

Aus dem Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Einfluss einer Quercetinsupplementierung bei Forellen und
Karpfen auf die Retention von Quercetin sowie mögliche
Einflüsse auf Wachstum und antioxidative Systeme**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

M.Sc. agr. Faraz Ansari

aus Täbriz, Iran

Kiel, 2016

Gedruckt mit der Genehmigung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Dekan: Prof. Dr. Joachim Krieter

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Siegfried Wolfram
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Carsten Schulz

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2016

Diese Dissertation wurde mit dankenswerter Unterstützung der Bundesanstalt für
Landwirtschaft und Ernährung angefertigt.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe	2
2.1.1 Flavonoide	2
2.1.1.1 Bioverfügbarkeit von Quercetin	5
2.1.1.2 Gewebeverteilung von Quercetin und seinen Metaboliten.....	16
2.1.1.3 Quercetin als Antioxidans.....	18
2.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS).....	20
2.2.1 Oxidativer Stress und Lipidperoxidation.....	23
2.3 Antioxidantien und Antioxidatives Schutzsystem.....	25
2.3.1 Antioxidative Enzymsysteme	25
2.3.2 Nicht enzymatische Antioxidantien.....	28
2.4 Effekte von Quercetin beim Fisch	30
3. Material und Methoden	33
3.1 Forellenversuch I.....	33
3.2 Karpfenversuch I	35
3.3 Probengewinnung Forellen- und Karpfenversuch I.....	35
3.4 Forellenversuch II	37
3.5 Karpfenversuch II	37
3.6 Probengewinnung Forellen- und Karpfenversuch II.....	38
3.7 Analytische Methoden	38
3.7.1 Bestimmung von Flavonole	38
3.7.2 Korrektur der Residualblutvolumen gefriergetrockneter Fischgewebe.....	42

3.7.3	Bestimmung von α -Tocopherol im Fischplasma.....	43
3.7.4	Bestimmung von Malondialdehyd im Plasma.....	45
3.7.5	Aktivität ausgewählter antioxidativer Schutzenzyme	46
3.7.6	Ganzkörperanalyse	48
3.8	Statistische Auswertung.....	48
4.	Ergebnisse	50
4.1	Versuch (I)	50
4.1.1	Gewebeverteilung von Quercetin nach Aufnahme von Quercetin-haltigem Futter bei wachsenden Forellen.....	50
4.1.2	Gewebeverteilung von Quercetin nach oraler Aufnahme von Quercetin- haltigem Futter bei wachsenden Karpfen	55
4.1.3	Parameter des oxidativen/antioxidativen Status	58
4.2	Einfluss von Quercetin auf die Aktivität ausgewählter antioxidativer Schutzenzyme	60
4.3	Wachstumsparameter und Körperzusammensetzung	61
5	Diskussion.....	68
6.	Zusammenfassung	78
7.	Summary	79
8.	Literatur	80
	Danksagung.....	IX
	Lebenslauf	X

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Ökologische und physiologische Funktionen von sekundären Pflanzenstoffen	2
Abb. 2:	Grundformen der Flavonoidunterklassen.....	3
Abb. 3:	Schematische Darstellung der möglichen Resorptionsmechanismen und Metabolisierung von Quercetin, Quercetinmonoglukoside und Rutin nach oraler Aufnahme beim Säugetier	12
Abb. 4:	Struktur des Verdauungstrakts von Forelle und Karpfen	15
Abb. 5:	Schematische Darstellung von Fischmuskelfasern.	15
Abb. 6:	Die Position des Quercetin und seine Metaboliten in den artifiziellen Phospholipid-Doppelmembranen.....	19
Abb. 7:	Reduktion von Sauerstoffmolekülen.....	21
Abb. 8:	Peroxidation der Arachidonsäure.....	24
Abb. 9:	Enzymatischer Abbau reaktiver Sauerstoffspezies	25
Abb. 10:	Grundstruktur der Tocopherole.....	29
Abb. 11:	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus und -ablaufs.....	34
Abb. 12 :	Eichgeraden zur quantitativen Bestimmung von Quercetin (Q), Kaempferol (K), Isorhamnetin (I) und Tamarixetin (T) im Plasma von Forellen.....	41
Abb. 13:	Eichgeraden zur quantitativen Bestimmung von α -Tocopherol im Plasma.....	44
Abb. 14:	Beispiel eines Chromatogramms eines methanolischen α -Tocopherol Standards... ..	44
Abb. 15:	Beispielchromatogramm eines aufgearbeiteten Forellenplasmas nach oraler Aufnahme von 50mg Quercetin/ Kg KGW über einen Zeitraum von 4 Wochen... ..	45
Abb. 16:	Xanthinoxidase (XOD) und SOD-Antagonismus in der Generation von Formazan-Farbstoff.....	46
Abb. 17:	Repräsentative Kalibrierungskurve von gereinigter Katalase.....	47
Abb. 18:	Konzentrationsabhängigkeit pro Versuchstag und Zeitabhängigkeit pro Dosis der Gesamtflavonolkonzentrationen im Plasma von Forellen nach oraler Applikation von Quercetin.....	51
Abb. 19:	Anteil der einzelnen Flavonole an der Gesamtflavonolkonzentration in Plasma, Leber und Muskel von Forellen nach oraler Applikation von 50 mg Quercetin/kg KGW über einen Zeitraum von 4 Wochen.....	52
Abb. 20:	Der nicht konjugiert vorliegende Anteil von Quercetin und sein methyliertes Derivat Isorhamnetin sowie die Gesamtflavonole im Plasma von Forellen nach oraler Aufnahme von 50 mg Quercetinäquivalenten/kg KGW	53
Abb. 21:	Zeitverlauf und Konzentrationsabhängigkeit der Gesamtflavonolkonzentrationen in Leber [A] und Muskel [B] von Forellen nach oraler Applikation von Quercetin.....	54
Abb. 22:	Konzentrations-Zeitverlauf der Plasmakonzentration an Gesamtflavonolen beim Karpfen nach oraler Applikation von 70mg Quercetin/kg KGW	55

Abb. 23: Zeitverlauf und Konzentrationsabhängigkeit der Malondialdehyd (MDA) Konzentrationen in Plasma von Forellen und Karpfen	58
Abb. 24: Zeitverläufe der α -Tocopherol-Konzentrationen im Plasma von Forellen und Karpfen nach oraler Applikation verschiedener Dosen von Quercetin	59
Abb. 25: Aktivität der Katalase in der Leber von Forellen und Karpfen nach oraler Applikation unterschiedlicher Quercetin-Dosen nach Abschluss der sechs- bzw. fünfwöchigen Versuchsperiode bei Forellen bzw. Karpfen.....	61
Abb. 26: Aktivität der Superoxid-Dismutase (SOD) in Leber und Muskel von Forellen und Karpfen nach oraler Applikation unterschiedlicher Quercetin-Dosen nach Abschluss der sechs- bzw. fünfwöchigen Versuchsperiode bei Forellen bzw. Karpfen.....	62

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Metabolitenmuster der Flavonole im Blut und in den Geweben nach oraler Applikation von Quercetin bei unterschiedlichen Spezies	9
Tab. 2: Anatomische und physiologische Unterschiede zwischen Forelle und Karpfen....	13
Tab. 3: Biologische Aktivität der Tocopherol-Derivate	29
Tab. 4: Komponenten und Nährstoffzusammensetzung der Versuchsdäten	36
Tab. 5: Einfluss des Zusatzes (70 bzw. 100 mg/ml) verschiedener Proteine bzw. lyophilisierter Gewebe auf ausgewählte Parameter der Peaks von Standardsubstanzen nach Messung mittels HPLC	57
Tab. 6: Wachstumsparameter von Forellen nach 6-wöchiger Fütterung mit Quercetin-angereicherten Diäten.....	63
Tab. 7: Wachstumsparameter von Karpfen nach 5-wöchiger Fütterung mit Quercetin-angereicherten Diäten.....	64
Tab. 8: Körperzusammensetzung von Forellen nach Fütterung von Quercetin-angereicherten Diäten über einen Zeitraum von 6 Wochen	66
Tab. 9: Körperzusammensetzung von Karpfen nach Fütterung von Quercetin-angereicherten Diäten über einen Zeitraum von 5 Wochen	67

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-binding cassette
ANOVA	Varianzanalyse (<u>an</u> alysis <u>of</u> <u>var</u> iance)
AP-1	Aktivatorprotein-1
AUC	Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeitkurve (<u>area</u> <u>under</u> the <u>curve</u>)
BCRP	breast cancer resistance protein
BHT	Butylhydroxytoluol
BSA	bovine serum albumin
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CAT	catalase
CBG	cytosolische β -Glucosidase
CHS	Calkhonsynthase
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CYP	Cytochrom-P450
EDTA	<u>E</u> thyl <u>e</u> diamin <u>e</u> tetra <u>a</u> cetic disodium salt dihydrate
EGF	epidermal growth factor
FA	Futtermaufnahme
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FCR	Futtermverwertung (<u>feed</u> <u>conversion</u> <u>rate</u>)
FM	Frischmasse
G-6-PD	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GIT	Gastrointestinaltrakt
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-disulfid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDL	High-density lipoprotein
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<u>h</u> igh <u>per</u> formance <u>li</u> quid <u>ch</u> romatography)
HSA	human serum albumin
KGW	Körpergewicht
LDL	Low Density Lipoprotein
LPH	Laktase-Phlorizin Hydrolase

MDA	Malondialdehyd
MPO	Myeloperoxidase
MRP2	Multidrug resistance-associated protein 2
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NF- κ B	Nuclear transcription factor kappa B
NH ₄	Ammonium
NO ₂ ⁻	Nitrit
Nrf2	Nuclear factor erythroid related factor 2
O ₂ ^{•-}	Superoxidradikal
O ₃	Ozon
OAT	organic anion transporter
OATP	organische Anionentransporter-Polypeptide
OH [•]	Hydroxylradikal
Pgp	P-glycoprotein
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
RT	Retention time
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
SGLT1	Natrium-abhängiger Glucosetransporter 1 (sodium-dependent glucose transporter 1)
SGR	specific growth rate
SOD	Superoxid-Dismutase
SR-BI	scavenger receptor class B type I
SULT	Sulfotransferasen
TM	Trockenmasse
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TOC	Tocopherol
TZ	tägliche Gewichtszunahme
UGT	Uridin-5'-Diphosphat-Glucuronosyltransferasen
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
XOD	Xanthinoxidase
ZP	Zeitpunkt

α -TTP α -Tocopherol-Transfer-Protein

1. Einleitung

Zwischen 1980 und 2012 stieg die Aquakulturproduktion weltweit um durchschnittlich 8,6 % pro Jahr und allein der Fischertrag aus Aquakulturen verdoppelte sich zwischen 2000 und 2012. Laut Welternährungsorganisation (FAO, 2014) wird die Aquakultur bis 2030 fast zwei Drittel des gesamten weltweiten Fischkonsums produzieren. Aufgrund des raschen Zuwachses im Aquakultursektor steigt auch der globale Bedarf an Fischmehl weiter an. Der in letzter Zeit größte Anteil an Forschungen auf dem Gebiet der Aquakultur befasste sich mit der Entwicklung alternativer Nahrungsquellen als Substitute für Fischmehl für die Ernährung unterschiedlicher Fischarten, insbesondere von carnivoren Spezies. In diesem Zusammenhang versucht man den Anteil an pflanzlichen Bestandteilen, welche reich an bestimmten chemischen Verbindungen, den sog. „sekundären Pflanzenstoffen“ sind, im Fischfutter zu erhöhen. Das Flavonol Quercetin zählt zu den sekundären Pflanzenstoffen und besitzt zahlreiche gesundheitsfördernde Wirkungen bei Mensch und Tier. Viele dieser positiven Eigenschaften von Quercetin beruhen wahrscheinlich auf den antioxidativen Eigenschaften von Quercetin. Unabhängig davon, wie Quercetin letztendlich im Körper wirkt, ist für die systemische Wirkung einer Substanz deren Bioverfügbarkeit Voraussetzung. Die Bioverfügbarkeit von Flavonoiden bei Fischen wurde bisher nur in sehr wenigen *in vivo*-Studien adressiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Gewebeverteilung und mögliche Akkumulation von Quercetin und damit Hinweise auf eine systemische Verfügbarkeit des Flavonols nach längerer Supplementierung mit dem Futter bei der carnivoren Regenbogenforelle und dem omnivoren Spiegelkarpfen, zu untersuchen. Des Weiteren wurden mögliche postabsorptive Wirkung von Quercetin, insbesondere seine etablierte antioxidative Eigenschaft, bei den oben genannten Fischarten sowie der Einfluss von Quercetin auf das Wachstum und die Gesamtkörperzusammensetzung der Fische untersucht. In der Aquakultur werden Fische in der Regel in einer hohen Besatzdichte gehalten, welche zu erhöhtem Stress und vor allem zu größerer Anfälligkeit für Krankheiten führen kann. Es ist sehr gut bekannt, dass suboptimale Umwelt- und Haltungsbedingungen, wie die Konzentration an gelöstem Sauerstoff im Wasser oder die Temperatur, oxidativen Stress beim Fisch hervorrufen können. Die Supplementierung von Quercetin, welches unter den Flavonoiden die höchste antioxidative Wirksamkeit aufweist, könnte somit nicht nur den oxidativen Status des lebenden Fisches und damit sein Wachstum und seine Gesundheit, sondern auch die Lagerstabilität des Nahrungsmittels Fisch positiv beeinflussen.

2. Literaturübersicht

2.1 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Sekundäre Pflanzenstoffe sind bestimmte chemische Verbindungen, die zwar nicht unmittelbar in anabolen bzw. katabolen Stoffwechselreaktion bei Pflanzen auftreten, aber dennoch eine wichtige Rolle bei der Anpassung an Umweltbedingungen, bei Verteidigungsmechanismen sowie bei der Signaltransduktion spielen (Wink, 2010; Abb. 1).

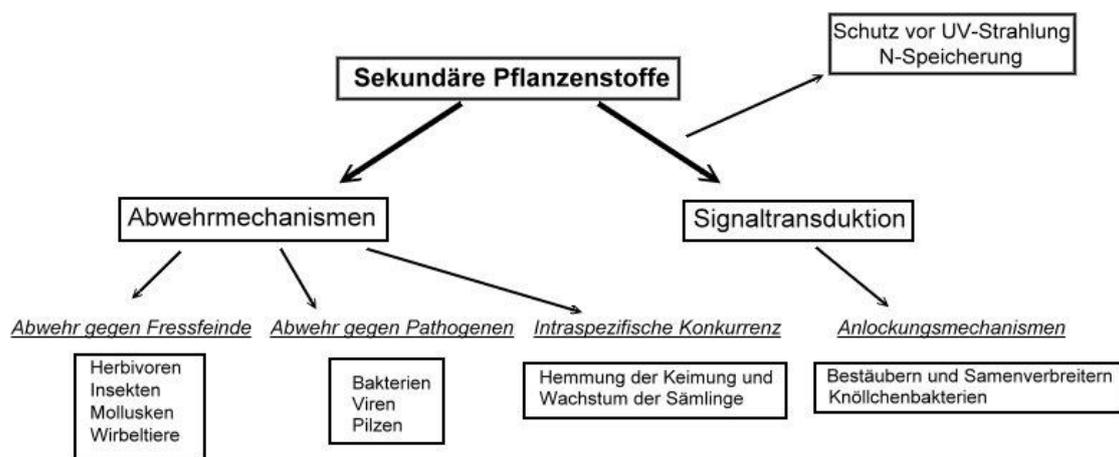


Abb. 1: Ökologische und physiologische Funktionen von sekundären Pflanzenstoffen (modifiziert nach Michael Wink, 2010)

2.1.1 Flavonoide

Die Flavonoide, die bei fast allen höheren Pflanzen in unterschiedlicher Konzentration synthetisiert werden, gehören zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und besitzen eine polyphenolische Struktur (Crespy et al. 2003). In den 1930ern wurden die Flavonoide zum ersten Mal durch den ungarischen Nobelpreisträger Albert von Szent-Györgyi Nagrapolt entdeckt und als Vitamin P, bzw. Permeabilitätsfaktor, bezeichnet (Szent-Györgyi 1937). Da die meisten Flavonoide in ihrer reinen Form eine gelbliche Färbung besitzen, wurde die Bezeichnung von Vitamin P zu Flavonoide (vom lateinischen Wort „flavus“ = gelb) geändert. Strukturell sind Flavonoide in der Regel durch die C6-C3-C6-Grundstruktur des Flavans oder, genauer gesagt, einem 2-Phenylbenzopyran mit zwei aromatischen Ringen (A und B), die über einen oxygenierten heterozyklischen C-Ring miteinander verbunden sind, gekennzeichnet. Man bezeichnet den Benzolring als "A"-Ring, den Pyran-Ring als "C"-Ring und den Phenylring als "B"-Ring. Sie bestehen aus 15 Kohlenstoffatomen und werden anhand des Oxidationsstatus, der Hydroxylierung und der funktionellen Gruppen des C-Rings sowie durch die Anordnung des aromatischen B-Rings an den Positionen C-2 oder C-3 des C-Rings in folgende sechs Hauptunterklassen eingeteilt: Flavonole, Flavone, Flavonone, Fla-

vanole, Anthocyanidine und Isoflavone (Abb. 2) (Chen et al. 2010; He et al. 2010; Grotewold 2006).

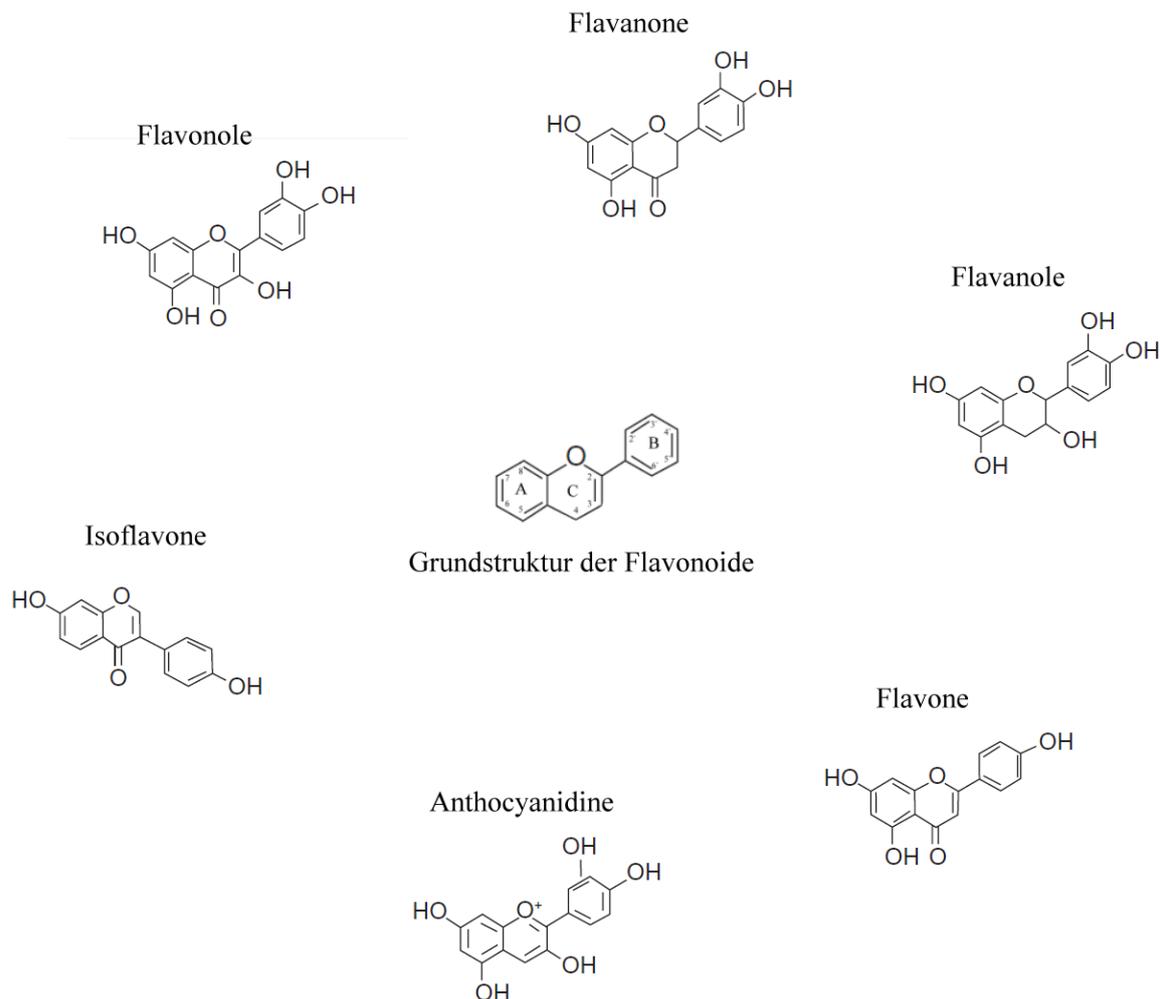


Abb. 2: Grundformen der Flavonoidunterklassen (Spencer et al. 2007 und Grotewold 2006). Zentral ist die Grundstruktur der Flavonoide (Flavan) mit Position des A-, B- und C-Rings sowie der Nummerierung der C-Arome dargestellt.

Die wichtigsten Ausgangssubstanzen für die Synthese von Flavonoiden sind die Aminosäure Phenylalanin und Malonyl-CoA, die von dem Shikimisäureweg, bzw. dem Tricarbonsäurezyklus produziert werden (Koes et. al., 1994). Die Flavonoid-Synthese beginnt mit der Kondensation von 1 Molekül 4-Cumaroyl-CoA und drei Molekülen Malonyl-CoA, wodurch Naringenin das Chalkon (ein aromatisches ungesättigtes Keton) gebildet wird. Diese Reaktion wird durch das Schlüsselenzym Chalkonsynthase (CHS) katalysiert. Die Synthese von Cumaroyl-CoA erfolgt über den Phenylpropanoidweg mit drei enzymatischen Schritten und Malonyl-CoA wird durch Carboxylierung von Acetyl-CoA im Tricarbonsäurezyklus synthetisiert. Das Chalkon wird anschließend durch das Enzym Chalcon-Flavanon-Isomerase

(CHI) zu einem Flavanon isomerisiert. Von diesem zentralen Zwischenprodukt werden andere Klassen der Flavonoide gebildet, die wiederum aufgrund ihrer unterschiedlichen physikochemischen und molekularen Eigenschaften, beispielsweise Molekulargewicht und Wasserlöslichkeit, eine unterschiedliche biologische Wirksamkeit aufweisen (Grotewold 2006; Winkel-Shirley 2001; Koes et al. 1994).

Mit Ausnahme der Catechine, liegen die Flavonoide in der Natur hauptsächlich in β -glykosidisch gebundener Form mit verschiedenen Zuckern vor (Glykoside) und nicht in freier Form als sog. Aglyka (Hollman 2004). Das Flavonol Quercetin, das zu den häufigsten und wirksamsten Flavonoiden in der Nahrung von Mensch und Tier zählt, ist in Früchten und Gemüse sowie Getränken weit verbreitet, wobei Zwiebeln (284-486 mg/Kg), Grünkohl (110mg/kg), Brokkoli (30mg/kg), Heidelbeeren (30-140 mg/kg), Äpfel (21-72 mg/kg), Cherrytomaten (17-200 mg/kg), Tee (10-25mg/l) und Rotwein (4-16 mg/l) die Hauptquellen in der Humanernährung darstellen (CAO et al. 2010; Manach et al. 2005 und 2004). Über die Flavonolgehalte in Futtermitteln für Nutztiere ist wenig bekannt. Buchweizen (153,8 g Quercetin/kg TM) und Buchweizenkleie (149 g Quercetin /kg TM) gehören zu den bedeutendsten quercetinhaltigen Futterkomponenten in der Nutztierernährung. Bezüglich des Quercetiningehalts in der Milchviehfütterung kann Weidelgrassilage mit 0,68 g Quercetin/kg TM genannt werden (Besle et al. 2010). Verschiedene Algenarten enthalten unterschiedliche Konzentrationen an Polyphenolen, darunter auch Flavonoide (Baviskar und Khandelwal 2015; Farasat et al. 2013; Zeng et al. 2010; Yoshie et al. 2003 und 2000). So enthält beispielsweise die Braunalgenart *Undaria pinnatifida* 202 μ g Quercetin/g TM (Yoshie et al. 2003). Über den Flavonoidgehalt von Futtermitteln, die in der heutigen Fischernährung eingesetzt werden, wie z. B. Fischmehl und -öl, Sojaextraktionsschrot, Weizen u.a. finden sich kaum Angaben in der Literatur. Des Weiteren muss bedacht werden, dass diese Futtermittel beim Fisch in pelletierter und andersweitig behandelte Form verwendet werden. Dabei ist wichtig, dass verschiedene Faktoren den nativen Gehalt an Flavonoiden in Lebens- und Futtermitteln sehr stark beeinflussen. Als Beispiele können Futterbearbeitungsfaktoren wie Thermalbehandlungen, Homogenisierung, Lyophilisierung, Kochen und Lagerung genannt werden. (Xu und Chang, 2009 , Miglio et al. 2008, DuPont et al. 2000, Mullen et al. 2002).

2.1.1.1 Bioverfügbarkeit von Quercetin

Für die sämtliche postabsorptive systemische Wirkung einer Substanz nach oraler Aufnahme ist deren Bioverfügbarkeit Voraussetzung. Im pharmakologischen Sinne wird unter Bioverfügbarkeit, der prozentualen Anteil eines applizierten Wirkstoffes verstanden, der unverändert in den systemischen Kreislauf gelangt und an seine Wirkungsstellen bzw. Zielorgane transportiert wird (Eichbaum und Schwab 2013). Verschiedene Faktoren können den Umfang der Absorption von Polyphenolen, darunter auch Quercetin, nach oraler Aufnahme in den Organismus beeinflussen. Als Beispiele kann man die Rolle von Alkohol bei der Absorption der im Wein enthaltenen Flavonole beim Menschen oder den Fettgehalt der Nahrung bei Schwein und Ratte nennen (Lesser et al. 2004; Azuma et al. 2003; Donovan et al. 1999). Obwohl die Bioverfügbarkeit von Quercetin vor allem von der applizierten Form abhängt, zeigten viele Studien an unterschiedlichen Tierarten, dass insbesondere tierbedingte Faktoren, wie zum Beispiel die Darmpassage, Darmflora, Fermentationseffizienz im Dickdarm oder Blindsäcke (van Duynhoven et al. 2010; Selma et al. 2009), Ernährungstypus wie carnivor, herbivor oder omnivor (Reinboth et al. 2010), Vitamin-C-Status (Guo et al. 2014) und Aktivität der xenobiotischen Stoffwechsellzyme (Williams et al. 2000), eine wichtige Rolle bei der Bioverfügbarkeit von Polyphenolen nach oraler Aufnahme zu spielen. In Abbildung 3 sind mögliche Resorptionsmechanismen sowie die Metabolisierung von Quercetin nach oraler Aufnahme beim Säugetier dargestellt.

Zahlreiche Studien haben sich mit der Bioverfügbarkeit von Quercetin bei Mensch und Tier beschäftigt. Bei Ratten und Schweinen war die absolute Bioverfügbarkeit von Quercetin nach oraler Aufnahme ohne Berücksichtigung der Quercetin-Metabolite mit intakter Flavonolstruktur nur 5% bzw. <1% (Chen et al. 2005, Ader et al. 2000). Betrachtet man dagegen die Summe von Quercetin und seinen Metaboliten nach oraler Aufnahme von Quercetin, ergeben sich Werte für die Bioverfügbarkeit von Quercetin bei Ratten und Schweinen von 59 bzw. 17 % (Chen et al. 2005, Ader et al. 2000). Eine *In situ*-Perfusionsstudie am Rattendarm zeigte, dass aufgrund der hohen Resekretion von Quercetin-Konjugaten (58%) nur ein kleiner Teil des absorbierten Quercetins (9%) letztendlich systemisch verfügbar ist (Cresspy et al. 2003). Die absolute Bioverfügbarkeit von Quercetin beim Menschen nach oraler Applikation (4g/Proband, n=4) wurde von Gugler et al. (1975) mit weniger als 1% geschätzt. Allerdings wurden in dieser Studie im Plasma vorliegende Konjugate von Quercetin nicht enzymatisch gespalten und daher analytisch nicht erfasst. Bei Hunden konnte nach oraler Aufnahme von Quercetin (10 mg/kg KGW) eine absolute Bioverfügbarkeit von 4% ermittelt werden (Reinboth et al. 2010). Bei Rindern wurde nach intraluminaler Applikation

von Quercetinaglykon (50mg/kg KGW) anhand der im Plasma auftretenden Gesamtflavonole eine absolute Bioverfügbarkeit von Quercetin von 0,1% ermittelt (Berger et al. 2012). Für Fische liegen in der Literatur keine entsprechenden Daten vor.

Intestinale Absorption

Bei den bisher untersuchten Spezies ist nach Applikation des Aglykons bzw. von bestimmter Quercetinmonoglukosiden der Dünndarm Hauptresorptionsort von Quercetin. Die Resorption aus dem Magen hat dagegen nur eine untergeordnete Bedeutung. Diesbezüglich zeigt eine *in situ*-Studie von Crespy et al. (2002) an Ratten, dass nur ein geringer Anteil von Quercetinaglykon nach oraler Aufnahme von Quercetin im Magen absorbiert und in die Galle ausgeschieden wird. Die Autoren konnten dagegen keine Absorption von Isoquercetin bzw. von Quercetin aus Rutin im Magen feststellen (Crespy et al. 2002). Die Bioverfügbarkeit von Quercetin hängt insbesondere von der applizierten Form ab. Das Quercetinaglykon ist relativ lipophil, so dass es vermutlich durch passive Diffusion durch die Enterozytenmembran gelangt und so im Vergleich zu Quercetinglykosiden besser absorbiert wird (Crespy et al. 2003). Allerdings zeigen viele Studien an monogastrischen Spezies, dass Quercetinmonoglukoside eine deutlich höhere Bioverfügbarkeit von Quercetin aufweisen als das Aglykon und insbesondere als Quercetinglykoside mit komplexeren Kohlenhydratresten, wie z. B. Rutin (Crespy et al. 2003; Cermak et al. 2003; Hollman et al. 1997). Eine Untersuchung bei Ileostomie-Patienten zeigte, dass 24 % des Quercetin aus Quercetinaglykon, 17% aus Rutin und 52 % aus Quercetinmonoglukosiden (aus Zwiebeln) nach oraler Aufnahme absorbiert wurden (Hollman et al. 1997).

Die Quercetinglykoside sind infolge ihrer Polarität relativ gut wasserlöslich und werden daher in intakter Form nicht in nennenswertem Umfang durch einfache Diffusion aus dem Darm aufgenommen. Des Weiteren spricht auch die Tatsache, dass i.d.R. nach oraler Applikation von Quercetinglykosiden keine intakten Glykoside in der Zirkulation nachweisbar sind (Sesink et al. 2001; Manach et al. 1997 & 1995). So zeigten Sesink et al. (2001), dass beim Menschen nach oraler Aufnahme von Quercetinglukosiden (Quercetin-3O- und 4'O-Glucoside) im Plasma keine Quercetinglukoside, sondern lediglich geringe Mengen des Aglykon und hauptsächlich Quercetinglucuronide auftreten (Sesink et al. 2001). Das bedeutet, dass das Aglykon entweder vor der Absorption enzymatisch aus den Glykosiden freigesetzt wird oder, und dies trifft für bestimmte Quercetinmonoglucoside, wie z. B. Quercetin-3-Glucoside (Q3G), zu, durch Transporter zunächst ins Darmepithel aufgenommen und anschließend intrazellulär gespalten werden (Lesser und Wolffram 2006; Cermak et al. 2004; Wolffram et al. 2002; Graefe et al. 2001). Mehrere Studien zeigen die Existenz einer β -

Glucosidaseaktivität im Dünndarmepithel von Tieren und Menschen (Silvana et al. 2013; Németh et al. 2003; Ioku et al. 1998). Die Laktase-Phlorizin-Hydrolase (LPH; EC 3.2.1.108) ist eine membranständige β -Galaktosidase, welche für die Hydrolyse der Lactose in der Säugermilch verantwortlich ist. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die LPH durch die extrazelluläre Hydrolyse der glykosidischen Bindung und die Freisetzung des Aglykon an der Absorption von Quercetinmonoglukosiden im Dünndarmepithel beteiligt ist (Sesink et al. 2003; DAY et al. 2000; Rings et al. 1994). Da die Hydrolyse in diesem Fall unmittelbar an der Epitheloberfläche geschieht, führt die anschließende Diffusion des Aglykon in das Epithel zu einer schnelleren Aufnahme im Vergleich zur Applikation des Aglykon, dass bei Vorliegen im Dünndarminhalt einen weiteren Diffusionsweg hat (Lesser und Wolffram 2006; Crespy et al. 2003; Sesink et al. 2003; Wolffram et al. 2002; DAY et al. 2000; Rings et al. 1994).

