (Serum, Leber und Fettgewebe). Eine anormale elektromyographische Aktivität der Hintergliedmaße war nach 40 Wochen Depletierung zu erkennen. Dies deutet auf eine chronische partielle Denervation hin. Nach 52 Wochen zeigte sich dies deutlich im klinischen Bild. Durch die chronische Unterversorgung litten die Tiere an Hypästhesie und Hypalgesie. Die anfänglichen unkoordinierten Bewegungen gingen in Ataxien, vor allem der Hintergliedmaße und Paralysen über.

Histologisch sind die Folgen des chronischen Mangels in Form von axonaler Dystrophie der Nerven und sekundärer Entmarkung der Axone zu erkennen.

Die Leitungsgeschwindigkeit der Nerven ist reduziert. Das Acetylcholinesterase spielt bei der Hydrolyse des Acetylcholins nach Übergang der Erregung eine wichtige Rolle. Es zerlegt Acetylcholin in Cholin und Acetat.

Histologisch lässt sich eine Dystrophie der Axone mit sekundärer Entmarkung erkennen. Auch Towfighi (1981) konnte erkennen, dass das zentrale Nervensystem

von den degenerativen Prozessen stärker betroffen ist, als das periphere Nervensystem.

Bedingt durch eine maternale chronische Unterversorgung, kann es auch schon bei Föten zu Entwicklungsstörungen der Nerven kommen.

Ausgedehnte axonale Degeneration und dystrophische Veränderungen sind infolge eines chronischen Vitamin E- Defizits im Rückenmark und in den Rückenmarkskernen anzutreffen. Äußere Reize gelangen über Spinalganglien über den Dorsalstrang des Rückenmarks direkt weiter zu den Kernen N. gracilis und N. cuneatus in der Medulla oblongata. Die Veränderungen sind besonders schwer im Nucleus gracile. Der Nucleus cuneatus ist von diesen pathologischen Prozessen weniger schwer betroffen. Von den Kernen in der Medulla oblongata gehen Signale weiter in das Kleinhirn, das für die Koordination und das Gleichgewicht zuständig ist. Reize aus der hinteren Körperhälfte werden im Nucleus gracilis umgeschaltet, Reize aus der vorderen im Nucleus cuneatus (Towfighi 1981).

Unter Vitamin E- Mangel kommt es zum massiven Neronenverlust in den Nuclei. Diese pathologischen Vorgänge spiegeln sich im klinischen Bild wieder. Die Versuchstiere von Towfighi zeigen, wie auch die Tiere in den Studien von Goss-Sampson et al., zu Beginn allgemeine Schwäche, inkoordinierte Bewegungen und Muskelzittern. Störungen im Bewegungsablauf, die zu einem verzerrten Gangbild führen, treten vor allem in den Hintergliedmaßen auf, begründet durch die pathologischen Prozessen im N. gracillis.

In den Neuronen der Dorsalwurzelganglien accumulieren als Folge des Vitamin E-Mangel Lipofuscine. Auch Nelson et al. (1981) beobachteten Lipofuscinansammlungen im Perikaryon der Nervenzellen in Endothelzellen des ZNS. Auch in diesen Versuchen an Rhesus Affen wurden die nervalen Schädigungen von chronisch nekrotisierenden Myopathien begleitet. Die Anzahl der betroffenen Neuronen ist nicht proportional zur Anzahl der betroffenen Axone (Towfighi 1981).

Wird diese Mangelsituation nicht behoben, kommt es zu progressiven Ataxien, Muskelatrophie und Paralysen.

Anhand zahlreicher Versuche mit Vitamin E depletierten Ratten wurden die schädlichen Einwirkungen eines längerfristigen Defizits auf das Nervensystem dokumentiert. Die Veränderungen betreffen das zentrale Nervensystem (ZNS) und das periphere Nervensystem (PNS), wobei das ZNS von den degenerativen Prozessen stärker betroffen ist, als das periphere Nervensystem (Pillai et al. 1994; Towfighi 1981).

Pillai et al. (1994) konnten nach 61 wöchiger defizitärer Ernährung histologisch keine Strukturveränderungen des PNS feststellen. Histologische Auswertungen des Gewebes ergaben jedoch schon nach dieser Zeitspanne eine Nekrose der Typ 1 Muskelfasern.

Machlin et al. induzierten im Jahre 1977 sichtbare neuromuskuläre Schäden bei Vitamin E verarmten Ratten. Auch hier waren die Folgen der defizitären Ernährung nekrotische Myopathien, Muskelzittern und axonale Dystrophien. Des Weiteren stellten sie selektive Aktivitäten von Lysosomen in der Mikrozirkulation des ZNS fest.

Viele Tiere entwickelten im Laufe des Versuches eine Kyphoscoliose (Machlin et al. 1977; Ralevic et al. 1995). Nach 12 Wochen treten die typischen Anzeichen einer Vitamin E- Verarmung auf. Die Wachstumsrate geht zurück, die Leistungs- und Belastungsfähigkeit der Tiere nimmt ab. Die klinischen Symptome beginnen, wie in den meisten Versuchen mit einem unsicheren schwankenden Gang und Inkoordination, besonders der Hinterhand.

2.2.3.11. Veränderungen der Retina:

Goss- Sampson et al. (1998) untersuchten an Ratten über 12 Monate die Auswirkungen eines Vitamin E- Defizits am Auge. Die Schlussfolgerung des Versuches ergab, dass Vitamin E die normale Funktion der Retina erhält.

Studien von Fujikawa et al. (2003) untermauern diese These. Vitamin E wirkt Schäden an der Cornea und den Conjunktiven, induziert durch einen Vitamin A- Mangel, entgegen.

Die ersten Anzeichen eines Vitamin E- Defizits werden an den Photorezeptoren sichtbar. Vermutungen von Goss- Sampson et al. (1998) zufolge, kommt es zu Veränderungen in der Mikroumgebung der Membranen, welche die Transduktion beeinflussen. Unter Transduktion versteht man die Umsetzung eines optischen Reizes (Lichteinfall) in eine Erregung neuronaler Elemente. Der in den Membranen der Stäbchen verankerte Sehfärbstoff Rhodopsin wechselt aufgrund des Energietransfers, induziert durch Photonen seine Stereoisomerieform. Die Fähigkeit des Farbmoleküls seine Struktur zu verändern, wird durch Vitamin E- Mangel beeinträchtigt.

Typische Schäden, die unter einem Vitamin E Defizit entstehen, entwickeln sich vom Zentrum der Retina aus und wandern von dort langsam in die Peripherie. Das Tapetum lucidum ist besonders betroffen. Es kann zur Veränderung der Augenfarbe, sowie zu Nachtblindheit und visueller Beeinträchtigung kommen (Riis et al. 1981).

Auch Davidson stellte Untersuchungen an Jagdhunden und Beagels an, die durch langsamen, aber fortschreitenden Verlust des Sehvermögens auffielen. Anhand klinischer Untersuchungen wurde bei den Tieren eine Degeneration der Retina diagnostiziert. Der zentrale tapetale Anteil des Augenfundus (Tapetum lucidum) war überwiegend von den degenerativen Prozessen betroffen. Alle Tiere wiesen besonders niedere α - Tocopherol Werte in Plasma, Serum und Gewebeprobe auf.

Des Weiteren wurden Ansammlungen von Lipofuszingranula im Pigmentepithel der Retina diagnostiziert (Herrmann et al. 1984; Davidson et al. 1998).

Die exzessive Akkumulation von Lipofuszin führt zu einer Hypertrophie des retinalen Pigmentepithels. Die Folge ist die Degeneration der Terminalstruktur der Photorezeptoren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Vitamin E sehr wohl Einfluss auf das Sehvermögen hat, unter anderem auch durch die Interaktion mit Vitamin A. Infolge des Vitamin E-Mangels kann es zu 30-40 %- igen Verlusten von Vitamin A kommen. Irreversible Schäden des langkettigen PUFA's der Retina, Anstieg der Lipidperoxidation, Degeneration bis hin zur Atrophie des Pigmentepithels der Retina können die Folgen einer Minderversorgung mit Vitamin E sein.

2.2.4. Interaktionen mit anderen Vitaminen

2.2.4.1. Vitamin C

Vitamin C –Ascorbinsäure- ist ein wasserlösliches Antioxidans und schützt Zellen, ebenso wie Vitamin E, vor oxidativer Schädigung, in dem es Radikale abfängt. Bei diesem Prozess geht es in die oxidierte Form, der Dehydroascorbinsäure und dem sich dabei bildenden Ascorbyl- Radikal über.

Verschiedene Autoren (Chen und Thacker 1987; Tanaka et al. 1997; Halpner et al. 1998; Packer et al. 2001; Huang und May 2003) beschreiben die Interaktion des wasserlöslichen Vitamin C und dem fettlöslichen Vitamin E.

Die Versuchsergebnisse von Chen und Thacker (1987) ergaben, dass Vitamin C teilweise den, durch Vitamin E Mangel hervorgerufenen, metabolischen Veränderungen und die hiermit verbundenen biochemischen Parametern entgegen wirken kann. Vitamin C ist in der Lage α - Tocopheroxyradikale zu reduzieren und damit wieder in die reaktionsfähigen Form, das α - Tocopherol umgewandelt, wie in Abbildung 9 veranschaulicht. Des Weiteren besitzt es die Fähigkeit selbst freie Radikale abzufangen und zu neutralisieren. Somit agiert es synergistisch zu Vitamin E, hieraus lässt sich der einsparende Effekt von Vitamin E bei gleichzeitiger Vitamin C Verabreichung erklären (Tanaka et al. 1997). Dieses Zusammenspiel stellten auch Halpner et al. (1998) fest. Auch in seinen Versuchen konnte durch Vitamin C Gabe der Verlust von Vitamin E vermindert werden.

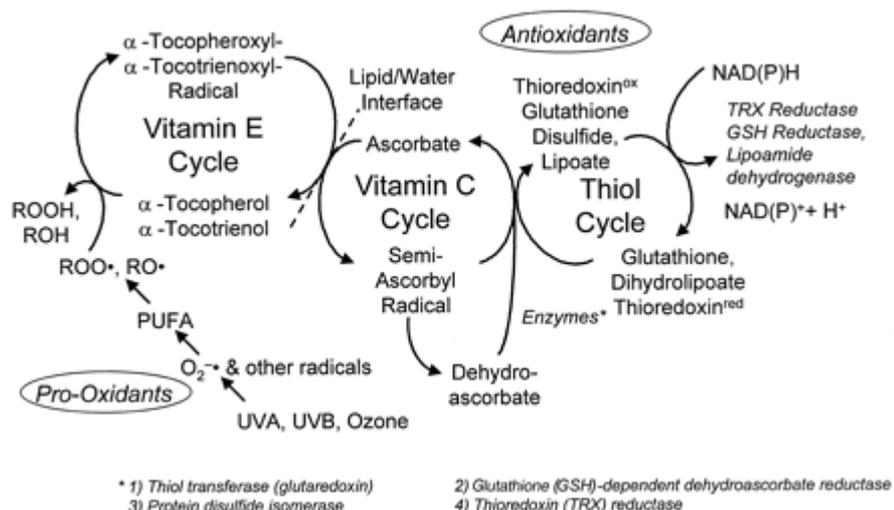


Abbildung 9: Zusammenspiel zwischen Vitamin E, Vitamin C und Thiolredoxzyklen (nach Packer et al. 2001)

Ho und Chan (1992), Chan (1993) und Packer et al. (2001) kamen zu dem Ergebnis, dass oxidiertes Vitamin E mittels wasserlöslichen reduzierenden Substanzen, wie Ascorbate und Glutathione regeneriert werden kann.

Vitamin C ist jedoch nicht in der Lage bei gravierendem chronischem Vitamin E Mangel die sich manifestierende Hämolyse zu verhindern. Infolge des Vitamin E Mangels erhöht sich der oxidative Stress und es kann zu einem Abfall des Vitamin C Gehaltes kommen. Gohil et al. (1986) erkannten, dass die Ascorbinsäure den schädlichen Effekt den ein Vitamin E- Mangel impliziert, nicht völlig ausgleichen kann.

2.2.4.2. Vitamin A

Vitamin A (Retinol) gehört, wie Vitamin E zur Gruppe der fettlöslichen Vitamine. Gebräuchliche Synonyme für Vitamin A sind Epithelschutzvitamin und Wachstumsvitamin.

Es kommt in Futtermitteln tierischer Herkunft (Fisch, Fischleberöl, Leber, Eigelb, Milch), sowie in Futterpflanzen vor. In Pflanzen liegt Vitamin A als Provitamin in Form von Carotinoiden vor.

Vitamin A wird im Darm absorbiert und in den Enterozyten mit langkettigen FS verestert. Das Retinylester wird, wie die Tocopherole in Chylomikronen eingebaut und gelangt über den Lymphweg zur Leber (Harrison EH 2004).

Die Leber ist das Hauptspeicherorgan von Vitamin A, die Speicherform ist das Retinylester. Anhand des Vitamin A Plasmaspiegels lässt sich nicht auf die aufgenommene Menge des Vitamins rückschließen, da große Mengen in der Leber gespeichert werden können (Arnhold et al. 2002). Für den weiteren Transport wird Retinol an ein Transportprotein, das Retinolbindungsprotein gebunden.

Vitamin A spielt eine große Rolle bei der Reproduktion (Arnhold et al. 2002), dem Sehvorgang, dem Immunsystem (Hoskinson 1992), der Genexpression, der Zelldifferenzierung, dem antikanzerinogene Effekt, dem Knochenwachstum und der Embryonalentwicklung.

Die Vorstufe von Vitamin A ist das in Pflanzen vorkommende Provitamin beta-Carotin. Da es ebenfalls Radikale an den Membranen abfängt, wirkt es zu Vitamin E synergistisch. Jedoch kann es infolge einer beta-Carotin Supplementierung zu einem Absinken der Vitamin E Konzentration im Plasma kommen.

Bei einer Kombination von Vitamin A mit Vitamin E kann es ebenfalls zu einem Absinken der Tocopherol-Konzentration kommen. In hohen Dosen wirkt Vitamin A antagonistisch zu Vitamin E. Hohe Konzentrationen Vitamin E beeinflussen im Gegenzug den Metabolismus von Vitamin A positiv.

In Versuchen mit Ratten konnte beobachtet werden, dass schon kleine Mengen Retinolsäure die Plasma-Konzentration von α -Tocopherol, im Vergleich zu äquivalent hohen Dosen Retinol, deutlich senken kann. Retinolsäure verändert den Vitamin E Metabolismus (Bieri et al. 1981).

Ratten, denen geringe Mengen an Retinolsäure gefüttert wurden, hatten eine deutlich geringere α -Tocopherol Konzentration wie Tiere, denen die äquivalente Menge an Retinol zugefüttert wurde. Den Versuchstieren wurde 4 mg/kg Retinol, oder Retinolsäure verfüttert. Nach 2-5 Wochen wurden das Plasma und das Gewebe der Tiere untersucht. Die α -Tocopherol Konzentrationen im Plasma, der Leber und dem Fettgewebe betragen nur die Hälfte der Werte der Gruppe, denen Retinol verfüttert wurde. Gleiche Effekte waren mit Hühnern als Versuchstieren zu erzielen.

Eine erhöhte Oxidationsrate des α -Tocopherols war die Folge der Aufnahme der Retinsäure in den Organismus. Der Organismus reagiert mit einer höheren Oxidationsrate des α -Tocopherols bei Applikation von Retinsäure, im Gegensatz zu Retinol. Beweisend hierfür sind die größeren Mengen von α -Tocopherylquinone in der Lymphe. Die Schlussfolgerung dieser Ergebnisse waren für Bieri et al. (1981) eine geringere intestinale Resorption von α -Tocopherol bei gleichzeitiger Applikation von Retinolsäure. Zusätzlich wurde angenommen, dass die Oxidation von α -Tocopherol im Körper gefördert wird (Bieri et al. 1981).

Hinzu kommt noch, dass Vitamin E im Darm in der Lage ist, die Umwandlung von beta-Carotin in Retinol zu steigern. Dieser Effekt ist dosisabhängig. Ebenfalls kann der lymphatische Transport von beta-Carotin durch die Gabe von Vitamin E in physiologischen Dosen um das 4-fache gesteigert werden. In pharmakologischen Dosen lässt sich der lymphatische Transport von beta-Carotin sogar um das 12-21 fache steigern (Wang et al. 1995).

Einen weiteren Beweis für den positiven Einfluss von Vitamin E auf Vitamin A erbrachten Sunder und Flachowsky (2001). Eine Steigerung bzw. ein Anstieg der Vitamin A Konzentration im Organismus von Legehennen, bei gleich bleibender Dosis, ließ sich durch eine Erhöhung der Vitamin E Applikation auf 1000 mg α -Tocopheryl acetat pro kg erzielen.

Auf der anderen Seite wirkt sich ein Vitamin E Exzess kontraproduktiv auf den Vitamin A Gehalt aus. Bei einem Vitamin E Exzess von 10,000 und 20,000 mg/kg Futter sanken die Retinol- Konzentration in der Leber deutlich ab.

Eine hohe Vitamin A Zufuhr übt einen antagonistischen Effekt auf Vitamin E aus. Die Auswirkung ist ein Absinken der Vitamin E Konzentration, da die Absorption der Tocopherole gehemmt wird. Bei exzessiver Gabe von Vitamin E ändert sich der Plasma Vitamin A Level nicht (Alam und Alam 1983).

3. Material und Methoden

3.1. Tiermaterial

Die Versuchstiere waren eine Gebrauchskreuzung aus Deutschen Landrasse x Pietrain und stammten aus einem bayrischen Ferkelerzeugerbetrieb. Die Versuchstiergruppe bestand aus insgesamt 45 Tieren, beiden Geschlechts. Die männlichen Tiere waren bereits kastriert. Zusätzlich wurden noch 10 Ersatztiere aus dem gleichen Erzeugerbetrieb unter denselben Bedingungen gehalten. Zum Zeitpunkt der Einstellung waren die Ferkel 4 Wochen alt. Bei Versuchsbeginn waren die Ferkel 6 Wochen alt und hatten ein durchschnittliches Gewicht von $18 \pm 3,2$ kg.

3.2. Versuchsgruppen

Bei Einstellung wurden die Ferkel gewogen und tätowiert. Anschließend wurden die Tiere nach Geschlecht, Gewicht und Wurf randomisiert und in drei Gruppen zu jeweils 15 Tieren aufgeteilt. Die Ersatztiere wurden nach gleichen Gesichtspunkten randomisiert und auch in 3 Gruppen mit je 3 Tieren aufgeteilt. Während der Adaptionsphase von 2 Wochen wurden die Tiere in Gruppen gehalten. Während des Versuches wurde ein Tier pro Bucht aufgestellt. So konnte eine gezielte Beobachtung hinsichtlich der Futteraufnahme und des Gesundheitsstatus gewährleistet werden.

Die Gruppeneinteilung war wie folgt:

- Gruppe 1: „Sano-Vital“ mit n= 15 Tiere
- Gruppe 2: konventionelle Vitaminverbindung mit n= 15 Tiere
- Gruppe 3: negative Kontrollgruppe „Placebogruppe“ mit n= 15 Tiere

3.3. Tierhaltung

Die Tiere wurden im institutseigenen Versuchsstall in Oberwiesenfeld in Einzelhaltung aufgestellt. Die Buchten hatten das Innenmaß von 1 x 2 m. Der Buchtenboden bestand im hinteren Bereich aus Beton und im vorderen Bereich aus Spalten. Der Trog reichte über die gesamte Frontseite, zusätzlich war in jeder Bucht eine Nippeltränke angebracht. Eingestreut wurde mit Stroh. Ausgemistet wurde jede Box einmal am Tag. Die Stalltemperatur betrug während des ganzen Versuchs zwischen 18 und 20 C°. Die Beleuchtungsdauer betrug 8 Stunden mit 50 Lux (gemäß der Schweinehaltungsverordnung vom 18.02.1994) und war dem Tagesrhythmus angepasst. Eine konstante Luftzufuhr und Luftgeschwindigkeit des Stalls wurde durch eine Belüftungsanlage gewährleistet.

Die Genehmigung für den Tierversuch, nach dem Tierschutzgesetz i.d.F. vom 25.05.1998 (BGBl I S. 1105) von der Regierung von Oberbayern lag vor.

Nach Abschluss der Versuchsreihen wurden die Schweine eingeschläfert. Die Organe, die für den Versuch benötigt wurden sind im Institut für Pathologie der Ludwig-Maximilian-Universität entnommen worden.

3.4. Futter

Das Futter bestand aus einer hauseigenen Mischung bzw. aus konventionellem Ferkelaufzuchtsfutter (siehe Tabelle 2).

Nach dem Einstellen wurden die Ferkel eine Woche restriktiv gefüttert um Durchfallerkrankungen durch Transportstress und Futterumstellung zu vermeiden. Eine Woche vor Versuchsbeginn wurde die Fütterung auf ad libitum- Fütterung umgestellt, dies wurde bis zum Versuchsende beibehalten. Auch zur Tränke hatten die Tiere jederzeit uneingeschränkten Zugang.

Tabelle 2: Futtermittelzusammensetzung

Inhaltsstoffe	Angaben in %
Weizen	31,1
Mais	14
Gerste	10
Reismehl	10
Weizengrießkleie	10
Sojaschrot	9,5
Malzkeime	6
Melasse	3
Grünmehl	2
Mineralstoffmischung für Schweine	2
Vitaminvormischung für Schweine	2
Calziumpropionat	0,4

Das Ferkelaufzuchtsfutter enthält kein Kupferzusatz.

Das Futter wurde von der Firma Zimmerer-Werk, Ludmilla-Straße 21a, 84034 Landshut gemischt.

Tabelle 3: Inhaltsstoffe im verwendeten Ferkelaufzuchtsfutter

Inhaltsstoffe	Gehalt in %
Rohprotein	18
Rohasche	6,2
Rohfaser	3,4
Lysin	1,0
Calcium	0,9
Phosphor	0,6
Natrium	0,2

Tabelle 4: Zusatzstoffe und Spurenelemente im verwendeten Ferkelfutter

Zusatzstoffe	Dosis/ kg Diät	in IE oder mg	Zusatzstoffe Spurenelemente	Dosis/ kg Diät	in mg
Vitamin A	8 000	IE	Ca-d- Pantothenat	7,50	mg
Vitamin D 3	2 000	IE	Nikotinsäure	20,00	mg
Vitamin E	60,00	mg	Cholinchlorid	290,00	mg
Vitamin B 1	1,25	mg	Zink	166,00	mg
Vitamin B 2	5,00	mg	Eisen	95,00	mg
Vitamin B 6	3,75	mg	Mangan	53,00	mg
Vitamin B 12	20,00	mg	Jod	0,24	mg
Vitamin K 3	2,50	mg	Selen	0,48	mg

3.5. Versuchsablauf

Der Versuchsablauf wurde in eine Vorperiode und in den Hauptversuch aufgeteilt. Die Vorperiode beinhaltete die Adaptionsphase der Tiere an Stall und Futter, sowie die Randomisierung nach Geschlecht, Wurf und Gewicht in die 3 Gruppen (Kontrolle, Vergleichspräparat- und Sanovital- Gruppe).

Nachdem die Ferkel 6 Wochen alt waren wurde mit dem Hauptversuch begonnen.

Die verabreichte Emulsion –Sanovital AE- enthält 50 mg Vitamin E und 75000 IE Vitamin A pro ml. Der Sanovital Versuchsgruppe wurden 4 ml der Emulsion oral in einer Einzelspritze verabreicht. Dies entspricht 300.000 IE Vitamin A und 200 mg Vitamin E pro Tier.

Die Tiere der Vergleichspräparat- Gruppe erhielten eine Gelatine kapsel mit 300.000 IE Vitamin A und 200 mg Vitamin E, die ihnen oral verabreicht wurde.

Der Kontrollgruppe wurden 4 ml Wasser oral mittels einer Dosierpumpe eingeflösst, um jedes Tier der gleichen Stressbelastung auszusetzen.

Vor Verabreichung des jeweiligen Präparates wurde Blut genommen. Dann wurde den Ferkeln 20 min nach oraler Gabe des Vitaminpräparates, sowie 1, 3, 5, 6, 7, 12 und 24 Stunden später nochmals 4 ml Blut entnommen. Das Blut wurde sofort zentrifugiert und das daraus gewonnene Serum bei -30C° tiefgefroren.

Bei allen drei Gruppen wurde eine 2- wöchigen Auswaschphase eingehalten. Diese Zeit diente zur Normalisierung des Tocopherol Gehaltes im Serum und in den Organen. Nach 2 Wochen wurden den Tieren entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit nochmals die gleiche Menge des Vitaminpräparates, bzw. des Placebos oral verabreicht.

Daraufhin wurden jeweils 5 Tiere der Versuchsgruppen nach 24, 48 und nach 72 Stunden getötet.

Allen Tieren wurden sofort nach der Tötung Organproben der Lunge, Leber, Niere, sowie Darmlymphknoten aus dem Dünndarmbereich entnommen. Diese Organgewebsproben wurden ebenfalls wie die Serumproben bei -30C° bis zur weiteren Bearbeitung tiefgefroren. Die restlichen 10 Ersatztiere wurden ebenfalls nach einmaliger Sanovital Applikation (4ml) getötet um Gewebeproben von

Dünndarm- und Lymphknotengewebe zu entnehmen. Um die Resorption histologisch zu erfassen, geschah dies 10, 20, 40 und 60 Minuten nach Applikation.

3.6. Orale Verabreichung

Mit Hilfe einer Dosierpumpe konnte die definierte Menge an Flüssigkeit oral appliziert werden. Die Ferkel wurden unter den Arm geklemmt, oder auf dem Schoß fixiert. Mit der einen Hand wurde der Schädel von kaudo-dorsal umfasst und mit Daumen und Zeigefinger Druck auf die Backen ausgeübt, so dass sich das Maul öffnete. Mit der anderen Hand konnte man nun das Präparat eingeben.

3.7. Blutentnahmetechnik

Eine Blutentnahme beim Schwein ist an mehreren Stellen möglich. Zum Beispiel an der Ohrvene, der Schwanzvene, an der V. jugularis und an der V. cava cranialis. Die Entnahmestelle an der V. cava cranialis wird vor allem beim Ferkel verwendet.