Darüber hinaus zeigten Studien, dass der intestinale Na^+ /Glukose-Cotransporter 1 (SGLT-1) an der Absorption von Quercetinmonoglukosiden beteiligt ist. (Cermak et al. 2004; Wolffram et al. 2002; Ader et al. 2001; Gee et al. 2000; Hollmann et al. 1995; Gee et al. 1998). Rutin (3-O-glucorhamnoside) ist aufgrund des Zuckerrestes, der Rhamnose enthält, weder Substrat für die LPH noch für cytosolische β -Glucosidasen (CBG). Die Freisetzung von Quercetinaglykon vom Rutin hängt so von der hydrolytischen Spaltung des Zuckers durch bakterielle Glycosidasen (α -Rhamnosidasen und β -Glycosidasen) im Dickdarm ab (Cermak et al. 2003; Manach et al. 1997) und erklärt die wesentlich schlechtere Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Rutin im Vergleich zu Quercetinmonoglukosiden und dem Quercetinaglykon.

Metabolisierung, Transport und Ausscheidung

Durch Perfusionsexperimente am Rattendünndarm wurde gezeigt, dass Quercetin nach Hydrolyse und Absorption noch vor Eintritt in die systemische Zirkulation und der Metabolisierung in der Leber im Dünndarmepithel durch Phase II-Enzyme intensiv konjugiert wird (Crespy et al. 1999). Daneben spielt auch die Konjugation von Quercetin und dessen Metaboliten mit intakter Flavonolstruktur in der Leber eine Rolle (Lesser und Wolffram 2006; Crespy et al. 1999; Hollmann et al. 1995). Zahlreiche *in vivo*-Experimente, in welchen fast 70 bis 90 % der zirkulierenden Flavonole im Plasma in konjugierter Form und kaum in freier Form vorlagen, unterstützen diese Aussage (De Boer et al. 2005; Cermak et al. 2003; Bieger et al. 2008; Wein und Wolffram 2013; Ader et al. 2000; Reinboth et al. 2010; Berger et al. 2012; Beyer et al. 2015; Graf et al. 2006; Rupasinghe et al. 2010).

Glucuronidierung (UDP-Glucuronyltransferasen), Sulfatierung (Sulfotransferasen) und Methylierung (Catechol-O-Methyltransferase, COMT) sind, nach oraler Aufnahme von

Quercetin, die drei Hauptkonjugationsreaktionen. Glucuronidierung und Sulfatierung verbessern die Wasserlöslichkeit von Quercetin und erleichtert so die Ausscheidung über Galle und Harn (Abb. 3). Darüber hinaus spielt die O-Methylierung durch das Enzym COMT eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung von Catechol-Gruppen (Hollman et al. 2004). Untersuchungen an der Rattenleber zeigten ferner, dass die Cytochrom-P450-Isoenzyme (CYP) Flavonole an der 4'-Position, aber nicht an der 3` Position demethylieren können. Die CYP1A ist auch für die Hydroxylierung der Flavonoide an der 3`-Position verantwortlich (Nielsen et al. 1998). Daher ist bezüglich der Methylierung der Catechol-Gruppe im B-Ring nicht nur die Aktivität der COMT, sondern auch die Demethylierung, durch Cytochrom P450 Isoenzyme von Relevanz. Bei Regenbogenforellen spielen die CYP1A Enzyme für die Biotransformation von Xenobiotika eine viel wichtigere Rolle als bei allen Säugetieren (Nabb et al. 2006).

Bei Fischen sind grundsätzlich neben der Leber und dem Gastrointestinaltrakt auch die Kiemen, welche die hohe Aktivität der Biotransformationsenzyme aufweisen, für Biotransformation und Metabolisierung von Xenobiotika verantwortlich (Keith et al. 2013). Ob dies auch für den Stoffwechsel von Flavonoiden gilt, ist bisher nicht untersucht.

Hinsichtlich der Metabolitenmuster im Blut und in den Geweben gibt es zum Teil Übereinstimmungen aber auch diverse tierspezifische Unterschiede, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind.

Tab. 1: Metabolitenmuster der Flavonole im Blut und in den Geweben nach oraler Applikation von Quercetin bei unterschiedlichen Spezies

Spezies	Plasma	Gewebe			Dosierung	Dauer	Quelle
		Leber	Muskel	Niere			
Ratte	38% Q 62% I Kein T	36% Q 58% I 6% T	29% Q 62% I 9% T	32% Q 55% I 14% T	1% Q /Futter	11Wochen	De Boer et al. (2005)
Schwein (a)	88% Q 12% I Kein T	64% Q 24% I 12% T	—	73% Q 13% I 14% T	500 mg Q/kg KGW	3 Tage	De Boer et al. (2005)
Schwein (b)	75,5% Q 9% I 15,5% T kein K	—	—	—	50mg Q/kg KGW	1Tag ¹	Cermak et al. (2003)
Schwein (c)	36% Q 29% I 35% T kein K	68% Q 20% I 12% T	86% Q 14% I 5% T	60% Q 19% I 22% T	50 mg Q/kg KGW	4 Wochen	Bieger et al. (2008)
Pferd	88% Q 9% I 3% K kein T	—	—	—	20 mg Q/kg KGW	1Tag ¹	Wein und Wolffram (2013)
Broiler	Hauptsächlich konjugierte Formen	Q und I : Nur konju- gierte For- men	—	—	150 mg Q/kg KGW	3 Tage	Rupasinghe et al. (2010)
Hund	88% Q 10% I 2% K kein T	—	—	—	30 mg Q/kg KGW	1Tag ¹	Reinboth et al. (2010)
Tilapia	93,47 % Q 6,53 I kein T	68,65 % Q 31,35% I kein T	—	—	1% Q /Futter	Plasma: 1Woche Gewebe: 15 Wo- chen	Park et al. (2008)
Rind	83,8% Q 7,3% I 8,9% K kein T	—	—	—	50 mg Q/kg KGW	1Tag ¹	Beyer et al. (2015)

Q= Quercetin; I= Isorhamnetin; K= Kaempferol; T=Tamarixetin; KGW= Körpergewicht

¹=Einmaldosis

Efflux und Influx der Quercetin-Konjugate

Zelluläre Efflux- und Influx-Transporter spielen eine entscheidende Rolle für den Stoffwechsel und die Ausscheidung von Quercetin. In der Literatur werden verschiedene Transportmechanismen für Influx und Efflux der Quercetin-Konjugate diskutiert. Im Darm werden Glucuronide und Sulfate von Quercetin teilweise über in der Bürstensaummembran lokalisierte ABC (ATP-binding cassette)-Effluxtransporter, wie z. B. das Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2), P-glycoprotein (Pgp/multidrug resistance protein 1) und breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2), ins Darmlumen abgegeben (Williamson et al. 2007, Sesink. 2005; Abb. 3). Effluxtransporter reduzieren die orale Bioverfügbarkeit von Quercetin, indem sie die Quercetin-Konjugate aus der Zelle in den Extrazellulärraum bzw. in das Darmlumen transportieren. *In vitro*-Studien mit ABCG2-defizienten Mäusen belegen, dass die intestinale Aufnahme und damit die orale Bioverfügbarkeit von Quercetin im Vergleich zu den Wildtypen erhöht wurde (Robey et al. 2009). In einer anderen Studie wurde über ähnliche Ergebnisse berichtet (Sesink et al. 2005). Eine *In situ*-Perfusionsstudie am Rattendarm zeigte, dass BCRP die intestinale Aufnahme von Quercetin durch Efflux der Quercetinglucuronide begrenzt (Sesink et al. 2005). Auf der basolateralen Seite von Leber und vor allem Niere scheinen organische Anionentransporter 1 (organic anion transporter 1, OAT1) und organische Anionentransporter-Polypeptide (OATP) am Transport von Quercetin-Konjugaten, insbesondere von Quercetin-Glucuronide und Quercetin-3'-O-Sulfate, beteiligt zu sein (Wong et al. 2012).

Transport im Blut

In vitro Studien zeigen, dass freie Flavonole (Aglyka) im Blut in hohem Ausmaß an Plasmaproteine gebunden werden (Kaldas et al. 2005; Papadopoulou et al. 2005; Janisch et al. 2004; Zsila et al. 2003, Sengupta und Sengupta 2002; Boulton et al. 1998). So zeigten Boulton et al. (1998), dass das Quercetinaglykon zu 99,4 % an humanes Serumalbumin gebunden wird. Allerdings zirkulieren im Blut, wie bereits dargestellt, v. a. Konjugate von Quercetin und dessen Metaboliten. Studien an Ratten und Menschen zeigen allerdings, dass nicht nur das Quercetinaglykon, sondern auch die nach oraler Aufnahme von Quercetin im Blut vorliegenden Metaboliten an Plasmaproteine bzw. an Serumalbumin gebunden sind (Murota et al. 2007; Manach et al. 1995). Die Gesamtproeinkonzentration im Plasma bei Fischen ist im Vergleich zum Säugetier generell geringer, wobei Albumin wie beim Säuger das quantitativ wichtigste Plasmaprotein ist (Keith et al. 2013; Di Giulio und Hinton 2008). Die Metabolisierung von Quercetin kann allerdings, je nach der Konjugationsstelle, die Affinität zu Al-

bumin senken. Glykosylierung und Sulfatierung an der phenolischen Hydroxylgruppe (3-OH), Methylierung der 3'-OH- (Isorhamnetin) und Dehydroxylierung der 3'-OH-Gruppe (Kaempferol) senken signifikant die Affinität von Quercetin zu Human- und Rinderalbumin (Dufour und Dangles 2005).

Lymphatischer Transport

Das Lymphsystem scheint neben dem Blutkreislauf das wichtigste Transportsystem für Flavonole im Säugerorganismus zu sein. Darüber hinaus kann der hepatische First-Pass-Effekt über lymphatische Absorption und Transport über das Lymphsystem umgangen werden (Murota et al. 2013). Untersuchungen an Ratten belegen, dass nach Absorption aus dem Darm die Metaboliten von Quercetin sowohl über die Pfortader als auch die Lymphgefäße transportiert werden (Murota et al. 2013; Cermak und Wolfram 2010; Murota und Terao 2005). Eine gesteigerte Absorption von Quercetin bei Zusatz von Lipiden zur Nahrung ließe sich über eine erhöhte lymphatische Absorption erklären (Murota et al. 2013; Lesser et al. 2004; Azuma et al. 2003).

Fische besitzen im Vergleich zu Säugetieren kein echtes Lymphgefäßsystem, sondern ein weiteres Gefäßsystem, welches einige Eigenschaften des Lymphsystems der Säuger aufweist. Dieser sog. Sekundärkreislauf ist ein arteriell-kapilläres-Venensystem, welches parallel zum Primärkreislauf läuft und über arterio-arterielle Anastomosen mit dem Blutkreislauf verbunden ist. Das sekundäre Gefäßsystem wurde in den Kiemenfilamenten, der Haut, dem Peritoneum und der Mundschleimhaut von Knochenfischen identifiziert (Olson 1996).

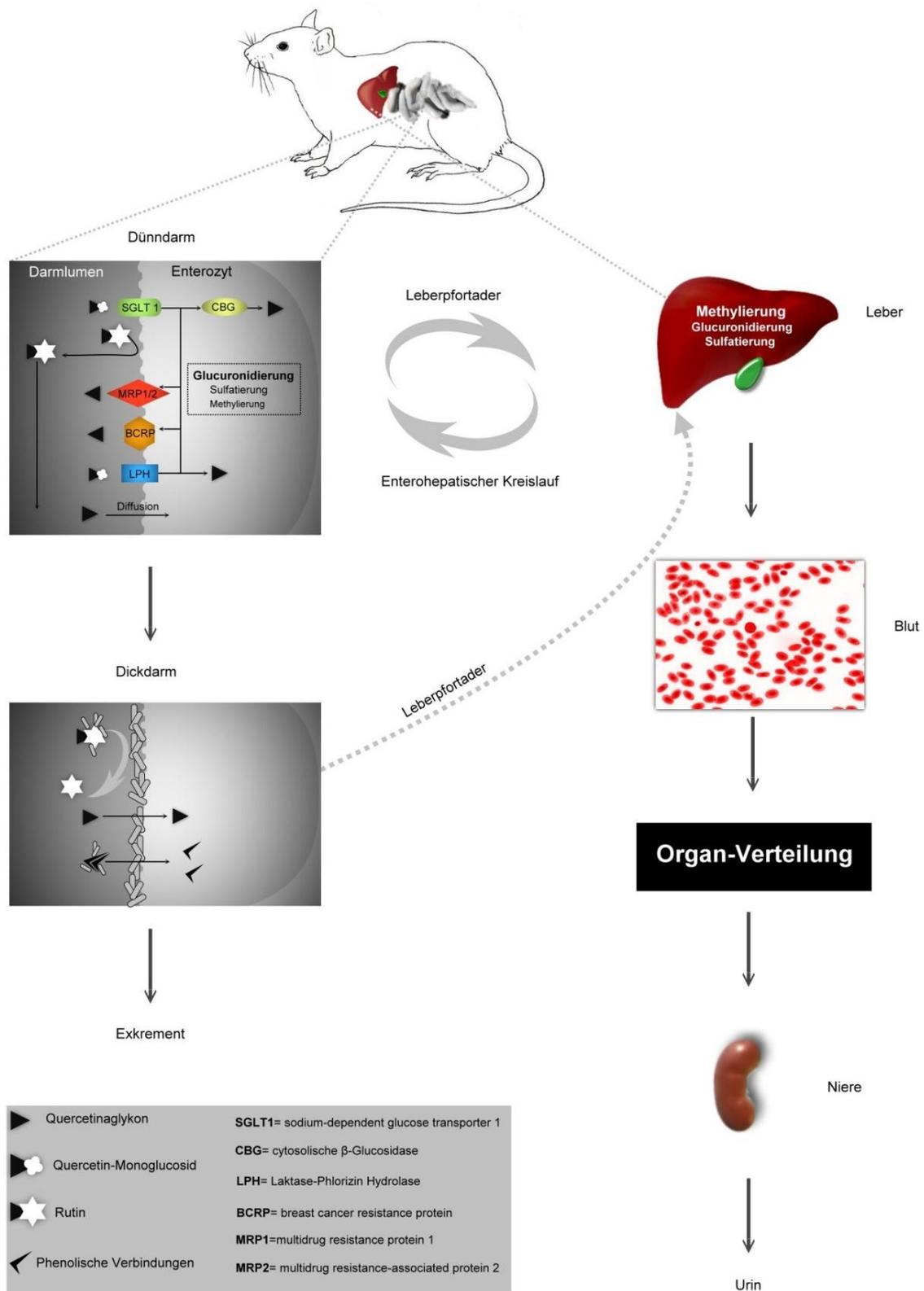


Abb. 3: Schematische Darstellung der möglichen Resorptionsmechanismen und Metabolisierung von Quercetin, Quercetinmonoglucoside und Rutin nach oraler Aufnahme beim Säugetier. Rutin wird erst im Colon nach Abspaltung der Zuckerreste durch bakterielle Rhamnosidasen absorbiert (Crespy et al. 2003, Lesser und Wolfram 2006, Wolfram et al. 2002, Rings et al. 1994, DAY et al. 2000, Sesink et al. 2003)

Anatomische und physiologische Besonderheiten von Forelle und Karpfen

Aufgrund der Bedeutung der tierbedingten Faktoren für die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen wird im Folgenden auf die wichtigsten anatomischen und physiologischen Besonderheiten bei Forellen und Karpfen eingegangen.

Karpfen und Forelle unterscheiden sich anatomisch und physiologisch in mehreren Aspekten voneinander, die in Tab. 2 zusammengefasst sind. Aufgrund der Relevanz für die vorliegende Arbeit wird an dieser Stelle nur kurz auf die Verhältnisse des Magendarmtrakts und seiner Anhangsdrüsen sowie der Skelettmuskulatur eingegangen.

Der Verdauungstrakt der Knochenfische besteht im Allgemeinen aus folgenden Teilen: Kopf-, Vorder-, Mittel- und Enddarm. Bei Forellen dienen die Zähne in der Maulhöhle dem Festhalten der Beute und das Futter wird unzerkleinert geschluckt. Karpfen hingegen besitzen im Kiefer keine Zähne, sondern aus dem fünften Kiemenbogen entstandene Schlundzähne, welche zur Zerkleinerung der Nahrung geeignet sind.

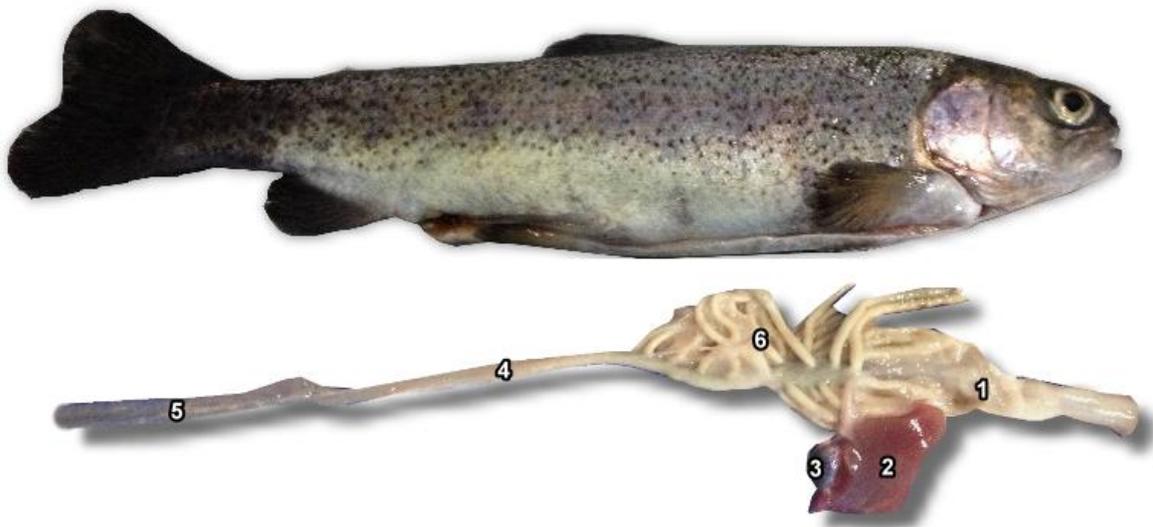
Tab. 2: Anatomische und physiologische Unterschiede zwischen Forelle und Karpfen

	Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Karpfen (<i>Cyprinus carpio</i>)
Art der Ernährung	carnivor	omnivor
Verdauungskanal		
Mund- und Kiemenhöhle	Fangzähne	Schlundzähne
Magen	U-förmiger Magen Mit Pylorusanhängen	kein Magen (Pseudogaster)
Darm	kurz	mittel
Anhangsdrüse des GIT	Leber, Pankreas	Hepatopankreas
Muskulatur	rote und weiße Fasern	rote, weiße und rosa Fasern

Beide Fischarten besitzen eine sehr kurze Speiseröhre. Der Ductus pneumaticus, die Verbindung zur Schwimmblase, mündet bei der Forelle in den Ösophagus und bei Karpfen in den Vorderdarm (Schulz 2012). Die Forelle besitzt im Gegensatz zum Karpfen einen U-förmigen Magen mit mehreren Pylorusanhängen (Abb. 4). Der Karpfen besitzt hingegen keinen Magen, aber am Anfang des Karpfendarms befindet sich eine magenähnliche Erweiterung, der sog. Pseudogaster. Er übernimmt eine vorübergehende Speicherung von Futter und besitzt keine Magendrüsen.

Der Darm ist bei Forellen sehr kurz und gerade ohne Schleifen, mit einer Gesamtlänge des 0,6 bis 0,8-fachen der Körperlänge (Chow 1980). Bei Karpfen ist der Darm länger (1,8-2,0-fache Körperlänge) und schleifenartig angeordnet (Grosell et al. 2011; Webster und Lim 2002). Weitere Besonderheiten beim Karpfen sind die Mitteldarmdrüse bzw. das Hepatopankreas, welches die Aufgabe der Leber und des exokrinen Pankreas übernimmt. Das Hepatopankreas beim Karpfen besteht aus 4 Lappen und ist eng mit dem Darm verbunden.

A



B

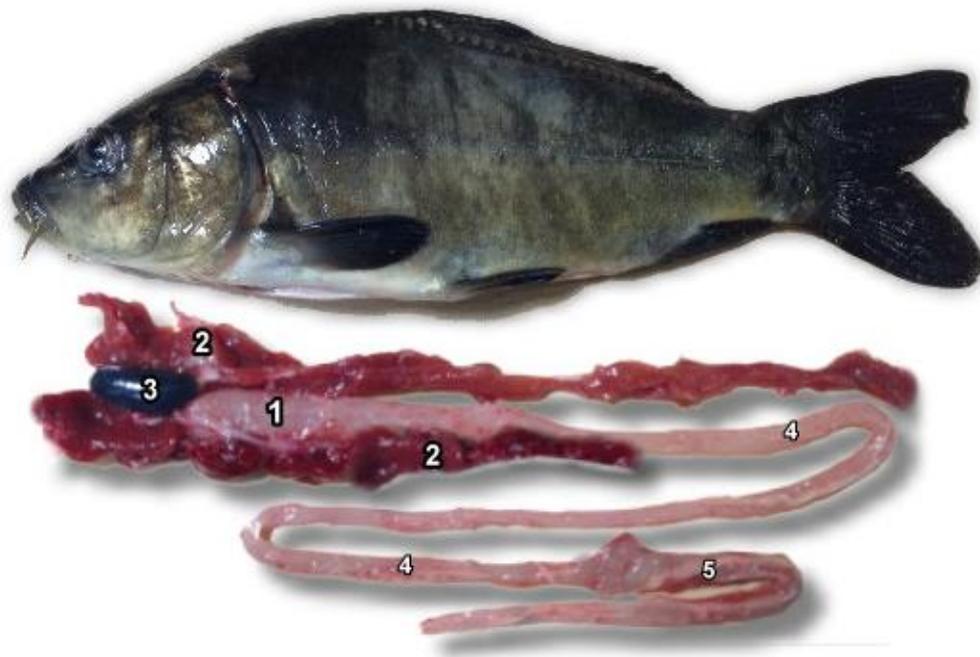


Abb. 4: Struktur des Verdauungstrakts von Forelle (A) und Karpfen (B). (1) Magen (Forelle) bzw. Pseudogaster (Karpfen) (2) Leber (Forelle) bzw. Hepatopankreas (Karpfen) (3) Gallenblase (4) Dünndarm (5) Dickdarm (6) Pylorusanhänge

Bei der Forelle sind Leber und Pankreas getrennte Organe. Die Forellenleber ist viel kompakter im Vergleich zu Karpfenleber und die Bauchspeicheldrüse befindet sich getrennt in Fett und Bindegewebe um den Pylorusanhängen herum und ist nicht klar sichtbar (Chow 1980). Beide Fische besitzen eine Gallenblase, jedoch ist die Gallenblase beim Karpfen deutlich größer. Die Fischmuskulatur besteht aus drei unterschiedlichen Fasertypen (Abb. 5).

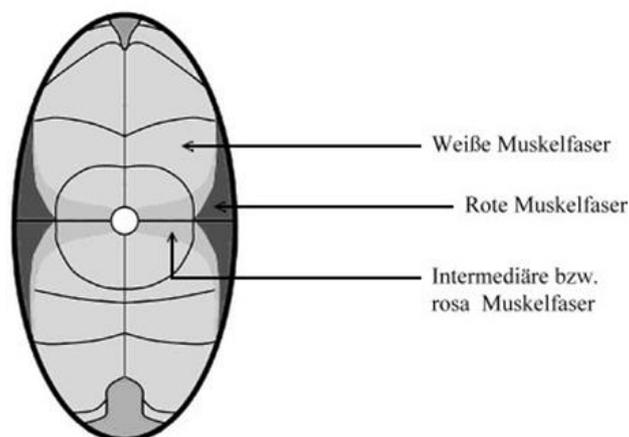


Abb. 5: Schematische Darstellung von Fischmuskelfasern (Evans et al. 2013)

Der Anteil an roten und weißen Muskelfasern variiert vor allem mit der Aktivität des Fisches (Huss 1995). Den Hauptanteil (90%) der Fischmuskulatur machen bei den meisten Fischarten die weißen Muskelfasern aus (Olsen 2011). Die Muskulatur der Forelle besteht aus zwei Fasertypen: Die roten Muskelfasern (*muscularis lateralis superficialis*) und die weißen Fasern (*muscularis lateralis profundus*). Beim Karpfen gibt es noch zusätzlich eine intermediäre bzw. rosafarbene Faser (Roberts 2012; Shadwick und Lauder 2006). Die roten Muskelfasern befinden sich direkt unter der Haut seitlich am Körper (Abb. 5).

2.1.1.2 Gewebeverteilung von Quercetin und seinen Metaboliten

Die Gewebeverteilung von Quercetin und seinen Metaboliten wurden bisher in einigen Studien adressiert, wobei die applizierte Dosis, die chemische Form, die Dauer der Applikation und vor allem der Zeitpunkt der Gewebeentnahme von großer Bedeutung sind.

Die Verteilung der Radioaktivität bei Ratten 60 Minuten nach der oralen Aufnahme von radioaktiv markierter [¹⁴C]Quercetin-4'-glykoside zeigte, dass 93,6% der aufgenommenen Radioaktivität im Darm und nur sehr geringe Konzentrationen in Leber und Niere (0,2%) detektiert wurden. Die niedrigsten Mengen an Radioaktivität wurden im Gehirn festgestellt (Mullen et al. 2002). Dazu ist aber anzumerken, dass über die Messung der Radioaktivität nicht zwingend Quercetin bzw. dessen relevante Metaboliten erfasst werden.

Untersuchungen von de Boer et al. (2005) zur Gewebeverteilung von Quercetin bei Ratten konnten zeigen, dass die orale Applikation von Quercetin (0,1% bzw. 1 % Quercetin/kg Futter/Tag) über einen Zeitraum von 11 Wochen zu messbaren Konzentrationen von Flavonolen im Plasma und verschiedenen Organen führte. In dieser Studie wurden die höchsten Konzentrationen von Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin in den Lungen und die niedrigsten im Gehirn, in der Milz und in weißem Fettgewebe detektiert. Allerdings war die Gesamtflavonolkonzentration im Plasma, im Vergleich zu den untersuchten Geweben, deutlich höher. Mittlere Konzentrationen fanden sich in Leber und Niere. Die gemessenen Flavonolkonzentrationen in dieser Studie zeigten eine Dosisabhängigkeit, wobei die niedrigere Dosierung (0,1% Quercetin/kg Futter/Tag) eine etwa 4-fach geringere Konzentration im Vergleich zu der höheren Dosierung (1% Quercetin/kg Futter/Tag) aufwies. Den Hauptanteil an den Gesamtflavonolen in den meisten untersuchten Geweben machte dabei das Isorhamnetin mit 60 % aus. Tamarixetin tauchte nur in sehr geringen Konzentrationen in den Geweben, aber nicht im Plasma von Ratten auf (Boer et al. 2005). Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte auch die Gewebeverteilung von Quercetin und seinen Metaboliten mit intakter Flavonolstruktur nach oraler Applikation von Quercetin-haltigem Futter (500 mg/kg

KGW/Tag) über einen Zeitraum von 3 Tagen bei Schweinen. Im Gegensatz zu Ratten zeigten die Leber und die Niere, und nicht das Plasma, die höchsten Quercetinkonzentrationen. Die methylierten Derivate von Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin wurden weder in Gehirn noch in Milz oder in Herz detektiert (Boer et al. 2005). Bieger et al. (2008) untersuchten ebenfalls die postabsorptive Gewebeverteilung von Quercetin beim Schwein (Bieger et al 2008) nach oraler Aufnahme von 50 mg Quercetin/kg KGW/Tag für 4 Wochen. Auch in dieser Studie zeigten sich die niedrigsten Gesamtflavonolkonzentrationen im Gehirn. Die höchsten Gesamtflavonol-Konzentrationen wurden in Organen, die in die Eliminierung von Quercetin involviert sind (Colon, Jejunum, Leber, Niere) detektiert. Im Gegensatz zur Ratte machten hier Quercetinkonjugate (67-98%) den Hauptanteil der Gesamtflavonole in allen untersuchten Geweben aus. In den untersuchten Geweben konnten im Gegensatz zum Plasma Gehalte von dekonjugiertem Quercetin (30-100% der Gesamtflavonolkonzentration) nachgewiesen werden. Allerdings konnten die Autoren keinen direkten Zusammenhang zwischen der Konzentration an Aglyka und der spezifischen Aktivität der β -Glucuronidase in den jeweiligen Geweben feststellen. Des Weiteren erfolgte keine nennenswerte Akkumulation von Quercetin/Quercetinmetaboliten in allen untersuchten Geweben über den gesamten Versuchszeitraum von 4 Wochen (Bieger et al, 2008).

Bislang gibt es nur sehr wenige Studien zur Bioverfügbarkeit und Gewebeverteilung von Quercetin und dessen Metaboliten bei Fischen. In einer Studie von Park et al. (2008) an Nil Tilapien (*Oreochromis Niloticus*) wurden nach oraler Aufnahme einer quercetinhaltigen Diät (1% Quercetin im Futter) über 1 bzw. 15 Wochen nur Quercetin und sein methyliertes Derivat Isorhamnetin im Plasma, in der Leber und im Ganzkörperhomogenat detektiert. Im Unterschied zu Ratte und Schwein lagen hier Quercetin und Isorhamnetin in den untersuchten Geweben ausschließlich in nicht-konjugierter Form vor. Wie beim Schwein machte den Hauptanteil an Gesamtflavonol das Quercetin im Plasma bzw. den Geweben aus (Park et al. 2008).

2.1.1.3 Quercetin als Antioxidans

Zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Versuche weisen darauf hin, dass eine flavonolreiche Ernährung gesundheitsfördernd ist und präventiv gegen verschiedene Krankheiten wirkt. Das Flavonol Quercetin besitzt bei Säugetieren mehrere positive Eigenschaften, so weist es zum Beispiel antibakterielle (Ramos et al. 2006; Cushnie und Lamb 2005), antiinflammatorische (Serafini et al. 2010; Comalada et al. 2005) und anticarcinogene (Dajas 2012; Boots et al. 2008) Effekte auf. Viele wenn nicht alle dieser Effekte von Quercetin beruhen wahrscheinlich letztendlich auf seinen antioxidativen Eigenschaften (Boots et al. 2008; Williams et al. 2004; Middleton et al. 2000). Flavonoide können durch diverse Mechanismen vor Zellschäden, welche durch reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) verursacht werden, schützen. Sie können entweder als direkter Radikalfänger freie Radikale abfangen und neutralisieren oder durch Bindung von pro-oxidativen Metallionen die ROS-Produktion verhindern (Baccan et al. 2012; Procházková et al. 2011; Mira et al. 2002; Fraga et al. 2010; Pietta 2000). Da insbesondere ungesättigte Fettsäuren in Membranphospholipiden durch ROS geschädigt werden können (Halliwell und Gutteridge 1999; Tichivangana und Morrissey 1985; Allen und Foegeding 1981), ist von Interesse, dass in einer *in vitro*-Studie gezeigt wurde, dass Flavonoide und ihre Derivate in Lipiddoppelmembranen integriert werden können und so lokal ungesättigte Fettsäuren von oxidativen Veränderungen schützen können (Košinová et al. 2012; Abb .6). In Untersuchungen von Bonarska-Kujawa et al. (2014) führten Flavonole zur Stabilisierung der Membranstruktur und schützten sie vor Lipidperoxidation.

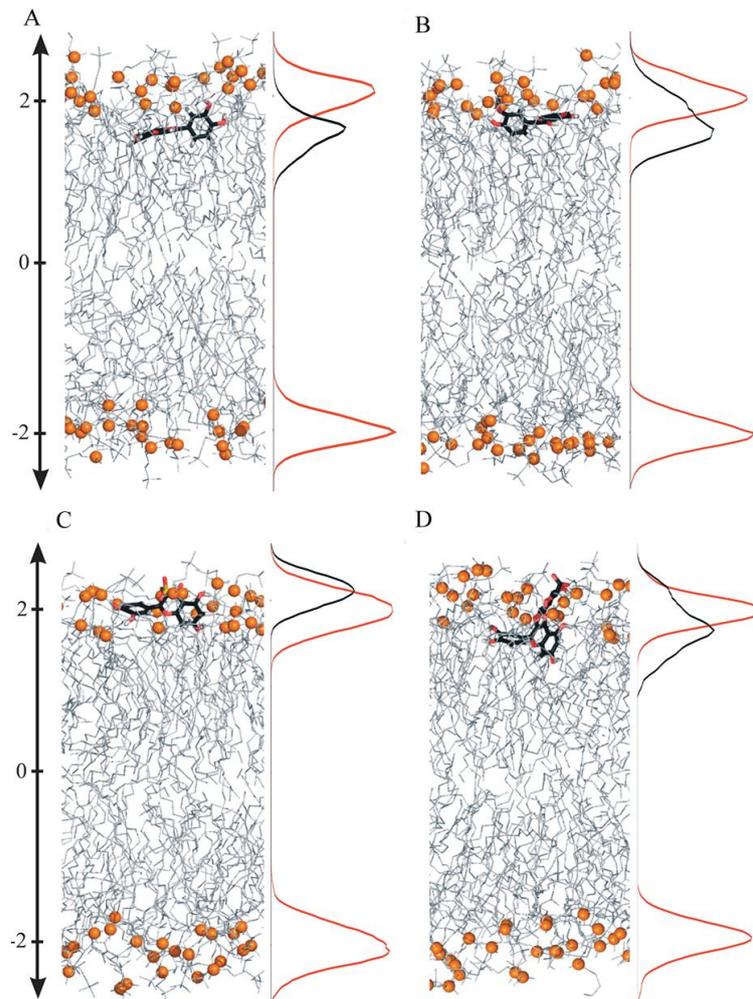


Abb. 6: Die Position des Quercetin und seine Metaboliten in den artifiziellen Phospholipid-Doppelmembranen (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine; DOPC), modifiziert nach Košinová et al. (2012). (A) Quercetin, (B) 3'-O-Methylquercetin, (C) Quercetin-3-O-Sulfate, (D) Quercetin-3-O-Glucuronide. Die orange Kugeln und Linien beschreiben die Phosphoratome

Wie schon erwähnt (Abschnitt 2.1.1.1), wird Quercetin nach oraler Aufnahme intensiv durch Biotransformationsenzyme umgesetzt. Im Blut zirkulieren deshalb v.a. Konjugate von Quercetin und seinen Metaboliten mit intakter Flavonolstruktur. Zahlreiche Studien belegen, dass methylierte bzw. konjugierte Metabolite von Quercetin aufgrund der Blockierung der freien phenolischen Hydroxylgruppen weniger effizient bezüglich der antioxidativen Wirkungen gegen freie Radikale sind (Procházková et al. 2011; Angeloni et al. 2007; Lemańska et al. 2004; Justino et al. 2004; Manach et al. 1998).

Flavonoide können auch über die Aktivierung endogener antioxidativer Schutzenzyme antioxidativ wirken (Carrasco-Pozo et al. 2016; Braun et al. 2011; Rodrigo et al. 2011; Kimura et al. 2009). Die Studien belegen, dass das Flavonol Quercetin seine antioxidative

und entzündungshemmende Wirkung durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear factor erythroid related factor 2 (Nrf2) und die Hemmung des NF- κ B Signalwegs wirkt (Carrasco-Pozo et al. 2016; Hur und Gray 2011; Chirumbolo 2010; Tanigawa et al. 2007) und so die Nrf2/Antioxidant responsive elements (ARE) - abhängige Gene induzieren kann (Lee et al. 2015; Ramyaa et al. 2014; Tanigawa et al. 2007; Shen et al. 2005). Nrf2 ist ein redoxsensitiver Transkriptionsfaktor, der für die Expression von mehreren antioxidativen Enzymen verantwortlich ist (Nguyen et al. 2009). In diesem Zusammenhang zeigten Tanigawa et al. (2007) in einer *in vitro*-Studie, dass nicht nur die relative Konzentration der mRNA von Nrf2 in HepG2-Zellen nach Inkubation mit Quercetin (5-40 μ M) anstieg, sondern auch die Konzentration des Nrf2-Proteins in der posttranskriptionalen Phase durch Verhinderung proteasomaler Abbau stabilisiert wurde. Braun et al. (2011) konnten anhand eines Zellkultur-Modells (primäre humane Osteoblasten) zeigen, dass Quercetin (100 μ M) die Genexpression antioxidativer Schutzenzyme wie den Superoxid-Dismutasen (SOD) und Hämoxigenase-1 (HO-1) induziert (Braun et al. 2011). In einer *in vitro* Zellkultur-Studie von Martín et al. (2010) konnte gezeigt werden, dass die Kakao-Polyphenolextrakte, bestehend aus Epicatechin (383,5 mg/100g), Catechin (116mg/100g) und Procyanidine (254,5mg/100g), die Glutathionperoxidase- (GPx) sowie Glutathionreduktase (GR)-Aktivität über die extrazelluläre regulierte Kinase (ERK) in HepG2-Zellen erhöht (Martín et al. 2010).

2.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Aufgrund der Relevanz für die vorliegende Arbeit wird hier auf die wichtigsten Aspekte der Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen und deren Wirkungen im Organismus sowie auf die zentralen anti-oxidativen Schutzenzyme des Organismus eingegangen.

Alle aeroben Lebensformen können ohne Sauerstoff nicht überleben. Dennoch ist der Umsatz von Sauerstoff mit gewissen Risiken für die Integrität bestimmter Moleküle, von Zellen und unter Umständen für den gesamten Organismus verbunden. Unter bestimmten physiologischen und pathologischen Bedingungen können hoch reaktive Sauerstoffverbindungen, sog. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen (Halliwell und Gutteridge 1999). Dazu zählen neben freien Sauerstoffradikalen auch nicht-radikalische Verbindungen wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Ozon (O_3) oder auch die sog. reaktiven Stickstoffspezies (RNS) (Halliwell und Gutteridge 1999). Als freie Radikale bezeichnet man grundsätzlich Atome, Ionen, oder auch Moleküle, die mindestens ein oder mehrere ungepaarte Elektronen aufweisen (Halliwell und Gutteridge 1999). Diese reaktiven Substanzen werden im Organismus in

bestimmten Umfang unter physiologischen Bedingungen, z.B. als Nebenprodukte der mitochondrialen Atmungskette oder auch durch exogene Faktoren wie z.B. UV-Strahlung gebildet (Thannickal und Fanburg 2000).

Im biologischen System spielen das Superoxidradikalanion und das Hydroxylradikal eine zentrale Rolle. Molekularer Sauerstoff wird in der Atmungskette über Zwischenprodukte zu Wasser reduziert. Die Reduktion von Sauerstoffmolekülen durch ein, zwei und drei Elektronen führt zur Bildung des Superoxidradikals ($\text{O}_2^{\bullet -}$), des Wasserstoffperoxids (H_2O_2), des Hydroxylradikals (OH^{\bullet}) und letztendlich des Wassers (H_2O) (Sies, 1997; Proctor und Reynolds 1984; Abb. 7).

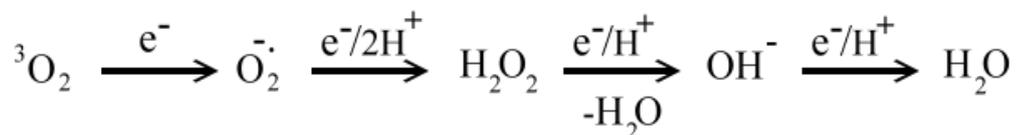
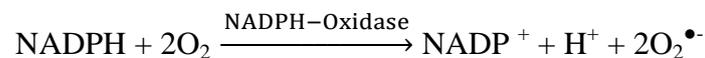


Abb. 7: Reduktion von Sauerstoffmolekülen (modifiziert nach Proctor und Reynolds 1984)

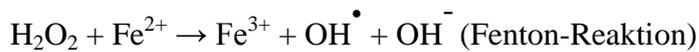
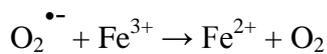
Das Superoxidradikal ($\text{O}_2^{\bullet -}$) wird hauptsächlich durch den Elektronentransport in der inneren Mitochondrienmembran gebildet. Es wird angenommen, dass 2% des eingeatmeten Sauerstoffs in der mitochondrialen Atmungskette zum Superoxidradikal umgesetzt werden (Abele und Puntarulo 2004; Halliwell und Gutteridge 1999). Der sog. respiratorische Burst, welcher mit der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, z. B. bei bakteriellen Infektionen verbunden ist, ist eine andere wichtige Quelle für die Bildung des Superoxidradikals ($\text{O}_2^{\bullet -}$) (Thannickal und Fanburg 2000).



Sharp und Secomber (1993) zeigten in einer Studie an Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), dass Makrophagen, aufgrund steigender Produktion von ROS, einen starken bakteriziden Mechanismus besitzen und eine Hemmung der NADPH-Oxidase die bakteriziden Eigenschaften der Makrophagen beim Fisch, ähnlich wie beim Säugetier, verschlechtert (Sharp und Secombes 1993).

Auch beim Fisch werden ähnlich wie beim Säugetier in der mitochondrialen Atmungskette große Mengen an ROS gebildet. Fische besitzen ebenfalls entsprechende antioxidative Schutzmechanismen, um die schädigende Wirkung von ROS zu verhindern (Mortelette et al. 2010). Des Weiteren wurde gezeigt, dass es eine positive Korrelation zwischen der Menge

an rotem Muskelanteil und der ROS-Produktion gibt. Rote Muskelfasern verbrauchen mehr Sauerstoff als weiße Fasern und weisen eine höhere mitochondriale Aktivität auf, welche zu einer erhöhten ROS-Bildung beim Säugetier sowie beim Fisch führt (Mortelette et al. 2010). Der wichtigste Lieferant für das Hydroxylradikal (OH^\bullet) ist das stabile, nichtradikalische Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das durch Interaktion mit Übergangsmetallionen in der sog. Fenton-Reaktion, in der Haber-Weiss-Reaktion (Reaktion zwischen H_2O_2 und $\text{O}_2^{\bullet -}$) oder durch Reaktion mit andere Verbindungen, z. B. Stickstoffmonoxid (NO), aus dem Ozon (O_3) in der Atmosphäre oder auch durch Einwirkung elektromagnetischer Gammastrahlung im Wasser gebildet werden kann (Kehrer 2000; Halliwell und Gutteridge 1999).



Im biologischen System stellt das Hydroxylradikal mit einer Halbwertszeit von 10^{-9} Sekunden das reaktivste Sauerstoffradikal dar und es reagiert sehr schnell mit fast jeder Art von in der Zelle befindlichen Molekülen, wie Zuckern, Aminosäuren, Phospholipiden, DNA-Basen und organischen Säuren (Halliwell und Gutteridge 1999; Pryor 1986). Das Hydroperoxylradikal (HO_2^\bullet), die protonierte Form des Superoxidradikals, ist viel reaktiver als das Superoxidradikal selbst. Das Hydroperoxylradikal, das in der Nähe der Membranoberfläche entsteht (eventuell auf Grund des niedrigeren PH-Werts in diesem Bereich), kann so die Zellmembran beschädigen (Halliwell und Gutteridge 1999).

Oxidativer Stress liegt vor, wenn die Produktion von Oxidantien (z.B. ROS/RNS) die Kapazität der antioxidativen Schutzmechanismen der Zielzelle überschreitet (Halliwell und Gutteridge 1999). Oxidativer Stress korreliert mit einem erhöhten Risiko für zahlreiche Erkrankungen beim Menschen, wie z. B. Tumorerkrankungen, chronische Darmerkrankungen, Diabetes mellitus, Parkinson, Alzheimer und Herz-Kreislaufkrankungen (Alfadda und Sallam 2012; Halliwell und Gutteridge 1999). Aber auch bei Nutztieren wird oxidativer Stress mit zahlreichen Erkrankungen wie z. B. Enteritis, Sepsis, Pneumonie, Mastitis und Gelenkerkrankung in Verbindung gebracht (Lykkesfeldt und Svendsen 2007).

2.2.1 Oxidativer Stress und Lipidperoxidation

Bei der Interaktion von ROS mit Phospholipiden werden die Strukturen der Zellmembran geschädigt, was schließlich zum Funktionsverlust der Biomembran führt. Das Ausmaß der Lipid-Oxidation ist abhängig von einer Reihe von Faktoren. Der wichtigste Faktor ist die Konzentration der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den jeweiligen Lipidsystemen (Allen und Foegeding 1981). Aufgrund des hohen Gehaltes an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA), ist Fisch bei der Verarbeitung und Lagerung im Vergleich zu Fleisch anderer Nutztiere wie Geflügel, Schwein, Rind, und Lamm, viel anfälliger für Lipidoxidation (Tichivangana und Morrissey 1985). Lipidoxidation ist eine der Hauptursachen von Qualitätsverlusten bezüglich Geschmack, Geruch, Farbe und Textur bei tierischen Fleischprodukten (Min and Ahn 2005).

Lipidperoxidation ist eine freie Radikal-Kettenreaktion, die sich aus den folgenden drei wichtigen Schritten zusammensetzt: Initiation, Propagation und Termination. Initiation der Lipidperoxidation erfolgt durch den Angriff reaktiver Radikale (ROS/RNS) auf ein labiles Wasserstoffatom einer Methylengruppe ($-CH_2$) einer ungesättigten Fettsäure und der Bildung eines Lipidradikals (L^{\bullet}). Unter Anwesenheit von O_2 reagiert das Fettsäureradikal mit Sauerstoff (O_2), wodurch ein Lipidperoxyradikal (LOO^{\bullet}) entsteht. Das gebildete Peroxyradikal ist in der Lage, erneut mit einer Abstraktion eines weiteren Wasserstoffatoms aus einem anderen Lipid-Molekül, wie z.B. aus benachbarten Fettsäuren, Hydroperoxid ($LOOH$) und ein weiteres Lipidradikal zu bilden (Propagation-Phase). Lipidhydroperoxide sind sehr instabil und reagieren deshalb rasch weiter. In dieser Phase laufen eine Reihe von Kettenreaktionen ab, die schließlich zu stabilen und toxischen Produkten, wie Aldehyden (Malondialdehyd), zyklische Endoperoxiden und Ketonen führen (Termination-Phase) (Halliwell und Gutteridge 1999). Dieser Prozess kann auch in der post mortem-Phase ablaufen (z. B. bei der Bearbeitung und Lagerung von Lebens- und Futtermitteln). In Abbildung 8 sind die drei Reaktionsphasen der Lipidperoxidation sowie die Entstehung von Malondialdehyd aus Arachidonsäure dargestellt.

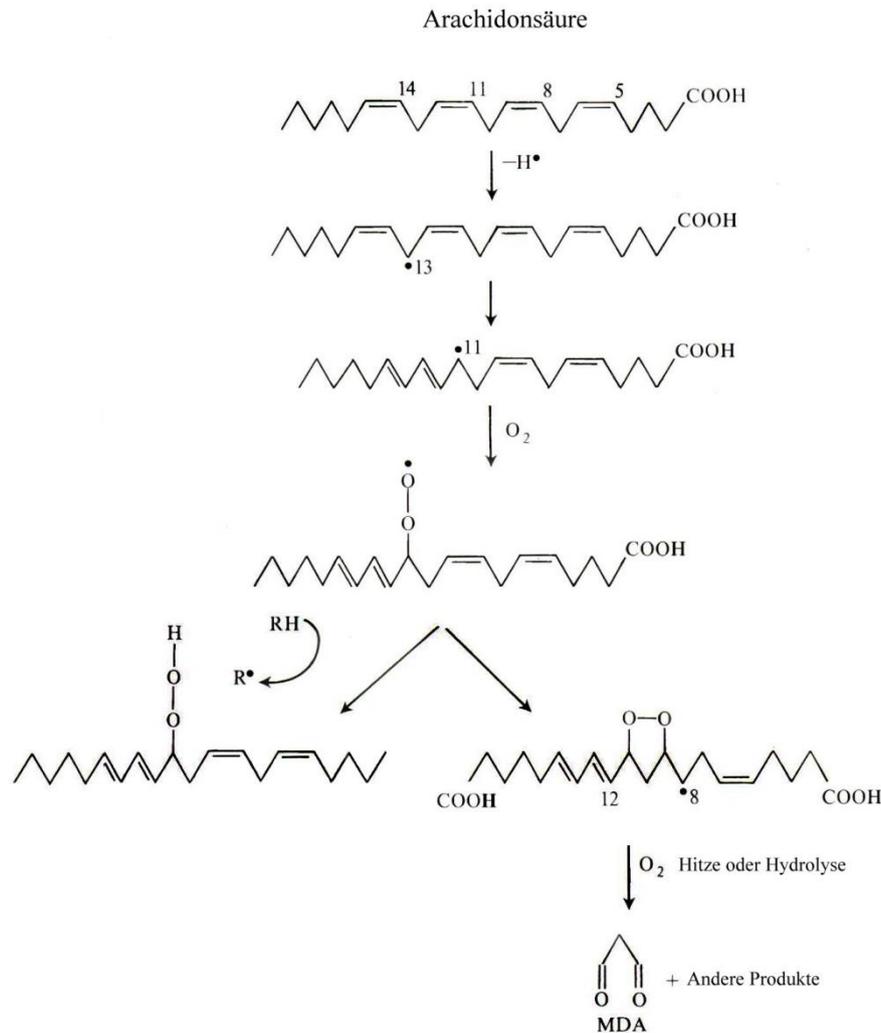


Abb. 8: Peroxidation der Arachidonsäure (Halliwell und Gutteridge 1999). Die ROS-initiierte Abstraktion eines Wasserstoffatoms erfolgt hierbei am C-13 (initiation). Das dabei entstandene Lipidradikal reagiert mit Sauerstoff zum Lipidperoxyradikal, welches in weiteren Schritten zu einem zyklischen Peroxid stabilisiert wird. Hieraus wird das Endoperoxid gebildet, welches aus dem Malondialdehyd (MDA) freigesetzt wird.

Malondialdehyd ist letztendlich ein Haupt-Abbauprodukt der Lipidperoxidation (Abb. 8). Seine Plasmakonzentration wird als ein Maß für den oxidativen Stress bei Mensch und Tier verwendet (Lykkesfeldt 2007; Halliwell und Gutteridge 1999; Nielsen et al. 1997). MDA kann mit unterschiedlichen Aminosäuren in Proteinen, wie Lysyl-, Histidyl-, Tyrosyl-, Arginyl- und Methionyl-Resten, reagieren. Dies kann zur Inaktivierung von Enzymen führen. Reaktionen von MDA mit DNA-Basen können auch Mutationen und eine Vielzahl von mutagenen Verbindungen (Pyrimido(1,2- α)purin-10(3H)-one, 1N²-Ethenodeoxyguanosin) verursachen (Halliwell und Gutteridge 1999).

2.3 Antioxidantien und Antioxidatives Schutzsystem

Fische besitzen wie alle anderen aeroben Organismen ein antioxidatives Schutzsystem, das in drei Subsysteme unterteilt werden kann: antioxidative Enzymsysteme, nicht enzymatische Antioxidantien und spezifische Metall-bindende-Proteine. Viele Faktoren können die oben genannten Schutzsystem beim Organismus induzieren und werden insbesondere durch die biotischen und abiotischen Umweltfaktoren wie Ernährungszustand, Qualität und Quantität der Nahrung, Temperatur, Salinität, intensive Schwimmverhalten, Strahlung, Wasserverschmutzung, Stressreaktionen und pathophysiologische Prozesse beeinflusst (Rahal et al. 2014; Pizzorno und Murray 2012; Tiwari 2012; Martínez-Álvarez et al. 2005).

2.3.1 Antioxidative Enzymsysteme

Zur Kontrolle der Konzentration von ROS besitzen lebende Zellen von Säugern und Fischen ein sehr aktives enzymatisches Schutzsystem. Die wichtigsten Vertreter dieser Enzyme sind Superoxid-Dismutasen (SOD), die Katalase (CAT) und Glutathionperoxidasen (GPx). Diese Enzyme sind wirkungs- und substratspezifisch (Rahal et al. 2014; Pizzorno und Murray 2012; Rodrigo et al. 2011; Pamplona und Costantini 2011; Davies 2001; Halliwell und Gutteridge 1999; Michiels et al. 1994). Die verschiedenen Enzymsysteme bilden im Organismus ein Netzwerk, dessen wesentliche Komponenten in Abb. 9 schematisch dargestellt sind.

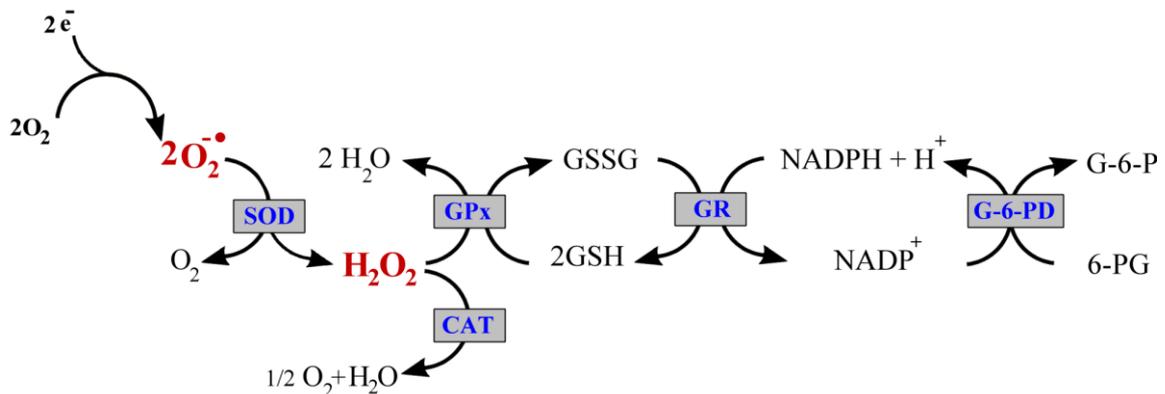


Abb. 9: Enzymatischer Abbau reaktiver Sauerstoffspezies (Jensen und Clausen 1984, Weydert und Cullen 2009). Das Superoxid-Anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) wird durch das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) entschärft und in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) überführt. Das entstandene Wasserstoffperoxid wird durch die Katalase (CAT) und Glutathion-Peroxidase (GP_x) zu Sauerstoff (O_2) und Wasser (H_2O) gespalten. Die GPx erfordert mehrere sekundäre Enzyme wie Glutathionreduktase (GR), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PD) sowie Glutathion (GSH), um seine Funktion auszuführen.

Superoxid-Dismutase (SOD)

Die SOD katalysiert die Reaktion von reaktiven Superoxid-Anionen zu weniger reaktivem Wasserstoffperoxid unter Bildung von Wasser und Sauerstoff und ist das erste Enzym, das auf ROS reagiert (Rahal et al. 2014; Pamplona und Costantini 2011; Marikovsky et al. 2003; Weydert und Cullen 2009; Michiels et al. 1994; McCord und Fridovich 1969).

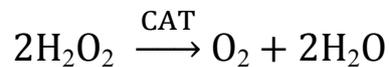


Je nach Lokalisationsort und dem Metallion im aktiven Zentrum des Enzyms unterscheidet man drei Formen: Die zytosolische Kupfer-Zink-SOD die mitochondriale Mangan-SOD und die eisenhaltige Form (Fe-SOD), die man nur in Bakterien und im Chloroplast der höheren Pflanzen, aber nicht in den tierischen Geweben findet (Halliwell und Gutteridge 1999).

Die Kupfer-Zink-SOD spielt sowohl bei der Immunantwort, neuronalen Apoptose und Angiogenese als auch bei Krebserkrankungen eine wichtige Rolle (Marikovsky et al. 2003; Marikovsky et al. 2002; Greenlund et al. 1995; Oberley und Buettner 1979). Die Spezifische Aktivität von Cu-Zn-Superoxid-Dismutase-Isoformen wurde auch als Biomarker des oxidativen Stresses beim Fisch empfohlen (Pedrajas et al. 1995). Entscheidend für die optimale Aktivität der SOD ist also das Metallion (Zink, Kupfer und Mangan) im aktiven Zentrum. *In vivo*-Studien belegen, dass Kupfer- und Zinkmangel einen negativen Einfluss auf die Cu-Zn-SOD Aktivität beim Organismus haben (Kleczkowski et al. 2003; Hidalgo et al. 2002). Als Beispiel wurde bei Regenbogenforellen gezeigt, dass in Folge eines Zinkmangels unter anderem der oxidative Stress begünstigt wird (Hidalgo et al. 2002). Veränderungen im Stoffwechsel der Spurenelemente, wie Zink (Zn), Kupfer (Cu) und Selenium (Se), können generell die endogenen antioxidativen Schutzenzyme stark beeinflussen (Fontagné-Dicharry et al. 2015; Jurczuk et al. 2004; Noaman et al. 2002; Hidalgo et al. 2002). Darüber hinaus wurde von einer Erhöhung der Aktivität der SOD durch Nahrungsentzug bei der Goldbrasse (*Sparus aurata*) berichtet (Pascual et al. 2003).

Katalase (CAT)

Das Enzym Katalase befindet sich vor allem in den Peroxisomen und katalysiert die Umwandlung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Sauerstoff (O_2) und Wasser (H_2O) (Halliwell und Gutteridge 1999; Forman und Torres 2002).



Akatalasämie oder Morbus Takahara ist eine seltene Krankheit beim Menschen, welche durch eine Mutation des Katalasegens verursacht wird und zu starken Schleimhautnekrosen in der Mundhöhle führt (Halliwell und Gutteridge 1999).

Beim Fisch findet man eine hohe Katalaseaktivität in Leber und Erythrozyten (Filho et al. 1993). In einer Studie mit Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) konnte gezeigt werden, dass das Alter des Fisches die Aktivität der enzymatischen Antioxidantien beeinflussen kann (Otto und Moon 1996). In der genannten Studie wurde eine Abnahme der Aktivität von SOD und Glutathion-Reduktase (GR) in der Leber und dem extrahepatischen Gewebe mit steigendem Alter beobachtet, während die Aktivität der Glutathion-Peroxidase (GP_x) und der CAT unverändert blieben (Otto und Moon 1996).

Glutathion-Peroxidase (GPX)

Glutathion-Peroxidasen (GP_x) katalysieren die Reduktion von H_2O_2 und organischen Hydroperoxiden zu Wasser bzw. Alkoholen. Zelluläres, in reduzierter Form vorliegendes, Glutathion dient hierbei als Cosubstrat. Das Enzym enthält Selen in Form von Selenocystein im aktiven Zentrum (Halliwell und Gutteridge 1999; Michiels et al. 1994).



Bis jetzt sind beim Säuger vier verschiedene Isoformen in der Familie der selenabhängigen Glutathion-Peroxidasen (Gp_x) bekannt: Phospholipidhydroperoxid- GP_x (PH GP_x), Plasma- GP_x (p GP_x), gastrointestinale GP_x (GI- GP_x) und cytosolische GP_x (c GP_x).

2.3.2 Nicht enzymatische Antioxidantien

Nach Halliwell et al. (1999) ist ein Antioxidans jede Substanz, die in niedrigerer Konzentration im Vergleich zu einem oxidierbaren Substrat vorliegt und dessen Oxidation signifikant verzögert oder verhindert (Halliwell und Gutteridge 1999). Bei den nicht enzymatischen Antioxidantien handelt es sich um niedermolekulare Substanzen, die entweder von endogenem oder exogenem Ursprung sind. Weiterhin wird zwischen wasser- und fettlöslichen Substanzen unterschieden.

Zu den niedermolekularen endogenen Antioxidantien gehören v.a. Glutathion (GSH), Harnsäure, Bilirubin, Coenzym Q und α -Liponsäure (Gómez-zubeldia et al. 2000; Halliwell und Gutteridge 1999). Als exogene Antioxidantien, die über die Nahrung zugeführt werden, kann man Tocopherole (Vitamin E), β -Carotin und sekundäre Pflanzenstoffe mit phenolischen Strukturen, wie z.B. Flavonoide, nennen. Viele Knochenfische, darunter auch die Regenbogenforelle, können ähnlich wie der Mensch und das Meerschweinchen Vitamin C aufgrund eines Mangels an L-Gulonon- γ -lacton-Oxidase nicht selbst synthetisieren (Krasnov et al. 1998). Damit gehört Vit C bei diesen Spezies zu den exogenen Antioxidantien.

Vitamin E

Vitamin E ist ein Oberbegriff für zwei Gruppen von fettlöslichen Verbindungen - Tocopherole und Tocotrienole - die qualitativ die gleiche biologische Wirksamkeit wie R, R, R- α -Tocopherol aufweisen und zum ersten Mal im Jahr 1922 durch Evans und Bishop als ein für Fortpflanzung und Reproduktion von Ratten essenzieller Faktor beschrieben wurden (Evans und Bishop 1922). In der Natur findet man acht Formen von Vitamin E: α -, β -, γ -, und δ -Tocopherol, sowie α -, β -, γ -, und δ -Tocotrienol, wobei die Derivate des Tocotrienols im Vergleich zu Tocopherol nur eine geringe Vit. E-Wirkung aufweisen (McDowell 2000).

Chemische Struktur und biologische Wirkung

Strukturell gesehen bestehen alle acht natürlichen Verbindungen von Vit E aus einem Chromanolring, der an Position C2 mit einer langen (C16) isoprenoiden Seitenkette verknüpft ist (Abb. 10). Derivate des Tocopherols (TOC) haben eine gesättigte Seitenkette, wohingegen Tocotrienole eine dreifach ungesättigte isoprenoide Seitenkette haben. Je nach Anzahl der Methylgruppen und deren Position am Chromanolring unterscheiden sich die Tocopherol und Tocotrienol-Derivate untereinander, wobei d- α -Tocopherol mit drei Methylgruppen am Chromanring die höchste biologische Aktivität aufweist (NRC 2011; Packer

und Obermüller-Jevic 2002). Die biologische Aktivität der natürlich vorkommenden Tocopherol-Derivate ist in Tab. 3 zusammengefasst.

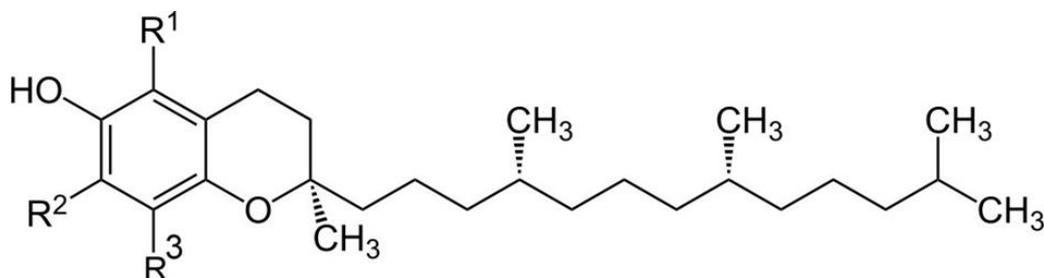


Abb. 10: Grundstruktur der Tocopherole (nach Azzi und Stocker, 2000; Packer und Obermüller-Jevic 2002). Diese bestehen aus einem Chromanolring mit einer isoprenoiden Seitenkette; R1-R3 sind Methylgruppen (s.a. Tab. 3).

Tab. 3: Biologische Aktivität der Tocopherol-Derivate

Derivat des Tocopherols	R1	R2	R3	Biologische Wirksamkeit*
α -Tocopherol	CH3	CH3	CH3	1
β -Tocopherol	CH3	H	CH3	0,5
γ -Tocopherol	H	CH3	CH3	0,1
δ -Tocopherol	H	H	CH3	0,03

* Ausgedrückt als d- α -Tocopherol-Äquivalente, wurden dann die folgenden Werte für die verschiedenen Isoformen zugeordnet (Ng 2004)

In der Tierernährung wird vor allem das synthetisch hergestellte α -Tocopherol verwendet. Synthetische α -Tocopherol enthält gleiche Mengen aller 8 möglichen Stereoisomere (RRR, RRS-, RSR-, RSS-, SRR-, SRS-, SSR-, SSS-) und wird auch als all-rac- α -Tocopherol bezeichnet (Vagni et al. 2011). Für die Stabilität der Chromanstruktur werden vor allem Acetat- und Succinatester- verwendet (z. B. all-rac- α -Tocopherylacetat). Alpha-Tocopherylacetat liegt bei Raumtemperatur in Ölform, der Succinylester als Pulver vor (Jensen et al. 1997). Die Ester werden nach Aufnahme im Gastrointestinaltrakt zu den freien Formen hydrolysiert und erst dann im Organismus biologisch aktiv (Weiser und Vecchi 1982). Die relative biologische Wirkung von all-rac- α -Tocopherol und seines Acetylestere betragen 74% bzw. 67% des RRR- α -Tocopherols (Packer und Obermüller-Jevic 2002).

Als wichtigstes lipophiles Antioxidans kann Vitamin E nur über die Nahrung zugeführt werden. Hierbei gibt es eine positive Korrelation zwischen Fettgehalt und Vitamin-E-Gehalt

des Fisches. Die Organe eines Fisches, die normalerweise nicht gegessen werden, wie Leber und Darm, enthalten viel größere Mengen an fettlöslichen Vitaminen als das Fleisch selbst (Murray und Burt 2001). In einer Studie mit Regenbogenforellen konnte gezeigt werden, dass das Alter des Fisches, nicht aber das Geschlecht, den Vitamin-E-Gehalt beeinflusst. In dieser Studie wiesen die jüngsten Fische den höchsten Tocopherolgehalt auf (Lopez et al. 1995).