Das Ferkel wurde möglichst ruhig aus der Bucht gefangen und in Rückenlage auf einem Bock fixiert. Eine Hilfsperson ist nötig, die mit der einen Hand den Kopf und mit der anderen Hand die beiden Vordergliedmaße fixiert. Hierbei wird der Zeigefinger zwischen die Vordergliedmaße gelegt, um eine Kompression der Karpalgelenke und des Brustkorbes zu verhindern. Mit dem Unterarm wird das Tier vorsichtig in den Bock gedrückt und in dieser Stellung gehalten. Hilfreich für die Blutentnahme ist es, wenn der Kopf gerade nach vorne gestreckt ist und die Vordergliedmaße seitlich am Körper liegend nach kaudal gezogen werden. Durch diese Position ist die Halsregion gerade und straff gestreckt.

Zur Punktion sucht man sich folgende anatomischen Punkte auf: das Manubrium sterni und die erste Rippe. Die Einstichstelle liegt rechts bzw. links dicht neben dem Manubrium sterni und der ersten Rippe. Mit dem Mittelfinger auf dem M. sterni und dem Daumen auf der ersten Rippe wird mit dem Zeigefinger ein Dreieck zur Punktionsstelle gebildet.

Bei linksseitiger Punktion können Komplikationen durch Verletzung des N. phrenicus entstehen.

Zur Punktion wurden Kanülen der Größe 0,8 x 40mm (Firma: Terumo, Leuven, Belgien) verwendet.

Es wird direkt neben dem M. sterni mit aufgesetzter Kanüle in leicht medialer Stichrichtung senkrecht eingestochen. Es wurden 4ml Blut pro Ferkel in eine Serummonovette (Firma: Sarstedt) entnommen. Anschließend wird sofort ein Druck auf die Einstichstelle ausgeübt, um eine Blutstillung zu begünstigen und einen Bluterguss zu vermeiden.

3.8. Probenentnahme und Probenverarbeitung

Nach der Blutprobenentnahme aus der V. cava cranialis wurde das Blut, innerhalb von 2 Stunden, in einer Zentrifuge (Zentrifuge Heraeus Sepatech, Heraeus Holding GmbH, Hanau) zentrifugiert. Dies geschah bei 3000 Umdrehungen 10 min lang. Das Serum wurde mit einer Einmalpipette abpipettiert, in Eppendorfcups gegeben und sofort bei -30°C bis zur Bestimmung der Untersuchungsparameter eingefroren.

Aus allen drei Gruppen wurden den getöteten Tieren Leber-, Lungen-, Nierengewebsproben und Darmlymphknoten des Dünndarms entnommen. Die Proben hatten die Größe von 2x2x2 cm und wurden einzeln in Kunststofftüten abgepackt und bei -30°C bis zur weiteren Analyse eingefroren.

3.8.1. Aufbereitung des Blutes zur Vitamin E Bestimmung

Das zu untersuchende Serum wird bis zur weiteren Untersuchung tiefgefroren aufbewahrt. Zum Auftauen werden die Cups kurz in lauwarmes Wasser gelegt.

Für die Bestimmung der Vitamin E Konzentration im Serum werden folgende Materialien und Geräte benötigt:

- HPLC Probenfläschchen G8-2,5 br, 1,5ml, 32x11,5, braun (Firma: Chromatographie Handel Müller, Fridolfing)
- Mikroinsert für HPLC-Fläschchen, Öffnung = 5mm, 0,1ml, 30x5 mm, farblos, rund (Firma: Chromatographie Handel Müller, Fridolfing)
- Schraubkappe G8 für HPLC-Fläschchen, 1,3 mm, 35S, Silikon-weiß/PTFE-rot (Firma: Chroma)
- PS-1/2 Mikroküvetten (Firma: Brand GmbH & CoKG, Wertheim)

- Kühlzentrifuge, Laborzentrifuge Typ SIGMA 301 K, (Firma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz)
- Verdampfer
- Vortex-Schüttler, (Firma: Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz)

Folgende Lösungsmittel werden benötigt:

- Reinstwasser, hauseigene Herstellung (Anlage Seralpur delta, Firma: Seral Reinstwasser-Systeme, Ransbach-Baumbach)
- Ethanol, Lichrosolv, Firma Merck, Merck-Nr.:1.11727.1000
- Methanol, Lichrosolv, Firma Merck, Merck-Nr.:106007
- n-Hexan, Lichrosolv, Firma Merck, Merck-Nr.:104391
- Standardsubstanz Tocopherol Firma: SIGMA

HPLC- Anlage, HPLC- Bedienung:

- HPLC-Gerät mit Pumpe,
- Pumpe Merck HITACHI, Typ: L6200 (Firma: Merck KgaA, Darmstadt)

- Fluoreszenzdetektor, Firma Jasko, Typ: FP920 (Jasko Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland, Groß-Umstadt)
- Autosampler: SHIMADZU SIL-10 ADVP, (Firma: SHIMADZU, Neufahrn Freising)
- Chromatographiesäule: Lichrosorb Si 60, 5 μm , Länge 125 x \varnothing 4mm (Firma: GROM Chromatographie GmbH, Rottenburg-Hailfingen)

Die Serumröhrchen werden nach dem Auftauen kurz aufgeschüttelt. In die durchnummerierten ungeschliffenen Röhrchen werden jeweils 200 μl Reinstwasser und 200 μl des zu untersuchenden Serums gegeben. Um eine Proteinausfällung zu erzielen, werden 750 μl Ethanol zugegeben und jedes Röhrchen kurz, mittels Vortex-Schüttler aufgeschüttelt. Anschließend wird in jedes Röhrchen unter dem Abzug 1ml n-Hexan pipettiert und abermals mit dem Vortex-Schüttler geschüttelt. Nun wird das Röhrchen für 5 min bei 3000 Umdrehungen in die Zentrifuge gestellt. Durch das Zentrifugieren haben sich zwei Phasen gebildet. Die obere Phase wird vorsichtig abpipettiert und in ein geschliffenes Röhrchen mit identischer Kennzeichnung gegeben.

Es ist darauf zu achten, dass bei diesem Vorgang bei jedem Serumröhrchen eine neue Pipettenspitze verwendet wird.

Dieser Arbeitsschritt wird 2-mal wiederholt, d.h. es wird erneut in jedes ungeschliffene Röhrchen 1 ml Hexan gegeben, geschüttelt und nach anschließendem zentrifugieren die obere Phase in das entsprechende geschliffene Gläschen pipettiert. Durch das Wiederholen des Arbeitsschrittes kann die Extraktion verbessert werden (Zaman et al. 1993).

Nun werden die gewonnenen Proben für etwa 10 min bei 30°C in den Verdampfer gestellt und mittels Stickstoff bis zur Austrocknung verdampft. Danach werden 200 μl eines Gemisches, bestehend aus 80% Methanol und 20% Ethanol jedem Röhrchen hinzugefügt. Auf die Schliff Röhrchen kommt ein Stopfen und alle werden gut aufgeschüttelt. Aus jedem Probengefäß werden 150 μl abpipettiert und in ein braunes HPLC- Fläschchen mit Glaseinsatz gegeben.

Nun kann die Serum- Vitamin E Konzentration mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) gemessen werden. Falls die Probe nicht sofort weiter verarbeitet werden, müssen sie bei - 20°C tiefgefroren werden.

3.8.2. Aufbereitung der Organproben zur Vitamin E Bestimmung

Für die Bestimmung der Vitamin E Konzentration in den Organen werden folgende Geräte in 4-6 facher Ausführung, abhängig von der Zentrifugengröße benötigt:

- Plastikzentrifugenbecher mit mindestens 50-100 ml Fassungsvermögen
- 50 ml Messzylinder mit Schliff und passendem Stopfen
- Trichter
- 50 ml Messkolben
- Messpipetten 5-10 ml
- Schliffkölbchen ca. 25-50 ml
- HPLC Probenfläschchen mit Mikroinsatz und Deckeln
- Analysewaage Mettler PM 4000, Firma:Mettler-Toledo GmbH, Giessen
- Pürrierstab Typ Ultra-Turax (IKA T25), Firma Jahnke & Kunkel, Staufen i. Br.
- Kühlzentrifuge, Laborzentrifuge Typ SIGMA 301 K, Firma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
- Zentrifugenbecher Typ Tragbecher, Firma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
- Eindampfgerät oder ein Wasserbad mit Sauganschluss
- HPLC- Anlage

Als Lösungsmittel werden benötigt:

- 0,1 molare NaCl Lösung (52,56 g NaCl auf 1 Liter Wasser), Natriumchlorid der Firma Merck
- n- Hexan, Lichrosolv, Firma Merck, Merck-Nr.:104391
- Methanol, Lichrosolv, Firma Merck, Merck-Nr.:106007
- Standard Vitamin E, bzw. α - Tocopherol, Firma: SIGMA
- Zusätzlich benötigt man ein Gemisch aus 3 Teilen n-Hexan und 2 Teilen Isopropanol
- Sowie ein Gemisch aus Methanol und Äthanol im Verhältnis 8:2

Die Organprobe, die bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren waren, werden langsam im handwarmen Wasserbad aufgetaut. Aus der Organprobe werden 3 g herausgeschnitten, und aufs Milligramm genau, mit 2 Stellen nach dem Komma zur späteren exakten Berechnung abgewogen. Die Entnahme sollte möglichst aus der Mitte des Präparates erfolgen, um Gefrierbrand bedingte Schäden zu vermeiden. Die 3 g Probe wird in ein Plastikzentrifugenröhrchen gegeben und nochmals mit dem Skalpell zerkleinert.

Nach Zugabe von 10 ml des Isopropanol-n-Hexan Extraktionsgemisches wird die Probe für einige Sekunden mit dem Ultaturrax IKA T25 (Firma Jahnke & Kunkel) homogenisiert. Es ist darauf zu achten, dass das Gerät nicht heiß wird. Das Homogenisat wird nun für 10 min bei 3000 Umdrehungen/Minute und einer Temperatur von 3°C zentrifugiert.

Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand vorsichtig in ein 50 ml Messzylinder abpipettiert. Zum übrigen Bodensatz werden nun abermals 10 ml des Isopropanol-n-Hexan Extraktionsgemisches zugesetzt, abermals einige Sekunden gut homogenisiert und bei 3000U/ min zentrifugiert. Der Überstand wird in den gleichen Messzylinder gegeben. Dieser Vorgang des Extrahierens wird insgesamt 3-mal wiederholt, um eine vollständige Extration des Vitamin E zu gewährleisten.

Jedem nummerierten Messzylinder wird nun 10 ml einer 0,9 ml NaCl- Lösung zur besseren Phasentrennung hinzugegeben und ein paar Mal hintereinander kräftig geschüttelt. Nun lässt man das Gemisch 30-60 min bis zur völligen Phasentrennung in Ruhe stehen. Wenn sich beide Schichten klar von einander abgetrennt sind, pipettiert man vorsichtig die obere klarere Schicht (n-Hexan und Vit. E) mit einer Pipette in einen neuen 50 ml Messkolben mit der gleichen Probennummer ab.

Der übrig gebliebene wässrige Phase wird 5 ml n- Hexan zugegeben, kräftig geschüttelt, stehen gelassen und abermals abpipettiert. Die obere Phase wird dabei in den jeweiligen Messkolben gegeben. Dieser Vorgang des Nachextrahierens wird insgesamt 2-mal wiederholt. Zur anschließenden Berechnung der Vitamin E Konzentration wird ein definiertes Volumen benötigt. Um dieses zu erhalten, werden die Kolben alle auf 50 ml Inhalt mit n-Hexan aufgefüllt.

Falls der gewonnene Extrakt nicht gleich weiter verarbeitet wird, sollte es lichtgeschützt aufbewahrt werden.

Zur weiteren Bestimmung werden von den 50 ml aus dem Messkolben 10ml in einen Schliffkolben abpipettiert. Dieses Aliquot wird nun im Wasserbad bei 50°C mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe bis zur Trocknung eingedampft.

Es ist drauf zu achten, dass nach dem Verdampfen immer erst der Kolben vom Schliffgefäß abgezogen und danach die Pumpe ausgeschaltet wird. Werden die einzelnen Schritte des Versuchaufbaus nicht eingehalten, ist es möglich, dass aufgrund des Vakuums Wasser in den Schliffkolben angesogen wird. Hierdurch kann es zu Verfälschungen der Messergebnisse kommen.

In den Schliffkolben wird nun 1 ml Methanol gegeben und sofort mit einem geschliffenen Stopfen verschlossen. Nachdem die Probe gut durchgeschüttelt wurde, nimmt man 1ml der Probe auf und gibt sie in ein Plastikcup. In diesem Zustand kann man die Probe bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren aufbewahren.

Zur sofortigen Weiterverarbeitung gibt man 100µl mit der Pipette in einen Mikroeinzelbehälter eines HPLC- Cup.

Bestimmung der Vitamin E- Konzentration in den Serum- und Organproben mittels Hochdruckchromatographie.

HPLC-Anlage, HPLC-Bedingung:

- HPLC-Gerät mit Pumpe,
- Pumpe der Firma Merck HITACHI, Typ: L6200, Flussrate 1ml/min, Druck ca. 0,9 x100 kg/cm²
- Fluoreszenzdetektor, Firma Jasco, Typ: FP920
- Integrator, Firma: SHIMADZU C-R4 AX Chromatopac
- Autosampler: SIL-10 ADVP, Firma: SHIMADZU
- Eluent: Methanol, stellt die mobile Phase dar
- Säule: Lichrosorb Si 60 5 µ Länge125 x Ø 4mm, Firma: GROM, stellt die stationäre Phase dar
- Standard Tocopherol, Firma: SIGMA
- Retentionszeit: 1,5 min
- Vitamin E Ext.: 295 nm
- Emission: 330 nm

Das Aliquot von 20 µl auf die HPLC-Trennsäule geben und bei einer Retentionszeit von 1,4 Minuten eluieren, siehe Abbildung 10. Methanol ist hierbei die mobile Phase. Diese läuft mit einer Flussrate von 1ml/ Minute über die stationäre Phase, die Trennsäule. Anschließend bei einer Extinktion von 295 nm und einer Emission von 330 nm photometrisch messen. Die Auswertung erfolgt über externen Standard. Die Darstellung der errechneten Ergebnisse erfolgt in Form eines Chromatogramms, siehe Abbildung 10.

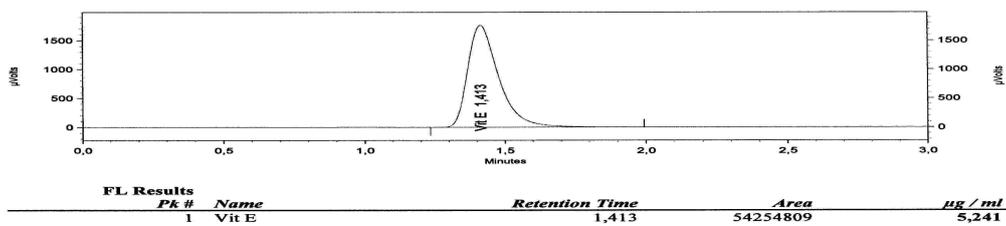


Abbildung 10: Chromatogramm Vitamin E

3.9. Gewinnung und Aufbereitung von Histologiepräparaten

Hergestellt wurden die Histoschnitte von Frau Silvia Mitterer im Institut der Anatomie der Ludwig- Maximilian – Universität München.

Im Institut wurde der gekühlte Darm in 6% gepuffertes Formalin gelegt.

Zur Darstellung der Lipide wird die Färbung Ölrot O gewählt. Da die Lösungsmittel im Histoprozessing und beim Entparaffinieren die Lipide herauslösen würden, müssen Gefrierschnitte verwendet werden.

Benötigte Lösungsmittel und Geräte:

- Kryostat der Firma Mikrom HM 500 OM
- Feather S 35 Einwegklingen
- 6% Formalin
- Superfrost Plus beschichtete Objektträger der Firma Menzel
- Isopentan
- 60% Isoprpanol
- Hämalaunlösung
- Aqua dest.
- Ölrot O

3.9.1. Herstellungsverfahren des Tissue Tec® -Schnittes:

- Das Darmstück wird vor der Bearbeitung halbiert. Eine Probenhälfte wird als Rückstellprobe eingefroren, die andere Hälfte wird 30 min mit fließendem Leitungswasser gewässert.
- Um Gefrierartefakte im anschließenden Verfahren zu vermeiden und bessere Ergebnisse zu erzielen, wird das Präparat über Isopentan Schock gefroren.
- Anschließend wird das Darmstück in Tissue Tec® eingebettet und abermals eingefroren.
- Standardtemperaturen sind hierbei: - 18° C Objektkühlung und -22° C Boxentemperatur

Beste Ergebnisse wurden mit folgenden Temperaturen erzielt:

- 25° C Objektkühlung und -27° C Boxtemperatur

- Nun ist das Präparat schnittfertig. Geschnitten wird das Darmstück im Kryostat (Firma: Mikrom HM 500 OM) mit Feather® S 35 Einwegklingen mit einem Schnittwinkel von 8 Grad.
- Zum Strecken verbringt man den Tissue Tec® -Schnitt in eine mit Aqu. dest. gefüllte Küvette. Die gefüllte Küvette ist gekühlt. Es ist darauf zu achten, dass sich keine Eisschicht auf der Oberfläche bildet.
- Der auf der Oberfläche schwimmende Tissue Tec® -Schnitt wird vorsichtig mittels Objektträger aus der Küvette entnommen.
- Das Präparat muss aus einem vollständig geschlossenen Darmrohr bestehen, da bei dieser Steckmethode ansonsten der Darmschnitt auseinander fließt. Alternativ empfiehlt sich den Schnitt direkt vom Messer auf einen Objektträger zu verbringen und ihn in der Wärme zu strecken.
- Die Schnitte werden in eine trockene Küvette verbracht und ohne weitere Fixierung (wie z.Bsp. mit Aceton) direkt gefärbt.

3.9.2. Färbehergang einer Fettfärbung mit Ölrot O:

- 1) Schnitte kurz (2 mal) in Leitungswasser hin und her ziehen
- 2) Anschließend 2 min in 60% Isopropanol geben
- 3) Danach 10 min in frisch filtriertes Ölrot O eintauchen
- 4) Abermals 2 min in 60% Isopropanol geben
- 5) kurz in Aqua dest. spülen
- 6) 5 min Gegenfärben mit Hämalaunlösung
- 7) nochmals in Aqua dest. spülen
- 8) Bläuen in fließendem Leitungswasser

Nachdem der Färbevorgang abgeschlossen ist, werden die Schnitte in Glyceringelatine nach Kaiser eingebettet, siehe Abbildung 10. Hierfür wird die Glyceringelatine im Wärmeschrank (60°C) erwärmt und erhält somit den flüssigen Aggregatzustand.

Benötigt werden für die Einbettung in Glyceringelatine:

- Glyceringelatine nach Kaiser
- runde Deckgläser
- eine Pipette
- eine Pinzette

Auf den angewärmten Objektträger mit dem Schnitt wird mittels Pipette ein Tropfen ebenfalls warmer Glyceringelatine gegeben. Ein rundes Deckglas wird über den Tropfen in Richtung Darmschnitt gezogen und vorsichtig abgelassen. Die runden Deckgläser dienen bei der Gelatineeindeckelung der Vermeidung von Luftblasen. Die fertigen Objektträger werden zum Abschluss noch für 10 min bei +4° C in den Kühlschrank gelegt, damit die Gelatine erkaltet und sich verfestigt.

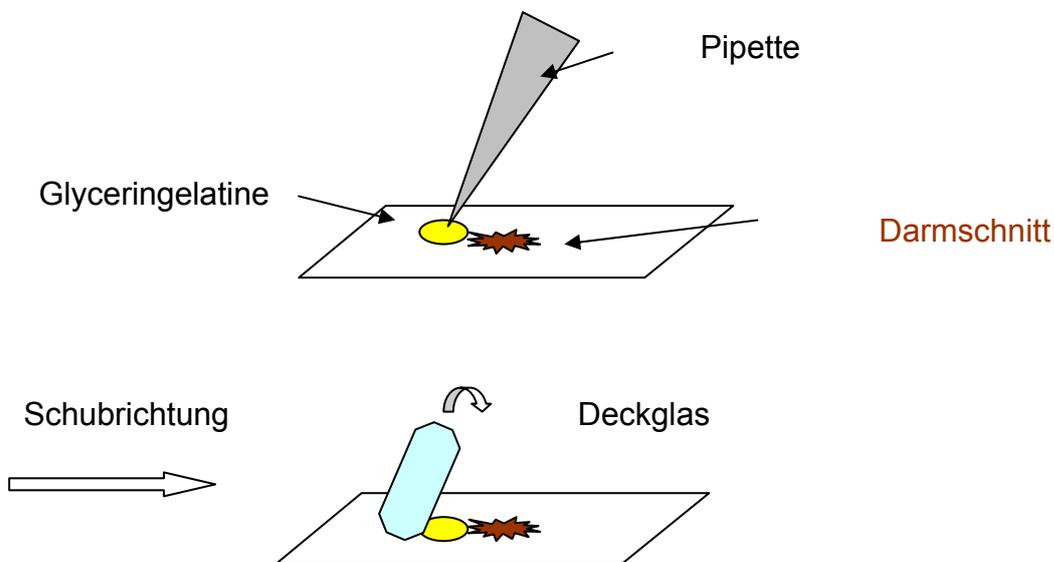


Abbildung 11: Einbettung des gefärbten Schnittes in Glyceringelatine

Es ist darauf zu achten, dass die Glyceringelatine nicht unbegrenzt haltbar ist. Im Kühlschrank kann das Präparat eine begrenzte Zeit aufbewahrt werden, ansonst empfiehlt es sich um den Deckglasrand einen Lack- oder Paraffinrand zu ziehen und das Präparat auf diese Weise zu versiegeln.

3.10. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm SAS (Statistical Analysis System).

Berechnet wurden folgende Parameter:

- Arithmetischer Mittelwert aus den Einzelwerten der Gruppen
- Standardabweichung als Maß für die Streuung der Daten um den Mittelwert
- Varianzanalysen zum Vergleich der Werte mehrerer Gruppen anhand des LS-Means-Tests

4. Ergebnisse

Die 45 Tiere, die zu Versuchsbeginn ein Gewicht von $18 \pm 3,2$ kg aufweisen, litten während der gesamten Versuchsperiode weder an Durchfall, noch an sonstigen Verdauungsproblemen, sondern wiesen einen optimalen Gesundheits- und Ernährungszustand auf. Die Tiere wurden mit normalem Aufzuchtsfutter, welches 60,00 mg Vitamin E/ kg enthielt, gefüttert und waren nicht Vitamin E depletiert.

Den Versuchstieren wurde einmalig vor oraler Applikation des jeweiligen Präparates 4 ml Blut aus der V. cava cranialis entnommen. Sowie ebenfalls 20 Minuten und nach 1, 3, 5, 6, 7, 12 und 24 Stunden nach oraler Verabreichung des jeweiligen Präparates.

4.1. Vitamin E Gehalt im Serum

Anhand der Serumwerte sollte verglichen werden, ob nach einer einmaligen oralen Vitamin E Applikation ein Unterschied in den beiden zu vergleichenden Präparaten existiert. Dies wurde mittels Gehalt im Serum und anschließenden Abbau von Vitamin E, bzw. dem Absinken der Vitamin E- Konzentration überprüft.

Der Vitamin E Gehalt im Serum der Kontroll-Gruppe war, trotz equivalenter Stressbelastung dieser Versuchsgruppe, während der gesamten Versuchsdauer konstant.

Die Werte der Kontroll-Gruppe lagen zwischen $4,98 \pm 0,53$ und $5,38 \pm 0,79$ $\mu\text{g} / \text{ml}$ Vitamin E, wie Tabelle 5 gezeigt.

In der Versuchsgruppe, die das Sanovital Präparat erhalten hat, konnte innerhalb der ersten 3 Stunden ein Anstieg der Vitamin E Konzentration verzeichnet werden. Nach 3 Stunden erreichen die Serumwerte dieser Gruppe mit $7,08 \pm 2,90$ $\mu\text{g} / \text{ml}$ Vitamin E ihr Maximum. Zu diesem Messzeitpunkt besteht ein signifikanter Unterschied

zwischen der Sanovital- Gruppe und der Kontrollgruppe, die ein Tocopherol Gehalt von $4,98 \pm 0,53 \mu\text{g} / \text{ml}$ Vitamin E im Serum aufweist.

In der Gruppe, die das Vergleichspräparat erhalten hat, kommt es ebenfalls nach 3 Stunden, zeitgleich mit der Sanovital- Gruppe, zu einem Anstieg der Vitamin E Konzentration auf $5,91 \pm 0,99 \mu\text{g/ml}$ Vitamin E. Dieser Wert liegt etwas unter dem der Sanovital-Gruppe, ist jedoch nicht signifikant kleiner. Die α - Tocopherol Anflutung hat zu diesem Zeitpunkt, 3 Stunden post interventionem, noch nicht ihr Maximum erreicht.

Im Zeitintervall 3 bis 7 Stunden nach Applikation des kommerziellen pulverisierten Vitaminpräparates verhalten sich die Serumwerte annähernd konstant.

12 Stunden nach Verabreichung des Vitamin E Bolus erreicht die Vergleichspräparat-Gruppe ihr Konzentrationsmaximum von $6,07 \pm 1,04 \mu\text{g} / \text{ml}$ Vitamin E. Dieses Maximum wird 9 Stunden zeitversetzt zur Sanovital Gruppe erzielt und erreicht eine geringe Anflutung im Serum, verglichen mit der Emulsionsform. Dieser Konzentrationspeak ist weder zur Kontrollgruppe, noch zur Sanovital- Gruppe signifikant. Nach 12 Stunden sinken auch in dieser Gruppe die Vitamin E Werte im Serum ab.

Die Serum Vitamin E Konzentrationen der Sanovital- Gruppe sinken bereits nach 3 Stunden wieder kontinuierlich. Der Abfall der Vitamin E Konzentration vollzieht sich in der Sanovital- Gruppe langsamer, verglichen mit der Gruppe, die das konventionelle Vitaminpräparat erhalten hat. Die Serumresponse der Sanovital- Gruppe liegt nach 24 Stunden noch bei $6,38 \pm 2,34 \mu\text{g} / \text{ml}$ Vitamin E, wobei sich der Vitamin E Gehalt im Serum der Vergleichspräparat- Gruppe nach 24 Stunden wieder den Werten der Kontrollgruppe angeglichen hat.

Die Messwerte zum Zeitpunkt 24 Stunden post interventionem liegen bei der Sanovital- Gruppe mit $6,38 \pm 2,34 \mu\text{g} / \text{ml}$ Vitamin E über den Werten der Vergleichspräparat- Gruppe, welche im Serum eine Konzentration von $5,34 \pm 1,49$ aufweist. Der Unterschied in den Konzentrationen der beiden Vitaminpräparate ist jedoch nicht mehr signifikant. Ebenfalls ist der Unterschied zwischen der Sanovital-Gruppe und der Kontrollgruppe nicht mehr signifikant.