Vitamin E werden unterschiedliche physiologische Eigenschaften zugeschrieben. Als das wichtigste lipophile Antioxidans übernimmt das Vitamin E eine Schutzfunktion der Zellmembran gegenüber oxidativem Stress. Die Mesomeriestabilisierung des Tocopherol-Radikals schützt die mehrfach ungesättigten Fettsäuren vor Angriffen durch Radikale, indem die radikalische Kettenreaktion durch Abgabe eines Wasserstoffatoms der phenolischen Hydroxylgruppe abgebrochen wird. Vitamin E stimuliert die Darmphagozytenfunktion bei der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) und stärkt so das Immunsystem der Fische (Clerton et al. 2001). In einer Studie mit Atlantischem Lachs (*Salmo salar*) konnte durch eine tägliche Supplementierung des Futters mit Vitamin E (400 mg/kg vitamin E als all-rac- α -Tocopherylacetat) über einen Zeitraum von 14 Wochen eine signifikante Abnahme der Malondialdehyd-Konzentrationen im Lachsfilet beobachtet werden, während die Aktivität antioxidativer Enzyme in der Leber (GPx und SOD) weitgehend unverändert blieb (Faizan et al. 2013).

2.4 Effekte von Quercetin beim Fisch

In verschiedene *in vivo*- und *in vitro*-Studien wurden bisher die postabsorptiven Wirkungen von Flavonoiden bei Fischen untersucht. Plakas et al. (1985) zeigten in einer *in vivo*-Studie mit Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*), dass eine sehr hohe orale Quercetinaufnahme (500mg/kg KGW/Tag) über eine lange Zeit (8 Monate) keine toxischen Wirkungen bei oben erwähnter Fischart hatte (Plakas et al. 1985). Untersuchungen von Tsuji und Walle (2008) zur Toxizität von einigen Flavonoiden bei der Fischleberzelllinie (*Oncorhynchus mykiss*) konnten den Befund von Plakas et al. (1985) *in vitro* bestätigen, laut welchem das Quercetin zwischen den untersuchten Flavonoiden die niedrigste Toxizität aufwies (Tsuji und Walle 2008). Quercetin wies *in vitro* eine potente inhibitorische Wirkung (IC₅₀ 139 μ M) auf die ovariale Aromataseaktivität bei Regenbogenforellen auf (Pelissero et al. 1996). In der Aquakultur werden Aromatase-Inhibitoren für die Erzeugung von Monosex-Populationen genutzt. Zum Beispiel führte der ovariale Aromatase-Inhibitor 1,4,6- androstatriene-3–17-dione (ATD) bei Regenbogenforellen zur Maskulinisierung von weiblichen Monosex-

Populationen (Guiguen et al. 1999). Quercetin ist in der Lage, den Ionentransport im Dün- und Dickdarm von Fischen ähnlich wie beim Säuger zu beeinflussen (Cermak et al. 1998, 2001 und 2002; Trischitta und Faggio 2006). Eine *in vitro*-Studie am isolierten Aaldarm (*Anguilla anguilla*) zeigte, dass Quercetin (400 µmol/l) den Ionentransport im Darm durch die Stimulierung der cAMP-unabhängigen Anionen bzw. der Chlorid-Sekretion zu beeinflusst. Die Sekretion von Chlorid spielt auch im Zusammenhang mit osmoregulatorischen Funktionen bei Salzwasserfischen eine Rolle, wobei Trischitta und Faggio (2006) vermuten, dass insbesondere Quercetin diese Prozesse beeinflussen könnte. Am Rattendarm konnte *in vitro* gezeigt werden, dass das Flavonol Quercetin (100 µmol/l als Aglykon) die Sekretion von Chlorid-Ionen im Dün- und Dickdarm induziert (Cermak et al. 1998 und 2001).

Bezüglich der antioxidativen Wirkungen des Flavonols Quercetin beim Fisch zeigten Yang et al. (2012), dass Rutin (50 µmol/l) beim Zebrafisch die durch UV-B-Strahlung ausgelöste ROS-Produktion und den Zelltod inhibiert (Yang et al. 2012). Shin et al. (2010a) untersuchten den Einfluss von Quercetin auf das Wachstum sowie seine antioxidative Wirkung bei Flundern (*Paralichthys olivaceus*), die hypoosmotischem Stress ausgesetzt waren. Den Tieren wurde eine quercetinhaltige Diät mit zwei Dosierungen (0,25% bzw. 0,5 % Quercetin/kg Futter/Tag) über einen Zeitraum von 30-60 Tagen verabreicht. Die Fütterungsgruppe mit der höchsten Quercetin-Supplementierung zeigte im Vergleich zu Kontrollgruppe eine höhere Gewichtszunahme. Zudem hatten die Tiere mit Quercetin-Supplementierung im Vergleich zur Kontrollgruppe niedrigere Cholesterinkonzentrationen im Blut. Des Weiteren beobachteten die Autoren eine gesteigerte Stressresistenz und Immunfunktion durch Zusatz von Quercetin bei den untersuchten Fischen (Shin et al. 2010a). Quercetin erhöhte die Lysozymaktivität und die Immunfunktion bei Flundern. Darüber hinaus waren die mRNA-Konzentration und die Aktivität der antioxidativen Enzyme SOD und CAT, die H₂O₂-Konzentrationen in Serum sowie Plasmacortisolspiegel bei Fischen mit Quercetinzusatz deutlich niedriger (Shin et al. 2010a). Die *in vitro* Studie von Higson und Jones (1984) zeigte, dass das Flavonol Quercetin unter anderem in der Lage ist, das im Blut der Regenbogenforelle nach Stimulation durch Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA; 1 µg/ml) produzierte Superoxidradikal (O₂^{•-}) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zu neutralisieren (Higson und Jones 1984).

Darüber hinaus zeigt Quercetin auch bei Fischen antibakterielle und antiinflammatorische (Serafini et al. 2010; Ramos et al. 2006; Cushnie und Lamb 2005; Comalada et al. 2005) sowie immunmodulatorische Effekt (Awad et al. 2013). Bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), führte die Fütterung von Quercetin (1% Quercetinaglykon im Futter) für eine Zeit von zwei Wochen zu einem erhöhten Immunglobulin-M-Spiegel (IgM), einer

erhöhten Myeloperoxidasemenge (MPO), sowie einer gesteigerten Lysozymaktivität (Awad et al. 2013).

Der Einfluss von Quercetin auf das Wachstum und die Lipidkonzentration im Serum von Tilapia (*Oreochromis niloticus*) wurde von Zhai und Liu (2013) untersucht. Die Tiere hatten Quercetin in verschiedenen Dosierungen (0, 200, 400, 800, und 1600 mg/kg KGW) oral über sieben Wochen erhalten. Sowohl die spezifische Wachstumsrate (SGR, specific growth rate) als auch der Korpulenzfaktor (K-Wert) der Quercetin-Gruppen war unabhängig von der Dosierungshöhe am Ende des Versuchs deutlich besser bzw. höher als in der Kontrollgruppe. Des Weiteren wurde die Triglyceridkonzentration im Serum dosisabhängig verringert, während sich die HDL-Cholesterin-Konzentration signifikant anstieg. In der genannten Studie wurde auch die Gesamtkörperzusammensetzung der Tiere durch Quercetin-Supplementierung beeinflusst. Der Rohfett- und Wassergehalt lag bei den Quercetin-Gruppen unabhängig von der Dosierungshöhe bzw. ab einer Konzentration von 400 mg Quercetin/kg KGW signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe, während der Gehalt an Rohprotein in der Kontrollgruppe am niedrigsten war (Zhai und Liu 2013). Die Autoren folgerten aus den beobachteten Ergebnissen, dass Quercetin verschiedene Wachstumsparameter verbessert und gleichzeitig die Lipidkonzentration im Serum und Gesamtkörper der untersuchten Fische verringert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass *in vivo*- und vor allem *in vitro*-Studien gezeigt haben, dass auch beim Fisch vielerlei Effekte von Quercetin, vergleichbar mit denen beim Säugetier, auftreten. Anzumerken ist hierbei allerdings, dass die verwendeten Quercetin-Konzentrationen in den oben genannten Studien häufig deutlich höher waren als die nach oraler Aufnahme biologisch vorkommenden Konzentrationen.

3. Material und Methoden

Sämtliche Versuche mit Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) und Spiegelkarpfen (*Cyprinus carpio*) wurden in den Versuchsanlagen der Gesellschaft für Marine Aquakultur mbH (GMA) in Büsum durchgeführt und waren durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt (Genehmigungsnummer V244-7224.123-34). Im ersten Versuchsdurchgang (Forellen- bzw. Karpfenversuch I) wurde v. a. die Retention und Akkumulation von Quercetin in ausgewählten Geweben (Blut, Muskel, Leber) gemessen. Zur Erfassung von oxidativem Stress wurde ferner die Konzentration von Vitamin E und Malondialdehyd im Blut der Fische ermittelt. Der zweite Versuchsdurchgang (Forellen- bzw. Karpfenversuch II) hatte zum Ziel, neben möglichen Effekten von Quercetin auf Wachstum und Körperzusammensetzung auch die Aktivitäten ausgewählter antioxidativer Enzyme (Superoxiddismutase, Katalase) in Leber und Muskulatur von Forellen und Karpfen nach unterschiedlicher Quercetin-Supplementierung zu messen.

3.1. Forellenversuch I

3.1.1. Versuchstiere, Versuchsdesign und Versuchsdiäten

Regenbogenforellen mit einem Anfangsgewicht von $196,7 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$ (Mittelwert \pm SEM) wurden von der Firma *Forellenzucht Troststadt GbR* (Trostadt, Deutschland) bezogen. Die insgesamt 272 Fische wurden so auf 16 Tanks (je 150 l) verteilt, dass ein möglichst ähnliches Durchschnittsgewicht/Becken erzielt wurde (Abb. 11). Jeweils 68 Tiere (4 Tanks mit jeweils 17 Fischen) erhielten dabei eine der vier Versuchsdiäten mit unterschiedlichem Quercetiningehalt (Dosierung 0, 10, 30 bzw. 50 mg Quercetin/kg KGW). Die Fische wurden in einem Kreislaufsystem bei einer Wassertemperatur von $14,2 \pm 0,04 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Mittelwert \pm SEM; $n=28$) und einer Licht- bzw. Dunkelperiode von jeweils 12 h gehalten. Die Wasserqualität wurde anhand der Sauerstoff-, Nitrit- und Ammoniumkonzentration täglich überwacht (Sauerstoff $8,4 \pm 0,11 \text{ mg/l}$ (Mittelwert \pm SEM; $n=28$), Handy Polaris, OXYGUARD International A/S, Birkerød, Dänemark; Nitrit $1,4 \pm 0,09 \text{ mg/l}$ und Ammonium $0,7 \pm 0,05 \text{ mg/l}$ (Mittelwert \pm SEM $n=28$), Microquant test kit, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Während einer den eigentlichen Versuchen vorausgehenden Adaptationsphase von zwei Wochen erhielten die Fische die Versuchsdiäten ohne Zusatz von Quercetin (= Kontrolldiät). Danach wurden die jeweiligen Versuchsdiäten über einen Zeitraum von vier Wochen gefüttert. Für die Versuche wurde ein pelletiertes (4 mm) Trockenfutter für die oben genannte Fischarten mit vier Dosierungen von Quercetin (Forelle: 0, 0,83, 2,5 und 4,2 g/kg

TM; Karpfen: 0, 1,1, 3,4 und 5,6 g/kg TM) konzipiert. Dies entspricht bei einem Fütterungsniveau von 1,2 % (Forelle) bzw. 1 % (Karpfen) der Körpermasse einer Quercetinaufnahme von 0, 10, 30 bzw. 50 mg/ kg KGW. Bezüglich der Nährstoffgehalte entsprechen die Diäten den aktuellen Versorgungsempfehlungen des NRC (National Research Council). Sämtliche Diäten werden von der Firma Altromin (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) hergestellt. Die Zusammensetzung der Versuchsdiäten ist in Tab. 4 dargestellt.

Da die Besatzdichte Verhalten und Futteraufnahme von Fischen beeinflusst (Ashley 2007; Alanara and Brannas 1996), wurden nach jeder Beprobung (s. u.) Fische aus den Reservetanks genommen, markiert (wurden nicht für Beprobung entnommen) und wieder in die Becken eingesetzt.

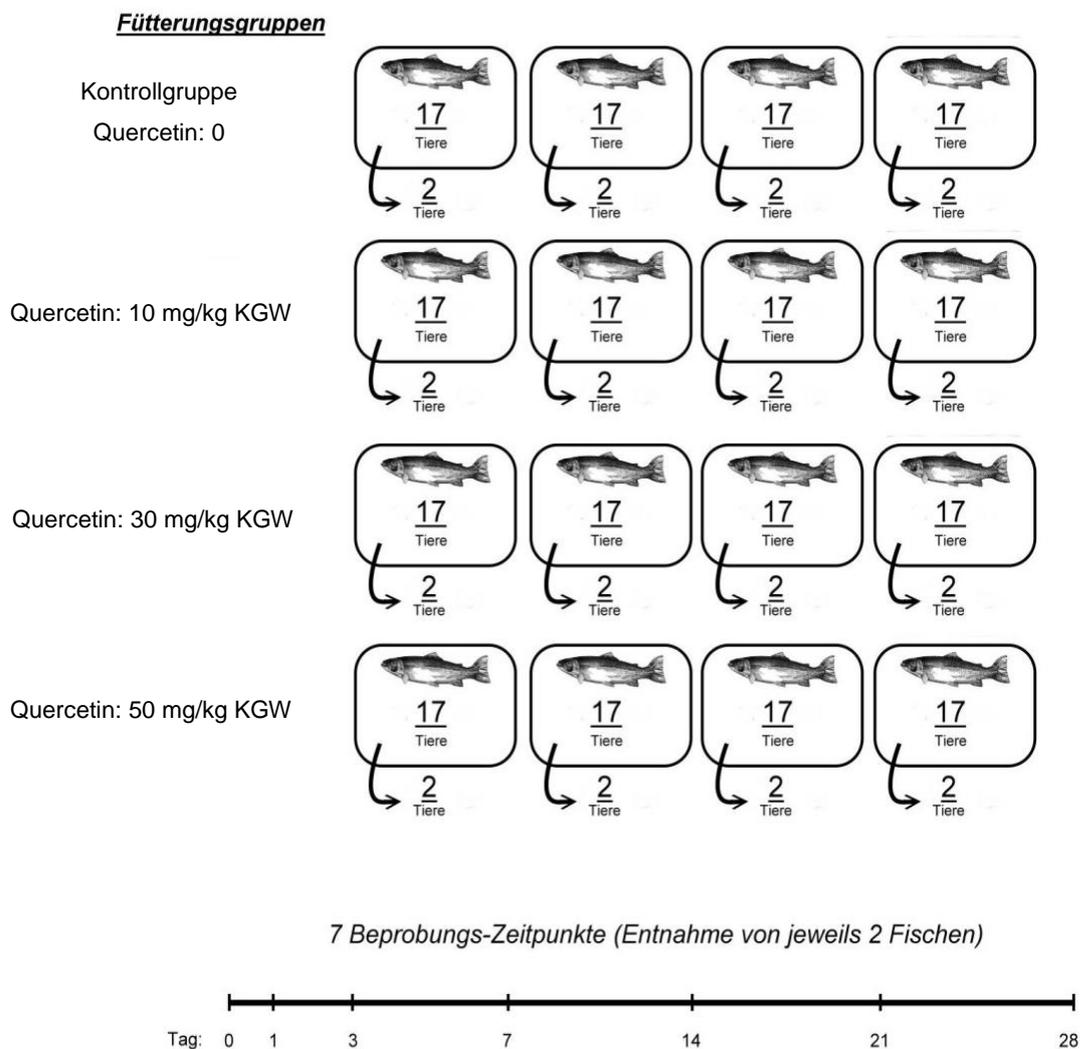


Abb. 11: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus und -ablaufs

3.2 Karpfenversuch I

Spiegelkarpfen mit einem Anfangsgewicht von $181,2 \text{ g} \pm 4,5 \text{ g}$ (Mittelwert \pm SEM) wurden von der kommerziellen Fischzucht *Kortmann GbR* (Hohenwestedt, Deutschland) bezogen. Die erste Versuchsreihe mit Spiegelkarpfen wurde im Wesentlichen analog zu dem oben beschriebenen Versuch mit Forellen durchgeführt. Unterschiede bestanden jedoch hinsichtlich der Wasserparameter sowie der Nährstoffzusammensetzung des Futters (Tab. 4). Die wichtigsten Wasserparameter für diesen Karpfenversuch waren: $21,74 \pm 0,12 \text{ }^\circ\text{C}$ Wassertemperatur (Mittelwert \pm SEM; $n = 28$), $10,39 \pm 0,17 \text{ mg / l}$ Sauerstoff (Mittelwert \pm SEM; $n=28$), Handy Polaris, OXYGUARD International A/S, Birkerød, Dänemark; $0,4 \pm 0,02 \text{ mg/l}$ Nitrit und $0,02 \pm 0,009 \text{ mg/l}$ Ammonium (Mittelwert \pm SEM; $n=28$), Microquant test Kit, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; pH-Wert $7,66 \pm 0,028$).

3.3 Probengewinnung Forellen- und Karpfenversuch I

Während des 4-wöchigen Fütterungsversuchs wurden nach 16-stündigem Futterentzug an 7 Zeitpunkten (Tag 0, 1 und 3 sowie nach 1, 2, 3 und 4 Wochen) jeweils 2 Fische/Becken entnommen (Abb. 11), mit einem Schlag auf den Kopf getötet und Gewebeproben (Blut, Muskel, Leber) für die Bestimmung der Quercetinkonzentrationen sowie der Konzentrationen von Vitamin E und Malondialdehyd entnommen.

Die Blutproben wurden aus der kaudalen Vene mit einer 4,5-ml Lithium-Heparinat-haltigen Spritze (45 I.E. Heparin /ml Blut Monovette®, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gesammelt und sofort zur Plasmagewinnung 10 min bei $10.000 \times g$ (Mikrozentrifuge 5415 CW, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Die individuellen biometrischen Daten, wie Gewicht und Länge der einzelnen Fische sowie das Lebergewicht, wurden auch zu jedem Beprobungszeitpunkt erfasst. Die Muskelproben stammten aus dem proximalen Teil des epaxialen Muskels, die Leber wurde *in toto* entnommen. Alle Gewebeproben wurden sofort einzeln in Plastikbeutel mit Verschluss verpackt und bis zur Analyse bei einer Temperatur von -80°C gelagert.

Tab 4. Komponenten und Nährstoffzusammensetzung der Versuchsdiäten

Komponente [%]	Karpfen	Forelle
Fischmehl (64% Rohprotein)	39,1	30,0
Fischöl	2,9	7,5
Soja-Protein-Isolat ^c	-	15,5
Maiskleber (62% Rohprotein)	-	15,5
Weizenmehl 550	19,5	27
Weizenkleie	35	-
Kaliumhydrogenphosphat	1	1
Natriumhydrogenphosphat	0,5	0,5
Vitamin mix ^a	2	2
Mineral mix ^b	-	1

Nährstoffe [g kg⁻¹ Trockensubstanz]

Trockensubstanz	90,1	92,3
Rohprotein	32,36	46,1
Rohfett	7	11,3
Rohasche	11,46	8,8
Rohfaser	5	1,3
Umsetzbare Energie (MJ kg ⁻¹)	13,8	15,2
Lysin	22,2	23,76
Methionin	8,49	10,75
Cystin	3,57	6,27
Calcium	1,92	1,48
Phosphor	1,83	1,36

^a **Vitamin-Prämix**; resultierende Konzentrationen im Futter (mg/kg⁻¹, Angaben laut Hersteller): A 10.000 IU kg⁻¹; Vitamin D₃ 2.000 IU kg⁻¹; Vitamin E (als α -Tocopherolacetat) 300; Vitamin K₃ (als Menadion) 10; Vitamin B₁ 20; Vitamin B₂, 40; Vitamin B₆ 20; Vitamin B₁₂ 0,5; Vitamin C 300; Pantothen säure 60; Nicotinsäure 200; Folsäure, 10; Biotin, 3; Inositol 100; ^b **Mineral-Prämix**; resultierende Konzentrationen im Futter für Forelle (F) bzw. Karpfen (K), (mg/kg⁻¹, Angaben laut Hersteller): Kobalt (F) 0,112 (K) 0,102; Mangan (F) 23,603 (K) 53,797; Jod (F) 1.381 (K) 1,455; Kupfer (F) 13,243 (K) 8,457; Selen (F) 0,288 (K) 0,458; Zink (F) 73,197 (K) 75,013; Eisen (F) 366,837 (K) 443,712; ^c VEGACON90, EUROSÖY GmbH, Deutschland

3.4 Forellenversuch II

3.2.1. Versuchstiere, Versuchsdesign und Versuchsdiäten

Für diesen Versuch wurden insgesamt 200 Regenbogenforellen mit einem Anfangsgewicht von $164,7 \pm 3,9$ g (Mittelwert \pm SEM) von der kommerziellen Fischzucht *Kortmann GbR* (Hohenwestedt, Deutschland) bezogen. Die Fische wurden so auf insgesamt 20 Tanks (je 150 l) verteilt, dass ein möglichst ähnliches Durchschnittsgewicht/Becken erzielt wurde. Für die vier Fütterungsgruppen (s. u.) wurden dabei jeweils fünf Tanks verwendet. Die Wassertemperatur betrug $14,3 \pm 0,1$ C° (Mittelwert \pm SEM; n=42) und die Hell- bzw. Dunkelphase betrug jeweils 12 h. Die Wasserqualität wurde täglich ermittelt. Der Sauerstoffgehalt betrug während des gesamten Versuchs $8,7 \pm 0,09$ mg/l (Handy Polaris; OXYGUARD International A/S, Birkerød, Dänemark), der Nitritgehalt $4,9 \pm 0,25$ mg/l und der Ammoniumgehalt $0,7 \pm 0,06$ mg/l (Mittelwert \pm SEM; n=42); Microquant test kit; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

Während der zweiwöchigen Adaptationsphase, die der Versuchsperiode vorausging, erhielten die Fische die Diät ohne Zusatz von Quercetin (= Kontrolldiät) und im Anschluss während der sechswöchigen Versuchsphase quercetinhaltige Diäten (Quercetin in 4 Dosierungen: 0, 2,5, 5,0 und 7,0 g Quercetin/kg Futter). Die Zusammensetzungen der Diäten entsprachen denen des ersten Versuchs (Tab. 4). Im Unterschied zur ersten Versuchsreihe wurde hier das Futter allerdings zweimal täglich zur ad lib. Aufnahme bzw. bis zur scheinbaren Sättigung angeboten. Zur Erfassung der tatsächlichen Futteraufnahme wurden die Fische während der Fütterung genau beobachtet und nicht gefressene Pellets innerhalb von 10 Minuten nach der Fütterung aus den Tanks abgesaugt und deren Gewicht ermittelt. Dazu wurden zuvor 600 Pellets eingewogen und das mittlere Gewicht eines Pellets bestimmt. Aus der Differenz zwischen eingesetzter und zurückgewonnener Futtermenge wurden die entsprechenden Futteraufnahmen kalkuliert.

3.5 Karpfenversuch II

Die zweite Versuchsreihe mit Spiegelkarpfen wurde analog zur zweiten Versuchsreihe mit Forellen durchgeführt. Im Unterschied zum zweiten Versuch mit Forellen dauerte der entsprechende Versuch mit Karpfen allerdings nur 5 Wochen.

3.6 Probengewinnung Forellen- und Karpfenversuch II

Die Beprobung erfolgte zu Beginn und nach Abschluss der sechs- bzw. fünfwöchigen Versuchsperiode. Zur Erfassung der verschiedenen Wachstumsparametern (Futteraufnahme, tägliche Gewichtszunahme, Futtermittelverwertung, spezifische Wachstumsrate und Körpermasse) wurde alle 2 Wochen eine Zwischenwiegung durchgeführt. Zur Bestimmung der chemischen Körperzusammensetzung (Rohprotein, Rohfett, Rohasche, Wassergehalt) wurden zu Beginn und zum Ende des Versuchs 2 Tiere/Becken entnommen und getötet. Die Tiere wurden dann bis zur weiteren Analyse bei -20° C gelagert. Darüber hinaus wurden zusätzlich am Ende des Versuchs 2 Tiere/Becken für die Bestimmung der Aktivität ausgewählter antioxidativer Enzyme (Katalase und Superoxid-Dismutase) beprobt. Die gewonnenen Gewebeprobe (Leber und Muskel) wurden sofort einzeln in Plastikbeutel mit Verschluss verpackt und bis zur Analyse bei einer Temperatur von - 80°C gelagert.

3.7 Analytische Methoden

3.7.1 Bestimmung von Flavonole

Sowohl in den eingesetzten Versuchsdieten als auch in den aus den Versuchen gewonnenen Plasma- und Gewebeprobe wurden neben Quercetin auch Quercetinmetabolite mit intakter Flavonolstruktur (Kämpferol, Isorhamnetin, Tamarixetin) erfasst. Zur sprachlichen Vereinfachung wird im weiteren Verlauf von der Bestimmung von Flavonolen gesprochen.

Extraktion der Flavonole aus dem Plasma und Gewebe

Die Flavonolbestimmung aus Muskel und Leber erfolgte aus lyophilisiertem Material. Dazu wurden die Gewebeprobe lyophilisiert (Christ Beta 1-8 LD, Newtown, Großbritannien) und anschließend unter flüssigen Stickstoff zu einem feinen Pulver homogenisiert (MIC-CRA D-1 Homogenisator, Müllheim, Deutschland). Da das von einzelnen Tieren gewonnene Material für die Untersuchungen nicht ausreichend war, wurde lyophilisiertes Gewebe von jeweils zwei Tieren aus demselben Becken zu jedem Zeitpunkt gepoolt.

Zu 980 µl Plasma bzw. 100 mg lyophilisiertes Gewebe, welches in 980 µl einer 0,9 %-igen NaCl-Lösung, die 1 % Albumin (Rinderalbumin, Albumin Fraktion V, proteasefrei. ≥98 % Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Germany) enthielt suspendiert wurde, wurden 20 µl einer methanolischen Rhamnetinlösung (50 µg /ml; Rhamnetin: Carl Roth GmbH & Co KG; Methanol: J.T. Baker, Deventer, Niederlande) als interner Standard zugegeben. Anschließend wurde eine genau definierte Menge (Plasma: 55µl; Leber: 35µl; Muskel: 60µl) Essig-

säure (0,583 mol/l) zu jedem Ansatz zugegeben, um den optimal pH-Wert für die Wirkung der β -Glucuronidase/Sulfatase (4,5-6) einzustellen. Den angesäuerten Proben wurden dann jeweils 75 μ l einer Enzymmischung (β -Glucuronidase/Sulfatase, Type H-1, Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) zugesetzt und die Ansätze gut gemischt (Vortex Genius 3; IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland). Anschließend wurden die Ansätze in einem Schüttelwasserbad für 60 min bei 37 °C inkubiert, um die konjugierten Formen der Flavonole in den Proben möglichst vollständig zu spalten. Um den Anteil an konjugierten bzw. nichtkonjugierten Flavonolen im Plasma zu erfassen, wurden die Plasmaproben von 2 Forellen pro Zeitpunkt mit der höchsten Dosierung (50 mg Quercetinäquivalenten/Kg KGW) je einmal mit und ohne enzymatische Behandlung analysiert. Da bei den Karpfen nach enzymatischer Behandlung der Proben weder Quercetin noch dessen Metabolite mit intakter Flavonolstruktur nachweisbar waren, wurde bei dieser Spezies auf eine Analyse ohne enzymatische Behandlung verzichtet.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 3ml Aceton (Rotisolv® HPLC, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Germany) den Proben zugesetzt und diese 20 min auf einem Horizontalschüttler geschüttelt um die Flavonole zu extrahieren. Im weiteren Verlauf wurden die Proben 45 min bei 4000 U/min und 4°C zentrifugiert (Zentrifuge 5810 R; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und der Überstand unter Vakuum bei 45°C bis zur vollständigen Trockene eingedampft (Speed-Vac AES 1010, Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, USA). Die so erhaltenen Rückstände wurden in 200 μ l Methanol aufgenommen, gründlich gemischt und 15 Minuten im Ultraschallbad vollständig gelöst. Danach wurden 77,5 μ l aqua bidest und 22,5 μ l Salzsäure (10 mol/l) dazugegeben und anschließend mit einer Tischzentrifuge (Zentrifuge MiniSpin®, mit Rotor F-45-12-11, Eppendorf, Hamburg, Germany) 10 min bei 14.500 rpm zentrifugiert und 30 μ l des Überstandes für HPLC-Analysen verwendet.

Bestimmung der Flavonole mittels HPLC

Die Identifikation und Messung der Konzentration der in den Diäten und Blut- und Gewebeproben enthaltenen Flavonole erfolgte mittels einer modifizierten Methode von Hollman (Hollman et al 1996, Beyer et al. 2015) mit Nachsäulenderivatisierung, bei welcher die Flavonole mit dreiwertigen Aluminiumionen (Al^{+3}) fluoreszierende Komplexe bilden. Mit Hilfe eines gekühlten Autosamplers (950-AS; Jasco GmbH; Gross-Umstadt, Germany, 4°C) wurden 30 μ l der aufgearbeiteten Proben injiziert. Die stationäre Phase bestand aus einer sog. „Reversed-Phase“ C-18 Kromasil 100 Trennsäule (250 \times 4 mm, Partikelgröße: 5 μ m, Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland), welche mit einer Vorsäule (C-18 Inertsil ODS-2, 10 \times

4mm, Partikelgröße: 5 µm, Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland) geschützt wurde. Zur Erhöhung der Effizienz der Trennung sowie zur Verringerung der Viskosität des Lösungsmittels im Lauf der Messung wurden die Trennsäulen zusammen mit dem Reaktor in einem Säulenofen (Jetstream II Plus) bei konstanter Temperatur von 30° C verbracht.

Die mobile Phase bestand aus einer Mischung von Phosphatpuffer (25mmol/l Natriumdihydrogenphosphat, pH=2,4; Merck KGaA), Acetonitril (Chromasolv[®], Sigma Aldrich Chemie GmbH) und Methanol (J.T.Baker[®], Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland) im Verhältnis von 68:27:5 (v/v/v) mit einer pH-Wert von 2,9 und wurde mit einer konstanten Flussrate von 1ml/min verwendet (Jasco PU-1580, Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland). Als Derivatisierungsreagenz wurde Aluminiumnitrat, gelöst in 7,2%iger Essigsäure (Fluka, Taufkirchen, Deutschland), als methanolische Lösung (1mol/l Aluminiumnitrat) verwendet, welche mit einer Flußrate von 0,4 ml/l über ein T-Mischstück der mobilen Phase nach der Trennsäule beigemischt wurde. Die Komplexierung der Flavonole mit Al³⁺ fand in einem 3m langen Kapillarreaktor (geflochtener Teflonschlauch, Innendurchmesser 0,5 mm) statt. Die Detektion der Komplexe erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 422 nm und einer Emissionswellenlänge von 485 nm flureszenzphotometrisch (Fluoreszenzdetektor 920-FP, Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland). Die Flavonole wurden anhand der Retentionszeiten einer analog zu den Proben hergestellten Standardlösung, die sämtliche relevanten Flavonole (Quercetin, Kämpereol, Isorhamnetin, Tamarixetin) enthielt, identifiziert. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe der Software Borwin Chromatography (Jasco-Borwin, version 1.50).

Kalibrierung und Quantifizierung

Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe von Standardlösungen, die alle untersuchten Flavonole (Quercetin, Isorhamnetin, Kaempferol und Tamarixetin) in Konzentrationen von 1,22 bis 312,50 ng/ml enthielten und identisch wie die Proben behandelt wurden, wurden Eichgeraden zur Quantifizierung von Quercetin, Isorhamnetin, Tamarixetin und Kämpferol (Rotichrom[®] HPLC; Carl Roth GmbH & Co KG) in den Proben erstellt (Abb. 12). Zur Erstellung der Eichgeraden wurden zuerst 20 µl von Standardstammlösungen sowie 20 µl einer methanolischen Rhamnetinlösung (Rhamnetin:50 µg/ml; Carl Roth GmbH & Co KG; Methanol:J.T. Baker, Deventer, Niederlande interner Standard) zu 960 µl Leerplasma bzw. 100 mg flavonolfreiem Leber- oder Muskelgewebe in physiologischer Kochsalzlösung gelöstem Bovinen Serum-Albumin (1% BSA in 0,9%NaCl, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) gegeben. Die weiteren Aufbereitungsschritte sind identisch mit jenen bei der

Extraktion von Flavonolen aus Plasma und Geweben und wurden bereits in dem vorhergehenden Abschnitt detailliert beschrieben. Die Quantifizierung von Quercetin und Isorhamnetin in den Proben erfolgte anhand der relativen Peakflächen (Q/R bzw. I/R). Aufgrund der höheren Stabilität von Kaempferol und Tamarixetin im Vergleich zum internen Standard (Rhamnetin) erfolgte hier die Quantifizierung anhand der absoluten Peakflächen.