Ein signifikanter Unterschied zwischen Sanovital Gruppe und Vergleichspräparat-Gruppe lässt sich, wegen der relativ hohen Streuung zu keinem Messzeitpunkt nachweisen, siehe Tabelle 5.

Tabelle 5: Serumresponse Vitamin E (in µg/ml Serum) in den drei Versuchsgruppen (Kontrolle, SanoVital, Vergleichspräparat) (Mittelwert \pm Standardabweichung) nach Gabe der Vitaminpräparate

Zeit post interventionem	Kontrollgruppe (n=15) Vitamin E	Versuchsgruppe „SanoVital“(n=15) Vitamin E	Versuchsgruppe „Vergleichspräparat“ (n=15) Vitamin E
0 min	5,38 \pm 0,79	5,74 \pm 1,86	5,21 \pm 0,79
20 min	5,01 \pm 0,45	5,59 \pm 2,04	5,08 \pm 0,70
1 Std	5,05 \pm 0,46	5,58 \pm 1,77	5,18 \pm 0,73
3 Std	4,98 \pm 0,53 ^b	7,08 \pm 2,90 ^a	5,91 \pm 0,99 ^{ab}
5 Std	5,15 \pm 0,46	6,95 \pm 2,49	5,89 \pm 1,33
6 Std	5,13 \pm 0,56	6,77 \pm 2,45	5,90 \pm 0,99
7 Std	5,26 \pm 0,47	6,67 \pm 2,58	5,89 \pm 0,92
12 Std	5,37 \pm 0,78	6,61 \pm 3,14	6,07 \pm 1,04
24 Std	5,29 \pm 0,58	6,38 \pm 2,34	5,34 \pm 1,49

a, b: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den 3 Versuchsgruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten

4.2. Vitamin E- Gehalte in den Organproben

Um die Organproben zu gewinnen, wurden den Tieren der Kontrollgruppe, der Sanovital- Gruppe und der Vergleichspräparat- Gruppe, nach einer 14- tägigen Auswaschphase, 4 ml, bzw. eine Kapsel des jeweiligen Präparates (Placebo, Sanovital, Vergleichspräparat) verabreicht.

Jeweils 5 Tiere pro Versuchsgruppe wurden nach 24, 48, 72 Stunden eingeschläfert. Sofort im Anschluss daran wurde jedem dieser Tiere Organgewebeproben (Leber, Niere, Lunge, Darmlymphknoten) entnommen. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -30C° tiefgefroren.

4.2.1. Vitamin E- Gehalt in der Leber

Die Vitamin E Konzentrationen der Kontrollgruppe, die das Placebopräparat erhalten hat, ist während der gesamten Versuchsdauer annähernd konstant. Die Werte liegen zwischen 22 ± 5 und $27 \pm 16 \mu\text{g} / \text{ml}$ Vitamin E. Die Vitamin E Konzentrationswerte liegen während der gesamten Versuchsperiode über den Werten der Sanovital- Gruppe. Signifikant ist dies zum Zeitpunkt 48 Stunden nach oraler Applikation des Präparates.

Bei der Vergleichspräparat- Gruppe ist ein ähnliches Phänomen aufgetreten. Auch bei dieser Gruppe liegen die Konzentrationsgehalte der Gewebeproben, die 24 und 48 Stunden post interventionem entnommen wurden unter den Werten der Kontrollgruppe. Hier besteht jedoch keine Signifikanz im Gehalt von Vitamin E in den Gewebeproben, weder 24 Stunden, noch Zeitpunkt 48 Stunden post interventionem. Im Unterschied zur Sanovital- Gruppe gleicht sich der Vitamin E Gehalt des Lebergewebes bei der Vergleichspräparat- Gruppe jedoch zum Zeitpunkt 72 Stunden post interventionem wieder den Werten der Kontroll- Gruppe an.

Die Konzentrationsverlaufskurve der Sanovital-Gruppe ist konkav. Sie sinkt zum Zeitpunkt 48 Stunden nach oraler Gabe des Vitaminpräparates ein und steigt zum Messzeitpunkt 72 Stunden wieder an und übersteigt sogar den Anfangsmesswert minimal.

Die Vitamin E Konzentration im Lebergewebe der Sanovital-Gruppe, mit $7 \pm 1 \mu\text{g} / \text{ml}$ Vitamin E, ist im Vergleich zur Kontrollgruppe, mit $24 \pm 10 \mu\text{g} / \text{ml}$ Vitamin E, zum Zeitpunkt 48 Stunden post interventionem signifikant ($p < 0,05$) erniedrigt, siehe Tabelle 6.

Die Konzentrationsverlaufskurve der Vergleichspräparat- Gruppe ist während den ersten beiden Messzeitpunkten konstant gleich, bei 13 ± 3 und $13 \pm 4 \mu\text{g} / \text{ml}$ Vitamin E. Zum Zeitpunkt 72 Stunden post interventionem ist die Vitamin E Konzentration auf $25 \pm 21 \mu\text{g} / \text{ml}$ Vitamin E angestiegen.

Der Vitamin E Gehalt in der Leber der Vergleichspräparat- Gruppe ($25 \pm 21 \mu\text{g} / \text{ml}$ Vitamin E) hat sich nach 72 Stunden den Konzentrationswerten der Leber der Kontrollgruppe, mit $27 \pm 16 \mu\text{g} / \text{ml}$ Vitamin E) annähernd angeglichen. Signifikanzen zwischen der Vergleichspräparat- und Kontroll- Gruppe lassen sich zu keinem Zeitpunkt nachweisen, siehe Tabelle 6.

Tabelle 6: **Vitamin E** Gehalte in der **Leber** ($\mu\text{g/g}$ uS) in den drei Versuchsgruppen (Kontrolle, SanoVital, Vergleichspräparat) (Mittelwert \pm Standardabweichung) nach Gabe der Vitaminpräparate

Zeit post interventionem	Kontrollgruppe (n=5) Vitamin E			Versuchsgruppe „SanoVital“(n=5) Vitamin E			Versuchsgruppe „Vergleichspräparat“(n=5) Vitamin E		
24 h	22	\pm	5	15	\pm	12	13	\pm	3
48 h	24	\pm	10^a	7	\pm	1^b	13	\pm	4^{ab}
72 h	27	\pm	16	19	\pm	7	25	\pm	21

a,b: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den 3 Versuchsgruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten

4.2.2. Vitamin E- Gehalt in der Niere

Anhand der Werte, die bei der Analyse der Vitamin E Konzentration des Nierengewebes ermittelt wurden, lassen sich während der ganzen Versuchsdauer bei allen drei Versuchsgruppen (Kontrolle, Sanovital und Vergleichspräparat) keine signifikanten Unterschiede aufzeigen, siehe Tabelle 7.

Die Werte der Kontrollgruppe waren im Zeitintervall 0 bis 72 Stunden annähernd konstant zwischen 20 ± 2 und 21 ± 1 μg Vitamin E/ g Nierengewebe.

Bei der Sanovital- Gruppe schwankten die Werte zwischen 20 ± 3 und 23 ± 2 μg Vitamin E/ g Nierengewebe. Leicht erhöhte Vitamin E Konzentrationen, im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsgruppen, lassen sich nur zum Zeitpunkt 24 Stunden post interventionem verzeichnen. Der Konzentrationsunterschied ist jedoch nicht so ausgeprägt, dass man von einer Signifikanz sprechen könnte, siehe Tabelle 7.

Bei der Vergleichspräparat- Gruppe kam es ebenfalls nur zu geringfügigen Schwankungen der Vitamin E Konzentration im untersuchten Gewebe. Hier befanden sich die ermittelten Werte zwischen 21 ± 2 und 22 ± 2 μg Vitamin E/ g Nierengewebe, siehe Tabelle 7.

Tabelle 7: Vitamin E Gehalte in der Niere (μg /g uS) in den drei Versuchsgruppen (Kontrolle, SanoVital, Vergleichspräparat) (Mittelwert \pm Standardabweichung) nach Gabe der Vitaminpräparate

Zeit post interventionem	Kontrollgruppe (n=5) Vitamin E			Versuchsgruppe „SanoVital“(n=5) Vitamin E			Versuchsgruppe „Vergleichspräparat“(n=5) Vitamin E		
24 h	21	\pm	1	23	\pm	2	21	\pm	2
48 h	21	\pm	1	22	\pm	3	21	\pm	5
72 h	20	\pm	2	20	\pm	3	22	\pm	2

4.2.3. Vitamin E- Gehalt in der Lunge

Die Vitamin E Konzentrationen der Kontrollgruppe sind zu den untersuchten Zeitpunkten 48 und 72 Stunden post interventionem mit 17 ± 3 und 17 ± 5 μg Vitamin E pro Gramm untersuchter Substanz fast gleich. Zum Entnahmezeitpunkt 24 Stunden post interventionem liegt der Wert mit 20 ± 7 μg Vitamin E/g untersuchter Substanz etwas höher, jedoch ist auch hier der Streufaktor größer, siehe Tabelle 8.

Die Konzentrationen der beiden anderen Gruppen, denen Vitamin E als Bolus, oder als Kapsel verabreicht wurde, lagen während des gesamten Versuches geringgradig oberhalb der Werte der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant, siehe Tabelle 8.

Tabelle 8: Vitamin E Gehalte in der Lunge (μg /g uS) in den drei Versuchsgruppen (Kontrolle, SanoVital, Vergleichspräparat) (Mittelwert \pm Standardabweichung) nach Gabe der Vitaminpräparate

Zeit post interventionem	Kontrollgruppe (n=5) Vitamin E			Versuchsgruppe „SanoVital“(n=5) Vitamin E			Versuchsgruppe „Vergleichspräparat“(n=5) Vitamin E		
24 h	20	\pm	7	22	\pm	9	25	\pm	9
48 h	17	\pm	3	25	\pm	7	24	\pm	15
72 h	17	\pm	5	22	\pm	8	22	\pm	12

4.2.4. Vitamin E- Gehalt in den Darmlymphknoten

Die Vitamin E Konzentrationen in den Darmlymphknoten, innerhalb der 3 Versuchsgruppen, weisen zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung signifikante Unterschiede auf, siehe Tabelle 9.

Tabelle 9: Vitamin E Gehalte in den **Darmlymphknoten** ($\mu\text{g} / \text{g uS}$) in den drei Versuchsgruppen (Kontrolle, SanoVital, Vergleichspräparat) (Mittelwert \pm Standardabweichung) nach Gabe der Vitaminpräparate

Zeit post interventionem	Kontrollgruppe (n=5) Vitamin E			Versuchsgruppe „SanoVital“(n=5) Vitamin E			Versuchsgruppe „Vergleichspräparat“(n=5) Vitamin E		
24 h	52	\pm	5	48	\pm	6	49	\pm	17
48 h	54	\pm	8	47	\pm	17	53	\pm	10
72 h	63	\pm	17	64	\pm	42	53	\pm	28

4.3. Histologieschnitte

In diesem Versuchsteil wurden ausschließlich Tiere herangezogen, die der SanoVital- Gruppe angehörten. Einige Tiere wurden direkt nach der Auswaschphase zur Entnahme eines Dünndarmabschnittes getötet. Der Rest der Tiere erhielt nochmals einen einmaligen Bolus von 4 ml Sanovital und wurde dann, ebenfalls gruppenweise nach 10, 20 und 60 Minuten zur Entnahme von Darmgewebe, bzw. 20 und 40 Minuten zur Entnahme von Lymphknotengewebe getötet.

Mit dem Darm- und Lymphknotengewebe wurde wie in Kapitel: Material und Methoden beschrieben verfahren.

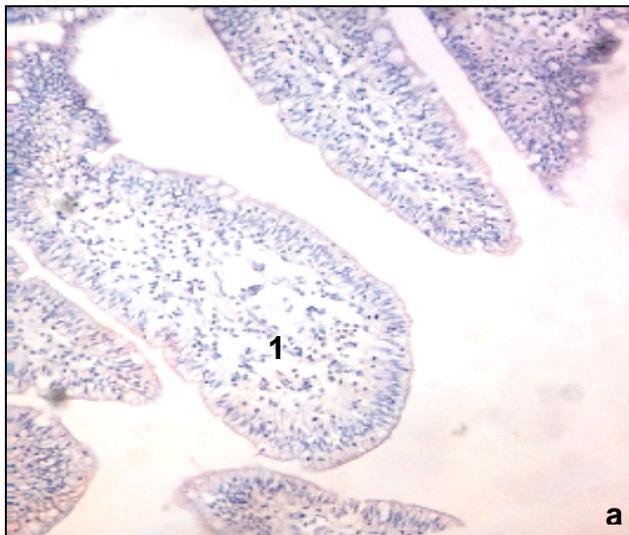
Da das Sanovital Präparat aus einer Milchfett- Tropfen- Emulsion besteht lässt sich der Resorptionsweg mittels der Fettfärbung Öl- Rot histologisch darstellen.

Für die Auswertung sind nur ausgewählte Histologieschnitte verwendet worden. Sie wurden mit 10 und 20 facher Vergrößerung (V10 und V20) betrachtet.

4.3.1. Histologieschnitte vor oraler Applikation

Vor der oralen Applikation lassen sich bei der histologischen Betrachtung des Dünndarmgewebes, weder im Epithelbesatz und im zentralen Lymphgefäß der Zotten, noch im Lymphsinus, der Submucosa und in der Mukosa der Dünndarmwand Fetttröpfchen identifizieren. Emulsionströpfchen sind in Abbildung 12 Schnitt a) und b) nicht zu erkennen. Deutlich unterscheiden sich arterielle und venöse Gefäße in Abbildung 12 Schnitt b).

a) V10



b) V20

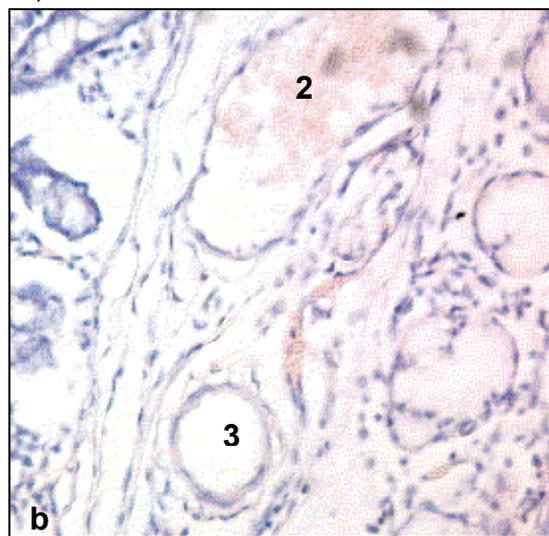


Abbildung 12: Dünndarmgewebe vor oraler Verabreichung der Sanovital AE Emulsion

- 1 Darmzotte
- 2 venöses Gefäß, gefüllt mit Erythrozyten
- 3 arterielles Gefäß

4.3.2. Darmhistologieschnitte nach oraler Applikation der Emulsion

Darmhistologieschnitte 10 min post interventionem

Anhand der Schnitte, die 10 Minuten nach Verabreichung des emulgierten Vitaminpräparates entnommen wurden, lassen sich bereits nach kurzer Zeit vereinzelt Emulsionströpfchen in den Räumen des Lymphplexus der Submucosa

identifizieren. Die Blutgefäße sind frei von angefärbten Fetttropfchen, hier lassen sich im mikroskopischen Schnitt ausschließlich Erythrozyten darstellen, siehe Abbildung 13.

a) V10

b) V20 Ausschnittsvergrößerung von a)

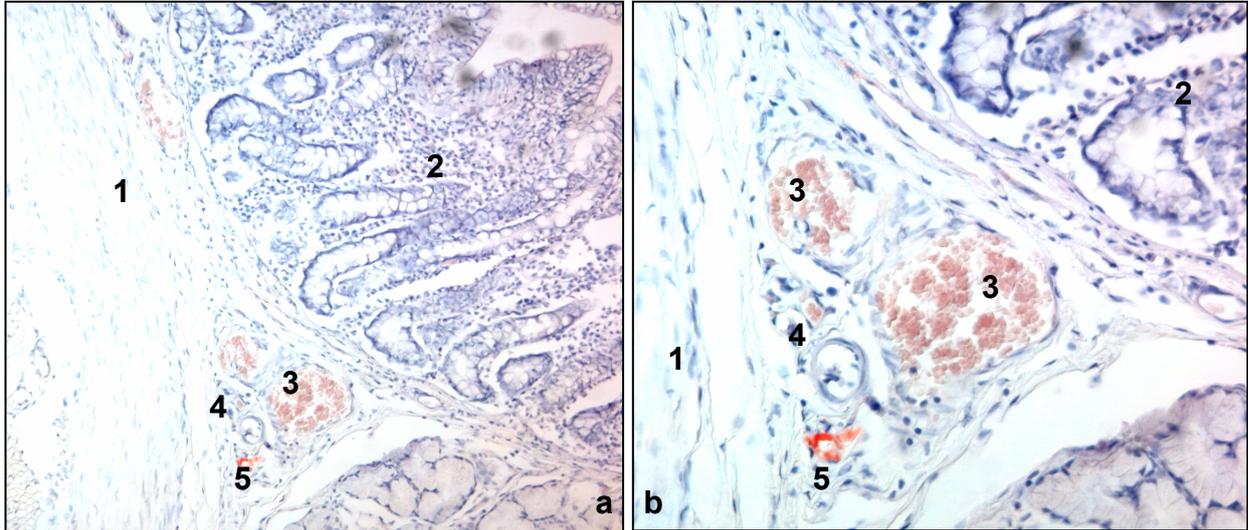


Abbildung 13: Histologische Schnitte des Dünndarms 10 Minuten nach oraler Applikation von 4 ml Sanovital AE

- 1 Bindegewebe
- 2 Darmzotten
- 3 Gefäß (venös), gefüllt mit Erythrozyten
- 4 Gefäß (arteriell)
- 5 Lymphgefäß (gefüllt mit Fetttropfchen)

In der Ausschnittsvergrößerung lassen sich die Fetttropfchen im Lymphgefäß deutlich darstellen. Zu diesem Zeitpunkt, 10 Minuten nach Aufnahme in den Organismus sind es jedoch nur vereinzelte rot angefärbten Emulsionströpfchen. Es lässt sich klar erkennen, dass die Gefäße frei von angefärbten Fetttropfchen sind. Im venösen Gefäß sind rötliche Erythrozyten zu sehen.

Darmhistologieschnitte 40 min post interventionem

Im Vergleich zu den vorherigen Dünndarmschnitten der Tiere, denen 10 Minuten post interventionem das zu untersuchende Darmstück entnommen wurde, lassen sich nach 40 Minuten nach oraler Applikation der Sanovital AE Emulsion deutlich größere

Mengen an Fetttröpfchen in den Lymphgefäßen und im Lymphsinus der Submucosa und der Mukosa identifizieren, siehe Abbildung 14.

Anhand der Abbildung 14, Schnitte a, b, c, d, e, welche alle 40 Minuten post interventionem angefertigt wurden, lässt sich der Resorptionsweg des emulgierten Vitaminpräparates verdeutlichen. Die Schnitte a), c) und e) wurden mit einer 10 fachen Vergrößerung und die Schnitte b) und d) mit einer 20 fachen Vergrößerung betrachtet.

Abbildung 14 Schnitt a) zeigt, in der 10 -fachen Vergrößerung, den prägnant prall angefüllten Lymphsinus der Lymphsinus der Submucosa. Im Unterschied zu den Histologiepräparaten, welche 10 Minuten post interventionem gemacht wurden, erkennt man hier eine deutlich höhere Menge resorbierter Fettemulsionströpfchen.

Anhand der Abbildung 14, Schnitt b) und d) lässt sich die Anreicherung der Fettemulsionströpfchen im Lymphgefäß dokumentieren.

Abbildung 14, Schnitt e) verdeutlicht den Resorptionsweg der Emulsionskügelchen von den Zottenspitzen in das zentrale Lymphgefäß der jeweiligen Zotte. In den Schnitten a) und c) sind die Fettemulsionströpfchen bereits im Lymphplexus, deutlich an den rot angefärbten Lymphgefäßen zu erkennen. Die Fetttröpfchen werden über die Zotten des Dünndarms auf lymphatisch- korpuskulärem Weg resorbiert, da sich in den Blutgefäßen keine Fettemulsionströpfchen nachweisen lassen. Da die Emulsionströpfchen bei der Resorption aus dem Darmlumen nicht enzymatisch gespalten werden bleibt die rote Färbung der Fetttröpfchen bestehen.

Abbildung 14: a, b, c, d, e: Histologische Dünndarmschnitte 40 Minuten nach oraler Verabreichung des Sanovital Präparate. - nächste Seite-

- 1 Darmzotten
- 2 Fettemulsionströpfchen (dunkelrot)
- 3 Bindegewebe
- 4 Gefäß (venös) mit Erythrozyten

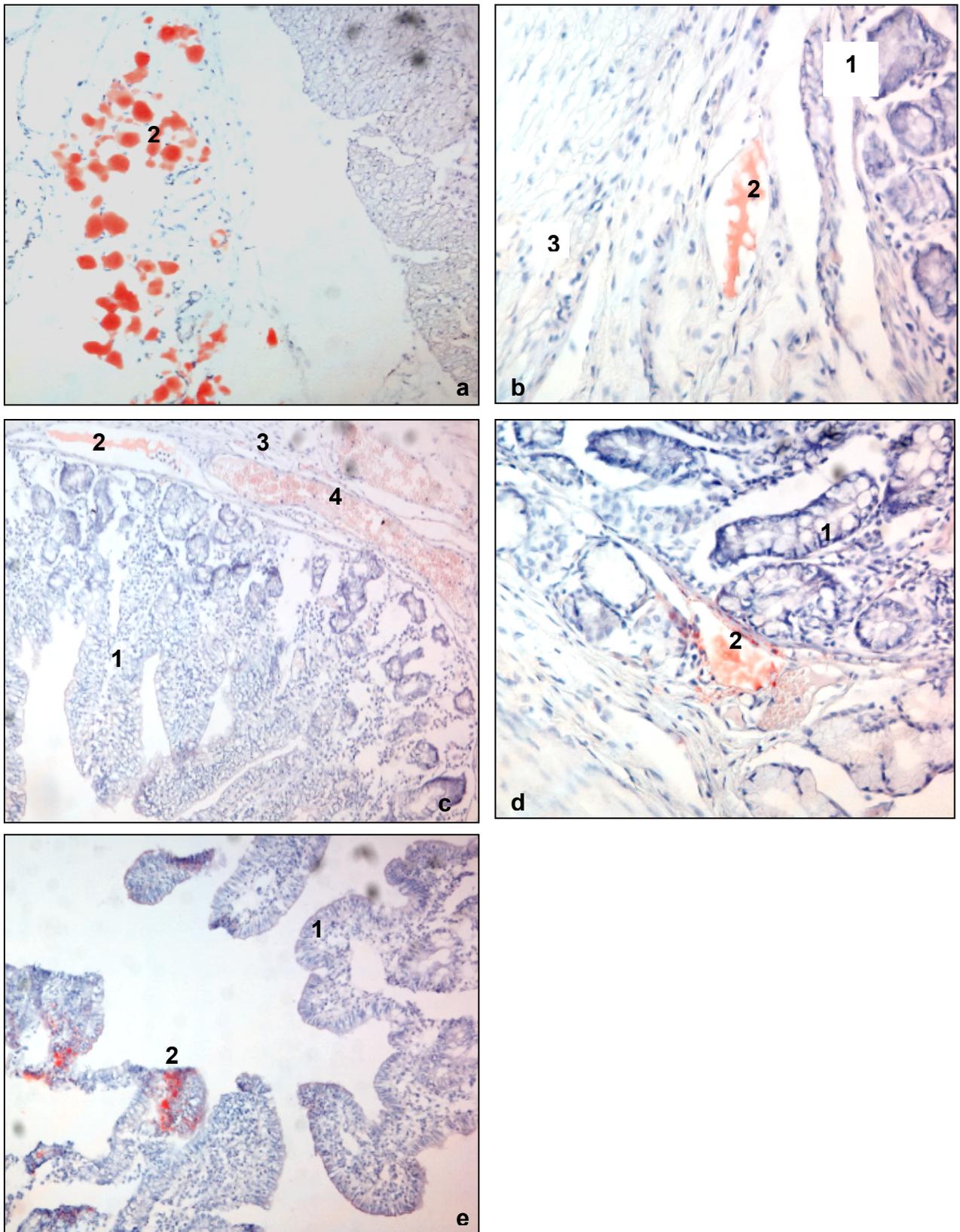


Abbildung 14: Histologischer Schnitt des Dünndarms vom Schwein 40 Minuten nach oraler Applikation von 4ml Sanovital AE Emulsion

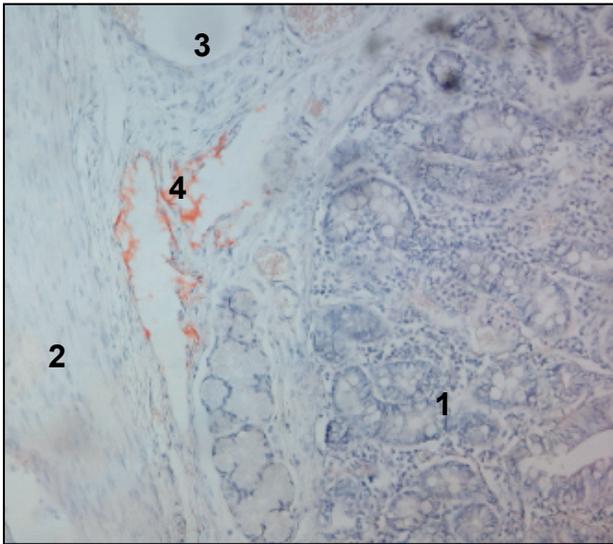


Abbildung 15: Histologischer Schnitt des Dünndarms 60 Minuten nach oraler Applikation von 4 ml Sanovital AE, V 10

- 1 Darmzotten
- 2 Bindegewebe
- 3 Gefäß
- 4 Lymphgefäß, angereichert mit Fettemulsionströpfchen

Innerhalb 60 Minuten post interventionem der Vitaminemulsion sind die Lymphgefäße, auch bei Vergrößerung V10 deutlich mit Fettemulsionströpfchen angereichert, siehe Abbildung 15.