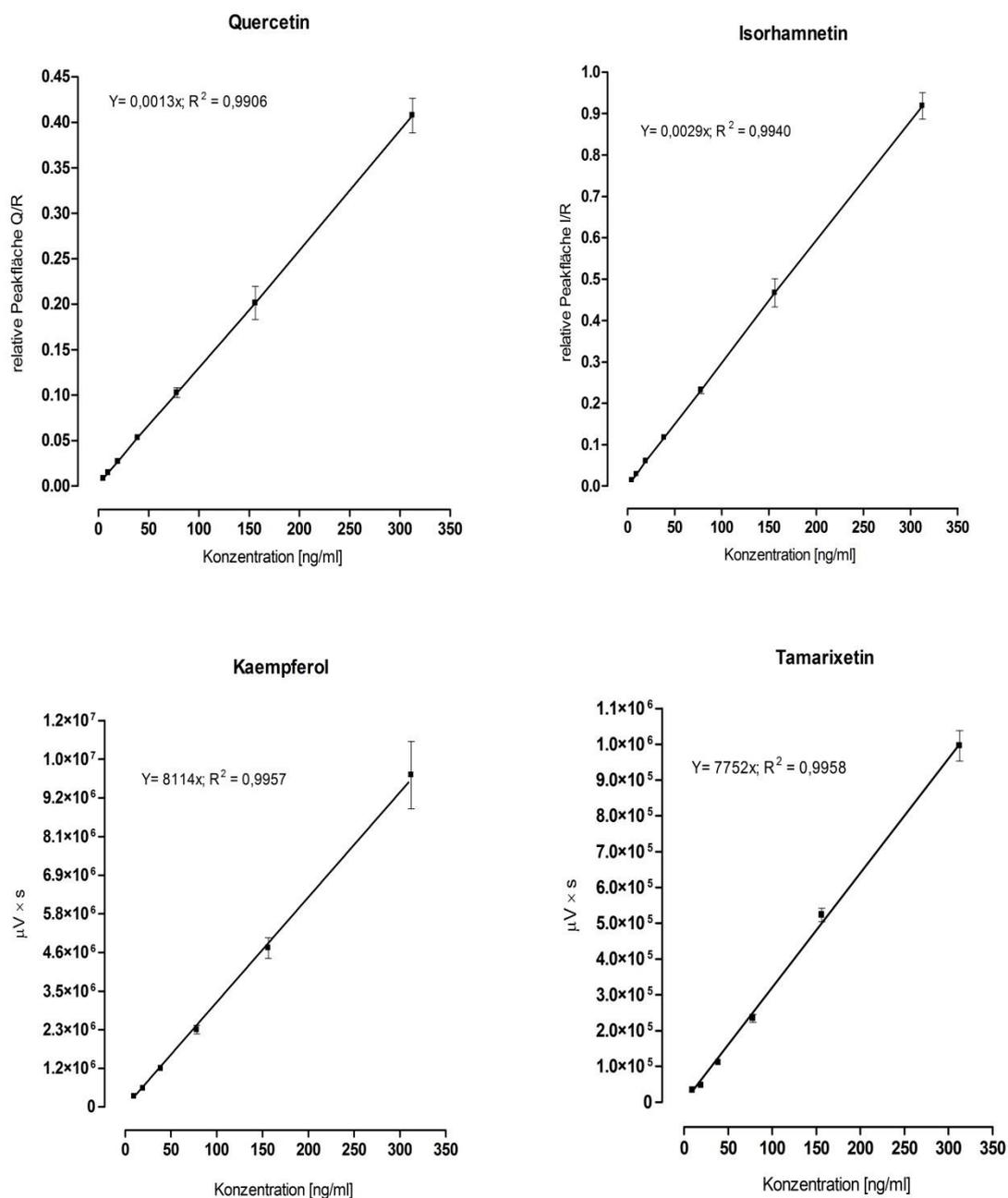


Abb. 12: Eichgeraden zur quantitativen Bestimmung von Quercetin (Q), Kaempferol (K), Isorhamnetin (I) und Tamarixetin (T) im Plasma von Forellen. R = Rhamnetin; Mittelwerte \pm SEM, $n = 3$; R^2 = Bestimmtheitsmaß

3.7.2 Korrektur der Residualblutvolumen gefriergetrockneter Fischgewebe

Im Körper besitzen verschiedene Organe unterschiedliche Kapillarisation und Durchblutung. Somit ist nach der Blutentnahme ein Restblutanteil in den Gewebeproben zu erwarten. Das Blutvolumen bei Knochenfischen entspricht in der Regel 5 Prozent (3-7 %) des Körpergewichtes (Roberts, 2012). Den dominierenden Anteil der festen Blutbestandteile machen Erythrozyten aus ($0.8-3.5$ Millionen μL^{-1}) (Olsen 2011). Die Erythrozyten der meisten Fischarten besitzen einen Zellkern und ihr Hauptbestandteil ist das Protein Hämoglobin. Der Fisch ist in der Lage, die Anzahl der Erythrozyten im Blut zu kontrollieren. Zum Beispiel wird im Fall von Sauerstoffmangel, sofern das Herzzeitvolumen unverändert bleibt, der Sauerstofftransport im Organismus über einen Anstieg der Erythrozytenanzahl erleichtert (Souza und Bonilla-Rodriguez, 2007).

Um die tatsächliche Flavonolkonzentration in den Gewebeproben zu bestimmen, musste diese Konzentration an das Residualblut in den entnommenen Organen korrigiert werden. Hierzu wurde ein Teil der Gewebeproben lyophilisiert und deren Hämoglobingehalt mit dem Hämoglobingehalt des lyophilisierten Vollbluts verglichen.

Zur Bestimmung des Restblutes wurde eine spektrophotometrische Methode nach de Boer et al. (2005) verwendet. Zuerst wurden 10 ml Tris (hydroxymethyl)-aminomethanol-HCL ($0,2$ mol/l, pH 7,4; mit 50 mmol/l EDTA; merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) zu $0,1$ g lyophilisiertem Gewebe bzw. Vollblut hinzugefügt und homogenisiert (Doppelbestimmungen). Anschließend wurden die Proben 10 min lang bei 14000 U/min und 10°C zentrifugiert (Zentrifuge 5810 R; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), sowie 500 μl des Überstandes im Verhältnis 1:1 mit Tris-Hcl vermischt und das Peakmaximum des Hämoglobins bei einer Wellenlänge von 540 nm photometrisch gemessen (UV-1602, Shimadzu Deutschland GmbH, Deutschland). Anhand der ermittelten Peakmaxima des Hämoglobins in Gewebe und Vollblut (Hbtissue/Hbbl) wurde für jede einzelne Probe die sog. Restidualblutfraktion (fbl) berechnet. Schließlich wurde die korrigierte Flavonolkonzentration (C_{corr}) durch Subtraktion der Restblutfraktion (fbl) und Gesamtplasmakonzentration (C_{pl}) von der totalen Gewebekonzentration (C_{tot}) berechnet.

$$(C_{\text{corr}} = C_{\text{tot}} - f_{\text{bl}} \times C_{\text{pl}})$$

3.7.3 Bestimmung von α -Tocopherol im Fischplasma

Die α -Tocopherol Konzentration wurde im Plasma mittels HPLC nach einer modifizierten Methode von Podda et al. (1996) bestimmt.

Zur Probenvorbereitung wurden 10 μ l Forellenplasma bzw. 50 μ l Karpfenplasma in einem Zentrifugenröhrchen (Polypropylen, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit 2 ml einer 1%igen ethanolischen Ascorbinsäurelösung (w/v, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) versetzt (Proteinfällung). Als nächstes wurden 800 μ l Bidest und, um die Stabilität der Proben zu erhöhen, 50 μ l einer 1%-igen ethanolischen BHT-Lösung (w/v, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) als Antioxidationsmittel zu den Proben gegeben. Danach wurden die Ansätze zur Extraktion des α -Tocopherols mit 2 ml Hexan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) versetzt und für 2 min ausgeschüttelt (Reagenzglas-Rotator GFL 3025, GFL mbH, Burgwedel, Deutschland) und 10 min bei 4000 U/min und 4 °C (5810 R, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde 1 ml der Hexanphase unter Vakuum bei Raumtemperatur bis zur Trockene eingedampft (Savant Speed Vac[®] System AES 1010, Global Medical Instrumentation, Minnesota, USA) und der Rückstand in 250 μ l eines Methanol/aqua. bidest-Gemisches (98:2, v/v) für die HPLC-Analytik verwendet.

Über einen Autosampler (AS-2057 Plus; Jasco GmbH; Gross-Umstadt, Germany, 4°C) wurden 40 μ l der aufgearbeiteten Proben auf eine reversed-phase Trennsäule (SUPELCO-SIL[™] LC-18, 15cm \times 4,6 mm, 3 μ m Partikelgröße, Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland) injiziert. Als mobile Phase wurde eine Lösung aus einem Methanol/aqua. Bidest-Gemisch (98:2, v/v) mit einer Flussrate von 1 ml/min verwendet. Die Säule wurde in einem 25°C warmen Säulenofen untergebracht. Die α -Tocopherol-Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 296 nm und einer Emissionswellenlänge von 325 nm in einem Fluoreszenzdetektor (Fluoreszenzdetektor FP.2020 Plus, Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland).

Die Kalibrierung erfolgte mit Hilfe einer Standardreihe, die durch Vorlage von definierten Mengen von in Ethanol (Ethanol ROTISOLV[®], Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Germany) gelöstem DL- α -Tocopherol (All-rac- α -Tocopherol, No 613424 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) durch Verdünnung mit 0,005%-iger methanolischer BHT-Lösung (w/v) erstellt wurden. Die weiteren Aufbereitungsschritte (Extraktion mit Hexan) waren identisch wie bei der Extraktion von α -Tocopherol aus den Plasmaproben (s. o.). Die Auswertung erfolgte anhand der relativen Peakflächen.

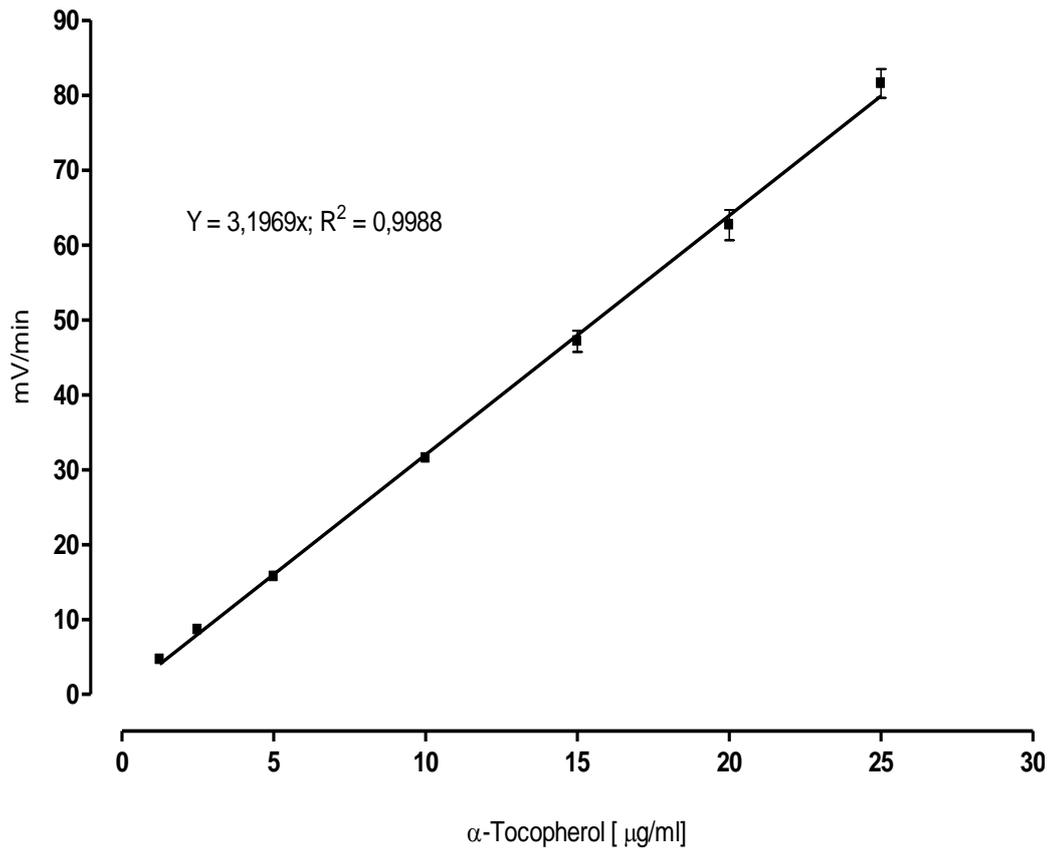


Abb. 13: Eichgeraden zur quantitativen Bestimmung von α -Tocopherol im Plasma; Mittelwerte \pm SEM, $n = 3$; $R^2 =$ Bestimmtheitsmaß.

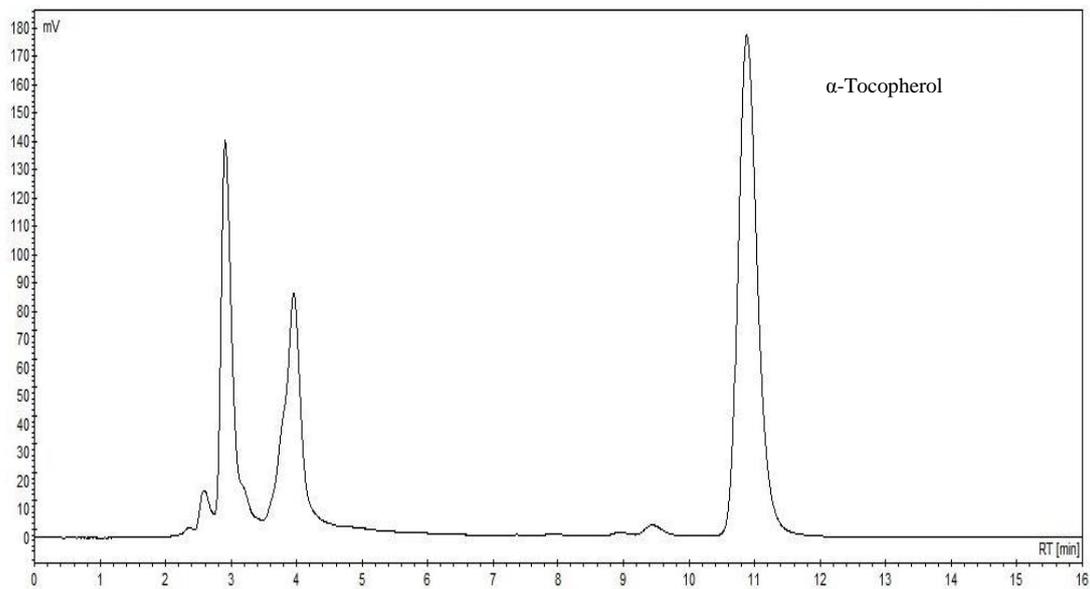


Abb. 14: Beispiel eines Chromatogramms eines methanolischen α -Tocopherol-Standards (20 $\mu\text{g/ml}$), RT = Retention time

3.7.4 Bestimmung von Malondialdehyd im Plasma

Die Bestimmung von Malondialdehyd (MDA) im Plasma erfolgte mittels einer HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion. Dafür wurde ein HPLC-Komplettkit der Firma RECIPE[®] verwendet (ClinRep[®], Chemicals and Instruments GmbH, München, Deutschland). Dieses Testverfahren basierte auf drei Schritten: Derivatisierung, Neutralisation / Fällung und HPLC-Analyse. Für diese Bestimmungsverfahren wurden 100 µl Plasma verwendet.

Die MDA Quantifizierung im Plasma erfolgte über einen Plasma-Kalibrator entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Die Auswertungen erfolgten mit der Externen Standard-Methode anhand der Peak-Flächen (Nachweisgrenze: 0,02 µmol/l; Linearität: 0,04-20 µmol/l).

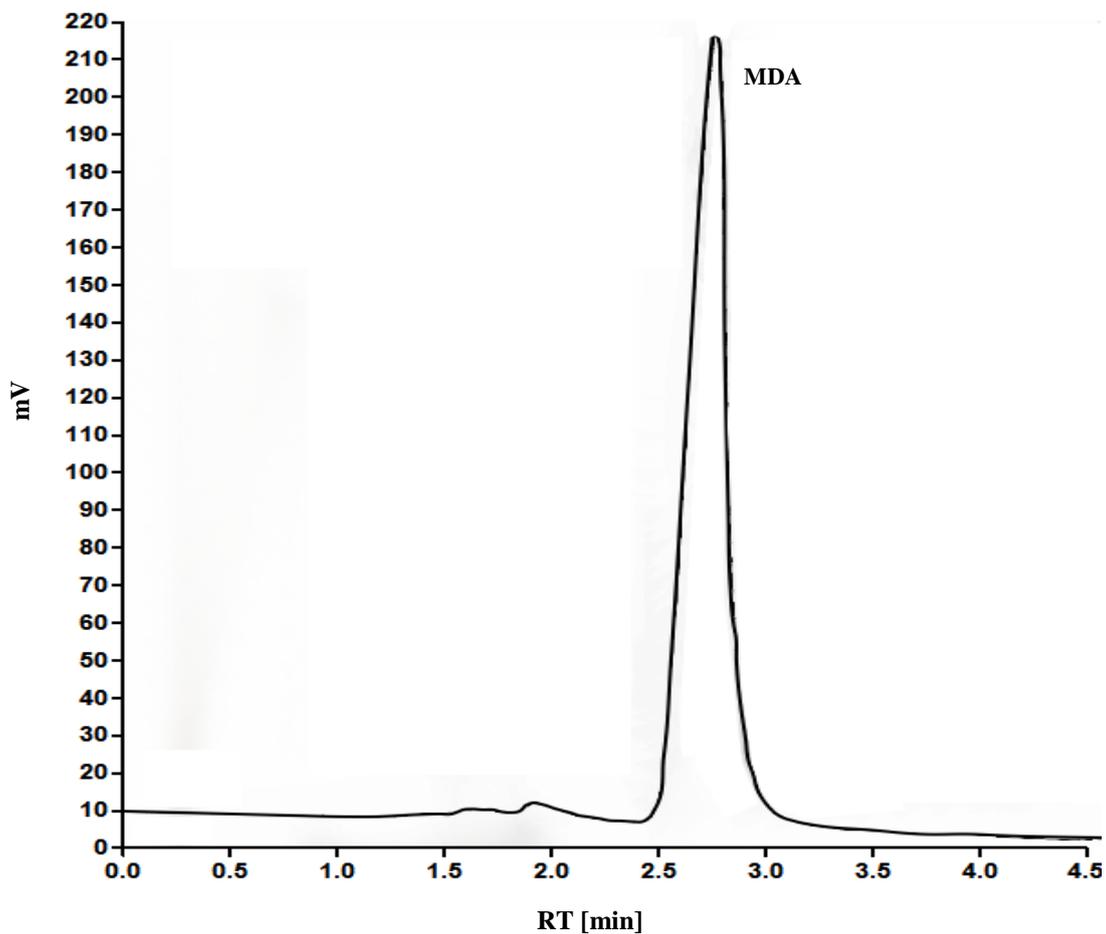


Abb. 15: Beispielchromatogramm eines aufgearbeiteten Forellenplasmas nach oraler Aufnahme von 50mg Quercetin/ Kg KGW über einen Zeitraum von 4 Wochen; MDA = Malondialdehyd; RT = Retention time

3.7.5 Aktivität ausgewählter antioxidativer Schutzenzyme

Superoxid-Dismutase (SOD)

Die Aktivität der Cu/Zn SOD in den Geweben wurde mit einem kommerziellen Kit der Firma Sigma-Aldrich (19160 SODAssay Kit-WST, Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Dabei werden die Superoxidanionen zunächst durch ein Xanthin/Xanthinoxidase(XOD)-System erzeugt. Die so entstehenden Superoxidanionen überführen das Tetrazoliumsalz (WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-Tetrazolium, Mononatriumsalz) in Formazan-Farbstoff, dessen Konzentration bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch (UV-1602, Shimadzu Deutschland GmbH, Deutschland) quantifiziert wird. In Abhängigkeit der SOD-Aktivität in den Proben kommt es dann zu einer Hemmung der Farbstoffbildung (Abb. 16). Die SOD-Aktivität wird in Units angegeben, wobei 1 U einer 50 %-Hemmung der maximalen Farbstoffbildung entspricht. Die Werte wurden anschließend auf mg Protein bezogen. Die quantitative Proteinbestimmung der Proben erfolgte mittels der Bicinchonininsäure-Methode (Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay, Rockford, IL USA).

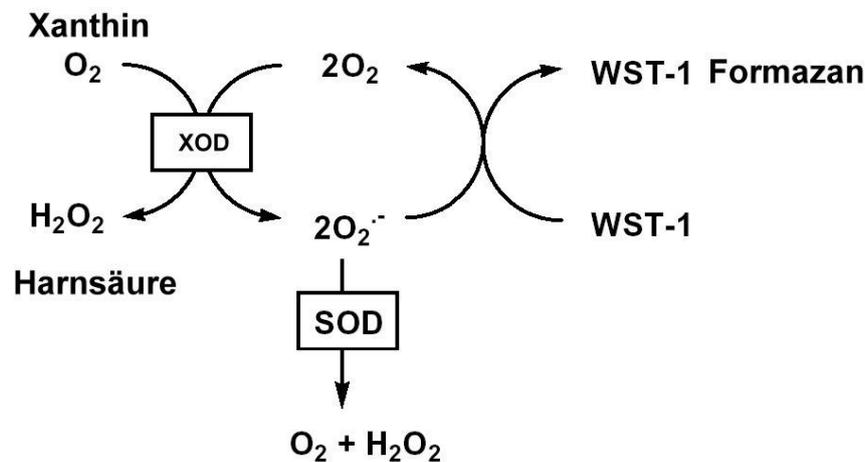


Abb. 16: Xanthinoxidase (XOD) und SOD-Antagonismus in der Generation von Formazan-Farbstoff; WST-1: water soluble tetrazolium (Tetrazoliumsalz).

Katalase (CAT)

Zur Bestimmung der Katalaseaktivität in den Geweben wurde ein kommerzielles Kit der Firma Sigma-Aldrich verwendet (CAT100, Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland). Diese Test-Methode basiert auf der Messung des Wasserstoffperoxidverbrauchs nach katalytischer Wirkung der Katalase. Zur Probenvorbereitung wurden 20 mg der Probe in 1ml 0,9% NaCl aufgenommen und mit einem Homogenisator (MICCRA D-1 Homogenisator, Müllheim, Deutschland) suspendiert. Die weiteren Aufbereitungsschritte wurden gemäß der Testanleitung des Herstellers durchgeführt. Die Quantifizierung der Katalaseaktivität in den Proben erfolgte über eine Kalibrierungskurve entsprechend dem Protokoll des Herstellers (Abb. 17). Die Werte wurden wie bei der SOD-Bestimmung auf mg Protein bezogen.

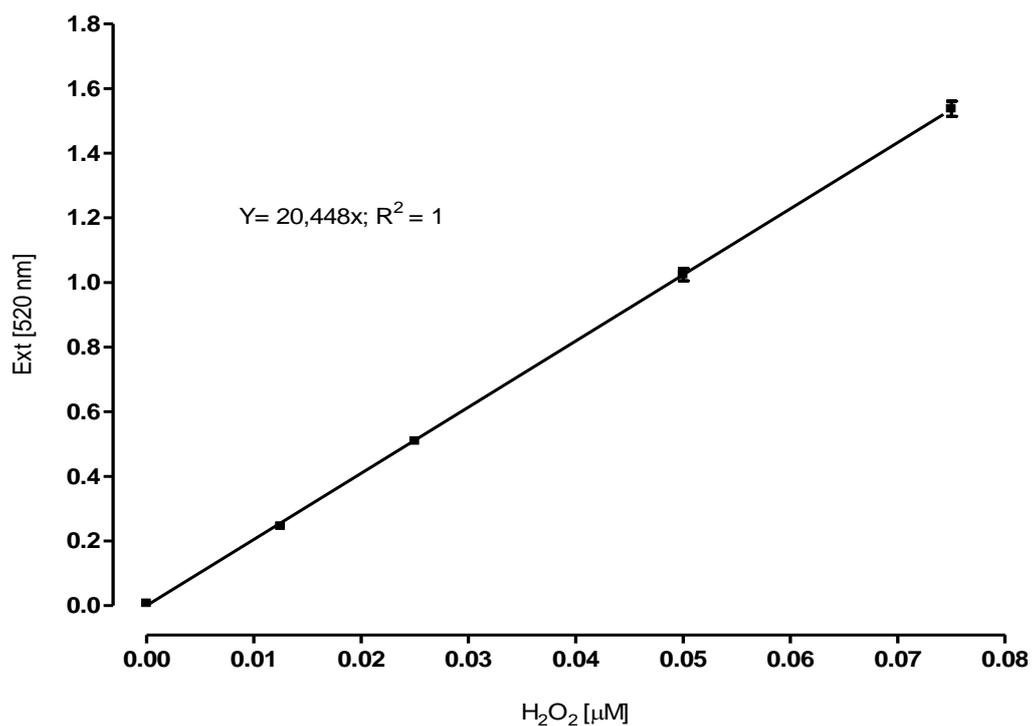


Abb. 17: Repräsentative Kalibrierungskurve von gereinigter Katalase; R^2 = Bestimmtheitsmaß

3.7.6 Ganzkörperanalyse

Zur Bestimmung der chemischen Körperzusammensetzung wurden die Fische zunächst über 168 h lyophilisiert und anschließend jeweils zwei Tiere aus demselben Becken zu jedem Zeitpunkt gepoolt und mittels einer elektrischen Mühle (Retsch ZM100 Ultra-Zentrifugalmühle; Siebgröße 0,1 mm; Haan, Deutschland) fein gemahlen und homogenisiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der TS nach Erhitzen der Proben im Trockenschrank (Memmert 100-800, Schwabach, Deutschland) bei 103 °C bis zur Gewichtskonstanz (12h). Durch vollständige Verbrennung der Probe bei 550 °C über 15 h in einem Hochtemperaturofen (Thermo Scientific Heraeus® K1253, Thermo Fisher Scientific Inc, USA), wurde der Rohaschegehalt ermittelt. Die Rohproteinbestimmung erfolgte nach der quantitativen Stickstoffbestimmung bzw. Kjeldahl-Methode ($N \times 6,25$). Die drei Hauptschritte, Aufschluss, Destillation und Titration, wurden mit Apparaten der Firma Büchi (Digestion Unit K-435, Destillation Unit B-324, BÜCHI Labortechnik GmbH, Flawil, Schweiz) durchgeführt. Die Bestimmung von Rohfett erfolgte nach Extraktion mit Petroläther (Petroleumbenzin 40-60°C reinst Ph. Eur, Walter-CMP GmbH & Co. KG, Kiel, Deutschland) in einem Soxhlet-Apparat, in Anlehnung an die Methode von VDLUFA (Methodenbuch. Band III.), ohne Salzsäure-Behandlung. Bruttoenergiegehalte wurden mittels eines Bombenkalorimeters (IKA® Kalorimeter C 200, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) bestimmt.

3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA= Analysis of Variance) nach einem Repeated Measurement-Modell mit Hilfe des Programms SAS (SAS Institute, Inc., Version 9,2). Dabei wurden die Quercetin-Supplementierung und die Zeitpunkte sowie die Interaktion zwischen den Beprobungszeitpunkte und Diäten als fixe Effekte festgelegt.

$$Y_{ij} = \mu + B_i + \tau_j + (B \times \tau)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij}	= Beobachtungswert
μ	= Gesamtmittelwert
B_i	= fixer Effekt der Futtergruppe, i = Quercetinkonzentration, 0, 10, 30 und 50 mg/kg KGW
τ_j	= fixer Effekt der Zeit, j = Tag 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28
$(B \times \tau)_{ij}$	= Interaktion Futter i & Zeit j
ε_{ij}	= Reststreuung

Als Post-hoc-Test wurde der Tukey-Test verwendet und das Signifikanzniveau wurde immer bei $p \leq 0,05$ festgelegt. Wenn nicht anders beschrieben sind die Ergebnisse in Form von Mittelwerten \pm SEM (Standardfehler) dargestellt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels des Programms GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA).

4. Ergebnisse

4.1 Versuch (I)

4.1.1 Gewebeverteilung von Quercetin nach Aufnahme von Quercetin-haltigem Futter bei wachsenden Forellen

Plasmakonzentration der Gesamtflavonole

In dieser Studie wurden nach enzymatischer Spaltung der Konjugate Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin im Plasma und Geweben nachgewiesen; Tamarixetin war dagegen nicht nachweisbar bzw. die Konzentrationen lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Bezüglich der Retention von Quercetin und seinen Metaboliten mit intakter Flavonolstruktur (Kämpferol, Isorhamnetin) (Werte nicht gezeigt) sowie der Konzentration an Gesamtflavonolen konnte eine dosisabhängige Retention im Blut festgestellt werden (Abb. 18). Aus der Tatsache, dass vor Fütterung der Quercetin-haltigen Diäten keine nachweisbaren Konzentrationen von Quercetin oder dessen Metaboliten im Blut auftraten, kann geschlossen werden, dass die zu späteren Zeitpunkten gemessenen Konzentrationen von Flavonolen zum Einen auf der Aufnahme des Quercetin-haltigen Futters beruhen, zum Anderen, dass es sich bei Isorhamnetin und Kämpferol um Metabolite von Quercetin handelt. Obwohl über den vierwöchigen Verlauf des Versuchs ein vorübergehender Anstieg der Blutkonzentration von Gesamtflavonolen auftrat, lag am Ende des Versuchs gegenüber der Ausgangssituation (Tag 1) keine deutliche Akkumulation von Gesamtflavonolen im Blut von Forellen vor (Abb. 18).

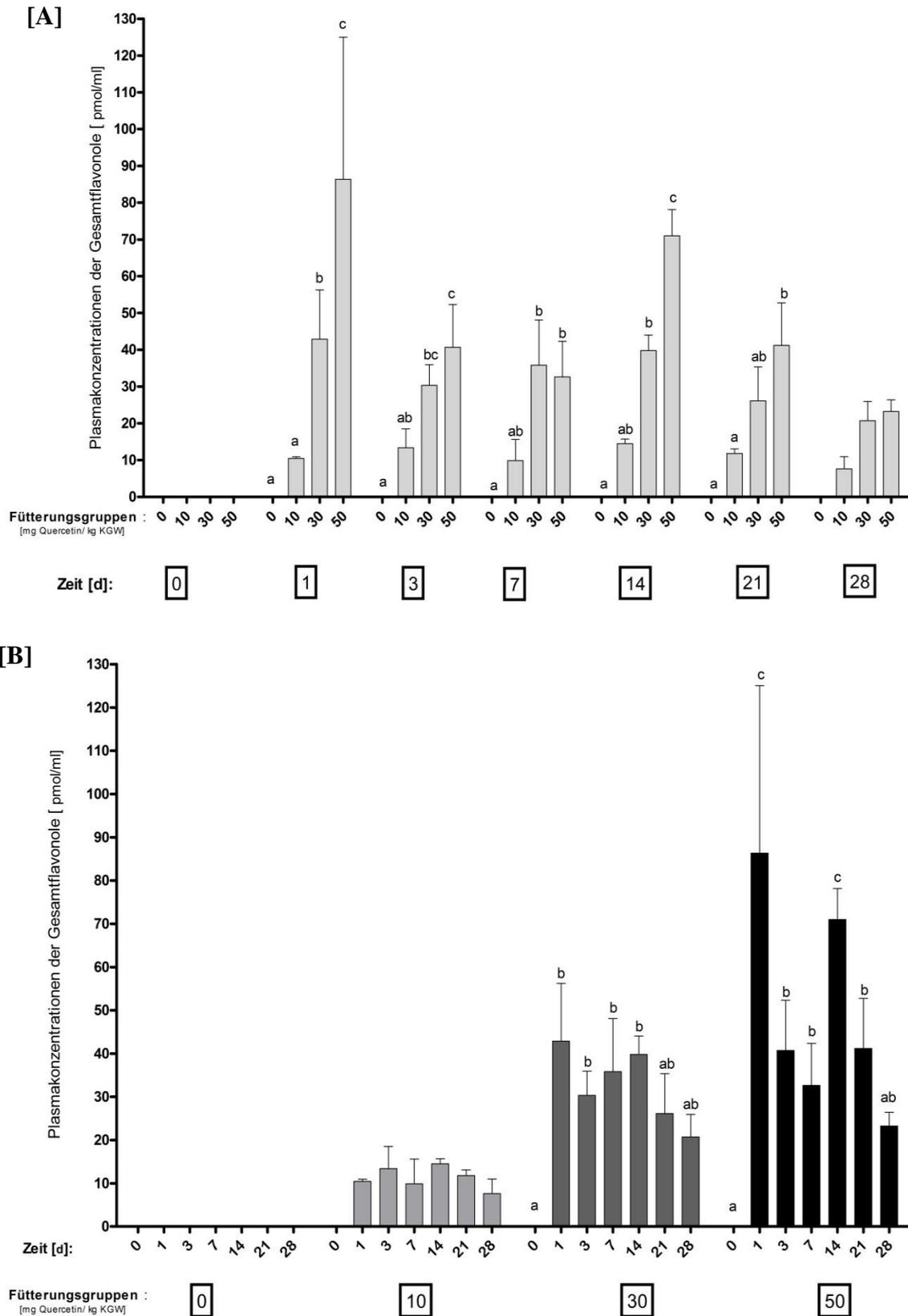


Abb. 18: Konzentrationsabhängigkeit pro Versuchstag [A] und Zeitabhängigkeit pro Dosis [B] der Gesamtflavonolkonzentrationen im Plasma von Forellen nach oraler Applikation von Quercetin; Mittelwerte \pm SEM, n = 4 (gepoolte Plasmaproben von jeweils 2 Fischen/Becken); Mittelwerte ohne gemeinsamen Buchstaben zwischen Dosierung innerhalb eines Tages [A] bzw. den Tagen bei einer bestimmten Dosierung [B] unterscheiden sich signifikant ($P < 0,05$).

Metabolitenmuster der Flavonole und deren Anteile an der Gesamtflavonolkonzentration

In Abbildung 19 ist der prozentuale Anteil von Quercetin und seinen Metaboliten an der Gesamtflavonolkonzentration bei einer Dosierung von 50 mg/kg KGW für Plasma, Leber und Muskel dargestellt. Den Hauptanteil an Gesamtflavonol in allen untersuchten Geweben machte dabei das Quercetin mit 70 bis 95 % aus. Der Isorhamnetinanteil lag bei 3 bis 27 % und Kaempferol tauchte nur in sehr geringen Konzentrationen (1-3%) auf. Tamarixetin war in keinem der untersuchten Gewebe nachweisbar. Die bei den niedrigeren Dosierungen von Quercetin (10 bzw. 30 mg Quercetin/kg KGW) ermittelten Daten (nicht gezeigt) entsprechen im Wesentlichen den dargestellten Werten.

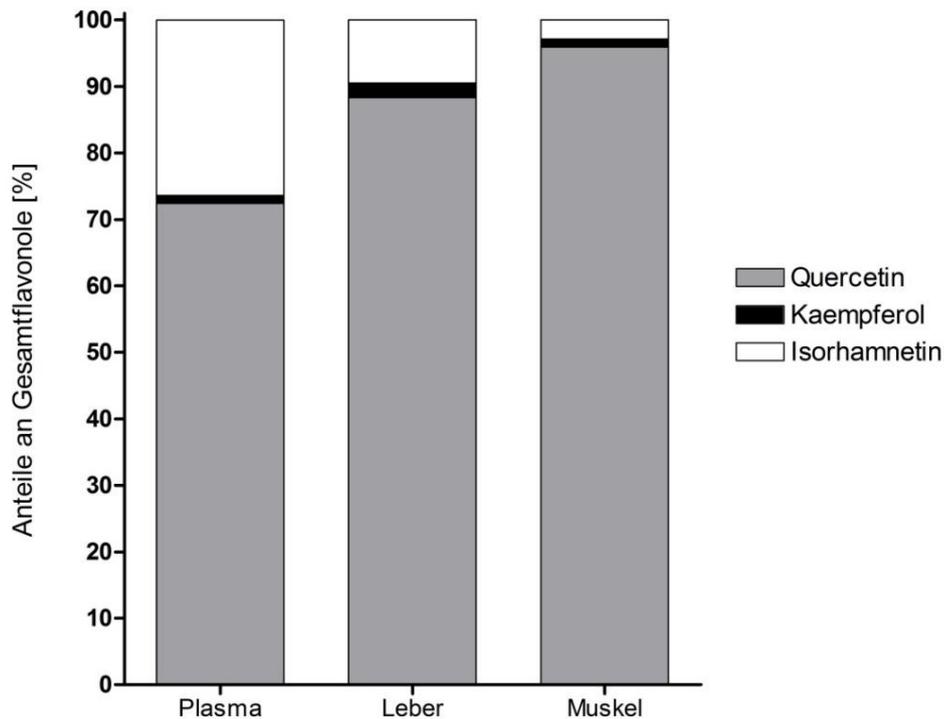


Abb. 19: Anteil der einzelnen Flavonole an der Gesamtflavonolkonzentration in Plasma, Leber und Muskel von Forellen nach oraler Applikation von 50 mg Quercetin/kg KGW über einen Zeitraum von 4 Wochen. Mittelwerte, n = 28 (da keine zeitabhängigen Unterschiede vorlagen, wurden die Werte als Mittelwert aller 6 Zeitpunkten und 4 Becken berechnet).

Konjugationsmuster der Flavonole im Plasma von Forellen

Der Anteil an konjugiertem bzw. nicht konjugiertem Quercetin bzw. dessen Metaboliten mit intakter Flavonolstruktur wurde nur bei den Fischen mit der höchsten Quercetindosierung (50 mg Quercetinäquivalenten/Kg KGW) bestimmt (Abb. 20). Der Anteil an nicht konjugierten Flavonolen lag bei der Forelle bei fast 50 %. Der freie Isorhamnetinanteil betrug 66.54 %. Die Konzentration an freiem Kaempferol lag unter der Nachweisgrenze. Für die

Gesamtflavonole ergab sich ein Wert von ca. 49 %, der im Plasma in freier, nicht konjugierter Form vorlag (Abb. 20).

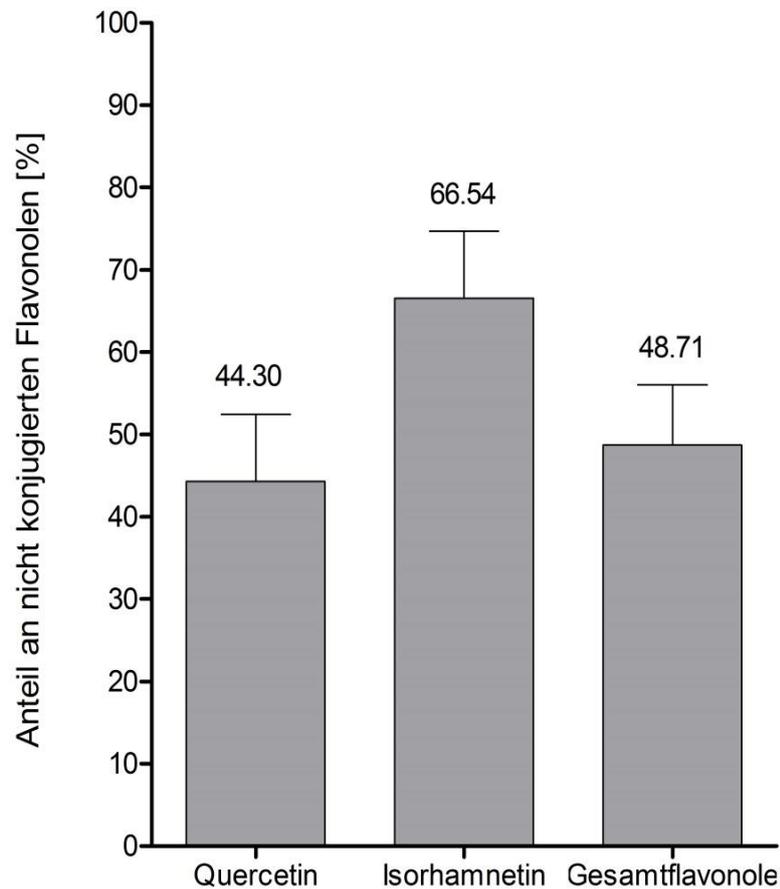


Abb. 20: Der nicht konjugiert vorliegende Anteil von Quercetin und sein methyliertes Derivat Isorhamnetin sowie die Gesamtflavonole im Plasma von Forellen nach oraler Aufnahme von 50 mg Quercetinäquivalenten/kg KGW, Mittelwerte \pm SEM, $n = 7$

Gesamtkonzentration der Flavonole in Muskel und Leber von Forellen

Wie im Plasma zeigten die Konzentrationen der Gesamtflavonole (Quercetin + Isorhamnetin + Kaempferol) zwar eine klare Dosisabhängigkeit, jedoch keine Akkumulation über die Versuchsdauer von 4 Wochen. Die Flavonolkonzentrationen in der Leber bzw. im Muskel von Forellen waren ca. 40 bis 50-Fach höher als im Plasma (Abb. 21 vergl. Abb. 18).

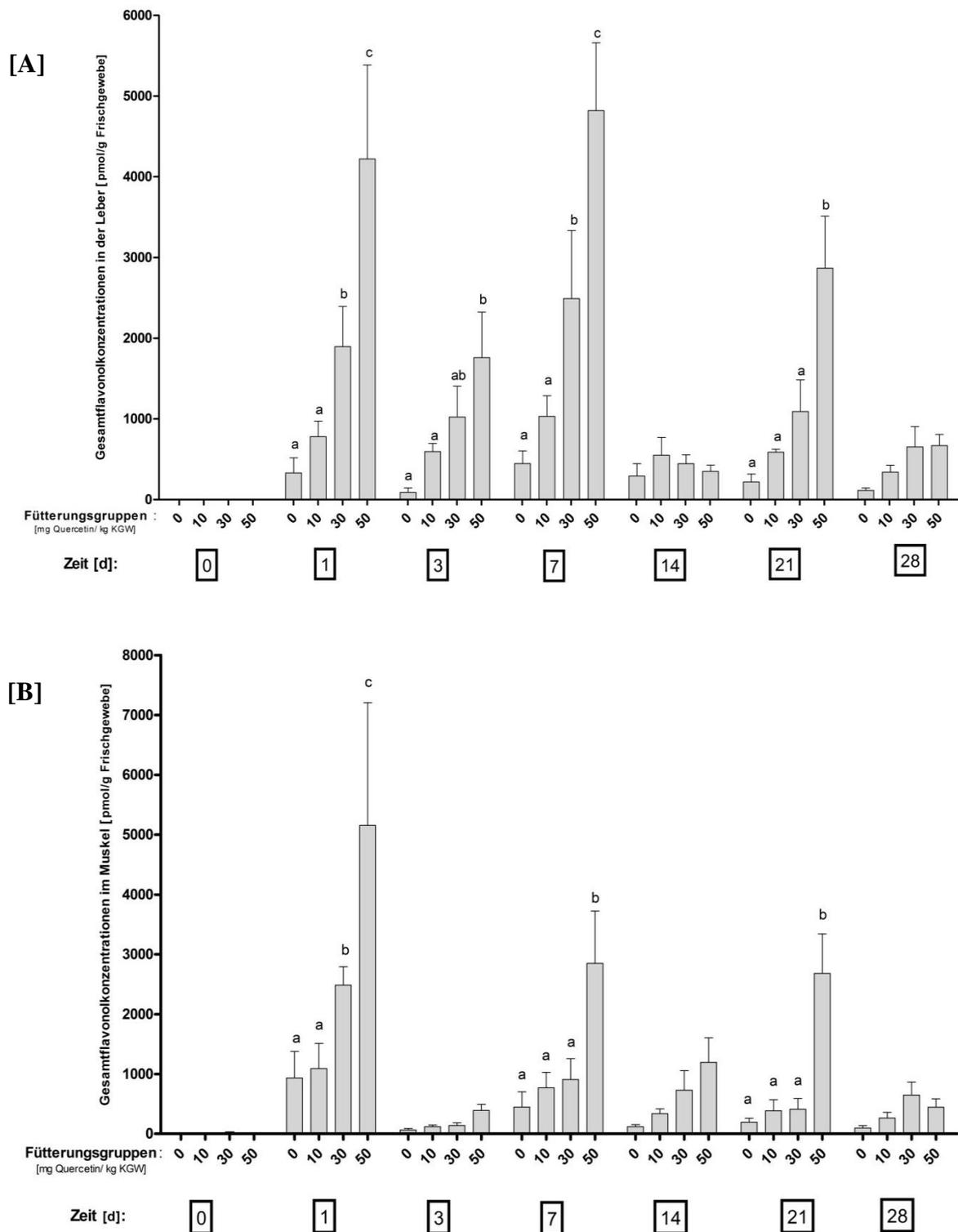


Abb. 21: Zeitverlauf und Konzentrationsabhängigkeit der Gesamtflavonolkonzentrationen in Leber [A] und Muskel [B] von Forellen nach oraler Applikation von Quercetin. Mittelwerte \pm SEM, $n = 4$ (gepoolte Plasmaproben von jeweils 2 Fischen/Becken); Mittelwerte ohne gemeinsamen Buchstaben zwischen Dosierung innerhalb eines Tages unterscheiden sich signifikant ($P < 0,05$).

4.1.2 Gewebeverteilung von Quercetin nach oraler Aufnahme von Quercetin-haltigem Futter bei wachsenden Karpfen

Plasmakonzentration der Gesamtflavonole bei Karpfen

Die Gesamtkonzentration der Flavonole im Plasma von Karpfen zeigte, dass im Blut zum Zeitpunkt der Entnahme nach ca. 16-stündigem Futterentzug weder Quercetin noch dessen Metaboliten mit intakter Flavonolstruktur (Isorhamnetin, Tamarixetin, Kämpferol) nachweisbar waren (sowohl mit als auch ohne enzymatische Behandlung der Proben). Zur Klärung der Frage, warum im Blut von Karpfen keine Flavonole nachweisbar waren, wurde bei 2 Reservetieren der Zeitverlauf der Flavonolkonzentrationen (Quercetin, Isorhamnetin, Tamarixetin und Kaempferol) bzw. der Gesamtflavonolkonzentration im Plasma nach Applikation von 70 mg Quercetin/kg KGW mit dem Futter erfasst (Abb: 22).

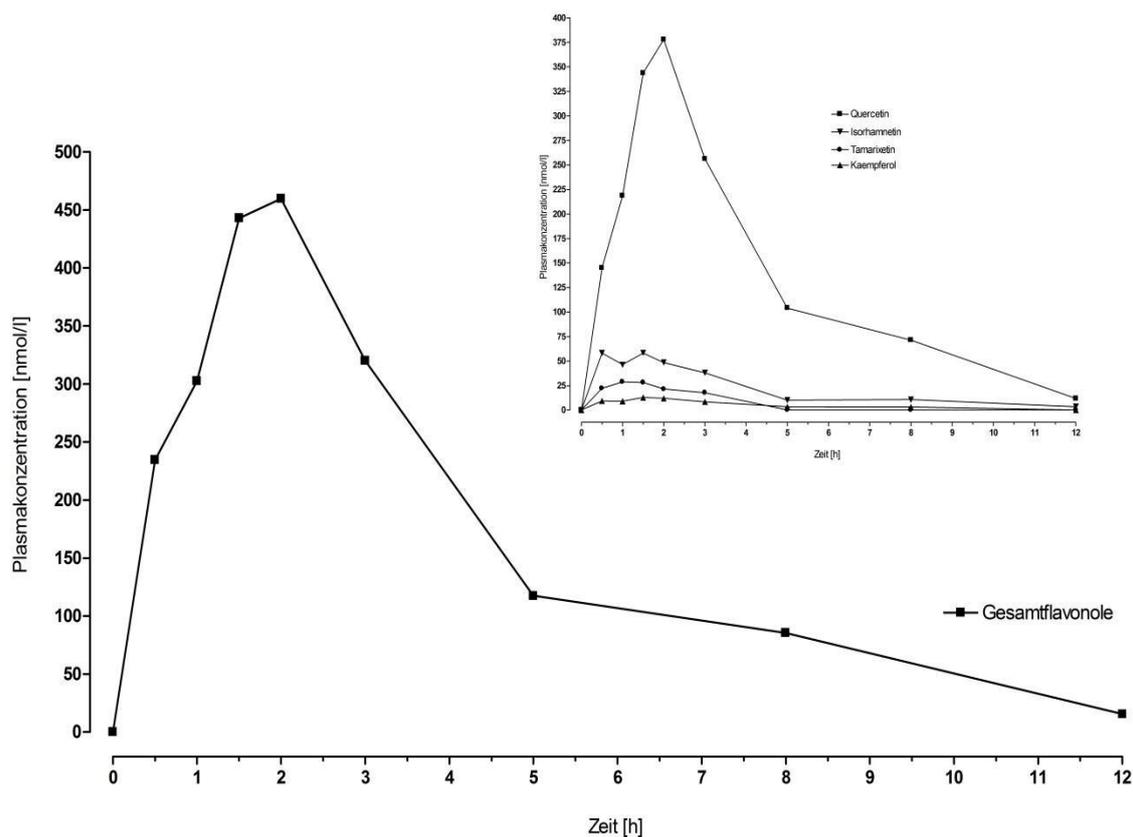


Abb. 22: Konzentrations-Zeitverlauf der Plasmakonzentration an Gesamtflavonolen beim Karpfen nach oraler Applikation von 70mg Quercetin/kg KGW (Inset: Verläufe von Quercetin, Isorhamnetin, Tamarixetin und Kaempferol); Mittelwerte von 2 Tieren pro Zeitpunkt.

Nach raschem Anstieg der Plasmakonzentration wurde das Peakmaximum sowohl der einzelnen Flavonole als auch der Gesamtflavonolkonzentration nach spätestens 2 Stunden erreicht und fiel danach rasch ab (Abb. 22). Bereits nach 12 h lag die Flavonolkonzentration im Bereich der Nachweisgrenze. Dieser Befund erklärt, dass bei Karpfen aufgrund der sehr schnellen Elimination 16 Stunden nach der letzten Fütterung keine nachweisbaren Konzentrationen von Flavonolen vorlagen.

Gesamtkonzentration der Flavonole in Muskel und Leber von Karpfen

Die Analyse der Flavonolkonzentrationen in Leber und Muskel von Karpfen mittels der unter Material und Methoden beschriebenen Extraktions- und Analysemethoden ergab bei keiner der verwendeten Konzentrationen von Quercetin im Futter bzw. bei keinem der untersuchten Zeitpunkte (Ausnahme Tag 1, Spuren von Quercetin in der Muskulatur nachweisbar) messbare Konzentrationen von Flavonolen in diesen Geweben. Um diese Phänomene zu klären, wurde in einer Versuchsreihe geprüft, ob in den lyophilisierten Muskel- bzw. Leberproben von Karpfen möglicherweise Substanzen enthalten sind, die zu einer starken Dämpfung des Signals in der HPLC-Analyse führen könnten.

Die in Tab. 5 gezeigten Werte belegen, dass der Zusatz von lyophilisierten Muskel bzw. Lebergewebe von Karpfen zu einer starken Dämpfung der Signale von Quercetin und insbesondere von Rhamnetin führte. Da für die Berechnung der Gewebekonzentrationen die relativen Peakflächen (F_Q/F_R) verwendet werden, führt dies zu einer massiven Verschiebung der Nachweisgrenze nach oben. Damit war der Nachweis niedriger Konzentrationen in den Geweben von Karpfen mit der vorliegenden Methode nicht mehr zuverlässig möglich.

Tab. 5: Einfluss des Zusatzes (70 bzw. 100 mg/ml) verschiedener Proteine bzw. lyophilisierter Gewebe auf ausgewählte Parameter der HPLC-Peaks von Standardsubstanzen.

Probe ¹	Peak	Flavonole				
		Quercetin	Kaempferol	Isorhamnetin	Tamarixetin	Rhamnetin*
Albumin ²	H	31751	116695	116340	25632	127155
	F	809189	4044548	1935642	537242	7346579
	Z	11,5	21,4	23,4	24,4	43,4
Kasein ²	H	37873	130148	128987	28592	137923
	F	994829	4545055	2170907	629655	8141754
	Z	11,5	21,3	23,4	24,3	43,3
Muskulatur Schwein	H	35542	101872	110090	35677	91622
	F	911732	3461636	1768432	525807	6015144
	Z	11,5	21,3	23,3	24,3	43,3
Muskulatur Forelle	H	29913	97918	103368	22840	63176
	F	788750	3466362	1771895	523958	3791356
	Z	11,5	21,4	23,4	24,4	43,4
Muskulatur Karpfen	H	1651	14695	10727	5446	2782
	F	34808	524705	183998	117355	161142
	Z	11,5	21,3	23,4	24,3	43,4
Leber Forelle	H	19686	83234	66950	19120	37803
	F	469971	2874788	1114773	397645	2230016
	Z	11,5	21,3	23,4	24,3	43,3
Leber Karpfen	H	1502	13784	6367	4812	3251
	F	31560	483373	120039	87942	82544
	Z	11,4	21,3	23,4	24,5	43,2

H= Peakhöhe [μv]; F= Peakfläche [$\mu\text{v}\cdot\text{sec}$]; Z= Zeit [min]; * interner Standard (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$);¹⁾ 100 mg/ml; ²⁾ 70 mg/ml

4.1.3 Parameter des oxidativen/antioxidativen Status

Malondialdehyd-Konzentration im Plasma

In Abbildung 23 sind die Zeitverläufe der Malondialdehyd-Konzentrationen in Plasma von Forellen und Karpfen nach oraler Applikation von Quercetin-haltigem Futter (4 Dosierungen) über einen Zeitraum von 4 Wochen dargestellt. Die gemessenen MDA-Konzentrationen im Plasma von Forellen bzw. Karpfen unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Fütterungsgruppen sowie den Beprobungstagen.

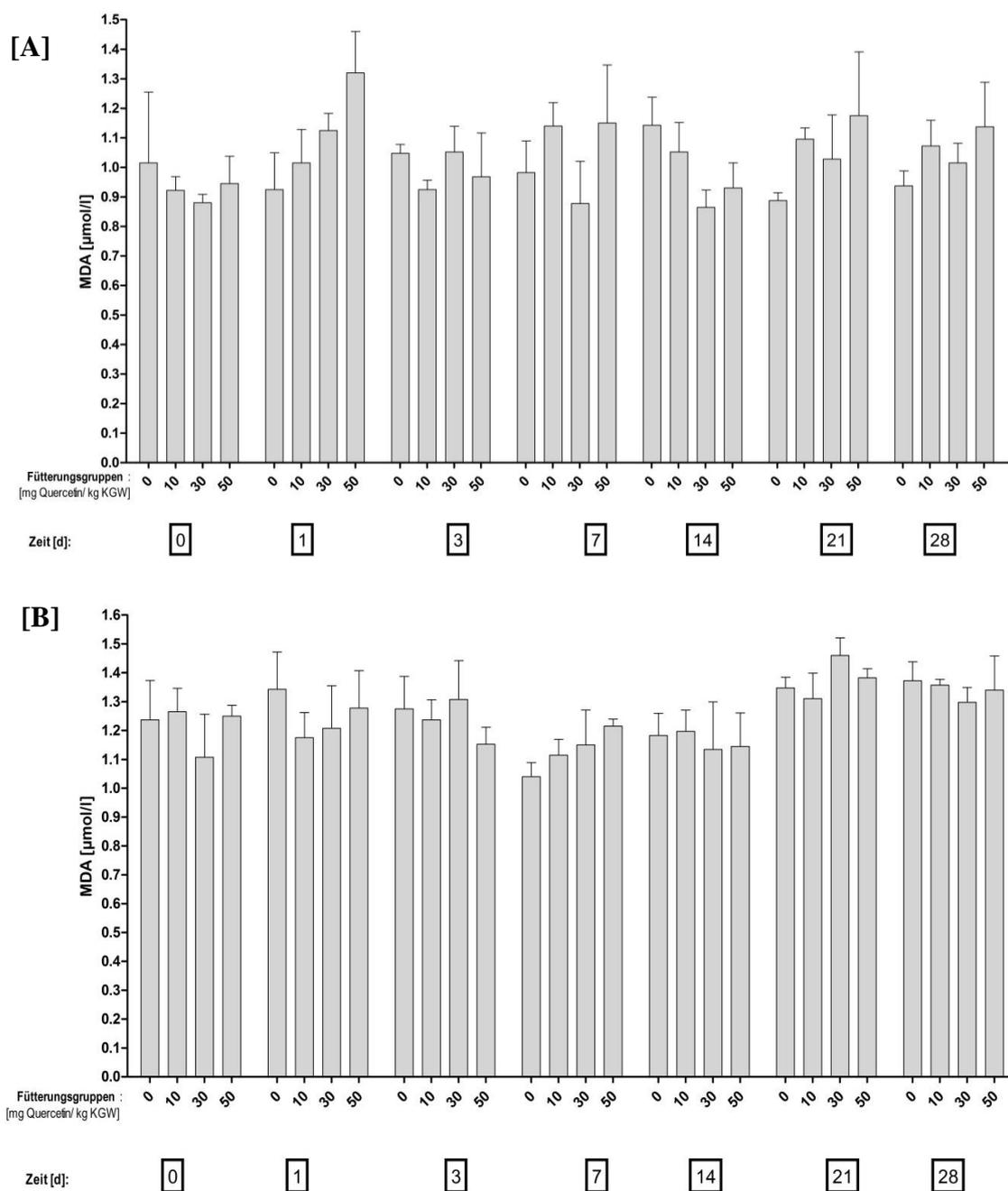


Abb. 23: Zeitverlauf und Konzentrationsabhängigkeit der Malondialdehyd (MDA)-Konzentrationen in Plasma von Forellen [A] und Karpfen [B]. Mittelwerte \pm SEM, n = 4 (gepoolte Plasmaproben von jeweils 2 Fischen/Becken).

α -Tocopherol (α -TOC)-Konzentration im Plasma

Da α -TOC das wichtigste lipophile Antioxidans im tierischen Organismus ist, wurde der Einfluss unterschiedlicher Quercetindosierungen auf den Zeitverlauf der α -TOC-Konzentration im Plasma von Forellen und Karpfen bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass trotz gleicher α -TOC-Gehalte in den Diäten beider Fischarten die α -TOC-Konzentrationen im Plasma von Forellen (Abb. 24A) deutlich höher waren als bei Karpfen (Abb. 24B). Des Weiteren zeigte sich, dass sowohl bei der Forelle als auch beim Karpfen bei allen Dosierungen von Quercetin ein signifikanter Anstieg der α -TOC-Konzentration mit zunehmender Versuchsdauer auftrat. Dieser Effekt war allerdings bei der Forelle deutlicher ausgeprägt als beim Karpfen. Dagegen ergab sich weder bei Forellen noch bei Karpfen eine deutliche Abhängigkeit der α -TOC-Konzentration von der Höhe der Quercetinaufnahme (Abb. 24A, 24B).

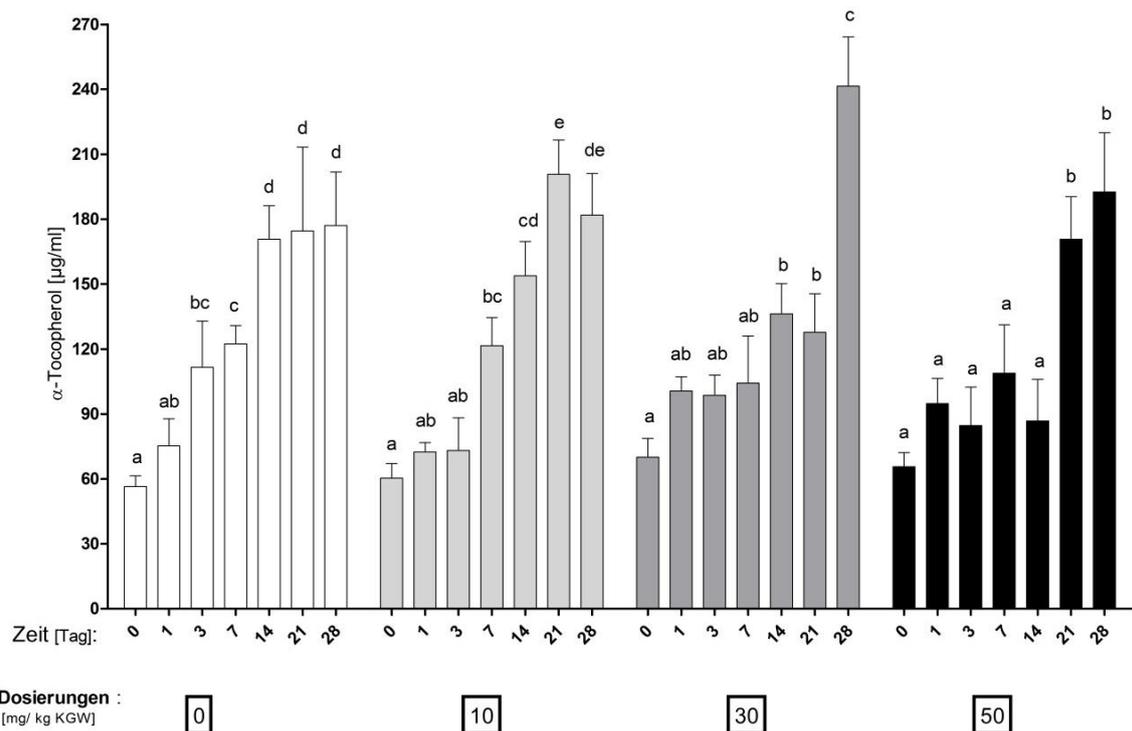


Abb. 24A: Zeitverläufe der α -Tocopherol-Konzentrationen im Plasma von Forellen nach oraler Applikation verschiedener Dosen von Quercetin. Mittelwerte \pm SEM, n = 4; Mittelwerte ohne gemeinsamen Buchstaben zwischen den Tagen bei einer bestimmten Dosierung unterscheiden sich signifikant (P<0,05).

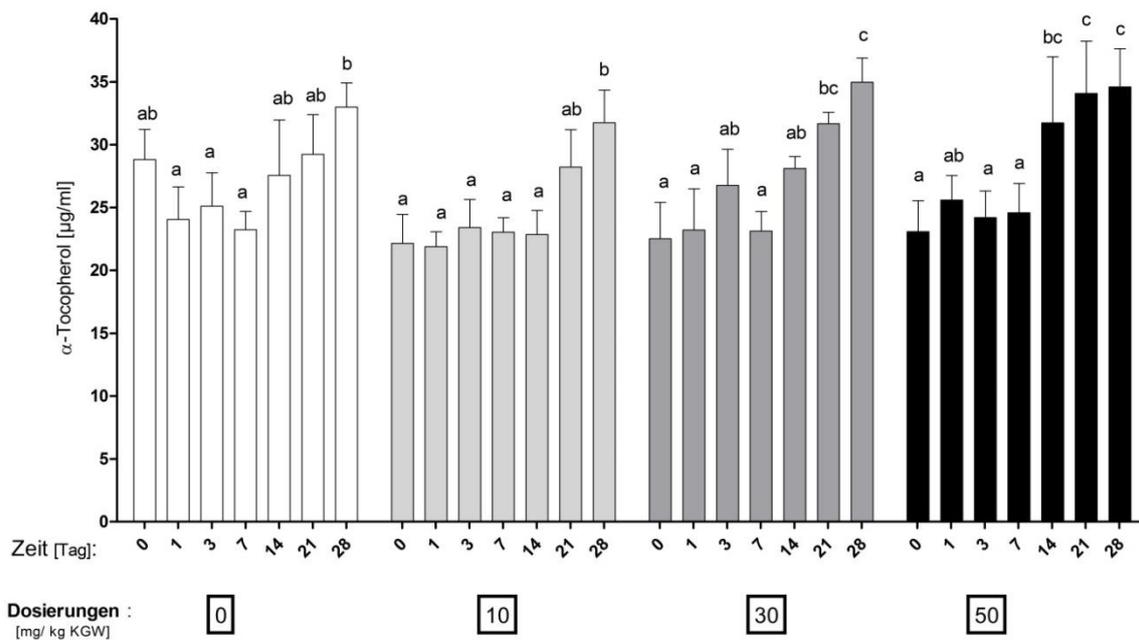


Abb. 24B: Zeitverläufe der α -Tocopherol-Konzentrationen im Plasma von Karpfen nach oraler Applikation verschiedener Dosen von Quercetin. Mittelwerte \pm SEM, $n = 4$; Mittelwerte ohne gemeinsamen Buchstaben zwischen den Tagen bei einer bestimmten Dosierung unterscheiden sich signifikant ($P < 0,05$).

4.2 Einfluss von Quercetin auf die Aktivität ausgewählter antioxidativer Schutzenzyme

Aktivität der Katalase (KAT)

Weder in den Muskelproben von Forellen noch von Karpfen konnte eine Katalase-Aktivität nachgewiesen werden. Bezüglich der Katalase-Aktivität in den Leberproben von Forellen bzw. Karpfen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen (Abb. 25).

Aktivität der Superoxid-Dismutase (SOD)

Abbildung 26 zeigt die Aktivität der cytosolischen SOD in der Muskulatur und Leber von Forellen (Abb. 26A) und Karpfen (Abb. 27B). Bei beiden Spezies zeigte sich eine deutlich höhere Aktivität des Enzyms in der Leber im Vergleich zur Muskulatur. Des Weiteren ergaben sich signifikant höhere Werte in der Muskulatur bei der Forelle (Abb. 26A) sowie in der Leber von Karpfen (Abb. 26B) bei einer Quercetin-Konzentration von 0,5 % Quercetin/kg Futter im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Quercetin-Supplementierung.