Abbildung 16: a, b, c, d, : Darmlymphknoten, a) vor, b) 20 Minuten, c) und d) 40 Minuten nach oraler Verabreichung des Sanovital Präparate. a, c, d sind V20, b ist V10 - nächste Seite-

- 1 Lymphknotengewebe
- 2 Fettemulsionströpfchen

4.3.3. Lymphknotengewebe aus dem Dünndarm

Für die Auswertung sind nur ausgewählte Histologieschnitte herangezogen worden. Die Schnitte sind mit einer Vergrößerung von V 10 (Abb. 16b) und V 20 (Abb. 16 a, c, d) begutachtet worden.

Die Dünndarmabschnitte sind in einem Zeitintervall von 20 Minuten, sowie von 40 Minuten post interventionem gewonnen worden.

Abbildung 16, Schnitt a, ist physiologisches Lymphknotengewebe vor oraler Applikation der Vitaminemulsion. Im Lymphgewebe sind nur ganz vereinzelt Fettemulsionströpfchen (rot) zu identifizieren.

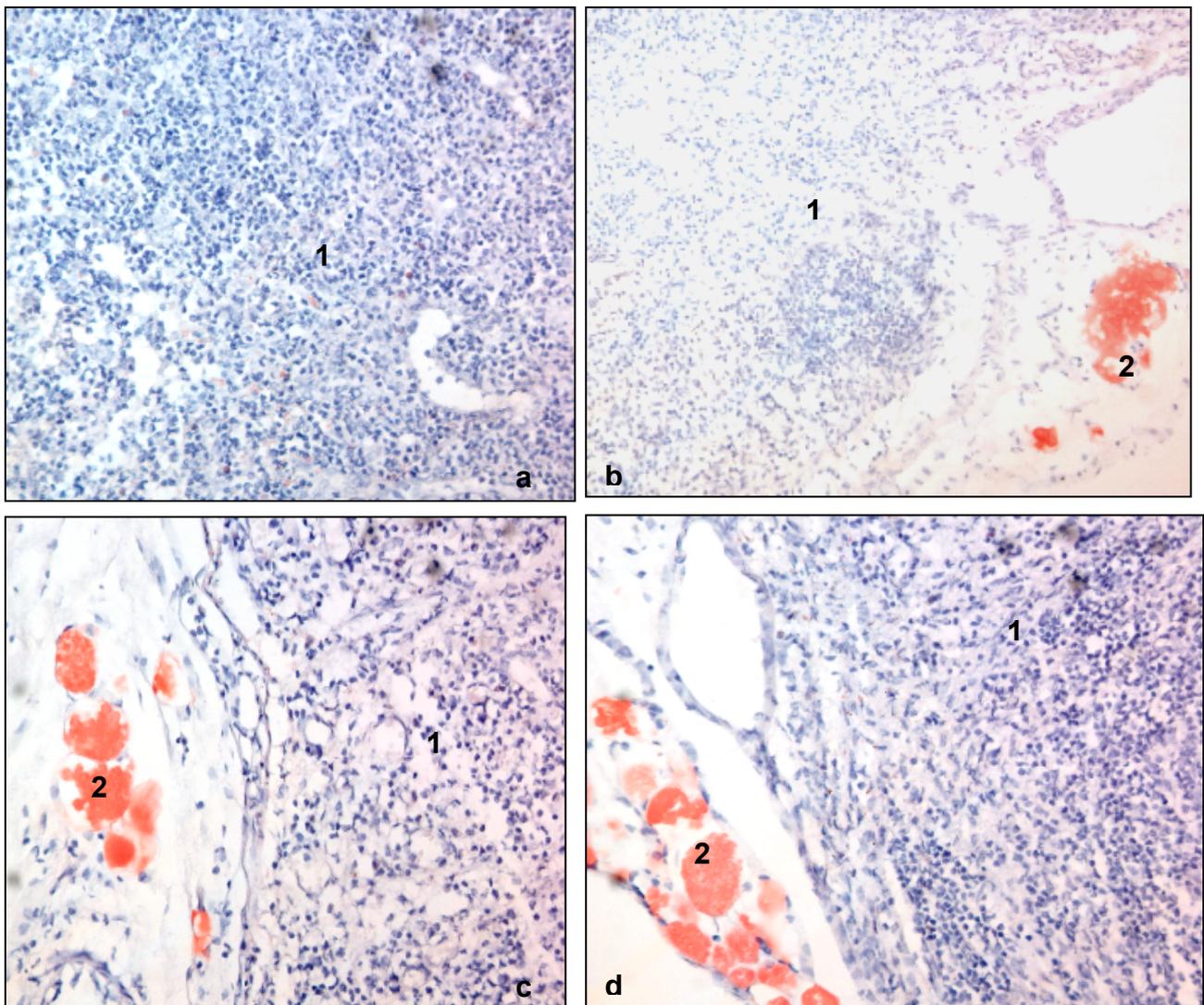


Abbildung 16: Darmlymphknoten a) vor, b) 20 Minuten, c) und d) 40 Minuten nach oraler Verabreichung von 4 ml Sanovital AE

Bereits nach 20 Minuten lassen sich verstärkt Fettemulsionströpfchen im histologischen Bild nachweisen. Nach einer Zeitspanne von 40 Minuten nach oraler Verabreichung der Vitamin E- Emulsion stellt sich histologisch eine deutliche Akkumulation von Fetttröpfchen in den Lymphgefäßen dar, siehe Abbildung 16 b, c, d).

5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit ist den Resorptionsweg, die Resorptionsgeschwindigkeit und die Resorptionsmenge von Vitamin E beim heranwachsenden Schwein aufzuzeigen. Hierfür wurde das fettlösliche Vitamin E in unterschiedlichen Wirkstoffformulierungen verabreicht. Die einmalig, oral applizierten Präparate bestanden aus einem konventionellen pulverisierten Vitaminpräparat, bestehend aus einer Gelantinekapsel und einer Vitamin E- haltigen Emulsionslösung, der „Sanovital AE“ Emulsion.

Es wurden Serumproben angefertigt, welche in unterschiedlichen Zeitintervallen entnommen wurden. Die Ergebnisse sollten die Anflutung, die Maxima und das Abfluten der Tocopherol -Konzentrationen im Blut zeigen. Die Anreicherung von Vitamin E in Kombination mit Vitamin A sollte in ausgewählten Organen (Leber, Niere, Lunge, Darmlymphknoten) nachgewiesen werden. Dazu wurde die Verteilung und Speicherung der beiden zu vergleichenden Präparataufbereitungsformen analysiert. Um die Resorption im Organismus zu verfolgen und zu belegen, wurden zusätzlich vom Dünndarm histologische Schnitte angefertigt.

5.1. Methodik

Zum Studiendesign und zur Studiendurchführung

5.1.1. Tiermodell

Die Ferkel sind eine Gebrauchskreuzung aus Deutsche Landrasse und Pietran. Diese Kreuzung wird auch unter praxisüblichen Bedingungen in der Schweinemast verwendet. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn 6 Wochen alt und nach Geschlecht, Gewicht und Wurf randomisiert. Zusätzlich wurden sie in drei Versuchsgruppen zu jeweils 15 Tieren aufgeteilt. Zu Versuchsbeginn wogen die Tier $18 \pm 3,2$ Kilogramm. Am Ende der Versuche hatten die Tiere in physiologischer Weise entsprechend der Mastzeit zugenommen. Rückschlüsse auf eine bessere Futtermittelverwertung oder ein

höheres Mastendgewicht lassen sich mittels dieser kurzen Versuchsperiode nicht ziehen. Referenzwerte für das Endgewicht lassen sich nicht heranziehen, da die Läufer vor Ende der Mastperiode getötet und nicht nochmals gewogen wurden.

Das Alter der Tiere spielt gerade in diesem Resorptionsversuch eine bedeutende Rolle. Jungtiere resorbieren Vitamine besser als ältere Tiere (Anderson et al. 1995, beim Schwein; Borel et al. 1997, beim Mensch). Während des Hauptversuches waren die Ferkel einzeln aufgestellt, um den Habitus und den Gesundheitsstatus der Tiere, hinsichtlich Fressunlust und Magen- Darm- Erkrankungen besser überprüfen zu können. Durchfallerkrankungen traten im Versuchszeitraum nicht auf. Dies ist hinsichtlich der Resorptionsfähigkeit und der Resorptionsmenge der fettlöslichen Vitamine im Dünndarm von großer Bedeutung.

5.1.2. Ablauf der Studie

Nach der Einteilung in die 3 Versuchsgruppen erhielt die:

- erste Versuchsgruppe einmalig oral einen Bolus von 4 ml Wasser (Placebo) in einer Einwegspritze.
- zweite Versuchsgruppe einmalig oral ein konventionelles Vitaminpulver in einer Gelatine kapsel mit 300.000 IE Vitamin A und 200 mg Vitamin E.
- die dritte Versuchsgruppe einmalig oral 4 ml des Vitaminpräparates – Sanovital-, mit ebenfalls 300.000 IE Vitamin A und 200 mg Vitamin E in emulgierter Form.

Entsprechend dem Körpergewicht der Tiere wurde die zu entnehmende Blutmenge berechnet. Den Tieren wurde in unterschiedlichen Zeitabständen jeweils 4 ml Blut aus der V. cava cranialis entnommen. Die erste Blutentnahme erfolgte vor Verabreichung des zu untersuchenden Präparates. Die weiteren Messzeitpunkte waren 20 Minuten, sowie 1, 3, 5, 6, 7, 12 und 24 Stunden post interventionem. Es wurde mit allen 3 Gruppen (Kontroll-, Vergleichspräparat- und Sanovital- Gruppe) gleich verfahren.

Zu Versuchsende wurden jeweils 5 Tiere der 3 Versuchsgruppen nach 24, 48 und nach 72 Stunden getötet. Sofort nach der Tötung wurden den Tieren Gewebeproben von Lungen, Leber, Niere und Darmlymphknoten entnommen.

5.1.3. Fütterung der Tiere

Die Versuchstiere wurden ad libitum gefüttert und getränkt. Um realistische Praxisbedingungen zu schaffen, auch hinsichtlich des Vitamin E Status der heranwachsenden Schweinen, wurden die Versuchstiere nicht Vitamin E depletiert. Eine Vitamin E Verarmung ist unter Praxisbedingungen schwierig bis nicht möglich, da die einzelnen Futterkomponenten Vitamin E -haltig sind (Grünfutter, Pellets) und über ölige Futterkomponenten immer fettlösliche Vitamine dem Organismus zugeführt werden. Eine Vitamin E -verarmte Fütterung ist nur mittels eines semi-synthetischen Futters möglich. Vitamin E depletierte Ferkel einzusetzen war jedoch nicht Ziel dieser Studie.

Die Ferkel in diesem Versuch erhielten ein konventionelles Ferkel -Aufzuchtsfutter, welches kein zusätzliches Fett enthielt. Es ist jedoch zu beachten, dass der Fettgehalt der Ration einen wesentlichen Einfluss auf den Vitamin E Gehalt der Tiere hat. Bei Verfütterung von sehr fettreichen Rationen kommt es zum Anstieg der Malondialdehyde im Plasma, dies weist auf einen Anstieg der Lipidperoxidation hin, dies hat ein Absinken der α - Tocopherol Konzentration zur Folge (Nair et al. 1993). Dieses wechselseitige Zusammenspiel von Vitamin E und Fettgehalt der Ration ist zu berücksichtigen und kann bei Varianzen der Fettkomponente zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

In Tabelle 4, Kapitel: Material und Methoden ist die Zusammensetzung, hinsichtlich Inhalts- und Zusatzstoffe des Ferkelfutters aufgeschlüsselt. Der Vitamin E Gehalt des Futters betrug in dieser Studie 60,00 mg pro Kg Diät, dies entspricht den Dosierungsempfehlungen der AWT für Ferkel.

Die Tiere erhielten zusätzlich zur Ration und darin enthaltenen Vitaminen einmalig einen 4 ml Bolus Sanovital oder das Vergleichspräparat, bzw. das Placebo in Form einer Gelatine kapsel oral verabreicht. Der Bolus und die Kapseln enthielten jeweils 300.000 IE Vitamin A und 200 mg Vitamin E.

5.2. Vitamin E Gehalt im Serum

Den Tieren wurde vor Applikation der unterschiedlichen Vitamin E -Präparate Blut entnommen. Im Anschluss daran erhielten die Versuchstiere einmalig einen Bolus von 4 ml Sanovital, bzw. eine Gelatine kapsel des zu vergleichenden Vitaminpräparates. Daraufhin wurde den Schweinen abermals nach 20 Minuten, 1, 3, 5, 6, 7, 12 und 24 Stunden 4 ml Blut aus der Vena jugularis cranialis entnommen. Die Intervalle der Blutentnahmen wurden in einem vorangestellten Vorversuch ermittelt und hier übernommen (Lambrecht 2006). Eine Überprüfung des Serums hinsichtlich möglicher Tocopherol –Konzentrationsänderungen in einem Zeitrahmen von bis zu 24 Stunden nach Applikation wurde als ausreichend erklärt.

Im allgemeinen Überblick stellte sich folgendes heraus:

- Der Vitamin E Serum Gehalt der Kontrollgruppe, die ein Placebopräparat erhalten hatte, blieb während der gesamten Versuchsdauer konstant.
- Unterschiede waren zwischen den einzelnen Versuchsgruppen, Sanovital und Vergleichspräparat- Gruppe zu erkennen. Hier zeigten sich Differenzen in der Anflutung, dem Zeitpunkt der maximalen Vitamin E Konzentration im Blut, sowie dem Verhalten nach Erreichen des Konzentrationspeaks. Die Verlaufskurven sind in Abbildung 17 in Relation gesetzt, siehe Abbildung 17.

- Signifikante Unterschiede waren nur zwischen der Kontroll- und der Sanovital-Gruppe nachzuweisen.

Zu diskutieren wäre, ob ein direkter Vergleich zwischen den beiden Präparaten mit der Placebo- Gruppe als Basiswert aufschlussreich genug ist. Eventuell hätte als Kontrollgruppe eine Gruppe herangezogen werden können, der Vitamin E intra venös appliziert wird. Die hierbei gewonnenen Werte hätten als Basiswerte dienen können, um diese mit der Sanovital- Gruppe in Bezug zu setzen. Dies könnte in einer nachfolgenden Studie verwirklicht und mit Hilfe dieser Arbeit diskutiert werden.

Die Autoren Wilkens und Kümmerlen (1973), welche den Begriff perorale Injektion prägten, vermuteten einen fast identischen Wirkungseintritt von i.v. injizierten wie von oral verabreichten emulgierten Vitaminpräparaten. Somit wäre ein direkter Vergleich möglich.

Bei Verabreichung eines fettlöslichen nicht emulgierten Vitaminpräparates ist im Gegensatz zur unveränderten Resorption des emulgierten Vitamins, die Spaltung und der Umbau im Dünndarm zu beachten. Dies kann zu einer späteren, zeitversetzten Resorption und eventuell durch intestinale Verluste zu einem geringen Resorptionsvolumen führen. Mit Hilfe der intra venösen verabreichten Vitamin-Emulsion, und deren Konzentrationswerte im Serum, ließe sich die tatsächlich im Magen- Darm- Trakt resorbierte Menge an emulgiertem Vitamin E im Vergleich zur definierten i.v. applizierten und zirkulierenden Menge in Relation setzen.

Ein weiterer positiver Effekt der oral verabreichten emulgierten fettlöslichen Vitamine ist die Resorption unabhängig vom Gesundheitszustand der Tiere. Gerade Ferkel neigen unter Stresssituationen und Futterumstellung zu Steatorrhoe, einer nichtinfektiösen Diarrhoe, bei der es infolge von Zottenatrophie zur Malabsorption von Fetten kommen kann. Tieren, die an Fettresorptionsstörungen erkrankt sind, sind in der Lage Vitamin E in emulgierter Formulierung aufzunehmen. Dies ist von nicht zu unterschätzender Bedeutung, da gerade kranke, geschwächte, kachektische und mangelernährte Tiere, bedingt durch Magen-Darm-Erkrankungen oder Lebererkrankungen einen erhöhten Vitaminbedarf aufweisen.

Bei Verabreichung eines fettlöslichen nicht emulgierten Vitaminpräparates ist, im Gegensatz zu emulgierten Vitaminpräparaten, die enzymatische Spaltung im Dünndarm im Bezug auf die Resorptionszeit zu berücksichtigen.

Erkenntnisse aus der Humanmedizin im Jahre 2000 von Julianto und seine Kollegen, welche an gesunden männlichen Probanden Unterschiede, hinsichtlich der Bioverfügbarkeit von emulgiertem Vitamin E und nicht emulgiertem Vitamin E in einer Gelatinekapsel ausgewertet hatten, zeigen ebenfalls Differenzen im Resorptionsverhalten. Aufbauend auf die damals gefundenen Ergebnisse am Mensch, dient diese Arbeit der Überprüfung eine gesteigerte Resorption pro Zeiteinheit, wobei das zu erreichende Maximum des Vitamingehaltes im Blut früher erreicht und größer ausfallen soll. Mittels Applikation von fettlöslichen emulgiertem Vitamin E konnte dies vergleichend mit einer Kontrollgruppe, sowie einer Vergleichspräparatgruppe beim beim Ferkel gezeigt werden, siehe Abbildung 17. Die Gabe von emulgiertem Vitamin E führt demnach beim heranwachsenden Schwein zu einem ähnlichen Resorptionsbild wie beim Mensch.

Ein Vergleich mit einer Gruppe, der die Vitamin- Öllösung intramuskulär verabreicht wird, ist in dieser Studie nicht sinnvoll. Es ist erwiesen, dass diese i.m. verabreichten Lösungen zu Ölabszessen neigen und die Resorption hierdurch erheblich verringert wird (Wagner 1954).

5.2.1. Anflutung im Serum

In der hier durchgeführten Studie führt die Verabreichung der emulgierten Wirkstoffformulierung in der Sanovital- Gruppe bereits nach einer Stunde zu einem sichtbaren Anstieg des Tocopherol Gehaltes. Nach 3 Stunden erreichte der Vitamin E Gehalt sein Konzentrationsmaximum mit $7,08 \pm 2,90 \mu\text{g/ml}$ Vitamin E. Dieser ist signifikant ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe. Dies zeigt sich in Abbildung 17.

Der Anstieg des Vitamin E Gehaltes im Serum der Vergleichspräparat- Gruppe vollzieht sich, im Vergleich zur Sanovital- Gruppe deutlich langsamer. Zusätzlich fällt

der Konzentrationspeak, also der Gehalt an Tocopherolen im Serum deutlich geringer aus.

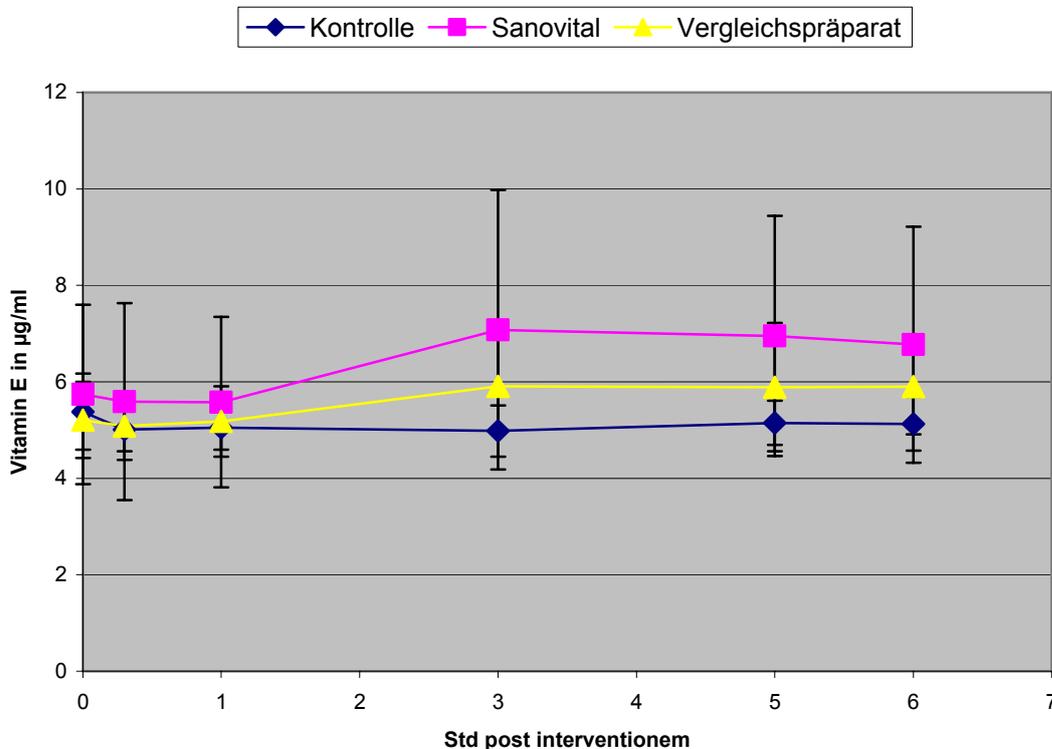


Abbildung 17: Serumresponse Vitamin E (in µg/ml Serum) in den 3 Versuchsgruppen (**Kontrollgruppe, Sanovital- Gruppe und Vergleichspräparatgruppe**), (Mittelwert \pm Standard- Abweichung), zum Zeitpunkt 0 (vor oraler Applikation) bis 7 Stunden post interventionem.

Ein unterschiedliches Resorptionsverhalten konnten Julianto et al. im Jahre 2000 beim Menschen ebenfalls mit Hilfe von emulgierten und nicht emulgierten Vitaminpräparaten provozieren. Im Zeitrahmen bis 6 Stunden post interventionem divergiert das Verhalten der zu vergleichenden Präparate deutlich. Öllösliche Vitamine werden auf die Tröpfchengröße des Milchfettes feinemulgiert. Hierdurch kann die Resorption analog der Muttermilch auf korpuskuläre -lymphatischen Weg erfolgen. Dieser Resorptionsweg geht im Vergleich zur transzellulären Resorption sehr rasch. Auch Haubold et al. registrierten in verschiedenen Studien (1959, 1960, 1962 und 1964) signifikant erhöhte Serumwerte, in diesen Studien kam es schon teilweise nach 15 Minuten zu einem Anstieg der Tocopherole. In diesen Studien konnte ebenfalls eine quantitativ höhere Resorbierbarkeit der Feinemulgate und der

daran gebundene Fettlöslichen Vitamin, gegenüber nicht emulgierten Fetten nachgewiesen werden.

Als Grundlage, der hier durchgeführten Studie, lassen sich die Versuchsergebnisse von Ochoa et al. ansehen. Mit einem ähnlichen Versuchsaufbau erzielte Ochoa et al. im Jahre 1992 am Tiermodell Schaf vergleichbare Ergebnisse. Dies galt es beim Ferkel zu bestätigen, um auch bei dieser Tierart ein optimale Verabreichungsform und Wirkstoffformulierung von fettlöslichen Vitaminen zu eruieren.

In den Studien von Ochoa et al. wurden sechs unterschiedliche Wirkstoffformulierungen (emulgiert, micelliert, als Alkohol- oder in Acetatform) des fettlöslichen Vitamin E miteinander verglichen. Hier wurde ebenso, die quantitative Resorption pro Zeiteinheit und deren Verhalten hinsichtlich Anflutung, Serumresponse, Konzentrationsgehalt und Absinken der Werte im Blut, sowie das Speicherverhalten in unterschiedlichen Gewebearten bei Applikation der unterschiedlichen Formen überprüft.

Ein direkter Vergleich kann jedoch nicht ohne Einschränkung gezogen werden, da es sich in der vorliegenden Untersuchung nicht um Ruminanten (Schaf), sondern um Monogastrier (Schwein) handelt. Die Resorption von Vitamin E bei diesen beiden Tierarten verläuft unterschiedlich, daher ist ein direkter Vergleich nicht möglich.

Ebenfalls unterschieden sich die Zeitpunkte der Blutentnahmen. In der Studie von Ochoa et al. fanden die Blutentnahmen in der ersten Woche täglich und ab dem siebten Tag bis zum 56 Tag 1mal wöchentlich statt.

In den Studien von Ochoa et al. konnte, wie auch in der vorliegenden Studie, mit emulgiertem flüssigen DL- α -Tocopherol eine rasche Anflutung in den ersten 24- 48 Stunden erzielt werden. Des Weiteren führte diese Formulierung, des fettlöslichen Vitamin E, zu einer best möglichen quantitativen Resorptionsmenge Vitamin E pro Zeiteinheit im Blut.

Anhand des hier durchgeführten Versuches und unter mit Einbezug der Studie von Ochoa et al. und Julianto et al. lässt sich ableiten, dass es zu einem schnelleren Konzentrationsanstieg bei Verabreichung von Vitamin E in emulgierter Form im Blut kommt. Dies konnte hiermit belegt werden, siehe Abbildung 17.

5.2.2. Erreichen des Konzentrationsmaximums

Bei Applikation von Vitamin E in Emulsionsform wird das Konzentrationsmaximum bereits nach 3 Stunden erreicht. Diese Zeitspanne, die bis zum Erreichen des Konzentrations- Peaks benötigt wird, lässt sich auch aus den Ergebnissen von Hidiroglou et al. (1989), Ochoa et al. (1992) und Julianto et al. (2000) ableiten. In diesen Studien wurde das Maximum der Vitamin E Konzentration bei Applikation von emulgiertem Vitamin E in den ersten Stunden erreicht. Ochoa et al. (1992) erzielte mit flüssigem emulgierten DL- α -Tocopherol die effizienteste Anflutung und das größte Konzentrationsmaximum im Blut, verglichen mit nicht emulgierten, trockenen, micelliertem Tocopherol, Tocopherol acetat und Tocopheryl. Bei Julianto et al. wurden die Maxima der zu vergleichenden Präparate zwischen 5 und 12 Stunden erreicht. Wie in dieser durchgeführten Studie verzeichneten Ochoa et al. und Julianto et al. ein zeitlich früheres Erreichen des Maximums bei Gabe von emulgiertem Vitamin E.

Nach einer Plateau- Phase, in der die Vitamin E Konzentration bei $5,89 \pm 0,92 \mu\text{g/ml}$ und $5,91 \pm 0,99 \mu\text{g/ml}$ stagniert, wird auch in der Vergleichspräparat- Gruppe das Konzentrationsmaximum, mit $6,07 \pm 1,04 \mu\text{g/ml}$ erreicht. Dieser Peak wird nicht nur später erreicht, sondern fällt auch im Vergleich zur Sanovital- Gruppe geringer aus und ist nicht mehr signifikant. Dies ergaben die Ergebnisse von Ochoa et al. am Tiermodel Schaf und Julianto et al., am Model Mensch, ebenfalls in vergleichbaren Studien. Ziel der Studie war es dies beim heranwachsenden Schwein zu bestätigen.