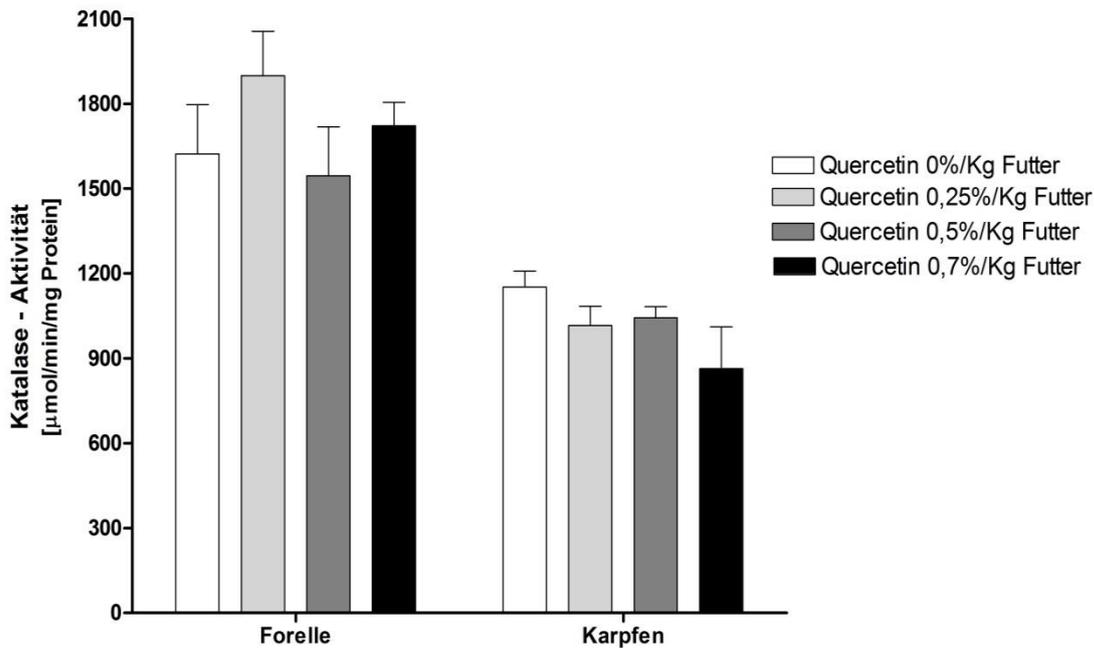


Abb. 25: Aktivität der Katalase in der Leber von Forellen und Karpfen nach oraler Applikation unterschiedlicher Quercetin-Dosen nach Abschluss der sechs- bzw. fünfwöchigen Versuchsperiode bei Forellen bzw. Karpfen. Mittelwerte \pm SEM, n = 10.

4.3 Wachstumsparameter und Körperzusammensetzung

Wachstumsparameter

Am Ende des 6 (Forellen) bzw. 5 (Karpfen)-wöchigen Fütterungsversuchs hatte sich das Körpergewicht sowohl bei Forellen als auch bei Karpfen fast verdoppelt. Die tägliche Aufnahme unterschiedlicher Dosen von Quercetin mit dem Futter zeigte jedoch keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Wachstumsparameter der Forellen (Tab. 6). Mit Ausnahme der täglichen Gewichtszunahme trat allerdings bei allen erfassten Wachstumsparametern wie Körpergewicht, Futteraufnahme, Futtermittelverwertung und spezifische Wachstumsrate ein Zeiteffekt auf. Während die Werte für Futteraufnahme, Futtermittelverwertung und Körpergewicht mit zunehmender Versuchsdauer anstiegen, wurde die spezifische Wachstumsrate bei allen Dosierungen von Quercetin reduziert.

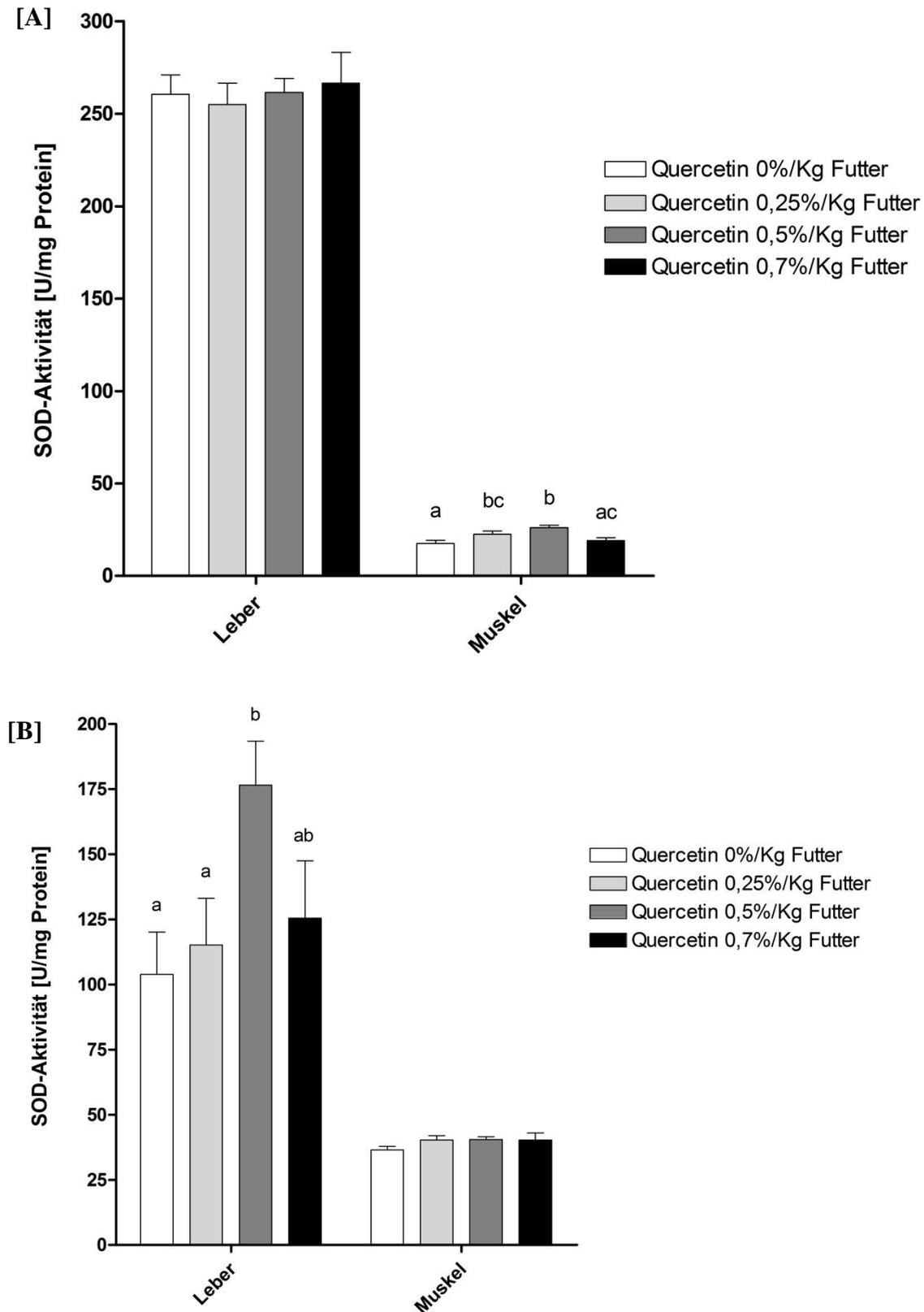


Abb. 26: Aktivität der Superoxid-Dismutase (SOD) in Leber und Muskel von Forellen [A] und Karpfen [B] nach oraler Applikation unterschiedlicher Quercetin-Dosen nach Abschluss der sechs- bzw. fünfwöchigen Versuchsperiode bei Forellen bzw. Karpfen. Mittelwerte \pm SEM, n = 10; Mittelwerte ohne gemeinsamen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($P < 0,05$).

Tab. 6: Wachstumsparameter von Forellen nach 6-wöchiger Fütterung mit Quercetin-angereicherten Diäten.

Parameter	Woche	Quercetin, g/kg Futter				±SEM	P-Wert		
		0	2,5	5	7		Zeit	Dosis	Dosis ×Zeit
KGW ¹ (g)	0	160,8	161,6	161,5	161,5	5,65	<.0001	0,689	0,405
	2	201,3	197,1	201,9	199,6				
	4	244,0	233,8	238,2	236,3				
	6	283,2	291,6	268,9	277,3				
FA ² (g)	0-2	2,7	2,2	2,7	2,4	0,32	<.0001	0,530	0,541
	2-4	4,1	3,7	3,7	3,6				
	4-6	5	4,3	4,4	4,1				
	0-6	3,2	3,4	3,6	3,4				
TZ ³ (g)	0-2	2,9	2,5	2,9	2,7	0,45	0,628	0,596	0,824
	2-4	3,1	2,6	2,6	2,6				
	4-6	3,4	3,4	2,3	2,9				
	0-6	2,9	2,9	2,6	2,8				
FCR ⁴	0-2	0,92	0,87	0,93	0,89	0,35	0,001	0,756	0,941
	2-4	1,34	1,41	1,46	1,39				
	4-6	2,14	1,65	2,40	1,79				
	0-6	1,43	1,18	1,44	1,27				
SGR ⁵ (%/Tag)	0-2	1,60	1,41	1,59	1,51	0,16	0,039	0,165	0,411
	2-4	1,37	1,21	1,17	1,20				
	4-6	1,25	1,59	0,92	1,13				
	0-6	1,34	1,40	1,21	1,28				

Mittelwerte ± SEM, n = 50/Fütterungsgruppen. Mittelwerte, die keinen gemeinsamen Buchstaben tragen, unterscheiden sich signifikant (P<0,05).

¹KGW=Körpergewicht; ²FA=Futtermenge (g/Fisch/Tag); ³TZ= tägliche Gewichtszunahme (g/Fisch/Tag);

⁴FCR= Futterverwertung, feed conversion rate= Futter (g) / Zuwachs (g);

⁵SGR= spezifische Wachstumsrate, specific growth rate = $(\ln W_f - \ln W_i \times 100) / t$; [W_f = Masse Tag x, W_i = Masse zu Tag 0, t = Versuchsdauer (d)]

Tab. 7: Wachstumsparameter von Karpfen nach 5-wöchiger Fütterung mit Quercetin-angereicherten Diäten.

Parameter	Woche	Quercetin, g/kg Futter				±SEM	P-Wert		
		0	2,5	5	7		Zeit	Dosis	Dosis ×Zeit
KGW ¹ (g)	0	176,0	176,8	176,7	176,7	3,17	<.0001	0,143	0,180
	2	235,7	241,0	241,9	245,0				
	4	319,7	326,7	325,9	331,7				
	5	390,5	396,9	397,8	405,2				
FA ² (g)	0-2	7,5	7,5	7,3	7,2	0,21	<.0001	0,355	0,964
	2-4	9,1	9,1	8,8	8,9				
	4-5	12,1	11,9	11,8	11,6				
	0-5	9,1	9,0	8,8	8,8				
TZ ³ (g)	0-2	4,2	4,6	4,6	4,9	0,24	<.0001	0,191	0,940
	2-4	6,0	6,1	6,0	6,2				
	4-5	10,1	10,1	10,3	10,5				
	0-5	6,1	6,1	6,3	6,5				
FCR ⁴	0-2	1,83 ^a	1,63 ^{ab}	1,58 ^{ab}	1,49 ^b	0,054	<.0001	0,004	0,342
	2-4	1,53	1,49	1,47	1,44				
	4-5	1,20	1,18	1,15	1,11				
	0-5	1,49 ^a	1,48 ^a	1,40 ^{ab}	1,34 ^b				
SGR ⁵ (%/Tag)	0-2	2,04	2,22	2,24	2,33	0,08	<.0001	0,199	0,547
	2-4	2,18	2,17	2,13	2,16				
	4-5	2,86	2,78	2,85	2,86				
	0-5	2,26	2,31	2,32	2,37				

Mittelwerte ± SEM, n = 50/Fütterungsgruppen. Mittelwerte, die keinen gemeinsamen Buchstaben tragen, unterscheiden sich signifikant (P<0,05).

¹KGW=Körpergewicht; ²FA=Futteraufnahme (g/Fisch/Tag); ³TZ= tägliche Gewichtszunahme (g/Fisch/Tag);

⁴FCR= Futtermittelverwertung, feed conversion rate= Futter (g) / Zuwachs (g);

⁵SGR= spezifische Wachstumsrate, specific growth rate = $(\ln W_f - \ln W_i \times 100) / t$; [W_f = Masse Tag x, W_i = Masse zu Tag 0, t = Versuchsdauer (d)]

Trotz kürzerer Versuchsdauer bei dem Versuch mit Karpfen im Vergleich zu Forellen war das mittlere Endgewicht der Tiere in allen Fütterungsgruppen nach fünf Wochen mehr als doppelt so hoch wie zu Versuchsbeginn. Die Quercetindosierung hatte allerdings auf die Entwicklung des Körpergewichts keinen Effekt. Bei den Karpfen trat bei allen erfassten Wachstumsparametern ein signifikanter Zeiteffekt auf (Tab. 7). Des Weiteren führte die Quercetinsupplementierung nach 2 Wochen zu einer Verbesserung der Futtermittelverwertung bei Karpfen. Über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet, zeigte die Höchste Quercetinsupplementierung (Quercetin 7g/kg Futter), die höchste Wirksamkeit in Bezug auf die Futtermittelverwertung.

Körperzusammensetzung

In den Tabellen 8 und 9 sind die Ergebnisse der Ganzkörperanalysen von Forellen bzw. Karpfen zu Beginn sowie 6 (Forellen) bzw. 5 (Karpfen) Wochen nach Fütterung Quercetin-haltiger Diäten (0, 2,5 5 und 7 g /kg Futter) zusammengefasst. Quercetin hatte unabhängig von der applizierten Dosis keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Körperzusammensetzung und den Bruttoenergiegehalt der Forellen. Ein signifikanter Zeiteffekt zeigte sich in allen Fütterungsgruppen für den Aschegehalt, wobei sich nach 6 Wochen eine Abnahme ergab.

Ebenso wie bei Forellen hat Quercetin unabhängig von den Dosierungen keinen signifikanten Effekt auf Körperzusammensetzung von Karpfen. Allerdings ergaben sich für alle erfassten Parameter signifikante Unterschiede zwischen Beginn und Ende des Fütterungsversuchs (Tab. 9). Während der Rohprotein- und Aschegehalt über die Dauer des Versuchs abnahmen, kam es zu einem signifikanten Anstieg des Rohfett-, Trockensubstanz- und Bruttoenergiegehalts.

Tab. 8: Körperzusammensetzung von Forellen nach Fütterung von Quercetin-angereicherten Diäten über einen Zeitraum von 6 Wochen.

Nährstoffe	Zeitpunkt	Quercetin, g/kg Futter					P-Wert		
		0	2,5	5	7	±SEM	Zeit	Dosis	Dosis ×Zeit
Rohprotein	ZP0	55,5	56,9	56,22	54,92	0,92	0,011	0,401	0,716
(% TS)	ZP6	54,5	53,6	53,18	53,26				
Rohfett	ZP0	36,3	34,9	36,54	36,96	1,48	0,249	0,282	0,729
(% TS)	ZP6	33,6	33,3	36,18	37,06				
Asche	ZP0	8,0 ^a	7,9 ^a	8,02 ^a	8,05 ^a	0,22	<,0001	0,953	0,974
(% TS)	ZP6	7,3 ^b	7,2 ^b	7,23 ^b	7,26 ^b				
TS	ZP0	29,1	29,2	29,17	29,08	0,65	0,921	0,983	0,927
(% FM)	ZP6	29,5	28,9	29,03	29,05				
Energie	ZP0	26,4	26,8	26,79	26,23	0,26	0,384	0,412	0,746
(MJ kg ⁻¹ TS)	ZP6	26,6	26,7	26,84	26,73				

Mittelwerte ± SEM, n = 10. TS = Trockensubstanz; FM = Frischmasse; Zeitpunkten: ZP0= Versuchsbeginn, ZP6 = Versuchsende nach 6 Wochen. Mittelwerte, die keinen gemeinsamen Buchstaben tragen, unterscheiden sich signifikant (P<0,05).

Tab. 9: Körperzusammensetzung von Karpfen nach Fütterung von Quercetin-angereicherten Diäten über einen Zeitraum von 5 Wochen.

Nährstoffe	Zeitpunkt	Quercetin, g/kg Futter				±SEM	P-Wert		
		0	2,5	5	7		Zeit	Dosis	Dosis × Zeit
Rohprotein	ZP0	64,7 ^a	65,5 ^a	64,0 ^a	65,0 ^a	1,22	<,0001	0,856	0,877
(% TS) ¹	ZP5	57,2 ^b	56,7 ^b	56,4 ^b	55,9 ^b				
Rohfett	ZP0	17,2 ^a	17,0 ^a	18,9 ^a	21,0 ^a	1,58	<,0001	0,468	0,649
(% TS)	ZP5	28,3 ^b	29,2 ^b	28,8 ^b	29,7 ^b				
Asche	ZP0	14,7 ^a	15,0 ^a	14,6 ^a	13,9 ^a	0,39	<,0001	0,445	0,422
(% TS)	ZP5	11,1 ^b	11,0 ^b	10,5 ^b	11,1 ^b				
TS	ZP0	21,4 ^a	21,6 ^a	21,8 ^a	22,3 ^a	0,48	<,0001	0,793	0,787
(% FM)	ZP5	25,4 ^b	25,1 ^b	25,3 ^b	25,4 ^b				
Energie	ZP0	22,2 ^a	21,9 ^a	22,4 ^a	22,9 ^a	0,38	<,0001	0,577	0,586
(MJ kg ⁻¹ TS)	ZP5	24,5 ^b	24,4 ^b	24,8 ^b	24,4 ^b				

Mittelwerte ± SEM, n = 10. TS = Trockensubstanz; FM = Frischmasse; Zeitpunkten: ZP0= Versuchsbeginn, ZP5 = Versuchsende nach 5 Wochen. Mittelwerte, die keinen gemeinsamen Buchstaben tragen, unterscheiden sich signifikant (P<0,05).

5. Diskussion

Fisch ist essentieller Bestandteil einer ausgewogenen Ernährung und gehört zu den wertvollsten Lebensmitteln in der Humanernährung. Er liefert nicht nur hochwertiges Eiweiß und wertvolle Fettsäuren sondern auch essenzielle Mineralstoffe und Vitamine (FAO/WHO, 2011). In letzter Zeit gewinnen pflanzliche Produkte in Fischfutter-Formulierungen zunehmend an Bedeutung, um den Bedarf an Fischmehl und -öl in der Fischproduktion zu reduzieren. Die Pflanzen liefern aber nicht nur Makro- und Mikronährstoffe, sondern enthalten auch bestimmte chemische Verbindungen, die sogenannten „sekundären Pflanzenstoffe“. Das Flavonol Quercetin gehört zu den sekundären Pflanzenstoffen und ist aufgrund seiner starken antioxidativen Eigenschaften und seines sonstigen vielseitigen Wirkungspotenzials eines der am meisten untersuchten Polyphenole (Lesser und Wolfram, 2006). Um die Bioaktivität der Flavonole *in vivo* beurteilen zu können, muss man ihre Absorption, ihren Metabolismus und letztendlich die Bioverfügbarkeit nach oraler Aufnahme im Organismus verstehen. Diesbezüglich gibt es beim Fisch, im Gegensatz zu terrestrischen Organismen, bisher nur sehr wenige wissenschaftliche Studien. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die mögliche Anreicherung und Gewebeverteilung von Quercetin nach mehrwöchiger Fütterungsdauer bei der carnivoren Regenbogenforelle und dem omnivoren Spiegelkarpfen zu untersuchen. Des Weiteren wurde in Anbetracht des antioxidativen Potenzials von Quercetin die Aktivität ausgewählte Parameter der Lipidperoxidation sowie die Aktivität antioxidativer Enzyme bei den oben genannten Fischarten untersucht. Schließlich wurden auch mögliche Auswirkungen unterschiedlicher hoher Quercetinsupplementierungen auf Wachstumsleistung und Körperzusammensetzung der Fische untersucht.

Gewebeverteilung und Retention von Quercetin

Unter den vorliegenden Versuchsbedingungen (Forellen- und Karpfenversuch I) konnte bei der Forelle nach Applikation Quercetin-haltiger Diäten im Vergleich zu einer Quercetin-freien Kontrolldiät bei allen untersuchten Dosierungen (10, 30 und 50 mg Quercetin/kg KGW) sowohl im Plasma als auch in der Leber und Muskulatur Quercetin und Quercetin-Metabolite nachgewiesen werden. Im Unterschied dazu lagen die Konzentrationen beim Karpfen in allen untersuchten Geweben unterhalb der Nachweisgrenze.

Mehrere *in vivo* Studien an monogastrischen Spezies wie Mensch, Schwein, Ratte, Huhn und Hund zeigen, dass Quercetin nach oraler Aufnahme im Plasma hauptsächlich in konjugierter Form zirkuliert (Reinboth et al. 2010; Rupasinghe et al. 2010; Bieger et al. 2008; Graf et al. 2006; De Boer et al. 2005; Cermak et al. 2003; Ader et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Regenbogenforellen, ähnlich wie beim Pferd (Wein und Wolffram 2013), nur ca. die Hälfte des Quercetin im Plasma nach oraler Aufnahme in konjugierter Form vorliegt. Im Vergleich zu Säugetieren zeichnet sich der Stoffwechsel von Fischen durch eine geringe Aktivität von Biotransformationsenzymen bzw. Phase I- und Phase II- Enzymkomplexen aus (Williams et al. 2000). Für eine geringe Konjugationsaktivität bei Fischen sprechen auch die Befunde von Park et al. (2008), die bei Nil Tilapien (*Oreochromis Niloticus*) nach Fütterung Quercetin-haltiger Diäten Quercetin und Isorhamnetin in den untersuchten Geweben (Plasma, Leber sowie Ganzkörperhomogenat) ausschließlich in nicht-konjugierter Form vorfanden (Park et al. 2008).

Wie im Literaturteil beschrieben (Abschnitt 2.1.1.), kann das postabsorptive Muster von Quercetinderivaten mit intakter Flavonolstruktur (Kaemperol, Isorhamnetin, Tamarixetin) von Spezies zu Spezies sehr variieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass bei Regenbogenforellen das Flavonol Quercetin ausschließlich bzw. stark bevorzugt an der 3'-Position zu Isorhamnetin methyliert wird, da in der vorliegenden Studie bei Regenbogenforellen kein Tamarixetin (4'-Methylderivat von Quercetin) detektiert werden konnte. Dies steht in weitgehender Übereinstimmung mit Befunden bei den meisten bisher untersuchten terrestrischen Spezies bei denen ebenfalls ausschließlich oder überwiegend Isorhamnetin als methylierter Quercetinmetabolit nachweisbar war (Wein und Wolffram 2013; Reinboth et al. 2010; Park et al. 2008; De Boer et al. 2005; Manach et al. 2005; Cermak et al. 2003; Ader et al. 2000). Tamarixetin wurde bei den bisher untersuchten Nutztierarten lediglich im Plasma vom Schwein nachgewiesen (Bieger et al. 2008; Cermak et al. 2003).

Während bei Ratten Isorhamnetin mit 62% den Hauptanteil an den Gesamtflavonolen im Plasma ausmacht (De Boer et al. 2005), stellt Quercetin bei Regenbogenforellen mit 70% den Hauptanteil. Bei anderen untersuchten Nutztierspezies konnte ebenso gezeigt werden, dass Quercetin den Hauptmetabolit nach oraler Aufnahme im Blut ausmachte. So stellte Quercetin in Plasmaproben von Schweinen, Pferden und Hunden mit 88% und von Nil Tilapien mit 94% den Hauptmetabolit nach oraler Aufnahme von Quercetin dar (De Boer et al. 2005; Wein und Wolfram 2013; Reinboth et al; 2010, Park et al; 2008). Diesbezüglich wurde auch bei Wiederkäuern ähnliche Ergebnisse berichtet. In einer Studie an Rindern nach oraler Aufnahme von Quercetin (50 mg Quercetin/kg KGW) machte das Quercetin selbst mit 83,8 % den Hauptmetabolit im Blut aus, gefolgt von Kaempferol und Isorhamnetin mit 8,9% bzw. 7,3 %. In der genannte Studie konnte kein Tamarixetin nachgewiesen werden (Beyer et al. 2015).

Im Vergleich zum Plasma lagen in der Leber bzw. Muskulatur sehr hohe Gesamtflavonolkonzentrationen bei den Forellen vor. Allerdings kam es auch in diesen Geweben, ähnlich wie im Plasma, zu keiner Akkumultion über die Dauer des Versuchs. Dies deutet einerseits auf eine rasche Aufnahme von Quercetin und oder Quercetinmetaboliten in die Gewebe, andererseits aber auch auf eine rasche anschließende Elimination hin. Zu der Frage, ob und inwieweit beim Fisch die renale Elimination mit dem Urin und die biliäre Ausscheidung über die Fäses an der Elimination von Quercetin und seiner Metaboliten beteiligt sind, liegen keine Daten in der Literatur vor.

Im Hinblick auf die Anreicherung von essbaren Fischprodukten mit Quercetin („functional food“) ist die relativ starke, vorübergehende Akkumulation von Quercetin und Gesamtflavonolen in der Muskulatur von Forellen (2,05 bzw. 2,12 nmol/g) interessant. In entsprechenden Untersuchungen bei Mastschweinen wurden deutlich niedrigere Konzentrationen von Quercetin bzw. Gesamtflavonolen in der Muskulatur (0,12 und 0,14 nmol/g) gefunden (Bieger et al., 2008). Allerdings lässt sich aus den Befunden der vorliegenden Arbeit folgern, dass dazu eine einmalige Fütterung kurz vor der Schlachtung wahrscheinlich ausreichend wäre. Ein überraschender Befund war, dass auch in der Versuchsgruppe, die die Diäten ohne Quercetinzusatz über die gesamte Versuchsdauer erhielt, in der Muskulatur und Leber geringe Konzentrationen von Quercetin bzw. Gesamtflavonolen nachweisbar waren, während die Konzentrationen in den entsprechenden Plasmaproben unter der Nachweisgrenze lagen. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch in der Studie von Park et al. (2008) bei Nil-Tilapien (*Oreochromis Niloticus*) gemacht. Die Autoren vermuteten, dass eine Quercetin-Aufnahme über Algen die mögliche Ursache dafür sein könnte. Auch in der vorliegenden

Studie kann eine Quercetin-Aufnahme über Algen nicht ausgeschlossen werden. Allerdings wurde in den Haltungsbecken kein nennenswertes Algenwachstum beobachtet. Eine andere mögliche Ursache könnte im „Leaching“-Effekt (Übergang von Quercetin aus dem Futter in das Wasser) und einer Absorption über Kiemen und/oder Haut liegen. Allerdings ist Quercetin sehr schlecht wasserlöslich. Eine wahrscheinlichere Erklärung könnte sein, dass in der vorliegenden Studie die Becken durch Zwischenwände unterteilt waren. Dabei kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass quercetin-haltige Pellets (Fütterungsgruppen mit Quercetinsupplementierung) aufgrund eines unvollständigen Schlusses der Zwischenwände in die Becken der Kontrollgruppe gelangten und von den Fischen konsumiert wurden.

Wie bereits eingangs der Diskussion erwähnt, zeigten die Untersuchungen bei Karpfen, dass im Blut zum Zeitpunkt der Entnahme im Gegensatz zu Forellen weder Quercetin noch dessen Metaboliten mit intakter Flavonolstruktur (Isorhamnetin, Tamarixetin, Kämpferol) nachweisbar waren. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich durchgeführten „Kinetik-Studie“ beim Karpfen, bei der auch frühere Zeitpunkte nach der Aufnahme von Quercetin erfasst wurden, zeigten, dass bereits nach 30 min Quercetin und seine Metaboliten mit intakter Flavonolstruktur im Plasma von Karpfen nachweisbar waren. Der maximale Plasmaspiegel wurde schon nach 2 Stunden erreicht. Bereits nach 4 Stunden war die Konzentration wieder um 50 % (ausgehend von der Maximalkonzentration) gesunken. Diese Ergebnisse weisen auf eine sehr rasche Elimination von Quercetin und seiner Metaboliten bei Karpfen hin. Auch der gastrointestinalen Passagerate bzw. der Magenentleerung spielt zumindest im Zusammenhang mit der Absorptionsgeschwindigkeit von Quercetin eine wichtige Rolle. Aufgrund des Fehlens eines Magens beim Karpfen gelangt die Nahrung und damit das applizierte Quercetin unverzüglich in den Darm, so dass im Vergleich zur Forelle eine raschere Absorption wahrscheinlich ist. Möglicherweise spielt auch die Ansäuerung des Chymus im Magen eine Rolle für die Löslichkeit und v.a. Stabilität von Quercetin und Quercetinderivaten. Dazu ist lediglich bekannt, dass Quercetin (Aglykon) in Lösungen mit niedrigen pH-Werten stabiler ist als bei neutralem oder alkalischem pH (Hatcher und Bryan 1985; Hu et al. 2012). Ob dies für die Verfügbarkeit bzw. Absorption unter unseren Bedingungen von Relevanz ist, kann anhand der vorliegenden Untersuchungen nicht beantwortet werden.

Die Gewebeverteilung von Flavonolen beim Karpfen konnte nicht ermittelt werden, da der Zusatz von lyophilisierten Leber- bzw. Muskelgewebe von Karpfen zu Standardproben zu einer starken Dämpfung des Signals in der HPLC-Analyse führte. Dies führte zu einer massiven Verschiebung der Nachweisgrenze nach oben. Damit lagen die Konzentrationen un-

terhalb der Nachweisgrenze und der Nachweis niedrigere Konzentrationen in den Geweben von Karpfen waren so nicht mehr möglich. Ein denkbarer Grund dafür könnte die Komplexbildung der Flavonole mit Proteinen, insbesondere Prolin-reichen Proteinen (PRPs), sein. In vielen Studien wurde die Bildung von Protein-Flavonoid-Komplexen belegt (Bohin et al. 2012; Andersen und Markham 2006; Kaldas et al. 2005; Papadopoulou et al. 2005; Zsila et al. 2003; Sengupta und Sengupta 2002). Ob tatsächlich die Bindung von Quercetin und seinen Metaboliten mit intakter Flavonolstruktur letztendlich der Grund für die schlechte Nachweisbarkeit von Flavonolen beim Karpfen war, muss in weiterführenden Studien genauer untersucht werden.

Wachstumsparameter und Körperzusammensetzung

Im Unterschied zur Studie von Zhai und Liu (2013) mit Tilapien (*Oreochromis niloticus*), hatte Quercetin in den verabreichten Dosierungen, mit Ausnahme der Futtermittelverwertung beim Karpfen, keinen Effekt auf Wachstumsparameter sowie die Körperzusammensetzung von Forellen und Karpfen. In den vorliegenden Untersuchungen konnte lediglich ein Effekt der Fütterungsdauer ermittelt werden, was den Erwartungen entspricht. Dabei wurde eine Reduktion des Rohprotein- und Aschegehalts bei den Forellen und Karpfen mit zunehmendem Alter bzw. Körpergewicht beobachtet. Dieser Rückgang war beim Karpfen deutlich auffälliger, besonders beim Aschegehalt. Mit zunehmender Fischgröße nimmt die Knochenmasse bezogen auf die Fischmasse ab und damit auch der Aschegehalt. Bedingt durch den ziemlich starken Anstieg des Fettgehaltes beim Karpfen am Ende des Versuches und die Tatsache, dass das Fett fast aschefrei ist, war dieser Unterschied im Aschegehalt beim Karpfen zwischen Anfang und Ende des Versuchs markanter als bei der Forelle. Des Weiteren ist bekannt, dass Karpfenknochen stärker als Forellenknochen mineralisiert sind (Macesic und Summers 2012). Die Höhe der täglichen Futteraufnahme beeinflusst insbesondere den Rohfettgehalt beim Fisch (Breck 2014). In dieser Studie wurde das Futter zur *ad lib.* Aufnahme (2x täglich bis zur scheinbaren Sättigung) angeboten. Die tägliche Futteraufnahme bei Karpfen war wesentlich höher als bei Forellen. Während der Rohfett- und Bruttoenergiegehalt bei den Forellen im Laufe der Zeit nicht nennenswert schwankten, ist der Rohfettgehalt beim Karpfen bis zum Versuchsende deutlich gestiegen. Aufgrund des bekannten Antagonismus zwischen Fett- und Wassergehalt des Organismus kam es dabei beim Karpfen auch zu einer Zunahme des Trockensubstanzgehaltes bzw. einer Abnahme des Wassergehaltes des Körpers.