5.2.3. Absinken des Vitamin E Gehaltes

Nach der Anflutung im Blut und dem Erreichen des Maximums fallen die Tocopherol- Werte wieder kontinuierlich ab. Das Vitamin E wird jetzt im Organismus auf die einzelnen Zielorgane verteilt. Das Absinken des Serum Vitamin E Gehaltes vollzieht sich in der Sanovital Gruppe langsamer im Vergleich zur Gruppe, der das herkömmliche nicht emulgierte Vitaminpräparat verfüttert wurde. Nach 24 Stunden sind die Werte der Sanovital- Gruppe immer noch über den Werten der Vergleichspräparat- Gruppe. Diese hat sich in ihren Werten der Kontrollgruppe fast

angeglichen, siehe Abbildung 18. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch Hidiroglou (1991). Hier wurde das emulgierte Vitamin E jedoch, verglichen zu dieser Arbeit, intravenös appliziert. In dieser Studie sanken die Tocopherol Konzentrationen ebenfalls langsamer und blieben lange, bis 48 Stunden post interventionem über den Werten der Vergleichsgruppe, welcher nicht emulgiertes Vitamin E i.v. verabreicht wurde.

Die hier gefundenen Ergebnisse untermauern die These einer schnelleren Resorption der Tocopherole im Dünndarm bei Verabreichung in emulgierter Form.

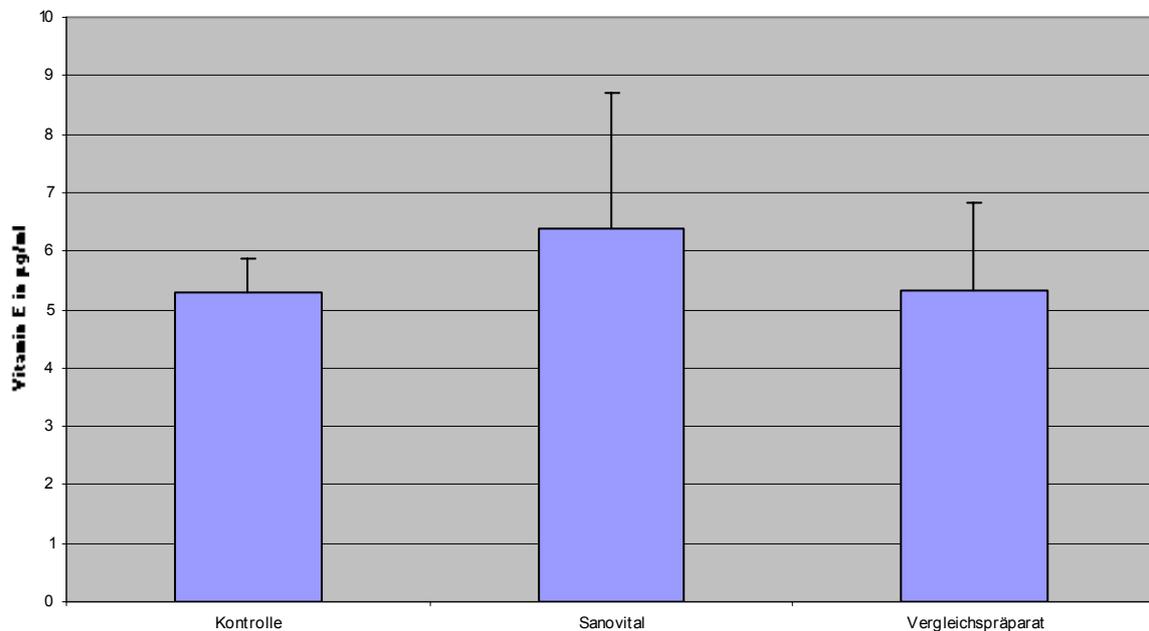


Abbildung 18: Serumresponse Vitamin E (in µg/ml Serum) der 3 Versuchsgruppen (Kontrollgruppe, Sanovital- Gruppe und Vergleichspräparatgruppe), (Mittelwert \pm Standardabweichung) zum Zeitpunkt 24 Stunden post interventionem.

5.3. Resorptionsweg und indirekte Nachweismethoden:

Um die Hypothese des korpuskulär-lymphatischen Resorptionsweges zu untermauern, wurden histologische Dünndarmschnitte angefertigt.

Um die Aufnahme in den Organismus, bzw. den Übertritt vom Darmlumen in das Blut- und Lymphsystem, zu veranschaulichen und verfolgen zu können, wurden die Schnitte in definierten Zeitabständen (10, 40 und 60 Minuten) angefertigt. Die kurzen Intervalle wurden basierend auf früher durchgeführte Studien an anderen Tiermodellen ausgewählt. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit Gewebeproben der Darmlymphknoten entnommen, dies geschah in den Zeitintervallen 20 und 40 Minuten post interventionem des emulgierten Vitaminpräparates. Die mittels Öl-Rot gefärbten Fettemulsionströpfchen werden ohne vorherige enzymatische Aufspaltung in den Interzellulärspalt zwischen den Enterozyten aufgenommen und direkt in das Lymphsystem geschleust. Anhand dieser Schnitte ist ersichtlich, dass der Übertritt ins Lymphsystem bereits nach 10 Minuten nach oraler Aufnahme des, an Fettkügelchen gebundenen Tocopherols aufgenommen wird, siehe Abbildung 13.

Anhand der, in dieser Arbeit angefertigten Bilder in unterschiedlichen Zeitintervallen, lässt sich die These von Haubold bestätigen. Durch Entnahme von Dünndarmgewebe zur Anfertigung von histologischen Schnitten 10, 40 und 60 Minuten post interventionem von 4 ml Sanovital Emulsion und anschließender Öl in Rot Färbung, lässt sich der Resorptionsweg der Fettemulsionskügelchen und der damit verknüpften fettlöslichen Vitamine verfolgen.

Man kann, aus diesen hier gefundenen Ergebnissen und den Überlegungen von Haubold hypothetisieren, dass Milchfett und Feinemulgaten, bzw. Fettemulsionströpfchen, nach dem Durchtritt durch die Dünndarmzotten auf korpuskulär -lymphatischen Resorptionsweg weiter transportiert werden. Es wird angenommen, dass emulgiertes Vitamin E ebenfalls an Milchfetttröpfchen gebunden die Darmschranke passiert. Studien von Wagner (1954), welcher sich mit der Resorption von fettlöslichem vitamin A und D beschäftigt hat, könnten zum Vergleich mit den hier gefundenen Ergebnissen herangezogen werden. Anhand mikroskopischer Bilder, des mit Sudan III angefärbten Fettes konnte festgestellt werden, dass die Resorption von Feinemulgaten überwiegend direkt, ohne Kontakt zur Leber über den Lymphweg in den großen Kreislauf erfolgt. Bei diesem

Resorptionsweg ist kein chemischer Abbau und Wiederaufbau in den Darmzellen notwendig. Haubold (1959) und Mölbert (1960) vermuteten, dass dieser Vorgang mit Hilfe der Zottenpumpe in das zentrale Lymphgefäß der Zotte von statten geht. Beweisend hierfür, zeichnet sich in dieser Arbeit bereits nach 10 Minuten, siehe Abbildung 13, post interventionem der Übertritt der Emulsionspartikel durch das Epithel der Darmzotten und die Überleitung in das Lymphsystem ab.

Shoshkes et al. (1950), Geyer (1952), Wagner (1954) und Haubold (1964) schlussfolgerten, dass Feinemulsionen und emulgierte fettlösliche Vitamine, wie Vitamin E, überwiegend den korpuskulär -lymphatischen Resorptionsweg einschlagen, ohne vorherige Lipolyse im Darmlumen und direkt in den großen Kreislauf eingeschleust werden, schematisch in Abbildung 19 dargestellt.

Spezifisch bei der Resorption von Emulsionen, emulgierten Vitaminen, Fetten und Ölen ist das Verteilungsmuster der angefärbten Fettpartikel. Diese sind in den histologischen Schnitten in den distalen Abschnitten des Zottenepithels rot angefärbt zu erkennen. Das nicht in Emulsionsform aufgenommene Fett wird ebenfalls resorbiert, jedoch zuvor fermentativ im Darmlumen abgebaut.

Des Weiteren verzeichnete Haubold eine schnellere Resorption von emulgierten Substanzen, bzw. von emulgierten fettlöslichen Vitaminen, in seinen Studien anhand von Vitamin A, und eine Verkürzung der Zeitspanne zwischen Resorption und Aufnahme ins Zielorgan. Durch den korpuskulären lymphatischen Resorptionsweg von Feinemulgaten wird der eigentliche Resorptionsweg, den nicht emulgierte Fette nehmen, über die Leber und das Pfortader- System mit Hilfe von Galle, Lipasen und Pankreasenzyme umgangen. Dieser Prozess kann schon im Maul über die Maulschleimhaut, bedingt durch Druck- und Durchblutungsänderungen beim Schlucken, beginnen und ist nicht auf die Aufnahme im Dünndarm beschränkt.

Resorptionsmöglichkeiten:

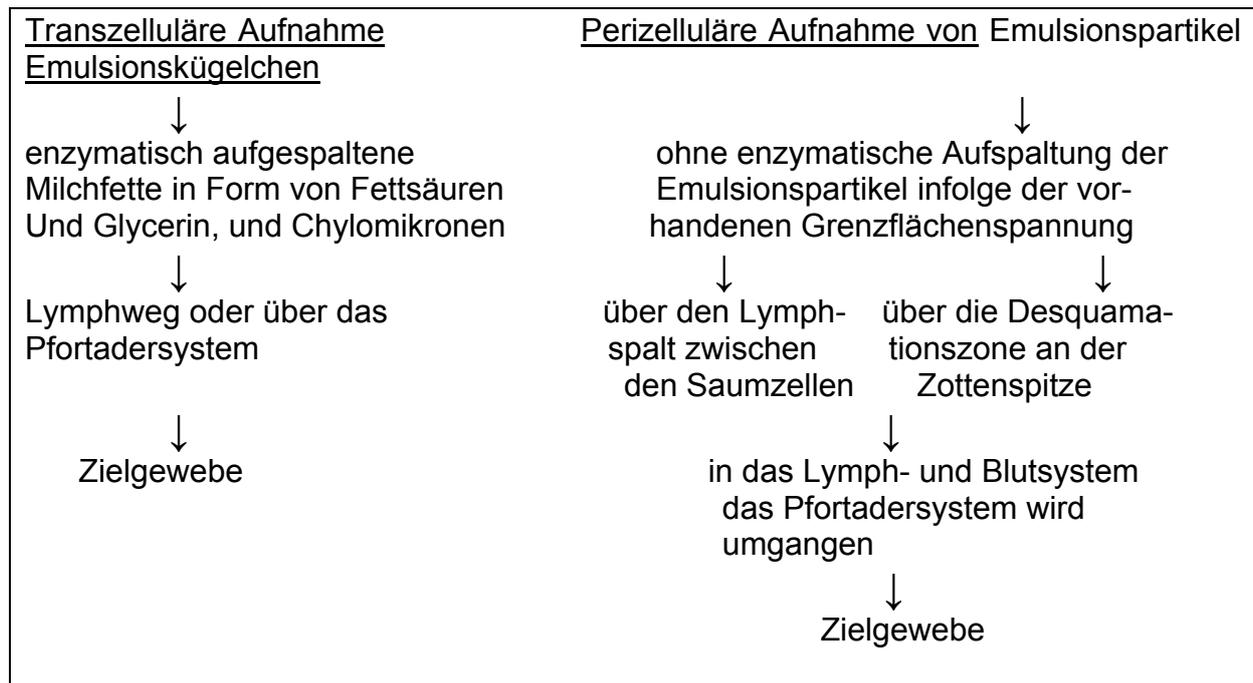


Abbildung 19: Verschiede Resorptionswege, trans- und perizellulär, von Vitamin E

Des Weiteren ist die Teilchengröße der Emulsionspartikel für die Aufnahme in den Organismus entscheidend (Armand et al. 1999). Milchfettkügelchen in Kuhmilch haben im Durchschnitt einen Durchmesser von 3 µ mit einer Schwankung von 0,2 – 22 µ. Die Fettemulsionspartikel des Präparates Sanovital sind der Partikelgröße von Milch nachempfunden und weisen einen Diameter von ebenfalls ca. 3 µ auf, um eine optimale Resorption im Darm zu gewährleisten.

Die Schlussfolgerung dieser histologischen Schnitte ist, dass das emulgierte Vitamin E direkt über die Lymph- und Blutbahn gelangt. Dies geschieht auf lymphatisch-korpuskulärem Wege. Die mögliche resorbierbare Menge ist somit, gemessen an der Resorptionszeit, größer und effektiver. Die nicht emulgierte Wirkstoffformulierung (Pulverform) wird erst im Dünndarm gespalten, intrazellulär aufgenommen und in den Enterozyten wieder neu zusammengesetzt. Anschließend erfolgt der Weitertransport zur Leber, um von dort aus im Organismus verteilt zu werden. Dieser Vorgang der Resorption über die Leber (Leber-Pfortader –System) dauert im Vergleich länger.

5.4. Anreicherung von Vitamin E in den Organen:

Zu berücksichtigen ist, dass nicht nur das, von extern zugeführte Vitamin E Auswirkungen auf den Vitamin Gehalt in den Organen hat, sondern auch das gespeicherte Vitamin E Einfluss auf den Gehalt und das Speicherverhalten nimmt. Der Plasmalipidlevel und der Grad der Fettleibigkeit sind ebenfalls wichtige Einflussfaktoren auf den Gehalt im Gewebe, (Bieri und Evarts 1975).

Exakte Angaben über das Anreicher- und Speicherverhalten in den, in dieser Studie untersuchten Organen sind nicht exakt verifizierbar, da die Versuchstiere nicht Vitamin E verarmt waren. Des Weiteren lässt sich das Langzeitspeicherverhalten von Vitamin E im Organismus nicht vollständig nachvollziehen, dies war jedoch auch nicht Ziel dieser Arbeit. Hierfür hätte man vor allem Proben von lipidreichem Gewebe, in diesem Fall dem Fettgewebe, als eines der Hauptspeicherorgane (Tomassi und Silano, 1996; Wang und Quinn, 1999; Jensen et al. 1990), sowie Gewebeproben der Skelettmuskulatur entnehmen müssen. Anhand der Studie von Bjorneboe et al. lässt sich ableiten, dass sich vor allem im Fettgewebe, aber auch in Leber, Skelettmuskulatur insgesamt ca. 92% des Gesamttocopherolmasse gespeichert wird, (Bjorneboe et al. 1986). Anhand der Tocopherol Konzentrationen im Fett- und Muskelgewebe lässt sich die Vitaminversorgung des Tieres auch retrospektiv, auf längere Sicht gesehen, ableiten. Diese Gewebe gehören zu den langfristigen Speicherorganen (Jensen et al. 1990). In diesem Fall fehlten hier zwei Gewebe, die nicht analysiert wurden, aber zu den langfristigen Hauptspeicherorganen gehören. Untersucht werden sollte die Anflutung der Tocopherole, sowie die Anreicherung und das kurzfristige Speicherverhalten von Vitamin E in folgenden Organen: Leber, Niere, Lunge, Darmlymphknoten.

Ebenfalls in dieser Studie nicht überprüft wurde die Ausscheidung des Vitamins über den Kot und den Urin der Tiere. Ein direkter Vergleich zwischen Vitamin- Input und Vitamin- Output lässt sich somit nicht ziehen. Der Anteil, der vom Tier unverwertet wieder ausgeschieden wird, wurde in dieser Studie somit nicht berechnet. Der Großteil der nachweisbaren Menge der Tocopherole, die über den Kot ausgeschieden werden, stammt aus unvollständiger Absorption. Dies ist vor allem bei einem Überangebot von Vitamin E in der Nahrung der Fall. Diese werden als

Tocopherylquinone, Tocopherylhydroquinone und deren Polymerisationsprodukte ausgeschieden. Hieran hätte man den Vitamin E Status der Schweine, sowie den Sättigungsgrad im Blut ableiten können, (Gassmann 1997, Traber und Sies 1996). Die Speicherkapazität und das Ausscheidungsverhalten, bzw. Ausscheidungsvolumen könnte in einer nachfolgenden Arbeit analysiert und mit dieser Arbeit diskutiert werden.

Die Organe wurden entnommen, um das Verhalten der einmalig oral applizierten Tocopherole im Organismus zu ermitteln. Dies geschah im Hinblick auf die kurzfristige Speicherkapazität in den Organen, bei nicht depletierten Tieren und zur Verifizierung der zeitlich gesehenen Ausscheidung von Vitamin E aus dem jeweiligen Gewebe.

Es ist jedoch zu bedenken, dass die hier untersuchten Organe zur Überprüfung des Konzentrationsanstieges bei oraler Verabreichung, eher ungeeignet sind, da eine Anflutung und Speicherung erst zeitversetzt erfolgt. Hierfür ist das Serum besser geeignet.

5.4.1. Leber

Der Tocopherolgehalt der Leber zählt zum essentiellen Vitamin E Pool im Organismus (Burten 1990, Cadenas et al. 1995, Mutaku et al. 1998). Vitamin E depletierte Tiere zeigen bei Substitution mit Vitamin E im Lebergewebe den höchsten Konzentrationsanstieg (Ochoa et al. 1992). Die Leber gehört, im Hinblick auf die Vitamin E Anreicherung zu den kurzfristigen Speicherorganen, daher spiegelt dieses Organ die momentane Versorgungslage wieder (Jensen et al. 1990).

Aus diesem Grund wurden die Vitamin E Konzentrationen in diesem Gewebe 24, 48 und 72 Stunden post interventionem gemessen. Eine mögliche Differenz in der Anflutung der Tocopherole der unterschiedlichen Versuchsgruppen, die auf die unterschiedliche Wirkstoffformulierung zurückzuführen wäre, sollte anhand der Vitamin E Konzentration im Lebergewebe nachgewiesen werden.

Ein deutlicher Unterschied besteht zum Zeitpunkt 48 Stunden, nach Verabreichung des emulgierten Vitamin E, mit der Kontrollgruppe. Die Sanovital Gruppe, mit 7 ± 1

$\mu\text{g/g uS}$, hat zu diesem Zeitpunkt eine signifikant ($p < 0,05$) geringere Tocopherol Konzentration, wie die Kontrollgruppe, mit $24 \pm 10 \mu\text{g/g uS}$, siehe Abbildung 20.

Der verspätete Anstieg der Tocopherol Konzentration im Lebergewebe ist eventuell auf den verspäteten Anstieg der Konzentration im Blut, und die hieraus resultierende zeitversetzte Verteilung auf die Organe zurückzuführen.

In der Vergleichspräparat -Gruppe sind die Konzentrationen der Leber zu den Messzeitpunkten 24 Stunden und 48 Stunden, unter Einbezug der geringen Streuung fast konstant. Die Konzentrationen liegen im Bereich $13 \pm 3 \mu\text{g/g uS}$ (24 Std.) und $13 \pm 4 \mu\text{g/g uS}$ (48Std.). Erst 72 Stunden post interventionem, des nicht emulgierten Vitaminpräparates zeichnet sich ein deutlicher Anstieg der Vitamin E Konzentration auf $25 \pm 21 \mu\text{g/g}$ des untersuchten Lebergewebes ab, hier ist jedoch die große Streuung zu beachten.

Ochoa et al. (1992) haben die Gewebekonzentrationen und das Verhalten der Tocopherole im Blut (Anflutung, Maximum, Absinken) bei Schafen über eine Zeitspanne von 56 Tagen ausgewertet. In diesen Studien wurde das Maximum der Vitamin E Konzentration im Blut nach 24 Stunden post interventionem erreicht. Bei oraler Verabreichung von nicht emulgiertem Vitamin E, je nach Formulierung, wird der Konzentrationspeak erst nach 2, bzw. 3 Tagen erreicht. Solch ein Maximum konnte in der vorliegenden Studie nicht erfasst werden, da die Blutentnahmen auf einen Zeitraum bis 24 Stunden post interventionem des Vitaminpräparates beschränkt waren. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag jedoch auf der Ermittlung der Speicherkapazität von emulgiertem Vitamin E in den kurzfristigen Speicherorganen, vor allem der des Lebergewebes.

Das Lebergewebe der Gruppe I, der 4 ml des emulgierten Vitaminpräparates verabreicht wurde, zeigt eine leicht konkave Resorptionskurve, siehe Abbildung 20.

Dieser, im Vergleich zur Kontrollgruppe reduzierte Tocopherolgehalt könnte, zum Messzeitpunkt 24 Stunden auf die gleichzeitige Verabreichung von Vitamin A zurückzuführen sein, siehe 5.5. Interaktionen von Vitamin A und E.

Eine weitere Möglichkeit das Ergebnis zu interpretieren, ist die Umgehung der Leber bei Applikation von emulgiertem Vitamin E. Dieses Verhalten der Tocopherole lässt sich anhand des lymphatisch korpuskulären Resorptionsweges erklären. Das

emulgierte Vitamin E wird, ohne Beteiligung der Leber direkt über den Lymph- und Blutweg auf die Zielorgane verteilt. Der späte Anstieg nach 72 Stunden auf $19 \pm 0,07 \mu\text{g/g uS}$, lässt sich durch die Funktion der Leber als Speicherorgan für fettlösliche Vitamine erklären.

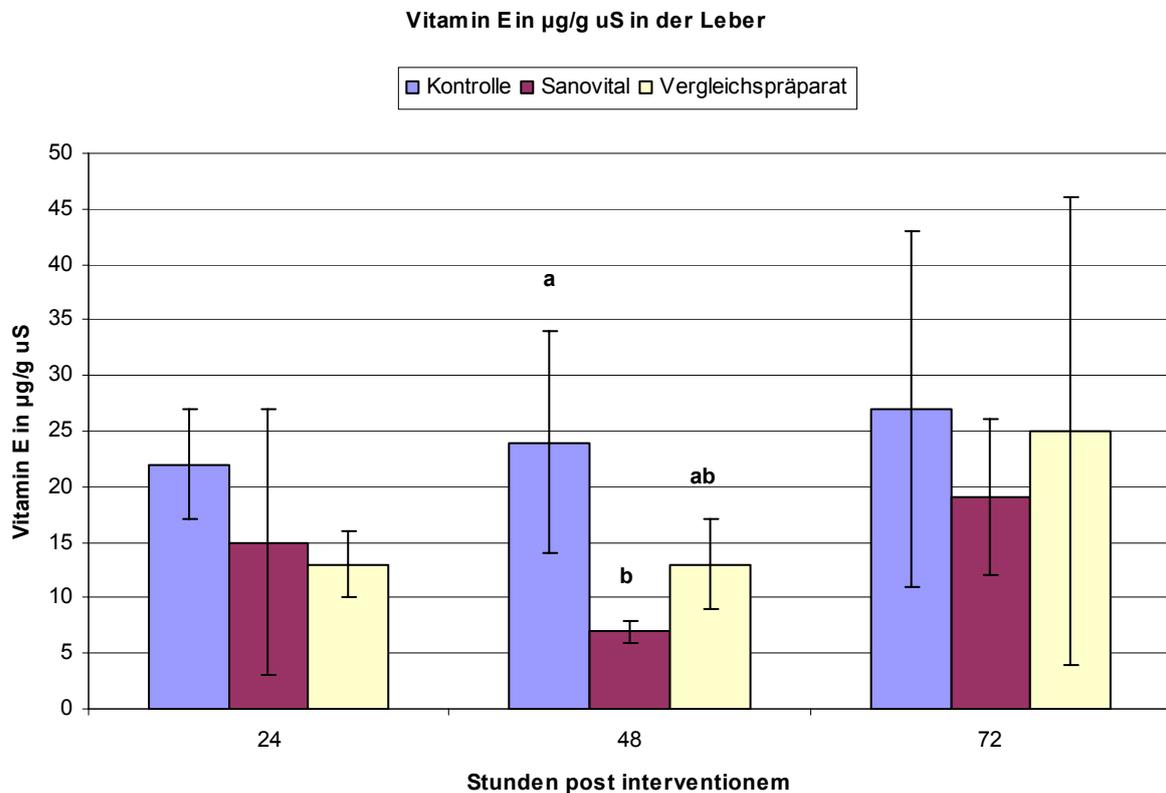


Abbildung 20: Vitamin E Gehalte in der Leber ($\mu\text{g/g uS}$) in den Versuchsgruppen (Sanovital und Vergleichspräparat) (Mittelwert \pm Standardabweichung) 24, 48, 72 Stunden nach Applikation des jeweiligen Vitaminpräparates, unterschiedliche Buchstaben (a, b) kennzeichnen Signifikanzen.

Das Sanovital Präparat ist ein Vitamingemisch aus den beiden fettlöslichen Vitaminen A und E. Der Bolus, den die Tiere verabreicht bekamen, enthielt 300.000 IE Vitamin A und 200 mg Vitamin E. Das Absinken des Vitamin E Gehaltes zu den Entnahmezeitpunkten, schon 24 Stunden post interventionem, lässt sich eventuell auf die hohe Konzentration des Vitamin A zu diesem Zeitpunkt zurückführen. Zum Messzeitpunkt 48 Stunden post interventionem hat Vitamin A sein

Konzentrationsmaximum in der Leber erreicht, diametral hierzu sind die Vitamin E Werte am Tiefpunkt ihrer Konzentration. Vitamin A wird eventuell unter dem schützenden Einfluss von Vitamin E vermehrt in die Speicher des Lebergewebes eingelagert. Hierbei kommt es zu Verlusten bei Vitamin E.

5.4.2. Niere

Die Niere zählt nicht, wie Leber, Pankreas, Fettgewebe und Muskulatur zu den primären Speicherorganen.

Dies lässt sich ebenfalls anhand der Ergebnisse von Ochoa et al. (1992) ableiten, in welchen die Niere, sowie der Musculus gluteus (wurde hier nicht untersucht) zu den Organen gehört, die eine sehr geringe Geweberesponse aufweisen.

Verdeutlicht wird dies durch die hier ermittelten Ergebnisse der Gewebeproben im Versuchszeitraum von 24 bis 72 Stunden. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe, welcher mittels dem Plazebopräparat kein zusätzliches Vitamin E zu geführt wurde, und den beiden anderen Gruppen, welche Vitamin E in unterschiedlicher Wirkstoffformulierung erhalten haben, herausarbeiten. Die Werte blieben konstant zwischen $20 \pm 2 \mu\text{g/g uS}$ und $23 \pm 2 \mu\text{g/g}$ untersuchtem Nierengewebe, unabhängig vom Entnahmezeitpunkt, siehe Abbildung 21.

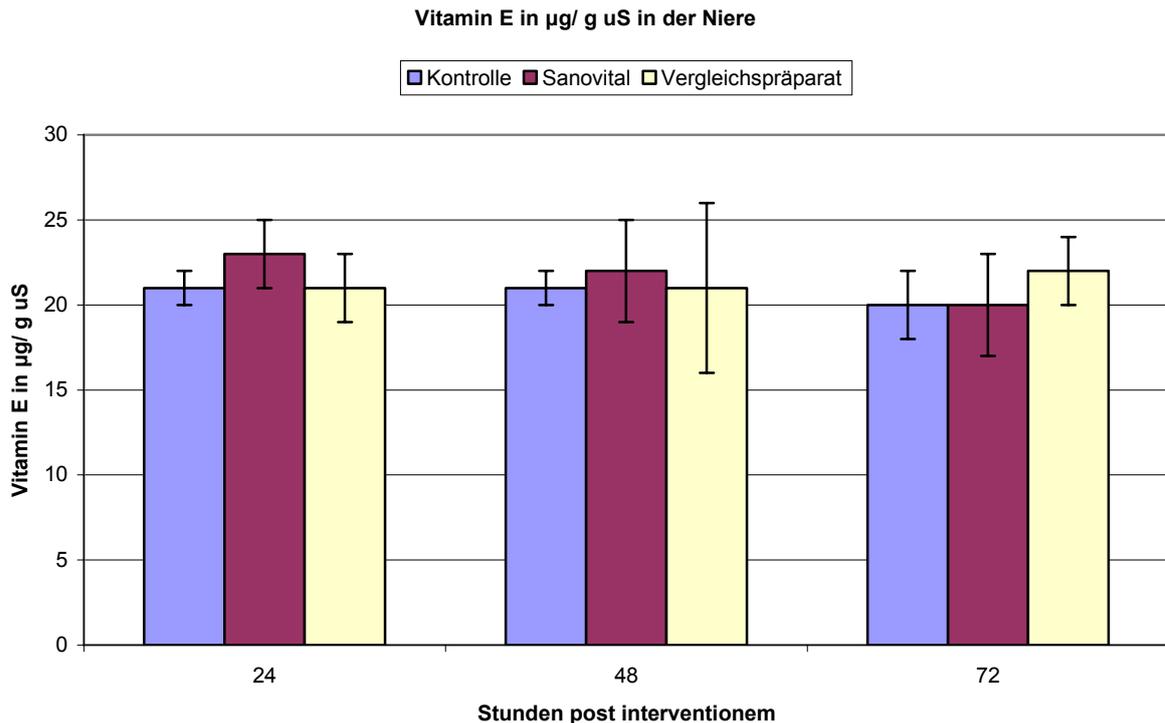


Abbildung 21: Vitamin E (in $\mu\text{g}/\text{g uS}$) Gehalte in der **Niere** in den beiden Versuchsgruppen (Sanovital und Vergleichspräparat) (Mittelwert \pm Standardabweichung)

5.4.3. Lunge

In der Lunge lassen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Applikation von Vitamin E in den beiden Wirkstoffformulierungen –emulgiert und nicht emulgiert– darstellen. Die Werte lagen von beiden Gruppen über den Werten der Kontrollgruppe, welche keinen zusätzlichen Vitamin E- Bolus erhalten hatte. Der Unterschied der Plazebogruppe ist jedoch zu keiner der beiden Gruppen signifikant, siehe Abbildung 22.

Zwar führte die Applikation von Vitamin E zu einem Konzentrationsanstieg im Lungengewebe, jedoch war der Konzentrationsunterschied zu keinem Zeitpunkt signifikant. Die Werte der Kontrollgruppe blieben während der Versuchsdauer konstant.

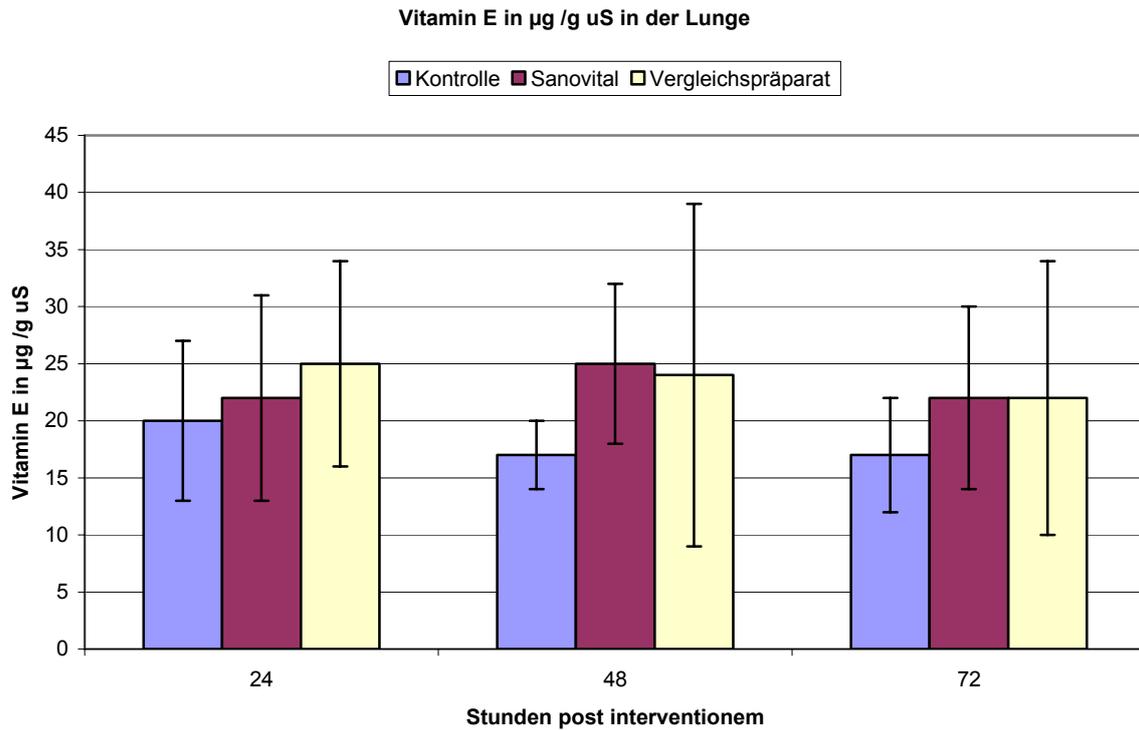


Abbildung 22: Vitamin E Gehalte in der **Lunge** ($\mu\text{g} / \text{g uS}$) in den drei Versuchsgruppen (Kontrolle, SanoVital, Vergleichspräparat) (Mittelwert \pm Standardabweichung) nach Gabe der Vitaminpräparate

5.4.4. Darmlymphknoten

Die Gewebeproben der Darmlymphknoten eignen sich nicht zur Überprüfung der Tocopherolanreicherung, da sie nicht zu den Speicherorganen fettlöslicher Vitamine zählen. Hierfür sprechen auch die ermittelten Ergebnisse. In den Darmlymphknoten lässt sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe weder bei der Sanovital- Gruppe noch bei der Vergleichspräparat- Gruppe ein deutlicher Unterschied verzeichnen. Die einzelnen Werte bewegen sich im Rahmen von $47 \pm 17 \mu\text{g} / \text{g uS}$ und $64 \pm 42 \mu\text{g} / \text{g uS}$.

Um Varianzen der Tocopherolkonzentrationen im Gewebe zu zeigen, hätten die Proben zu einem früheren Zeitpunkt entnommen werden müssen. Dass die Darmlymphknoten in den Resorptionsweg mit involviert sind, zeigen die histologischen Schnitte deutlich. Diese Gewebeproben sind zu früheren Zeitpunkten (20 und 40 Minuten post interventionem) entnommen worden und spiegeln den raschen lymphatisch- korpuskulären Resorptionsweg in Form der rot angefärbten Milchfett- Emulsionströpfchen im Lymphknotengewebe wieder. Bereits 20 Minuten nach oraler Applikation sind vereinzelt Fetttropfchen zu identifizieren. Daher sind die Gewebeproben, welche erst 24, 48 und 72 Stunden post interventionem entnommen wurden weniger aussagekräftig, da hier kaum noch Vitamin E nachzuweisen ist. Dies ist in Abbildung 23 zu sehen.

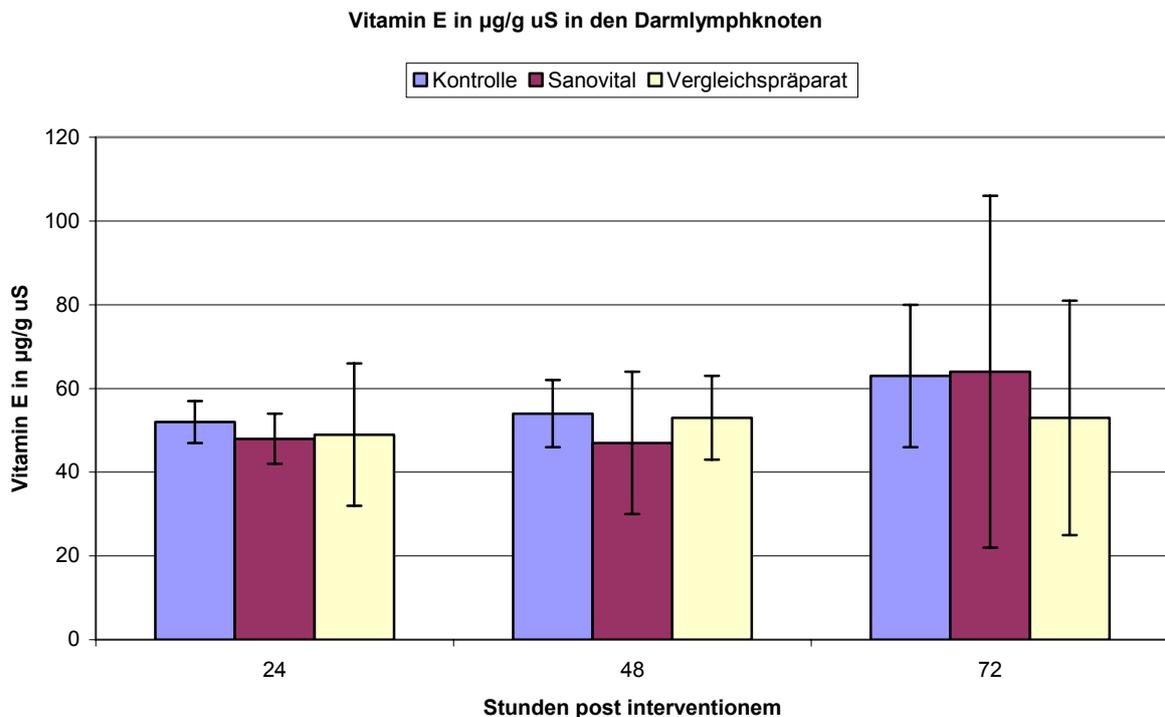


Abbildung 23: Vitamin E Gehalt ($\mu\text{g/g uS}$) in den **Darmlymphknoten** in den drei Versuchsgruppe (Kontrolle, Sanovital, Vergleichspräparat) (Mittelwert \pm Standardabweichung)

5.5. Vitamin A und Vitamin E Applikation in Kombination

Ein geringer Konzentrationsausschlag von Vitamin E, sowohl im Blut, als auch in den Organen, ist möglicherweise auf den Zustand zurückzuführen, dass die Tiere vor Versuchsbeginn nicht Vitamin E depletiert worden sind. Der Vitamin E Level der Schweine war im physiologischen Bereich (unter 7 $\mu\text{mol/l}$), daher war kein signifikanter Ausschlag der Vitamin E Konzentration zu erwarten.

Eine weitere Möglichkeit für den geringen Anstieg der α - Tocopherol Konzentration im Körper könnte auf die gleichzeitige Applikation des, ebenfalls im Sanovital AE-Präparat enthaltenen Vitamin A zurückzuführen sein. Beide Vitamine ähneln sich in ihrem Metabolismus. Beide fettlöslichen Vitamine benötigen spezielle extra- und intrazelluläre Bindungsproteine für ihre unterschiedlichen Formen und deren Katabolismus im Körper.

Interaktionen dieser beiden fettlöslichen Vitamine wurden schon von mehreren Autoren in diversen Studien an unterschiedlichen Versuchstieren beschrieben (Bieri et al. 1981, Bieri und Tolliver 1982, Alam und Alam 1983, Hanke et al. 1985, Hoppe et al. 1992, Anderson et al. 1995, Wang et al. 1995, Tesariere et al. 1996, Fuhrmann et al. 1997, Eicher et al. 1997, Goss-Sampson et al. 1998, Zimmer et al. 2000, Brigelius-Flohe et al. 2002, Ching et al. 2002).

Es wurden unterschiedliche Hypothesen von unterschiedlichen Autoren erstellt, die die gegenseitigen Wechselwirkungen der Vitamine E und A erklären:

- Vitamin A hemmt die intestinale Resorption von Vitamin E, Absorptionsbehinderung (Bieri und Tolliver 1982)
- Bei Verabreichung von Retinolsäure: Retinolsäure verändert den Vitamin E Metabolismus (Bieri et al. 1981)
- Bei Verabreichung von Retinsäure: Erhöhte Oxidationsrate der Tocopherole (Bieri et al. 1981)

- Vitamin E übt einen schützenden Effekt auf Retinol aus, und wird dadurch vermehrt verbraucht (Hanke 1985)
- Geringere Zurückbehaltung der Tocopherole im Organismus bei gleichzeitiger Verabreichung von Vitamin A (Ching et al. 2000)
- Interaktion von Vitamin A und E: sinkende Vitamin E Konzentrationen im Serum und der Leber, bei Erhöhung des Vitamin A Gehaltes im Futter (Ching et al. 2002)

Ob sich in dieser Arbeit eine Behinderung der Resorption schon während des Überganges vom Darmlumen in das Blut-, bzw. Lymphsystem vollzieht, ist nicht zweifelsfrei zu bestätigen. Es findet auf jeden Fall ein Anstieg der Tocopherol Konzentration im Serum statt, siehe Abbildung 18. Ob bei alleiniger Verabreichung von Vitamin E ein quantitativ größeres Konzentrationsmaximum zu erwarten gewesen wäre, müsste in einer zweiten Vergleichstudie, in der ausschließlich Vitamin E verabreicht wird, überprüft werden.

Ching et al. (2002) untersuchten die Beziehung von Vitamin E und Vitamin A und deren gegenseitige Interaktionen an Schweinen.

Ching et al. konnten eine eindeutige Korrelation zwischen der Vitamin-Applikation und dem Vitamin -Gehalt im Serum nachweisen. Wie zu erwarten, erfolgte ein Konzentrationsanstieg beider Vitamine, Retinol und α - Tocopherol, im Plasma bei einer Erhöhung des jeweiligen Substituenten im Futter. Dies war auch hier zu beobachten. Die α -Tocopherol- Konzentrationen in der Leber und im Serum sanken beide nachdem die Vitamin A Ration im Futter erhöht wurde. Werden den Schweinen nur erhöhte Retinol Mengen verabreicht, sinken die α - Tocopherol- Werte im Plasma. Ching et al. (2002) begründeten diesen Effekt in einer reduzierten Absorption und einer geringeren Zurückbehaltung des α -Tocopherols im Organismus infolge der Verabreichung von größeren Mengen Vitamin A bei heranwachsenden Schweinen. Ein Anstieg der Vitamin A Konzentration im Futter von heranwachsenden Schweinen beeinflusst die Vitamin E Konzentration im Serum negativ, die beiden Vitamin wirken diametral.

Die Studien von Ching et al. lassen sich nicht unmittelbar auf die hier durchgeführte Studie übertragen. In dieser Arbeit wurden den Schweinen einmalig, und nicht wie bei Ching et al. über längere Zeit beide Vitamine, A und E, oral zugeführt wurden. Die These der gegenseitigen Absorptionsbehinderung könnte die Ursache für den gering ausfallenden Vitamin E Peak sein.

Bei ausgewachsenen Schweinen ließ sich eine Behinderung der α - Tocopherol Absorption durch große Mengen an Vitamin A nicht nachweisen, (Anderson et al. 1995). Dies hängt mit einem anderen Vitamin E Metabolismus bei älteren ausgewachsenen Tieren zusammen.

Da die Serumwerte in kurzen Abständen nach der Applikation genommen wurden, lässt sich vermuten, dass die Resorption in den Organismus erschwert, und damit vermindert wird, oder es zumindest zu einem Konkurrenzverhalten zwischen den beiden fettlöslichen Vitaminen E und A kommt. In der Leber existieren spezifische Bindeprotein- und Transportmechanismen, wie das α -Tocopherol-Transfer- Protein, (α -TTP) und das α -Tocopherol-assoziierte-Protein (α -TAP) (Catignani 1975). Zimmer et al. (2000) erkannten eine CRAL (cis-retinal binding motif) Sequenz, die den α -TAP gemein ist. Dieses α - Tocopherol assoziierte Protein ist in der Lage, außer Tocopherolen, ebenfalls Retinal zu binden. Dieser Prozess findet vor allem in den Mukosazellen statt. Dies lässt den Rückschluss zu, dass bei gleichzeitiger Applikation der fettlöslichen Vitamin A und E in emulgierter Form, vermehrt Vitamin A resorbiert oder in Hepatozyten aufgenommen wird. Es besetzt die spezifischen Vitamin E Bindeproteine und vermindert so dessen vollständige Aufnahme in die Enterozyten. Hier wäre in einer weiteren Studie das Ausscheidungsvolumen von Vitamin E mit geschlossenen Chromanring, d.h. in unverbrauchter Form aufschlussreich.

Jack Yang und Desai (1977) beobachteten in Versuchen mit Ratten, unter einer Vitamin E Supplementierung (25 IU/Kg Futter), einen 4,5-mal so hohen Vitamin A Speicherinhalt in der Leber, wie bei den Tieren, welchen kein Vitamin E zugefüttert

wurde. Eine Steigerung dieses Effektes gelang auch mit Hilfe eines Vitamin E Exzesses nicht. Dies würde wieder den unterstützenden Effekt von Vitamin E auf Vitamin A untermauern, welcher sich auch in den hier gefundenen Ergebnissen abzeichnet.

Aufbauend auf die Studie von Yang und Desai (1977) analysierten Fuhrmann et al. (1997) an Schweinen die Auswirkung von Fetten unterschiedlicher Qualität und unterschiedlichen Vitamin A Dosen (5,000 oder 20,000 IU/kg) und Vitamin E (25 oder 125 IU/kg), welche über einen Zeitraum von 7 Wochen verfüttert wurden. Während der Aufzuchtphase der Tiere konnte ein Absinken der α - Tocopherol Konzentration beobachtet werden. Nach 27 Tagen war die α - Tocopherol Konzentration im Plasma, der Herz- und Skelettmuskulatur, infolge eines hohen Vitamin A Angebots um 25-30% gesunken. In dieser Studie von Fuhrmann et al. waren 20,000 IU des Vitamin A notwendig, um den Vitamin E Spiegel im Plasma und im Gewebe zu reduzieren.

Dieser Effekt, den Vitamin A auf Vitamin E ausübt, führte zu einem Anstieg der Lipidperoxidation, welche durch die gesteigerte Produktion von Hydrocarbonen angezeigt wird. In der hier durchgeführten Studie wurden 300 000 IE Vitamin A und 200 mg Vitamin E parallel appliziert, dies geschah jedoch einmalig und nicht, wie in den von Fuhrmann et al. durchgeführten Versuchen, über einen längeren Zeitraum. An Tabelle 6 (Gehalt an Vitamin E in der Leber), sowie an der Serumresponse lassen sich erkennen, dass Vitamin A das Resorptionsvolumen von Vitamin E vermindert, oder dessen Verbrauch steigert.

Die Auswirkungen einer täglichen Zufuhr von Vitamin A auf den Vitamin E Status variiert von Gewebe zu Gewebe (Hoppe et al. 1992). Während die Vitamin A Applikation auf den M. longissimus und das Rückenfett bei heranwachsenden Schweinen keinen Einfluss ausübt, ändern sich die α - Tocopherol Werte im Herz und der Leber im entgegen gesetzten (umgekehrten) diametralen Verhältnis zur Vitamin A Aufnahme (Hoppe et al. 1992).

Ching et al. propagierten, dass, beim Schwein, das Lebergewebe als sensitiver Indikator des Vitamin E Status herangezogen werden kann. Zu beachten ist, dass

den im Versuch verwendeten Ferkeln Vitamin A, mit dem vor Versuchsbeginn verfütterten Aufzuchtsfutter verabreicht wurden. Speziell in dieser Aufzuchtperiode ist das Futter mit größeren Mengen Vitamin A (8000 IE Vit. A/kg Futter) angereichert.

Dies zeigt auch die Anflutung in den untersuchten Organen. Vor allem in der Leber kam es zu gegenseitigen Interaktion der beiden fettlöslichen Vitamine, siehe Abbildung 24 und 25. In den anderen Gewebeproben von Lunge, Darmlymphknoten und Niere kamen diese Interaktionen nicht so deutlich zum Tragen. In der Kontrollgruppe, welche weder Vitamin A, noch Vitamin E verabreicht bekam, sind die Vitamin E Werte permanent konstant. In der Versuchsgruppe I (Sanovital) und Versuchsgruppe II (Vergleichspräparat) kommt es deutlich zu einem Absinken der Tocopherolkonzentrationen im Gewebe. Zu interpretieren ist dieses Phänomen durch die gleichzeitige Applikation einer hohen Vitamin A Dosis (300.000 IE Vitamin A).

Hanke erkannte diesen Synergismus der beiden Vitamine im Jahre 1985. Hierbei ging man von einem schützenden Effekt vor oxidativer Schädigung des Vitamin E auf das Retinol aus. Diese These lässt sich durch den Umkehrschluss, dass ein E Defizit zu einem 30-40% Verlust an Vitamin A führen kann, bekräftigen (Goss-Sampson et al. 1998).

Ein weiterer Ansatzpunkt für die hier, in Abbildung 20 gefundenen Ergebnisse ist der verlangsamte Verbrauch der beiden Antioxidantien bei gleichzeitiger Verabreichung von alpha- Tocopherol und all-trans-Retinol, begründet durch die wechselseitige Schutzwirkung. Eine ähnliche These stellten auch Tesoriere et al. im Jahre 1996 auf.

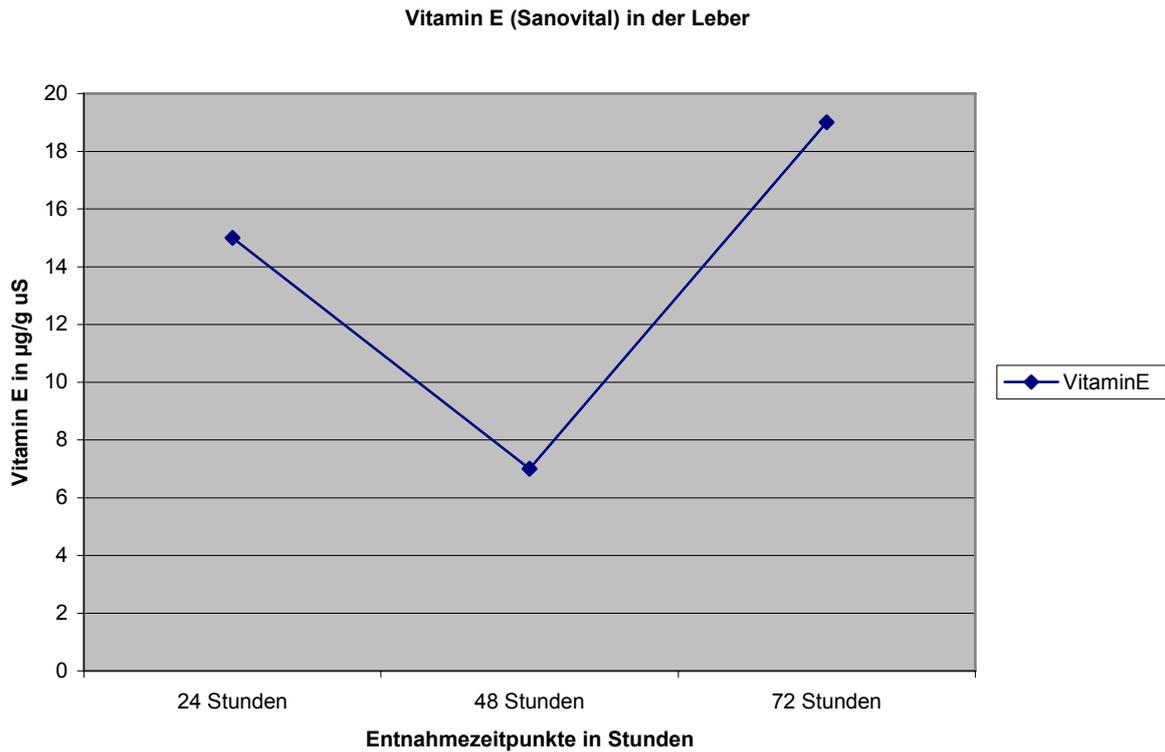


Abbildung 24: Vitamin E in µg / uS in der Leber nach Applikation von 4 ml Sanovital

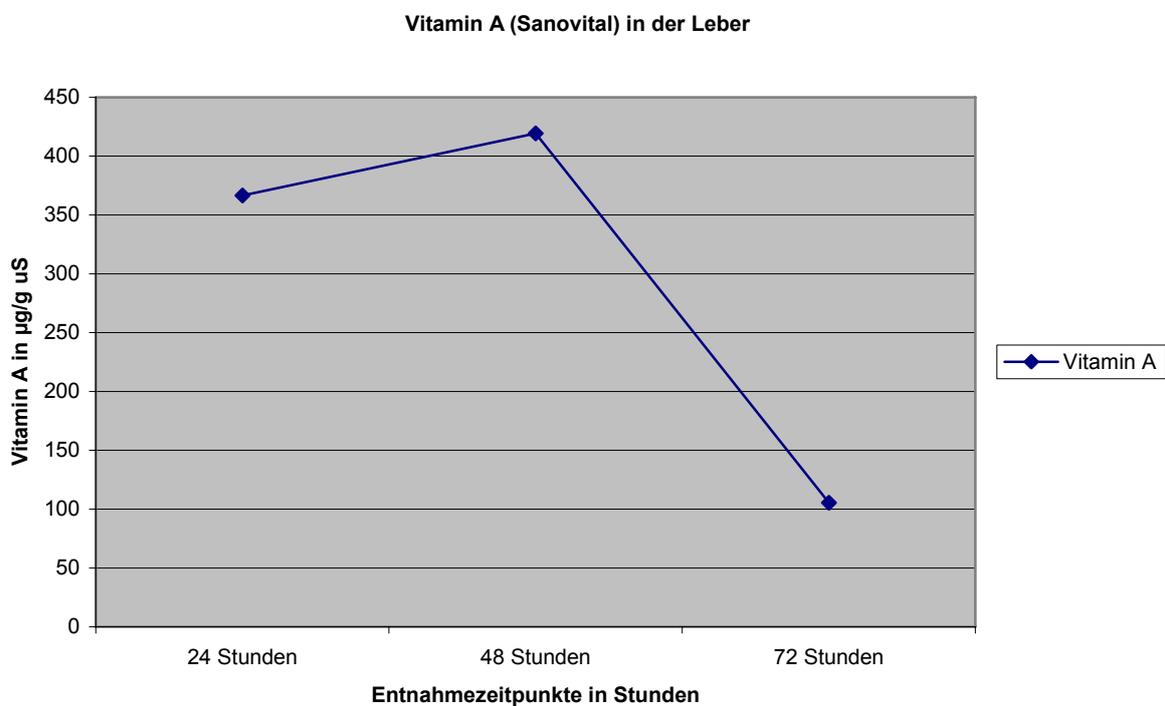
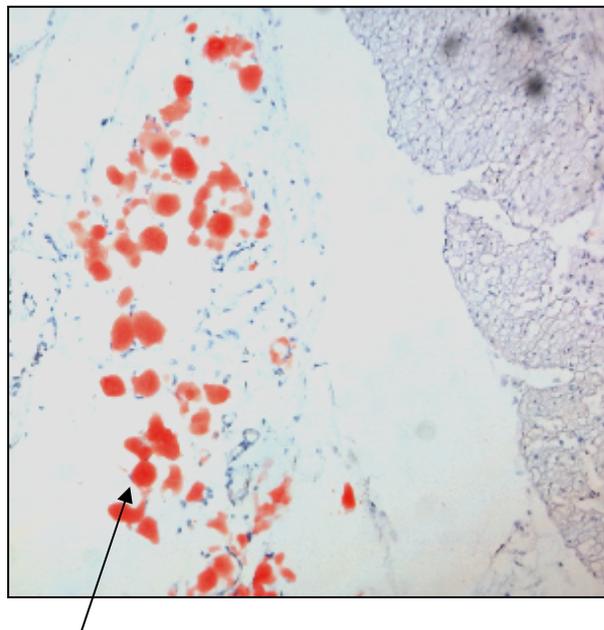


Abbildung 25: Vitamin A in µg / g uS in der Leber nach 4 ml Sanovital (Ergebnisse aus Lambrecht 2006)

Hierdurch wären auch die, in dieser Versuchsreihe, gefundenen Ergebnisse zu erklären. Es kommt zu einem gesteigerten Vitamin E Verbrauch infolge einer hohen Vitamin A Applikation. Anhand der Gewebeproben und der Tocopherolkonzentrationen lassen sich Tendenzen erkennen, dass sich die Tocopherolgehalte wieder normalisieren und die Gewebespeicher wieder mit Hilfe des im Futter vorhandenen Vitamin E aufgefüllt werden. Dies tritt bei der Versuchsgruppe II (Vergleichspräparat) schon innerhalb des Versuchszeitrahmens, nach 72 Stunden auf.

Um die Resorption, hinsichtlich des Vitamin E und A im Dünndarm zu spezifizieren, hätte eine andere Analysetechnik angewendet werden müssen, dies war jedoch nicht Ziel der Arbeit. Trotzdem sollte dies kurz an dieser Stelle erwähnt werden. Beim hier angewandten Verfahren lässt sich nur der Zeitpunkt der Aufnahme ins Lymphsystem verifizieren, nicht jedoch ob quantitativ eine Präferenz eines der fettlöslichen Vitamin von statten geht. Die histologischen Schnitte zeigen nur die Aufnahme der Fettemulsionströpfchen, an die die Vitamine gebunden sind, siehe Abbildung 26 unten.



1 Fettemulsionströpfchen

Abbildung 26: Mittels Öl in Rot gefärbte Fettemulsionströpfchen im Lymphplexus des Dünndarms. Vergrößerung V20, 40 Minuten nach oraler Applikation von 4 ml Sanovital AE

Zu diskutieren wäre, nach bestätigter gegenseitiger Beeinflussung der beiden Vitamine, A und E, ob eine einmalige Applikation hinsichtlich maximaler Anflutung beider Vitamine sinnvoll ist. Durch die hier gefundenen Ergebnisse lässt sich die positive Beeinflussung der Vitamin A Resorption, infolge zeitgleicher Vitamin E Verabreichung bestätigen. Unter Einbezug dieses positiven Effektes ist eine orale Applikation der beiden Vitamine als sinnvoll anzusehen. Die kombinierte Verabreichung hat jedoch auch einen negativen Effekt. Die Resorption von Vitamin E wird bei zeitgleicher Einnahme von Vitamin A gehemmt. Die maximal mögliche Konzentration im Blut und in den Organen kann nicht erreicht werden. Um dies zu kompensieren, wäre ein zweiter zeitversetzter Bolus, mitausschließlich Vitamin E, oder eventuell einem Vitamin E Agonisten in Erwägung zu ziehen.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Resorptions- und Speicherverhalten von oral verabreichten Vitamin E in zwei verschiedenen Aufbereitungsformen bei 6 Wochen alten Ferkeln zu untersuchen. Die Tiere der Gebrauchskreuzung Pietrain und Deutsche Landrasse wiesen zu Versuchsbeginn ein Gewicht von $18 \pm 3,2$ kg auf. Sie wurden nach Wurf, Geschlecht und Gewicht randomisiert. Zur Überprüfung möglicher Unterschiede im Resorptionsverhalten wurde das Vitamin E in emulgierter Form, als Sanovital AE Emulsion, oder in konventioneller pulverisierter Form, in einer Gelatine kapsel oral verabreicht. Beide Präparate enthielten in den verabreichten Dosen (4 ml Sanovital und einer Gelatine kapsel) äquivalente Mengen an Vitamin E (200mg).

Zur Darstellung der Serum- Tocopherol- Konzentrationen in den 3 Versuchsgruppen (Sanovital, Vergleichspräparat, Placebo) wurde den Tieren, sowohl vor, als auch nach Verabreichung des jeweiligen Präparates 4 ml Blut aus der Vena Cava cranialis entnommen. Die Zeitpunkte post interventionem waren 10 und 20 Minuten, sowie 1, 3, 5, 6, 7, 12, 24 Stunden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen einen deutlich schnelleren Anstieg des Tocopherolgehaltes bei Gabe des Emulsionspräparates im Vergleich zur konventionellen Darreichungsform. Zusätzlich fällt das Resorptionsvolumen, bzw. das Konzentrationsmaximum bei Applikation von emulgiertem Vitamin E größer aus. 3 Stunden post interventionem ist der Unterschied zwischen der Kontroll- Gruppe und der Sanovital- Gruppe signifikant ($p < 0,05$).

Trotz Weiterentwicklung der Wirkstoffformulierungen, hinsichtlich spezieller Sprühverfahren und sog. gecoateter Produkte, musste festgestellt werden, dass die emulgierte Darreichungsform quantitativ immer noch effektiver ist. Denn auch die Zusammensetzung von Emulsionen ist, vor allem hinsichtlich der verwendeten Ölkomponente optimiert worden.

Zur Entnahme der Organe (Leber, Niere, Lunge und Darmlymphknoten), ebenfalls in unterschiedlichen Zeitintervallen (24, 48, 72 Stunden post interventionem), werden die Tiere nach einer 14-tägigen Auswaschphase getötet. Anhand der Organproben konnte die Anflutung, Speicherung und das Absinken des Tocopherolgehaltes in den jeweiligen Geweben verifiziert werden.

Dabei zeichnet sich in Niere und Lunge ein nicht signifikanter Anstieg des Tocopherolgehaltes ab. In der Leber, sowie in den Darmlymphknoten führt die Applikation beider Wirkstoffformulierungen zu einer Reduzierung des Tocopherolgehaltes zu den Messzeitpunkten 24 und 48 Stunden post interventionem. Der reduzierte Gehalt gleicht sich nach 72 Stunden den Werten der Kontrollgruppe wieder an. Dieses Phänomen ist bei Verabreichung des emulgierten Vitamin E verstärkt. Vermutlich ist dies auf die Kombination der Vitamine A und E im Präparat Sanovital AE zurückzuführen.

Zur bildlichen Darstellung des Resorptionsweges sind Tieren der Sanovital- Gruppe in unterschiedlichen Zeitintervallen Gewebeproben von Dünndarm und Darmlymphknoten nach oraler Applikation von 4 ml Sanovital -Emulsion entnommen worden.

Anhand der histologischen Dünndarmschnitte lies sich der Resorptionsweg chronologisch verfolgen. Die Histologiebilder zeigen, dass das fettlösliche Vitamin E in emulgierter Wirkstoffformulierung (Feinemulgat) überwiegend über den korpuskulär-lymphatischen Resorptionsweg aufgenommen wird. Feinemulgat, sowie das an die Fetttröpfchen gebundenen Tocopherole, gelangen perizellulär, über die elastischen Interzellularspalten, bzw. über das zentrale Lymphgefäß der Zotten direkt in das Lymphsystem. Durch den, in dieser Arbeit nachgewiesene lymphatisch-korpuskulären Resorptionsweg wird das Leber-Pfortader-System umgangen. Dies ist vor allem bei Maldigestion (Funktionsbeeinträchtigung der Enterozyten), bei Malabsorption (Zottenatrophie), bei Fettresorptionsstörung (Steatorrhoe), sowie bei Störungen der Gallen- und Pankreasenzyme von Bedeutung, da die emulgierte Form des Vitamins, im Gegensatz zur konventionellen pulverisierten Formulierung auf diese Parameter nicht angewiesen ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch Applikation von Vitamin E in emulgierter Wirkstoffformulierung eine quantitativ bessere Resorption pro Zeiteinheit erzielt werden kann. Damit ist diese Darreichungsform vor allem bei erkrankten, kachektischen und geschwächten Tieren zu empfehlen und gegenüber konventionellen Aufbereitungsformen vorzuziehen. Hier liegt der Vorteil bei Verabreichung von Vitamin E in emulgierter Form.

7. Summary

Katharina Lutz

Investigation of the resorption of emulsified Vitamin E in piglets.

Purpose of this study was to investigate the resorption and storage properties of orally administered Vitamin E in different formula components in 6 week old piglets. At the beginning of the study the animals of the commercial crossbreed (Pietrain/German Landrace pig) weighed $18 \pm 3, 2$ kg. They were randomized according to litter, sex and weight and divided into one control group and two treatment groups. For the evaluation of possible differences in the resorption vitamin E was applied in an emulsified form (Sanovital AE emulsion), as well as in the conventional powder form applied orally in gelatine capsule. Both preparations contained equal amounts of vitamin E (200mg).

For the delineation of the tocopherol concentrations in the serum of all three experimental groups (Sanovital, comparative preparation and placebo) 4 ml of blood was taken from the anterior vena cava of all animals before as well as after the administration of the respective preparation. The points in time to draw blood were 10 and 20 minutes as well as 1,3,5,6,7,12 and 24 hours post interventionem.

The analysis shows clearly a faster increase in the concentration of tocopherol after application of the comparative preparation in comparison to the conventional pharmaceutical form. In addition to that the resorbed volume, or rather the maximum concentration, after the application of emulsified vitamin E is much higher. 3 hours post interventionem are the differences between the control and the sanovital group significant ($p < 0,05$).

Despite further developments in the formulation of the active ingredients regarding special spraying and so-called "coated" products it was found that the emulsified drug formulation remained more effective quantitatively for the composition of the emulsions was also further optimized with special regard to the oily component.

After an excretion period of 14 day the animals were killed. Organ samples of the liver, kidney, lung and iliac lymph nodes were taken at intervals of 24, 48 and 72 hours post interventionem. On the basis of these samples it was possible to verify the induction, storage and subsidence of the tocopherol content.

There is no significant increase in the tocopherol content emerges in the lung and kidney. In the liver, as well as in the iliac lymph nodes the application of both formulas results in a reduction of the tocopherol content after 24 and 48 hours. This reduced level returns to normal after 72 hours and approximates the levels found in the control group. This phenomenon is being stressed with the application of emulsified Vitamin E and is most likely due to the combination of the vitamins A and E in Sanovital AE.

For illustration of the resorptive path tissue samples of the small intestine and the iliac lymph nodes were taken from animals of the group treated with Sanovital. This was done at different intervals.

Based on the histological samples of the small intestine it was possible to follow the resorptive path chronologically. The histology showed that the fat-soluble vitamins in emulsified formulation were predominantly absorbed via the corpuscular-lymphatic path. Fine emulgates as well as the tocopherol bound to globules of fat enter the lymphatic system directly pericellularly, through elastic intercellular spaces, or via the central lymphatic vessel of the villi. In this study the corpuscular-lymphatic resorptive path which was found the portal circulation was bypassed. This is particularly important with conditions such as malabsorption, maldigestion, perturbed absorption of fat or dysfunction of biliary and pancreatic enzymes since the emulsified form of the vitamin as opposed to the conventional powder form is not dependent on these parameters.

Concluding these results the resorption per time interval is better with vitamin E in an emulsified pharmalogic form. This formula is particularly recommendable for sick, cachectic and weak animals and preferring in relation to conventional pharmalogic formulation. This is the advantage of orally given emulsified vitamin E.

9. Literaturverzeichnis

A

- Acuff RV., Thedford SS., Hidiroglou NN., Papas AM., Odom TA Jr.
Relative bioavailability of RRR- and all-rac-alpha-tocopheryl acetate in humans: studies using deuterated compounds.
Am J Clin Nutr. 1994 Sep;60(3):397-402
- Alam SQ., Alam BS.
Lipid peroxide, alpha-tocopherol and retinoid levels in plasma and liver of rats fed diets containing beta-carotene and 13-cis-retinoic acid.
J. Nutr. 1983 Dec;113(12):2608-14
- Amemiya T.
Effekts of vitamin E and selenium deficiencies on rats capillaries.
Int Journal Vitam Nutr Res. 1989; 59(2):122-6
- Anderson LE Sr., Myer RO., Brendemuhl JH., Mc Dowell LR.
The effect of excessive dietary vitamin A on performance and vitamin E status in swine fed diets varying in dietary vitamin E.
J. Anim Sci 1995;73:1093-98
- Armand M., Pasquier B., Andre M., Borel P., Senft M., Peyrot J., Salducci J., Portugal H., Jaussan V., Lairon D.
Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract.
Am J Clin Nutr. 1999 Dec;70(6):1096-106
- Arnhold T., Nau H., Meyer S., Rothkoetter HJ., Lampen AD.
Porcine intestinal metabolism of excess vitamin A differs following vitamin A supplementation and liver consumption.
J Nutr. 2002 Feb;132(2):197-203
- Aten RF., Kolodecik TR., Behrmann HR.
Ovarian vitamin E accumulation: evidence for a role of lipoproteins.
Endocrinology. 1994 Aug;135(2): 533-9
- ### B
- Bensoussan K., Morales CR., Hermo L.
Vitamin E deficiency causes incomplete spermatogenesis and affects the structural differentiation of epithelial cells of the epididymis in the rat.
J Androl. 1998 May-Jun;19(3):266-88
- Bieri JG., Tolliver TJ.
Reversal by bile acid on the inhibition of alpha-tocopherol absorption by retinoic acid.
J. Nutr. 1982 Feb. 112(2):401-3

- Bieri JG., Wu AL., Tolliver TJ.
Reduced intestinal absorption of vitamin E by low dietary levels of retinoic acid in rats.
J. Nutr. 1981 Mar;111(3):458-67
- Bieri JG., Evarts RP.
Effect of plasma lipid levels and obesity on tissue stores of alpha-tocopherol.
Proc. Soc Exp Biol Med. 1975 Jun;149(2):500-2
- Bjorneboe A., Bjorneboe GE., Drevon CA.
Absorption, transport and distribution of vitamin E.
J Nutr. 1990 Mar;120(3):233-42
- Bjorneboe A., Bjorneboe GE., Hagen BF., Nossen JO., Drevon CA.
Secretion of alpha-tocopherol from cultured rat hepatocytes.
Biochim Biophys Acta. 1987 Nov 21;922(2):199-205
- Bjorneboe A., Bjorneboe GE., Bodd E., Hagen BF., Kveseth N., Drevon CA.
Transport and distribution of alpha-tocopherol in lymph, serum and liver cells in rats.
Biochim. Biophys Acta. 1986 Dec 19;889(3):310-5
- Blakely SR., Mitchell GV., Jenkins MY., Grundel E., Whittaker P.
Canthaxanthin and excess vitamin A alter alpha-tocopherol, carotenoid and iron status in adult rats.
J. Nutr. 1991 Oct;121(10):1649-55
- Blatt DH., Leonard SW., Traber MG.
Vitamin E kinetics and the function of tocopherol regulatory proteins.
Nutrition. 2001 Oct;17(10):799-805
- Blatt DH., Pryor WA., Mata JE., Rodriguez-Proteau R.
Re-evaluation of the relative potency of synthetic and natural alpha-tocopherol: experimental and clinical observations.
J Nutr Biochem. 2004 Jul;15(7):380-95
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt KV.
Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review.
Ann Bot (Lond). 2003 Jan;91 Spec No:179-94
- Brigelius-Flohe R., Traber MG.
Vitamin E: function and metabolism
FASEB J. 1999 Jul;13(10):1145-55

- Brigelius-Flohe R., Kelly FJ., Salonen JT, Neuzil J., Zingg JM., Azzi A.
The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research.
Am J Clin Nutr. 2002 Oct;76(4):703-16
- Brisson GJ., Schultz RD.
Cellular immune response in pigs fed a vitamin E- and selenium- deficient diet.
J Anim Sci. 1991 Apr;69(4):1575-82
- Bonnette ED., Kornegay ET., Lindemann MD, Hammerberg C.
Humoral and cell-mediated response and performance of weaned pigs fed Four supplemental vitamin E levels and housed at two nursery temperatures.
J Anim Sci. 1990 May;68(5):1337-45
- Borel P., Mekki N., Boirie Y., Partier A., Grolier P., Alexandre-Gouabau MC., Beaufriere B., Armand M., Lairon D., Azais Braesco V.
Postprandial chylomicron and plasma vitamin E responses in healthy older subjects compared with younger ones.
Eur J Clin Invest. 1997 Oct;27(10):812-21
- Boscoboinik D., Szewczyk A., Azzi A.
Alpha-tocopherol (Vitamin E) regulates vascular smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity.
Arch. Biochem Biophys. 1991, Apr, 286(1):264-9
- Burton GW., Ingold KU., Cheeseman KH., Slater TF.
Application of deuterated alpha-tocopherols to the biokinetics and bioavailability of vitamin E.
Free Radic Res Commun. 1990;11(1-3):99-107
- Burton GW., Traber MG.
Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability.
Annu. Rev. Nutr. 1990; 10:357-382
- Buttriss J.L. und Diplock A.T.
The relationship between alpha-tocopherol and phospholipid fatty acids in rat liver subcellular membrane fractions.
Biochem Biophys Acta, 1988 Sep 2;962(1):81-90
- C**
- Cabell CA., Ellis NR
The vitamin E content of certain varieties of wheat, corn, grasses and legumes.
The journal of nutrition 1942/ 23:633-644
- Cadenas S., Rojas C., Perez-Campo R., Copez-Torres M., Barja G.
Vitamin E protects guinea pig liver from lipid peroxidation without depressing levels of antioxidants.
Int. J Biochem Cell Biol 1995 Nov; 27(11):1175-1181

Catignani GL.

An alpha-tocopherol binding protein in rat liver cytoplasm.
Biochem Biophys Res Commun 1975;67:66–72.

Chan AC.

Partners in defense, vitamin E and vitamin C
Can J Physiol Pharmacol. 1993 Sep;71(9):725-31

Chopra RK., Bhagavan HN.

Relative bioavailabilities of natural and synthetic vitamin E formulations containing mixed tocopherols in human subjects.
Int J Vitam Res. 1999 Mar;69(2):92-5

Ching S., Mahan DC., Wieseman TG., Fastinger ND.

Evaluating the antioxidant status of weanling pigs fed dietary vitamins A and E.
J. Anim Sci. 2002 Sep;80(9):2396-401

Cohn W., Goss-Sampson MA., Grun H., Muller DP.

Plasma clearance and net uptake of alpha-Tocopherol and low-density lipoprotein by tissues in WHHL and control rabbits.
Biochem J. 1992 Oct 1;287 (Pt1):247-54

Cooper DR., Kling OR., Carpenter MP.

Effect of vitamin E deficiency on serum concentration of follicle-stimulating hormone and testosterone during testicular maturation and degeneration.
Endocrinology. 1987 Jan;120(1):83-90

Corrigan JJ Jr.

The effect of vitamin e on warfarin-induced vitamin K deficiency.
Ann N Y Acad Sci. 1982;393:361-8

Corrigan JJ Jr.

Coagulation problems relating to vitamin E.
Am J Pediatr Hematol Oncol. 1979 Summer;1(2):169-73

Czyba JC

Effects of hypervitaminosis E on the testis of the golden hamster.
C R Seances Soc Biol Fil. 1966;160(4):765-8

D

Das P., Chowdhuy M.

Vitamin E-deficiency induced changes in ovary and uterus.
Mol Cell Biochem. 1999 Aug; 198(1-2): 151-6

Davidson MG., Geoly FJ., Gilger BC., Mc Lellan GJ., Whitley W.

Retinal degeneration associated with vitamin E deficiency in hunting dogs.
J Am Vet Med Assoc. 1998 Sep 1;213(5):645-51

De Gritz BG

Copper zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) in antioxidant deficient pigs.

Zentralbl Veterinarmed A 1995 Nov; 42(9):561-73

Drevon CA.

Absorption, transport and metabolism of vitamin E.

Free Radic Res. Commun. 1991;14(4):229-46

Dutta-Roy AK.

Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of alpha-tocopherol: role of tocopherol-binding proteins.

Food Chem Toxicol. 1999 Sep-Oct;37(9-10):967-71

Duttay-Roy AK., Leishman DJ., Gordon MJ., Campbell FM., Duthie GG.

Identification of a low molecular mass (14.2 kDa) alpha-tocopherol-binding Protein in the cytosol of rat liver and heart.

Biochem Biophys Res Commun 1993;196:1108-12

E

Eicher SD., Morrill JL., Velazco J.

Bioavailability of α -tocopherol fed with retinol and relative bioavailability of D- α -tocopherol or DL- α -tocopherol acetate.

J Dairy Sci 80:393-399;1997

F

Feki M., Souissi M., Mebazaa A.

Vitamin E: structure, metabolism, and functions.

Ann Med Interne (Paris). 2001 Oct;152(6):384-91

Ferrans VJ., Van Fleet JF.

Cardiac lesions of selenium und vitamin E deficiency in animals

Heart Vessels Suppl. 1985;1:294-7

Fontaine M, Valli VE, Young LG, Lumsden JH.

Studies on vitamin E and selenium deficiency in young pigs. I.

Hematological and biochemical changes.

Can J Comp Med. 1977 Jan; 41(1):41-51

Frank J., Weiser H., Biesalski HK.

Interaction of vitamins E and K: effect of high dietary vitamin E on phyloquinone activity in chicks.

Int J Vitam Nutr Res. 1997;67(4):242-7

Fujikawa A., Gong H., Amemiya T.

Vitamin E prevents changes in the cornea and conjunctiva due to vitamin A deficiency.

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2003 Apr;241(4):287-97. Epub 2003 Mar 15

Fuhrmann H., Sallmann HP., Thesing E.

Effects of vitamins A and E on the antioxidative metabolism of weaning pigs given dietary fats of different qualities.

Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 1997 Sep;104(9):387-91

G

Gallo-Torres HE., Ludorf J., Brin M.

The effect of medium-chain triglycerides on the bioavailability of vitamin E.

Int J Vitam Nutr Res. 1978;48(3):240-1.

Geyer RP.

Fat absorption and the experimental basis of oral fat emulsions.

Ann NY Acad Sci 1952 Oct 10;56(1):16-21

Goss-Sampson MA, Mac Evilly CJ, Muller DP.

Longitudinal studies of the neurobiology of vitamin E and other antioxidant systems, and neurological funktion in the vitamin E deficient rat.

J Neurol Sci. 1988 Oct;87(1):25-35

Goss-Sampson MA., Kriss T., Muller DP.

Retinal abnormalities in experimental vitamin E deficiency.

Free Radic Biol Med. 1998 Sep;25(4-5):457-62

Gutteridge J.M.C. und Halliwell B.

The measurement and mechanism of lipidperoxidation in biological systems.

Trends in Biochem. Scien., 1990, 15: 129-135

Gutteridge J.M.C.

Peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage.

Clin Chem, 1995; 41(12):1819-1828

H

Hänichen T., Heinritzi K., Bollwahn W., Blende HM.

Untersuchungen über den Nutzen der Anwendung von Vitamin E und Selen zur Prophylaxe und Therapie des porcinen Stresssyndroms.

Tierarztl. Prax. 1988;16:147-151

Hanke A.

The biochemical and physiological role of vitamins A and E and their interactions.

Acta Vitaminol Enzymol 1985;7 Suppl:5-11

Harrison EH.

Mechanism of digestion and absorption of dietary vitamin A.

Annu Rev Nutr. 2004 May 21

Haubold H.

Beiträge zur corpuskulären lymphatischen Resorption von Milchfett und feinen Fettemulsionen.

Fett-Seifen-Anstrichmittel: Die Ernährungsindustrie 61(8);669-772, 1959

Haubold H., Heuer E., Loew W., Rohuschinsky R.

Dünndarmstruktur und Milchfettresorption

Milchwissenschaft 21; Nr. 1, 21-28, 1966

Haubold H., Heuer E., Loew W., Rohuschinsky R.

Nachweis von Milchfettpartikelchen im Protoplasma lebender Zellkulturen.

Milchwissenschaft 20; 181-188, 1965

Haubold H., Heuer E., Loew W., Rohuschinsky R.

Resorptionsfragen von Vollmilch, Sahne und Butter

Milchwissenschaft 15; 302, 1964

Haubold H., Heuer E., Loew W., Rohuschinsky R.

Histologische Beiträge zur Resorption von Fetten und Fettemulsionen.

Fette-Seifen-Anstrichmittel 64; 606, 1962

Herrera E., Barbas C.

Vitamin E: action, metabolism and perspectives.

J Physiol Biochem. 2001 Mar;57(1):43-56

Herrmann RK., Robison WG JR., Bieri JG.

Deficiencies of vitamin E and A in the rat: lipofuscin accumulation in the choroid.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 1984 Apr;25(4):429-33

Hidiroglou M.

Plasma kinetics of tritiated d- α -tocopherol in sheep given intravenously in emulsion or ethanol.

Ann Rech Vet 1991;22(4):345-52

Hidiroglou M., Farnworth E., Butler G.

Vitamin E and fat supplementation of sows and the effect on tissue vitamin E

concentrations in their progeny.

Reprod Nutr. Dec. 1993;33(6): 557-65

Hidiroglou M., Batra TR., Farnworth ER., Markham F.

Effect of vitamin E supplementation on immune status and alpha-tocopherol in plasma of piglets.

Reprod Nutr Dev. 1995;35(4):443-50

Hollander D., Dadufalza V.

Lymphatic and portal absorption of vitamin E in aging rats.

Dig. Dis. Sci. 1989 May;34(5):768-72

Hong CB., Chow CK.

Induktion of eosinophilic enteritis and eosinophilia in rats by vitamin E and selenium deficiency.

Exp Mol Pathol. 1988 Apr;48(2):182-92

Hoppe PP., Schoner FJ., Frigg M.

Effects of dietary retinol on hepatic retinol storage and on plasma and tissue alpha-tocopherol in pigs.

Int J. Vitam Nutr Res 1992;62(2):121-9

Hoppe PP., Krennrich G.

Bioavailability and potency of natural-source and all-racemic alpha-tocopherol in the human: a dispute.

Eur J Nutr. 2000 Oct;39(5):183-93

Hoskinson CD., Chew BP., Wong TS.

Effects of injectable beta-carotene and Vitamin A on lymphocyte proliferation and polymorphonuclear neutrophil function in piglets.

Biol Neonate. 1992;62(5):325-36

Huang C.J., Shaw HM.

Tissue vitamin E status is compromised by dietary protein insufficiency in young growing rats.

J. Nutr. 1994 Apr;124(4):571-579

I

Iben, B.

Importance of oral iron supplementation in pigs in the first hours of life.

Tierarztl. Prax Ausg. G Großtiere Nutztiere 1998 Feb; 26(1): 36-40

Ibrahim W., Lee US., Yeh CC., Szabo J., Bruckner G., Chow CK.

Oxidative stress and antioxidative status in mouse liver: effects of dietary lipid, vitamin E and iron.

J. Nutr. 1997 Jul; 127(7):1401-1406

Iuliano L., Micheletta F., Maranghi M., Frati G., Diczfalusy U., Violi F.

Bioavailability of vitamin E as function of food intake in healthy subjects: effects on plasma peroxide-scavenging activity and cholesterol-oxidation products.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001 Oct;21(10):E34-7

J

Jack Yang NY., Desai ID.

Effect of high levels of dietary vitamin E on liver and plasma lipids and fat soluble vitamins in rats.

J. Nutr. 1977 Aug;107(8):1418-26

Jensen M., Lindholm A., Hakkarainen J.

The vitamin E distribution in serum, liver, adipose and muscle tissues in the pig during depletion and repletion.

Acta vet. Scand. 1990;31:129-136

Julianto T., Yuen KH., Noor AM.

Improved bioavailability of vitamin E with a self emulsifying formulation
International Journal of Pharmaceutics, 2000 Apr.25;200(1): 53-57

K

Kaempff-Rotzoll DE., Traber MG., Arai H.

Vitamin E and transfer proteins.
Curr Opin Lipidol. 2003 Jun;14(3):249-54

Kaneko K., Kiyose C., Ueda T., Ichikawa H., Igarashi O.

Studies of the metabolism of alpha-tocopherol stereoisomers in rats using
[5-methyl-(14)C]SRR- and RRR-alpha-tocopherol.
J Lipid Res. 2000Mar;41(3):357-67

Kaneko K., Kiyose C., Ueda T., Ichikawa H., Igarashi O.

Studies of the metabolism of alpha-tocopherol stereoisomers in rats using
[5-methyl-(14)C]SRR- and RRR-alpha-tocopherol.
J Lipid Res. 2000 Mar;41(3):357-67

King N.

Die Membran der Milchfettkügelchen
Volkswirtschaftlicher Verlag, Kempten, 1957

Kiyose C., Muramatus R., Fujiwara Y., Ueda T., Igarashi O.

Biodiscrimination of alpha- tocopherol stereoisomers during intestinal
absorption.
Lipids. 1995 Nov;30(11):1015-8

Kolb E., Hoffmann U.

Zur Frage der zweckmäßigen Form der Anwendung von Fe-Dextran, seiner
Verwertung sowie des Mechanismus einer möglichen Schädigung der
Ferkel.
Mh. Vet. Med., 1989; 44: 497-501

Kostner GM., Oettl K., Jaauhianen M., Ehnholm C., Esterbauer H., Dieplinger H.

Human plasma phospholipid transfer protein accelerates
exchange/transfer of α -tocopherol between lipoproteins und cells.
Biochem J 1995;305:659-67

L

Lannek N., Lindberg P.

Vitamin E and selenium deficiencies (VESD) of domestic animals.
Adv Vet Sci Comp Med. 1975;19:127-64

Lamont, HG., Luke D., Gordon WA.

Some pig diseases.
Vet Rec. 1950 Dec 9;62(49):737-47

Lauridsen C., Engel H., Craig AM., Traber MG.
Relative bioactivity of dietary RRR- and all-rac-alpha-tocopheryl acetates
in swine assessed with deuterium-labeled vitamin E.
J Anim Sci. 2002 Mar;80(3):702-7

Lauridsen C., Engel H., Jensen SK., Craig AM., Traber MG.
Lactating sows and suckling piglets preferentially incorporate RRR- over
all-rac-alpha-tocopherol into milk, plasma and tissues.
J Nutr. 2002 Jun;132(6):1258-64

Liebler D.C., Burr J.A., Philips L., Ham A.J.
Gas chromatography-mass spectrometry analysis of vitamin E and its
oxidation products.
Anal Biochem. 1996 Apr 5;236(1):27-34.

Lodge JK., Hall WL., Jeanes YM., Proteggente AR.
Physiological factors influencing vitamin E biokinetics.
Ann N Y Acad Sci. 2004 Dec;1031:60-73

M

Mc Murray CH., Rice DA., Kennedy S.
Experimental models for nutritional myopathy
Ciba Found Symp. 1983;101:201-23

Martin MM., Hurley LS.
Effect of large amounts of vitamin E during pregnancy and lactation.
Am J Clin Nutr. 1977 Oct;30(10):1629-37

Mathias PM., Harries JT., Peters TJ., Muller DP.
Studies on the in vivo absorption of micellar solutions of tocopherol and
tocopheryl acetate in the rat: demonstration and partial characterization of
a mucosal esterase localized to the endoplasmic reticulum of the
enterocyte.
J Lipid Res. 1981 Jul;22(5):829-37

Mavromatis J., Koptopoulos G., Kyriakis SC., Papasteriadis A., Saoulidis K.
Effects of alpha-tocopherol and selenium on pregnant sows and their
piglets immunity and performance.
Zentralbl Veterinarmed A. 1999 Nov;46(9):545-53

Meier R., Tomizaki T., Schulze-Briese C., Baumann U., Stocker A.
The molecular basis of Vitamin E retention: structure of human alpha-
tocopherol transfer protein.
J Mol Biol. 2003 Aug 15;331(3):725-34

Moreira I., Mahan DC.
Effect of dietary levels of vitamin E (all-rac-tocopheryl acetate) with or
without added fat on weanling pig performance and tissue alpha-
tocopherol concentration.
J Anim Sci. 2002 Mar;80(3):663-9

- Muralidhara KS., Hollander D.
Intestinal absorption of alpha-tocopherol in the unanesthetized rat. The influence of luminal constituents on the absorptive process.
J Lab Clin Med. 1977 Jul;90(1):85-91
- Miller ER.
Importance of diet of dam and colostrum to the biological antioxidant status and parenteral iron tolerance of the pig.
J. Anim. Sci. 1986 Dec;63(6): 1905-14
- Machlin LJ., Filipski R., Nalson J., Horn LR., Brin M.
Effects of a prolonged vitamin E deficiency in the rat.
J Nutr. 1977 Jul;107(7):1200-8
- Mahan DC.
Assessment of the influence of dietary Vitamin E on sows and offspring in three parities: reproductive performance, tissue tocopherol, and effects on progeny.
J. Anim. Sci. 1991 Jul;69(7):2904-17
- Mahan DC.
Effects of dietary vitamin E on sows reproductive performance over a five-parity period.
J. Anim. Sci. 1994 Nov;72(11):2870-9
- Mahan DC., Kim YY., Stuart RL.
Effect of vitamin E sources (RRR- or all-rac-alpha-tocopheryl acetate) and levels on sow reproductive performance, serum, tissue, and milk alpha-tocopherol contents over a five-parity period, and the effects on the progeny.
J Anim Sci. 2000 Jan;78(1):110-9
- Mavromatis J., Koptopoulos G., Kyriakis SC., Papasteriadis A., Saoulidis K.
Effects of α -Tocopherol and Selen on pregnant sows and their piglets` Immunity and performance.
Zentralbl. Veterinarmed. A 1999 Nov; 46(9): 545-53
- Marin-Gunzman J., Mahan DC., Chung YK., Pate JL., Pope WF.
Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue response, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts.
J Anim Sci. 1997 Nov;75(11):2994-3003
- Marin-Gunzman J., Mahan DC., Pate JL.
Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars.
J Anim Sci. 2000 Jun;78(6):1537-43

- Mc Murray CH., Rice DA., Kennedy S.
Experimental models for nutritial myopathy
Ciba Found Symp. 1983;101:201-23
- Moir DC, Masters HG
Hepatitis dietetica, nutritional myopathy, mulberry heart disease and
associated hepatic selenium level in pigs.
Aust Vet Journal 1979 Aug;55(8):360-4
- Mulder H.
The surface layers of milk fat globules
Nederlands melk- en zuiveltijdschrift, Vol. II, No. 3, Aug./Sep. 1957
- Mutaku JF., Many MC, Colin I., Deneff JF, van den Hove MF.
Antigoitrogenic effect of combined supplementation with dl- α -tocopherol
ascorbic acid and β -carotene and of dl- α -tocopherol alone in the rat.
J. Endocrinol 1998 Mar; 156(3):551-561
- Mavromatis J., Koptopoulos G., Kyriakis SC., Papasteriadis A., Saoulidis K.
Effects of alpha-tocopherol and selenium on pregnant sows and their
piglets immunity and performance.
Zentralbl Veterinarmed A. 1999 Nov;46(9):545-53
- Moriguchi S., Muraga M.
Vitamin E and immunity.
Vitam Horm. 2000;59:305-36
- Mudron P., Levkut M., Revajova V., Kovac G.
Studies of immune response in pigs fed with high vitamin E-dosages.
Dtsch Tierarztl Wochenschr. 2000 Oct;107(10):411-4
- N**
- Nelson JS., Fitch CD., Fischer VW., Broun GO Jr., Chou AC.
Progressive neuropathologic lesions in vitamin E-deficient rhesus
monkeys.
J Neuropathol Exp Neurol. 1981 Mar;40(2):166-86
- Nenseter MS., Myklebost O., Blomhoff R., Drevon CA., Nilsson A., Norum KR., Berg
T.
Low-density-lipoprotein receptors in different rabbit liver cells.
Biochem J. 1989 Jul 15; 261(2):587-93
- Nockels CF., Menge DL., Kienholz EW.
Effect of excessive dietary vitamin E on the chick.
Poult Sci. 1976 Mar;55(2):649-60

O

Ochoa L., Mc Dowell LR., Williams SN., Wilkinson N., Boucher J., Lentz EL.
α-Tocopherol concentrations in serum and tissues of sheep fed different
sources of Vitamin E.
J Anim Sci. 1992 Aug;70(8):2568-73

P

Packer L, Weber SU, Rimbach G
Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell
signalling.
J Nutr. 2001 Feb;131(2):369S-73S

Pillai SR., Traber MG., Kayden HJ., Cox NR., Toivio-Kinnucan M., Wright JC.,
Braund KG., Whitley RD., Gilger BC., Steiss JE.
Concomitant brainstem axonal dystrophy and necrotizing myopathy in
vitamin E-defizient rats.
J Neurol Sci. 1994 May;123(1-2):64-73

Pinelli-Saavedra A.
Vitamin E in immunity and reproductive performance in pigs.
Reprod Nutr Dev. 2003 Sep-Oct;43(5):397-408

Plonait H., Bickhardt K., Pohlenz J., von Mickwitz G.
Klinische Befunde der so genannten Maulbeerherzkrankheit der Schweine
Dtsch. Tierarztl. Wschr. 1970;77:357-392

Putnam M.E., Comben N.
Vitamin E
Vet Rec. 1987 Dec 5;121(23):541-5.

Q

R

Ralevic V., Milla PJ., Brunstock G.
Effects of chronic vitamin E deficiency on vascular funktion – a study of
sympathetic nerves, smooth muscle and endothelium of the mesenteric
arterial bed of the rat.
Br J Pharmacol. 1995 Dec;116(7):2983-8

Rice DA, Kennedy S.
Vitamin E, selenium, and polyunsaturated fatty acid concentrations and
glutathione peroxidase activity in tissues from pigs with dietetica
microangiopathy (mulberry heart disease).
Am J Vet Res. 1989 Dec.; 50(12): 2101-4

Riis RC., Sheffy BE., Loew E., Kern TJ., Smith JS.
Vitamin E deficiency retinopathy in dogs.
Am J Vet Res. 1981 Jan;42(1):74-86

Rimbach G., Minihane AM., Majewicz J., Fischer A., Pallauf J., Virgli F., Weinberg PD.

Regulation of cell signalling by vitamin E.
Proc Nutr Soc. 2002 Nov;61(4):415-25

Ronéus B., Essén-Gustavsson B.

Muscle fibre types and enzyme activities in healthy foals and foals affected by muscular dystrophie.
J. Vet. Med. A,33, 1-12; 1986

Roth F.X., Kirchgessner M.

Zum Einfluß von Vitamin-E- und Selenzulagen auf das Beinschwächesyndrom beim Schwein.
Zbl. Vet. Med. A, 1975;22:854-863

S

Sauberlich HE.

Bioavailability of vitamins.
Prog Food Nutr Sci. 1985;9(1-2):1-33

Schafer H., Elmadfa I.

Relative bioactivity of alpha- and gamma-tocopherol calculated from respiration parameters in rat liver mitochondria.
Ann Nutr Metab. 1984;28(5):297-304

Schlotke B.

Die Maulbeerherzkrankheit oder diätetische Mikroangiopathie.
Tierärztl. Prax. 1975; 3:303-308

Schuelke M., Elsner A., Finckh B., Kohlschutter A., Hubner C., Brigelius-Flohe R.

Urinary alpha-tocopherol metabolites in alpha-tocopherol transfer protein-deficient patients.
J Lipid Res. 2000 Oct;41(10):1543-51

Schultz M., Leist M., Petrzika M., Gassmann B., Brigelius-Flohe R.

Novel urinary metabolite of alpha-tocopherol, 2,5,7,8-tetramethyl-2(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman, as an indicator of an adequate vitamin E supply?
Am J Clin Nutr. 1995 Dec;62(6 Suppl):1527S-1534S.

Seffner W., Wittig W., Rittenbach P.

Investigations on Mulberry heart disease (microangiopathy) of pigs.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 1967 May 1;74(9):213-20

Shoshkes M., Geyer RP., Stare FJ.

Fat emulsions for oral nutrition. I. The absorption of fat in the rat.
J. Lab. Clin. Med 1950 Jun;35(6):968-75

- Sies H., Stahl W., Sundquist AR.
Antioxidant functions of vitamins. Vitamin E and C, beta-carotene, and other carotenoids.
Ann N Y Acad Sci. 1992 Sep 30;669:7-20
- Sies H.
Relationship between free radicals and vitamins: an overview.
Int J Vitam Nutr Res Suppl. 1989;30:215-23.
- Southam E., Thomas PK, King RH, Goss-Sampson MA., Muller DP.
Experimental vitamin E deficiency in rats. Morphological and functional evidence of abnormal axonal transport secondary to free radical damage.
Brain. 1991 Apr;114 (Pt 2):915-36
- Shakibi JG, Stone WL:
A quantitative microscopic analysis of the myocardial interstitial tissue space and myocardial fiber diameter in rats with vitamin E and selenium deficiency.
Jpn Heart J. 1987 Jan; 28(1):97-105
- Stahl W., Sies H.
Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids.
Diabetes. 1997 Sep;46 Suppl 2:S14-8
- Stocker A., Azzi A.
Tocopherol-binding proteins: their function and physiological significance.
Antioxid Redox Signal. 2000 Fall;2(3):397-404
- Stocker A.
Molecular mechanisms of Vitamin E transport.
Ann N Y Acad Sci. 2004 Dec;1031:44-59
- Stocker A., Zimmer S., Spycher SE., Azzi A.
Identification of a novel cytosolic tocopherol-binding protein: structure, specificity, and tissue distribution.
IUBMB Life. 1999 Jul;48(1):49-55
- Sunder A., Halle I., Flachowsky G.
Vitamin E hypervitaminosis in laying hens.
Arch Tierernahr. 1995; 52(2):185-94
- Sunder A., Flachowsky G.
Influence of high vitamin E dosages on retinol and carotenoid concentration in body tissues and eggs of laying hens.
Arch Tierernahr 2001;55(1):43-52
- Swanson JE., Ben RN., Burton GW., Parker RS.
Urinary excretion of 2,7,8-Trimethyl-2-(beta-carboxyethyl)-6-hydroxychroman is a major route of elimination of gamma-Tocopherol in humans.
J Lipid Res. 1999 Apr;40(4):665-71

T

- Tesoriere L., Bongiorno A., Pintaudi AM., D'Anna R., D'Arpa D., Livrea MA.
Synergistic interactions between vitamin A and E against lipid peroxidation in phosphatidylcholine liposomes.
Arch. Biochem. Biophys. 1996 Feb 1;326(1):57-63
- Tollerz G., Lannek N.
Protection against iron toxicity in vitamin E deficient piglets and mice by vitamin E and synthetic antioxidants.
Nature. 1964 Feb. 22;201:846-7
- Tomassi G., Silano V.
An assessment of the safety of tocopherols as food additives.
Food Chem. Toxicol. 1986 Oct-Nov; 24(10/11):1051-1061
- Towfighi J.
Effects of chronic vitamin E deficiency on the nervous system of the rat.
Acta Neuropathol (Berl). 1981;54(4):261-7
- Traber MG., Ramakrishnan R., Kayden HJ.
Human plasma vitamin E kinetics demonstrate rapid recycling of plasma RRR-alpha-tocopherol.
Proc Natl Acad Sci USA. 1994 Oct 11;91(21):10005-8
- Traber MG., Sies H.
Vitamin E in humans: demand and delivery.
Annu Rev Nutr. 1996;16:321-347
- Traber MG., Elsner A., Brigelius-Flohe R.
Synthetic as compared with natural vitamin E is preferentially excreted as alpha-CEHC in human urine: studies using deuterated alpha-tocopheryl acetates.
FEBS Lett. 1998 Oct 16;437(1-2):145-8
- Traber MG., Rudel LL., Burton GW., Hughes L., Ingold KU., Kayden HJ.
Nascent VLDL from liver perfusions of cynomolgus monkeys are preferentially enriched in RRR- compared with SRR-alpha-tocopherol: studies using deuterated tocopherols.
J Lipid Res. 1990 Apr;31(4):687-94
- Traber MG., Burton GW., Hamilton RL.
Vitamin E trafficking.
Ann NY Acad Sci. 2004 Dec;1031:1-12

U

- Ueberschar S.
Sudden death in suckling.
Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 1966 Apr. 1;73(7): 145-50

V

- Van Vleet JF, Ferrans VJ.,Ruth GR.
Ultrastructural alterations in nutritional cardiomyopathy of selenium
vitamin E deficient swine. I. Fiber lesions.
Lab Invest. 1977 Aug; 37(2): 188-200
- Van Vleet JF, Ruth G, Ferrans VJ.
Ultrastructural alterations in skeletal muscle of pigs with selenium- vitamin
E deficiency.
Am J Vet Res. 1976 Aug; 37(8):911-22
- Volkheimer G.
Zur Resorption von korpuskulärer Elemente durch die Darmschleimhaut
und deren Ausscheidung in den Harn.
Dtsch. Gesundh. Wes. 16; 1610, 1961
- Volkheimer G.
Durchlässigkeit der Darmschleimhaut für großkorpuskuläre Elemente.
Zeitschr. f. Gastroenterologie 2; 57, 1964
- Vollmerhaus, B., W. Bollwahn, Heide Roos, K. Heinritzi und W.Waibel (1982)
Vereinfachte Methode zur Blutentnahme Beim Ferkel
Prakt. Tierarzt 63, 433-435

W

- Wagner KH.
Resorption of fat-soluble vitamins with respect to the used solvents.
Klein. Wochenschr. 1954 Jan 15; 32(3-4):87-9
- Wallimann M., Hanimann R., von Rotz A., Jucker H.
Zur Selen- und Vitamin E-Versorgung des Schweins.
Beziehung zur Maulbeerkrankheit. 1. Teil
Schweiz. Arch. Tierheilk. 1984; 126: 553-570
- Wallimann M., Hanimann R., von Rotz A., Jucker H.
Zur Selen- und Vitamin E-Versorgung des Schweins.
Beziehung zur Maulbeerkrankheit. 2. Teil
Schweiz. Arch. Tierheilk. 1984; 126: 621-631
- Wang X. und Quinn P.J.
Vitamin E and its function in membranes.
Prog. Lipid Res. 1999Jul; 38(4):309-336
- Wang X., Marini RP., Hebuterne X., Fox JG., Krinsky NI., Russel RM.
Vitamin E enhances the lymphatic transport of beta-carotene and its
conversion to vitamin A in the ferret.
Gastroenterology. 1995 Mar; 108(3):719-26
- Wilkins W., Kümmerlen E.
Perorale Injektion mit Hilfe emulgierter Vitamine
Der praktische Tierarzt, April 1973; 54, Nr. 4

X

Y

Yang NY., Desai ID.

Reproduktive consequences of mega vitamin E supplements in female rats.

Experientia. 1977 Nov 15;33(11):1460-1

Z

Zaman Z., Fielden P., Frost PG.

Simultaneous determination of Vitamin A and E and carotenoids in plasma by reversed-phase HPLC in elderly and younger subjects.

Clin Chem. 1993 Nov; 39(11Pt 1): 2229-34

Zimmer S., Stocker A., Sarbolouki MN., Spycher SE., Sassoon J., Azzi A.

A novel human tocopherol-associated protein: cloning, in vitro expression, and characterization.

J Biol Chem 2000;275:25672-80

10. Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN:

KATHARINA LUTZ

Geboren: 23.10.1976 in Karlsruhe
Adresse: Ahornstr. 15, 85774 Unterföhring
Eltern: Claire Schwarz, geb. Härttäg, Oberstudienrätin
Wolfgang Lutz, Oberstudienrat
Familienstand: ledig
Konfession: evangelisch

SCHULAUSSBILDUNG

- 09.1983 – 07.1987 Weiherberg Grundschule
Pforzheim
- 09.1987 – 07.1988 Otterstein Realschule
Pforzheim
- 09.1988 – 07.1991 Schiller-Gymnasium
Pforzheim
- 09.1991 – 07.1996 Otto-Hahn Gymnasium
Karlsruhe
Abschluss: Abitur

BERUFSAUSSBILDUNG

- 09.1996 – 07.1998 Ausbildung zur Tierarzhelferin in der
Tierklinik Dr. vet. Med. E. Götze in Karlsruhe
Abschluss: Tierarzhelferin

STUDIUM

- WS 98/99 Studium der Tiermedizin an der Justus-
Liebig- Universität Giessen
- SS 99/SS 00 Vorphysikum/ Physikum
- SS 00 Studium an der Ludwig-Maximilian-
Universität München
- WS 03/04 Abschluss Staatsexamen 3. Teil an der
LMU
- SS 04 Beginn der Dissertation

11. Danksagung

Ganz besonders Dank möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. habil. W. A. Rambeck für die Überlassung des Themas und die sehr gute Betreuung und Unterstützung aussprechen.

Mein herzlicher Dank gilt auch meinem Betreuer Herrn Dr. Uli Wehr, für die sehr gute und engagierte Betreuung. Er war jederzeit ein äußerst hilfsbereiter Ansprechpartner.

Ein Dankeschön möchte ich auch an Herrn Dr. Matthias Ritzmann richten für die intensiven fachlichen Gespräche.

Mein besonderer Dank gilt Frau Antje Wetzel. Obwohl ich bis spät abends das Labor blockiert hatte, war sie zu jeder möglichen und unmöglichen Zeit für mich erreichbar. Danke für Ihren fachlichen Beistand, Ihre Hilfe bei der Aufbereitung der Proben und für die Durchführung der Vitamin E –Analysen.

Vielen Dank möchte ich auch Frau Elke Kleiner und Herrn Walter Hesselbach aussprechen für die fachlichen Gespräche über die Analysegeräte und –Techniken.

Ich bedanke mich ebenfalls bei den Mitarbeitern des Instituts der Pathologie für die Organisation und Mithilfe bei der Zerlegung der Schweine.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls herzlich bei Frau Silvia Mitterer für die Herstellung der Histoschnitte und das fachliche Gespräch über deren Anfertigung.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern, besonders Frau Elisabeth Stadler, Herrn Adrian Frille und Herrn Uli Gindhart, des Instituts für Ernährung in Oberwieselfeld für die Betreuung der Schweine und Ihre Mithilfe bei der Vorbereitung und Durchführung der Versuche.

Danken möchte ich auch ganz herzlich meiner „Schweinefreundin“ Kirstin für viele arbeitsreiche und lustige Stunden im Schweinestall und im Labor. Danke für die Rettung von der Boxentür!!

Ein liebes Dankeschön an meinen kleinen Bruder für ein paar ruhige Stunden, in denen er mit meiner Hündin Rana spazieren war.

Meiner Mutter danke ich von ganzem Herzen für ihre immer uneingeschränkte Unterstützung in jeder Lebenslage.

Danke für deine Unterstützung Markus. Hab dich lieb.