Wie bereits oben erwähnt, trat eine signifikant verbesserte Futtermittelverwertung am Ende der 5. Woche bei Karpfen bei einer Dosierung von Quercetin 7 g/kg Futter auf. Zhai und Liu (2013) beobachteten bei Tilapien (*Oreochromis niloticus*) ebenso eine Verbesserung der Futtermittelverwertung im Vergleich zur Kontrollgruppe durch Zusatz von Quercetin in verschiedenen Dosierungen (0, 200, 400, 800, und 1600 mg/kg KGW) über einen Zeitraum von sieben Wochen. Des Weiteren war die spezifische Wachstumsrate der Quercetin-Gruppe bei allen Dosierungen am Ende des Versuchs deutlich besser als in der Kontrollgruppe. Die Autoren konnten ebenfalls einen signifikanten Effekt von Quercetin auf Wachstum feststellen (Zhai und Liu 2013). Die Gründe für eine verbesserte Futtermittelverwertung bei der höchsten Dosierung von Quercetin in unserem Karpfenversuch sind nicht klar. Eine verbesserte Verdaulichkeit des Futters oder ein vermehrter Protein- anstelle von Fettansatz könnte die verbesserte Futtermittelverwertung theoretisch erklären. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch keine Messung der Verdaulichkeit vorgenommen. Die Analyse der Körperzusammensetzung zeigt, dass Quercetin, unabhängig von der Dosierung, keinen signifikanten Effekt auf die Körperzusammensetzung der Versuchstiere hatte.

Parameter des oxidativen/antioxidativen Status

Einfluss von Quercetin auf die Aktivität von Katalase und Superoxiddismutase

Die SOD ist ein antioxidatives Enzym der „vordersten Linie“ (Rahal et al. 2014; Pamplona und Costantini 2011; Marikovsky et al. 2003; Weydert und Cullen 2009; Halliwell und Gutteridge 1999), das auch beim Fisch, wie beim Säuger, v.a. in der Leber und Niere exprimiert wird (Vélez-Alavez et al. 2015; Vasylykiv et al. 2011; Radovanovic et al. 2010; Hidalgo et al. 2002; Halliwell und Gutteridge 1999; Pérez-Campo et al. 1993; Kobayashi und Yuki 1954a & b). Es dient der „Entschärfung“ des hochreaktiven Superoxidradikals, wobei Wasserstoffperoxid generiert wird. Das im antioxidativen Netzwerk des Organismus (Abb. 9) folgende Enzym ist die Katalase, die Wasserstoffperoxid zu Wasser und molekularem Sauerstoff umsetzt. Beim Fisch findet sich die Katalase vor allem in den Peroxisomen der Leber und den Erythrozyten (Filho et al. 1993). Zusammen mit weiteren Enzymen (z.B. Glutathionperoxidasen) schützt die konzertierte Aktion von SOD und Katalase die Zelle vor oxidativen Schäden (Halliwell und Gutteridge 1999). Des Weiteren spielen dabei auch nicht-enzymatische Mechanismen, wie z. B. die Funktion bestimmter Verbindungen als direkte Radikalfänger, eine wichtige Rolle. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass das Flavonol Quercetin zumindest unter *in vitro*-Bedingungen durchaus in der Lage ist,

freie Radikale zu quenchen (Fraga et al. 2010; Pietta 2000; Adewole et al. 2006; Coskun et al. 2005; Molina et al. 2003; Formica und Regelson 1995; Rice-Evans et al. 1997).

In der vorliegenden Studie lagen die Katalaseaktivität in den Muskelproben von Forellen und Karpfen alle unter der Nachweisgrenze. Aus unterschiedlichen Studien an verschiedenen Fischarten ist bekannt, dass die Leber, ähnlich wie bei terrestrischen Spezies, die höchste Katalaseaktivität im Vergleich zu anderen Geweben aufweist, gefolgt von Niere, Herz, Gehirn. Die niedrigste Aktivität wurde in der Muskulatur gemessen (Vélez-Alavez et al. 2015; Vasylykiv et al. 2011; Radovanovic et al. 2010; Hidalgo et al. 2002; Pérez-Campo et al. 1993; Kobayashi und Yuki 1954a & b). Des Weiteren scheint die Aktivität der antioxidativen Schutzenzyme im Muskel von Fischen hauptsächlich von ihrer körperlichen Aktivität bzw. Schwimmfähigkeit abzuhängen (Vélez-Alavez et al. 2015; Filho et al. 1993). Den Hauptanteil der Fischmuskulatur machen bei den meisten Fischarten weiße Muskelfasern aus. In der chemischen Zusammensetzung gibt es viele Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Fischmuskelfasern. Die weißen Muskelfasern sind anaerob und schnell. Sie benötigen viel mehr Energie im Vergleich zu roten Muskelfasern. Sie benutzen vor allem Glykogen für ihre Energieversorgung. Die roten Muskelfasern sind hingegen aerob und langsam und beziehen ihre Energie nicht nur aus Glykogen sondern auch aus Lipiden (Huss 1995). Die roten Muskelfasern haben in der Regel einen höheren Gehalt an Hämipigmenten (Myoglobin und Hämoglobin), Mitochondrien, Fett und Glykogen im Vergleich zu weißen Muskelfasern (Evans et al. 2013; Haard 1992). Die Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff durch das Enzym Katalase läuft aerob. Wie bereits erwähnt besitzen die weißen Muskelfasern einen anaeroben Stoffwechsel und sind relativ mitochondrienarm und wahrscheinlich auch arm an Peroxisomen. So konnte keine Katalaseaktivität in den Muskelproben festgestellt werden. Im Unterschied zu den Muskelproben konnte die Aktivität von Katalase in den Leberproben von Forellen und Karpfen gemessen werden. Allerdings hatte die Quercetinsupplementierung in unterschiedlicher Konzentration mit dem Futter keinen signifikanten Einfluss. Bei Flundern (*Paralichthys olivaceus*), die zur Stressprovokation unter hypoosmotischen Bedingungen gehalten wurden konnte gezeigt werden, dass Quercetin die Expression und Aktivität der antioxidativen Enzyme CAT und SOD in der Leber sowie die H₂O₂-Konzentration im Plasma erhöhte. Die Autoren folgerten aus diesem Ergebnis, dass Quercetin die beim osmotischen Stress vermehrt gebildeten freien Radikale direkt neutralisiert (Shin et al. 2010a).

In Bezug auf die Interpretation der antioxidativen Eigenschaften von Flavonoiden sollte man berücksichtigen, dass das Flavonol Quercetin nicht nur antioxidative Eigenschaften hat, sondern auch nach Reduktion prooxidativer Verbindungen selbst zum Radikal wird und über die Bildung von Verbindungen wie z. B. Quercetin-Quinon (QQ) auch prooxidativ wirken kann (Boots et al, 2008; Metodiewa et al. 1999; Boots et al. 2007). Prooxidative Verbindungen sind in der Lage, die endogenen antioxidativen Schutzenzyme zu aktivieren bzw. zu induzieren (Varela-Valencia et al. 2014; Procházková et al. 2011; Lee-Hilz et al. 2006; Hermes-Lima 2004; Halliwell und Gutteridge 1999). Hinsichtlich der Aktivität der SOD wurde beobachtet, dass die Diät mit einem Quercetiningehalt von 0,5% im Vergleich zu den Diäten mit 0, 0,25 und 0,7 % in der Muskulatur von Forellen und in der Leber von Karpfen signifikant höher war. Eine Steigerung der Aktivität der SOD wird üblicherweise mit einem vermehrten oxidativen Stress und einem Anstieg der Bildung von Superoxidationen gesehen (Panet al. 2011; Pavlović et al. 2010; Halliwell und Gutteridge 1999). Deshalb sprechen diese Ergebnisse für einen erhöhten oxidativen Stress. Die Dosisabhängigkeit anti- bzw. prooxidativer Effekte von Quercetin wurde auch in anderen Studien beobachtet (Procházková et al. 2011; Watjen et al. 2005).

Im Vergleich zum Karpfen ergaben sich in unseren Versuchen für die SOD- und CAT-Aktivität in der Leber bei der Forelle höhere Werte. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass gezeigt wurde, dass schnell schwimmende Fischarten eine höhere SOD- und CAT-Aktivität im Blut aufweisen (Rudneva, 1997). In der Regel besitzen carnivorere Fischarten im Vergleich zu den omnivoren bzw. herbivoren Fischarten eine höhere Stoffwechselrate (Halver und Ashley, 1972). Im Vergleich zum Karpfen ist die Regenbogenforelle viel aktiver. Sie besitzt eine höhere Stoffwechselrate und somit einen um das 2-3-fache höheren Sauerstoffverbrauch (Bertram et al. 1928). Aus diesem Grund bildet die Forelle im Vergleich zum Karpfen vermutlich vermehrt Superoxidationen in der Atmungskette. Der niedrige Sauerstoffverbrauch der Karpfen kann die geringere Aktivität der antioxidativen Schutzenzyme im Vergleich zur Forelle erklären.

Vitamin E und MDA

In der Literatur gibt es kontroverse Befunde über die Interaktionseffekte zwischen Flavonolen und Vitamin E bei Säugetieren. Während in einigen Studien die positive Wirkung von Flavonolen auf den Vitamin E-Status gezeigt werden konnte (Luehring et al. 2011; Becker et al. 2007; Frank et al. 2006; Frank 2005; Choi et al. 2003; Jovanovic et al. 1996), wurden in anderen Studien keine α TOC-sparende Effekte beobachtet (Wiegand et al. 2009; Augustin et al. 2008; Ameho et al. 2008). Ein Vit E-sparender Effekt von Quercetin und damit eine

Erhöhung von Plasma- bzw. Gewebekonzentrationen von Vit E wird in der Regel damit erklärt, dass Quercetin an Stelle von Vit E als direkter Radikalfänger fungiert (Luehring et al. 2011; Becker et al. 2007; Frank et al. 2006; Choi et al. 2003; Pedrielli und Skibsted 2002; Van Acker et al. 2000). Ob die Flavonole eine geeignete Alternative zur Regeneration des oxidierten α -TOCs *in vivo* sind, und so möglicherweise die Vit E-Konzentration erhöhen können, ist dagegen noch immer nicht klar (Luehring et al. 2011; Ameho et al. 2008; Frank et al. 2006; Choi et al. 2003). Diesbezüglich gibt es keine vergleichbaren Studien bei Fischen.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein α -TOC-sparender Effekt von Quercetin weder bei Forellen noch bei Karpfen beobachtet werden. Erwähnenswert dabei ist, dass die gemessenen α -Tocopherol-Konzentrationen im Plasma von Forellen deutlich höher als bei Karpfen waren.

In der systemischen Zirkulation wird α -Tocopherol mit unterschiedlichen Klassen von Lipoproteinen transportiert. Deswegen können der Lipoproteinstoffwechsel und vor allem die relative Plasmakonzentration der Lipoproteine, die Vitamin E-Konzentration im Plasma beeinflussen. In einer Studie mit Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) konnte gezeigt werden, dass mehr als 80% des radioaktiv markierten α -Tocopherol nach Gabe von DL- α -[3',4',¹⁴C]-Tocopherylacetat nach 32 h in LDL lokalisiert war, was somit das wichtigste Transportvehikel für Vitamin E im Blut von Regenbogenforellen darstellt (Hung et al. 1982). Im Unterschied zu Fischen wird α -Tocopherol bei Säugetieren vor allem durch VLDL transportiert (Perugini et al. 2000, Reboul et al. 2005, Anwar 2006). Zum Beispiel wird nach Vitamin E-Supplementierung beim Menschen ein Drittel des Gesamt- α -Tocopherols durch VLDLs transportiert (Perugini et al. 2000). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Plasmakonzentrationen der unterschiedlichen Klassen der Lipoproteine, insbesondere die LDL-Konzentration, bei der Regenbogenforelle deutlich höher als bei Karpfen liegen (Babin und Vernier 1989). Diese Befunde können die höheren α -Tocopherol-Konzentrationen im Plasma von Forellen im Vergleich zu Karpfen bei gleicher α -Tocopherol-Zufuhr mit dem Futter erklären.

In der Vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass sowohl bei der Forelle als auch beim Karpfen bei allen Dosierungen von Quercetin ein signifikanter Anstieg der α -TOC-Konzentration mit zunehmender Versuchsdauer auftrat. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf eine gesteigerte Futteraufnahme und damit einhergehende höhere α -TOC-Aufnahme bei zunehmender Körpermasse zurückzuführen.

Malondialdehyd gilt als sog. sekundäres Lipidperoxidationsprodukt und seine Plasmakonzentration wird als zuverlässiger Marker für oxidativen Stress verwendet (Ayala et al. 2014; Lykkesfeldt 2007; Halliwell und Gutteridge 1999; Esterbauer et al. 1991; Nielsen et al. 1997). Die Bestimmung der MDA-Konzentrationen im Plasma von Forellen und Karpfen zeigten, dass in der vorliegenden Studie unabhängig von der applizierten Quercetindosis bei Forellen und Karpfen keine signifikanten Unterschiede auftraten. Dies deutet darauf hin, dass Quercetin in den verabreichten Dosierungen keinen signifikanten Einfluss auf die Lipidperoxidation *in vivo* bei oben genannten Fischen hatte. Im Gegensatz dazu zeigten verschiedene Studien, dass eine Quercetin-Supplementierung die Lipidperoxidation vermindert und so eine Erhöhung der MDA-Werte verhindert. In einer Studie an Flundern (*Paralichthys olivaceus*), die einem „Cadmiumstress“ ausgesetzt waren, senkte die Gabe von Quercetin (0,25% bzw. 0,5 % Quercetin/kg Futter/Tag) die MDA-Konzentrationen im Lebergewebe (Shin et al. 2010b). Eine Quercetinsupplementierungen (10 bzw. 50 mg/ kg KGW) über einen Zeitraum von 48 Stunden führte im experimentellen Rattenmodell ebenfalls zu einer Absenkung der MDA-Konzentration in der Hirnrinde (*cerebral cortex*) (Dong et al. 2014). Eine *in vivo*-Studie an spontan hypertensiven Ratten (SHR) zeigte, dass Quercetin (10 mg/kg KGW) die Malondialdehyd-Konzentrationen im Plasma reduziert (Romero et al. 2010). Obwohl letztendlich die Gründe für diesen Unterschied im Vergleich zur vorliegenden Studie nicht bekannt sind, liegt eine mögliche Erklärung darin, dass im Unterschied zu den genannten Versuchen, bei denen Quercetin positive Effekte zeigte, in unseren Versuchen weitestgehend stressfreie Haltungsbedingungen vorlagen.

6. Zusammenfassung

Die Absorption und post-absorptive Verteilung des Flavonols Quercetin wurde bei Säugetieren wie Schwein und Ratte umfangreich untersucht. In der Literatur liegen zahlreiche Hinweise vor, dass das Flavonol Quercetin aufgrund seiner ausgeprägten anti-oxidativen Eigenschaften „oxidativen Stress“ und damit verbundene Prozesse, wie z. B. Entzündungen und Krankheitsanfälligkeit, bei Mensch und Tier beeinflusst. Darüber hinaus gibt es etliche Belege, dass Quercetin sowohl das Wachstum als auch die Körperzusammensetzung terrestrischer Nutztiere positiv beeinflusst. Diesbezüglich existieren für Fische kaum Informationen. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zunächst die mögliche Akkumulation sowie Gewebeverteilung von Quercetin nach vierwöchiger Fütterungsdauer bei der carnivoren Regenbogenforelle und dem omnivoren Spiegelkarpfen zu untersuchen. Des Weiteren wurde die postabsorptive Wirkung von Quercetin bezüglich des oxidativen/antioxidativen Status sowie dessen Einfluss auf Wachstumsleistung und Körperzusammensetzung bei den oben genannten Fischarten untersucht.

Die Ergebnisse zur Retention von Quercetin zeigten, dass zwar Quercetin bzw. Gesamtflavonole nach oraler Aufnahme bei beiden Spezies systemisch verfügbar waren, allerdings findet eine rasche Elimination des Flavonols und seiner Metaboliten mit intakter Flavonolstruktur statt, die eine Akkumulation in den Geweben verhindert. Ein interessanter Befund war, dass bei Forellen, ähnlich wie beim Pferd (Wein und Wolfram 2013), nur ca. die Hälfte des Quercetin im Plasma nach oraler Aufnahme in konjugierter Form vorlag. Erwähnenswert ist ferner, dass die Flavonolkonzentrationen in der Leber bzw. im Muskel von Forellen ca. 40 bis 50-Fach höher als im Plasma waren. Weitgehend ungeklärt bleibt die Gewebeverteilung der Flavonole in Leber und Muskulatur von Karpfen, da die Flavonolanalyse aus bisher nicht geklärten Gründen in diesen Geweben nicht zuverlässig möglich war. Dieser Befund könnte mit einer Bindung an Proteine zusammenhängen, die nur beim Karpfen in Muskulatur und Leber vorliegen. Hinsichtlich möglicher antioxidativer Wirkungen der Quercetinsupplementierung ergab sich, dass Quercetin in den verabreichten Dosierungen keinen signifikanten Einfluss auf den oxidativen/antioxidativen Status der Versuchstiere hatte. Die vorliegende Arbeit zeigt darüber hinaus, dass Quercetin zumindest in den verabreichten Dosierungen zu keiner signifikanten Beeinflussung von Wachstum und Körperzusammensetzung bei Forellen bzw. Karpfen führte.

7. Summary

The absorption and post-absorptive distribution of the flavonol quercetin has been extensively studied in mammals such as pigs and rats. Scientific research indicates that due to its highly anti-oxidative properties, the flavonol quercetin might ameliorate “oxidative stress” and related processes, like inflammation and the susceptibility for various diseases in humans and animals. In addition, there is a significant amount of evidence that points to a positive influence of quercetin on growth and body composition in terrestrial species. However, concerning those effects of quercetin, there is hardly any information in fishes.

For this reason, one aim of the present study was to examine the possible accumulation as well as tissue distribution of quercetin in the carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the omnivorous carp (*Cyprinus carpio*) after a four-week feeding period. Furthermore, the post-absorptive effect of quercetin in relation to oxidative/anti-oxidative status, as well as its influence on growth performance and body composition was studied in the above mentioned fish species.

With respect to the retention of quercetin in both species the results clearly demonstrate, that quercetin is systemically available after oral ingestion. However, there was a rapid elimination of quercetin and its metabolites with an intact flavonol structure, thus hindering an accumulation over time in body tissues. In trouts an interesting finding was, that similar as in horses (Wein and Wolfram 2013), approx. only 50 % of the quercetin contained in plasma was present in conjugated forms after oral ingestion. It is also noteworthy that the concentration of total flavonols was approx. 40 to 50-times higher in the liver and muscle tissues of the trout than in plasma. In contrast, the tissue distribution of the flavonols in the liver and muscle of the carp could not be measured reliably because due to unknown reasons the analytical method for determination of flavonols used in the present study did not work. One possible reason therefore could be a binding of flavonols to proteins only present in carp muscle and liver. Regarding the possible anti-oxidative effect of quercetin, the findings show, that, in the doses administered, quercetin had no significant effect on the parameters of oxidative/anti-oxidative status in both fish species. Furthermore, the results show, that quercetin at least in the doses administered, did not lead to any significant impact on the growth and body composition of trouts or carps.

8. Literatur

- Abele, D., Puntarulo, S. (2004). Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A. Molecular & Integrative Physiology*. 138 (4), 405-415
- Ader, P., Blöck, M., Pietzsch, S., Wolfram, S. (2001). Interaction of quercetin glucosides with the intestinal sodium/glucose co-transporter (SGLT-1). *Cancer Letters*. 162 (2), 175-180.
- Ader, P., Wessmann, A., Wolfram, S. (2000). Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Radical Biology and Medicine*. 28 (7), 1056-1067.
- Adewole, SO., Caxton-Martins, EA, Ojewole, JAO (2007). Protective effect of quercetin on the morphology of pancreatic β -cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 4 (1).
- Alanara, A., Brannas, E. (1997). Diurnal and nocturnal feeding activity in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 54 (12), 2894–2900.
- Alfadda, A. A., Sallam, R. M. (2012). Reactive Oxygen Species in Health and Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. S. 1-14.
- Allen C.E., Foegeding E.A. (1981). Some lipid characteristics and interactions in muscle foods-a review. *Food Technology*, 35(4), 253-257.
- Ameho, CK., Chen, C.Y. Oliver., Smith, D., Sánchez-Moreno, C., Milbury, PE, Blumberg, JB. (2008). Antioxidant activity and metabolite profile of quercetin in vitamin-E-depleted rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 19 (7), 467-474.
- Angeloni, C., Spencer, J.P.E., Leoncini, E., Biagi, P. L., Hrelia, S. (2007). Role of quercetin and its *in vivo* metabolites in protecting H9c2 cells against oxidative stress. *Biochimie*. 89 (1), 73-82.
- Anwar, K. (2006). Transport of vitamin E by differentiated Caco-2 cells. *The Journal of Lipid Research*. 47 (6), 1261-1273.
- Ashley, P.J. (2007). Fish welfare Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science* 104 (3-4), 199-235.
- Augustin, K., Blank, R., Boesch-Saadatmandi, C., Frank, J., Wolfram, S., Rimbach, G. (2008). Dietary green tea polyphenols do not affect vitamin E status, antioxidant capacity and meat quality of growing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 92 (6), 705-711.
- Awad, E., Austin, D., Lyndon, A R. (2013). Effect of black cumin seed oil (*Nigella sativa*) and nettle extract (Quercetin) on enhancement of immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*. 388-391(1), 193-197.
- Ayala, A., Muñoz, M F., Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation. Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-31.
- Azuma, K., Ippoushi, K., Ito, H., Terao, J. (2003). Enhancing Effect of Lipids and Emulsifiers on the Accumulation of Quercetin Metabolites in Blood Plasma after the Short-term Ingestion of Onion by Rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 67 (12), 2548-2555.
- Azzi, A., Stocker, A (2000). Vitamin E. non-antioxidant roles. *Progress in Lipid Research*. 39 (3), 231-255

- Babin, P. J., Vernier, J. M., (1989). Plasma lipoproteins in fish. *The Journal of Lipid Research* 30(4).467-89.
- Baccan, M. M., Chiarelli-Neto, O., Pereira, R M S. (2012). Quercetin as a shuttle for labile iron. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 107 (1), 34-39.
- Bagnyukova, T.V., Storey, K.B., Lushchak, V.I. (2003). Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. *Journal of Thermal Biology*. 28 (1), 21-28.
- Bando, N., Wakamatsu, S., Terao, Junji. (2007). Effect of an Excessive Intake of Quercetin on the Vitamin E Level and Antioxidative Enzyme Activities of Mouse Liver under Paraquat-Induced Oxidative Stress. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 71 (10), 2569-2572.
- Baviskar, J.W., Khandelwal, S.R. (2015). Extraction, Detection and Identification of Flavonoids from Microalgae. An Emerging Secondary Metabolite. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2319-7706 (2), 110-117.
- Becker, E M., Ntouma, G., Skibsted, L H. (2007). Synergism and antagonism between quercetin and other chain-breaking antioxidants in lipid systems of increasing structural organization. *Food Chemistry*. 103 (4), 1288-1296.
- Berger, L.M., Wein, S., Blank, R., Metges, CC., Wolfram S. (2012). Bioavailability of the flavonol quercetin in cows after intraruminal application of quercetin aglycone and rutin. *Journal of Dairy Science*. 95 (9), 5047-5055.
- Bertram, F., Bethe, A., Bergmann, G. (1928). Stoffwechsel und Energiewechsel. In: *Gesamtstoffwechsel Energiewechsel Intermediärer Stoffwechsel*, Springer.
- Besle, J., Viala, D., Martin, B., Pradel, P., Meunier, B., Berdague, J., Fraise, D., Lamaison, J., Coulon, J. (2010). Ultraviolet-absorbing compounds in milk are related to forage polyphenols. *Journal of Dairy Science* 93 (7), 2846–2856.
- Beyer, B., Wolfram, S. (2015). Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Catechinen und Quercetin beim Rind. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Bieger, J., Cermak, R., Blank, R., de Boer, V.C.J., Hollman, P.C.H., Kamphues, J., Wolfram, S. (2008). Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *Journal of Nutrition*. 138 (8), 1417–1420.
- Bjorneboe, A., Bjornebow, G.E.A., Drevon, C.A. (1990). Absorption, transport and distribution of vitamin E. *Journal of Nutrition*, 120 (3), 233–242.
- Bonarska-Kujawa, D., Pruchnik, H., Cyboran, S., Żyłka, R., Oszmiański, J., Kleszczyńska, H. (2014). Biophysical Mechanism of the Protective Effect of Blue Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevast.) Polyphenols Extracts Against Lipid Peroxidation of Erythrocyte and Lipid Membranes. *Journal of Membrane Biology*. 247 (7), 611-625.
- Boots, A W., Haenen, G R.M.M., Bast, A. (2008). Health effects of quercetin. From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*. 585 (2-3), 325-337.
- Boots, A W., Li, H., Schins, R P.F., Duffin, R., Heemskerk, J. W., Bast, A., Haenen, G. R. (2007). The quercetin paradox. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 222 (1), 89-96.
- Boulton, D W., Walle, U. K., Walle, T. (1998). Extensive Binding of the Bioflavonoid Quercetin to Human Plasma Proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 50 (2), 243-249.
- Braun, K. F., Ehnert, S., Freude, T. u., Egaña, J. T., Schenck, T. L., Buchholz, A., Schmitt, A., Siebenlist, S., Schyschka, L., Neumaier, M., Stöckle, U., Nussler, A. K. (2011). Quercetin Pro-

- ffects Primary Human Osteoblasts Exposed to Cigarette Smoke through Activation of the Antioxidative Enzymes HO-1 and SOD-1. *The Scientific World Journal*. 11, 2348-2357.
- Breck, J E. (2014). Body composition in fishes, body size matters. *Aquaculture*. 433 , 40-49.
- Bundesamt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE). (2013). Daten aufbereitet vom NSC Deutschland.
- Canada, A T., Giannella, E., Nguyen, T D., Mason R. P. (1990). The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. *Free Radical Biology and Medicine*. 9 (5), 441-449.
- Cao, J., Chen, W., Zhang, Y., Xiujuan, Z. (2010). Content of Selected Flavonoids in 100 Edible Vegetables and Fruits. *Food Science and Technology Research*. 16 (5), 395-402.
- Carrasco-Pozo, C., Castillo, R L., Beltrán, Cl., Miranda, A., Fuentes, J., Gotteland, M. (2016). Molecular mechanisms of gastrointestinal protection by quercetin against indomethacin-induced damage. Role of NF- κ B and Nrf2. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 27, 289-298.
- Cermak, R, Landgraf, S., Wolfram, S. (2003). The bioavailability of quercetin in pigs depends on the glycoside moiety and on dietary factors. *Journal of Nutrition* 133 (9), 2802–2807.
- Cermak, R., Föllmer, U., Scharrer, E., Wolfram, S. (1998). The dietary flavonol quercetin induces a chloride secretion in rat colon. *American Journal of Physiology*. 38 (5 Pt 1), 1166-1172.
- Cermak, R., Kuhn, G., Wolfram, S. (2002). The flavonol quercetin activates basolateral K⁺ channels in rat distal colon epithelium. *British Journal of Pharmacology*. 135 (5), 1183-1190.
- Cermak, R., Landgraf, S., Wolfram, S. (2004). Quercetin glucosides inhibit glucose uptake into brush-border-membrane vesicles of porcine jejunum. *British Journal of Nutrition*. 91 (6), 849.
- Cermak, R., Vujcic, Z., Scharrer, E., Wolfram, S. (2001). The impact of different flavonoid classes on colonic Cl⁻ secretion in rats. *Biochemical Pharmacology*. 62 (8), 1145-1151.
- Cermak, R., Wolfram, S. (2010). Comment on Lymphatic Absorption of Quercetin and Rutin in Rat and Their Pharmacokinetics in Systemic Plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (14), 8467-8467.
- Chen, C., Zhou, J., Ji, C. (2010). Quercetin. A potential drug to reverse multidrug resistance. *Life Sciences*. 87 (11-12), 333-338.
- Chen, C.H., Cheng, TH., Lin, H., Shih, N.L., Chen ,Y.L., Chen, Y.S., Cheng,C.F., Lian, W. S., Meng ,T.C., Chiu, W. T., Chen, J. J. (2006). Reactive Oxygen Species Generation Is Involved in Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation through the Transient Oxidization of Src Homology 2-Containing Tyrosine Phosphatase in Endothelin-1 Signaling Pathway in Rat Cardiac Fibroblasts. *Molecular Pharmacology*. 69 (4), 1347-1355.
- Chen, X., Yin, O. Q., Zuo, Z., Chow, M.S. (2005). Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 22 (6), 892–901.
- Chirumbolo, S. (2010). The Role of Quercetin, Flavonols and Flavones in Modulating Inflammatory Cell Function. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*. 9 (4), 263-285.
- Choi, E J., Chee, K M., Lee, B H. (2003). Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. *European Journal of Pharmacology*. 482 (1-3), 281-285.
- Choi, MH, Shim, S M., Kim, G H. (2015). Phenolic acids and quercetin from Korean black raspberry seed protected against acetaminophen-induced oxidative stress in mice. *Journal of Functional Foods*. 19, 404-416.

- Clerton, P., Troutaud, D., Verlhac, V., Gabaudan, J., Deschaux, P. (2001). Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions. Effect on gut and on head kidney leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology*. 11 (1), 1-13.
- Comakli, V., Akkemik, E., Ciftci, M., Kufrevioglu, O. I. (2013). Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and investigation of the effects of some metal ions on enzyme activity. *Toxicology and Industrial Health*. 31 (5), 403-411.
- Comalada, M., Camuesco, D., Sierra, S., Ballester, I., Xaus, J., Gálvez, J., Zarzuelo, A. (2005). In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- κ B pathway. *European Journal of Immunology*. 35 (2), 584-592.
- Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., Oter, S. (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and cell damage in rat pancreas. *Pharmacological Research*. 51 (2), 117-123.
- Coskun, O., M. Kanter, F. Armutcu, K. Cetin, B. Kaybolmaz and O. Yazgan, (2004). Protective effects of quercetin, a flavonoid antioxidant, in absolute ethanol-induced acute gastric ulcer. *European Journal of General Medicine*, 1(3). 37-42.
- Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Cotellet, N., Vézin, H., Demigné, C., Rémésy, C. (2003). The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 284 (6), 980-988.
- Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigne, C., Remesy, C. (2002). Quercetin, but not Its Glycosides, Is Absorbed from the Rat Stomach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (3), 618-621.
- Crespy, V., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Demigne, C., Remesy, C. (1999). Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *American Journal of Physiology*. 277 (1 Pt 1), 120–126.
- Cushnie, T.P. T., Lamb, A J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26 (5), 343-356.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scaccocchio, B., Masella, R. (2010). Bioavailability of the Polyphenols. Status and Controversies. *International Journal of Molecular Sciences*. 11 (4), 1321-1342.
- Dajas, F. (2012). Life or death. Neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *Journal of Ethnopharmacology*. 143 (2), 383-396.
- Davies, K. (2001). Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*. 50 (4), 279-289.
- Day, A. J., Canada, F. J., Diaz, J. C., Kroon, P. A., Melauchlan, R., Faulds, C. B., Plumb, G. W., Morgan, M. R. A., Williamson, G. (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *Federation of European Biochemical Societies Letts*. 468 (2-3), 166-170.
- De Boer, V. C. J., Dihal, A. A., Van der Woude, H., Arts, I. C. W., Wolffram, S., Alink, G. M., Rietjens, I. M. C. M., Keijer, J. und Hollman, P. C. H. (2005). Tissue Distribution of Quercetin in Rats and Pigs. *The Journal of Nutrition*, 135 (7), 1718–1725.

- De Boer, V. C. J., van Schothorst, E. M., Dihal, A. A., Van der Woude, H., Arts, I. C., Rietjens, I.M., Hollman, P. C., Keijer, J. (2006). Chronic quercetin exposure affects fatty acid catabolism in rat lung. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 63 (23), 2847-2858.
- Di Giulio, RT., Hinton, D E (2008). In: *The toxicology of fishes*. CRC Press. 686.
- Dong, Y., Wang, J., Feng, D., Qin, H. Z., Wen, H., Yin, Z. M., Gao, G. D., Li, C. (2014). Protective Effect of Quercetin against Oxidative Stress and Brain Edema in an Experimental Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage. *International Journal of Medical Sciences*. 11 (3), 282-290.
- Donovan, J. L., Bell J. R. C., Kasim-Karakas S. E., German J. B., Walzem R. L., Hansen R. J., Waterhouse, A. L. (1999). Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *Journal of Nutrition* 129 (9), 1662-1668.
- Duarte, S., Paiva, M. A. R., Lara, C. C., Bemquerer, M. P., Araújo, F. (2013). Influence of season, environment and feeding habits on the enzymatic activity of peptidase and β -glucosidase in the gastrointestinal tract of two Siluriformes fishes (Teleostei). *Zoologia* 30 (3), 296–306.
- Dufour, C., Dangles, O. (2005). Flavonoid–serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1721 (1-3), 164-173.
- DuPont, M. S., Mondin, Z., Williamson, G., Price, K. R. (2000). Effect of Variety, Processing, and Storage on the Flavonoid Glycoside Content and Composition of Lettuce and Endive. *Journal of Agricultural and Food*. 48 (9), 3957-3964.
- Eichbaum, M., Schwab, M. (2013). In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 11. Auflage., Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Starke, K., Editoren, Seite 64-83, Urban & Fischer, München.
- Esterbauer, H., Schaur, R J., Zollner, He (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*. 11 (1), 81-128.
- Evans, D H., Claiborne, J B., Currie, S (2013). In: *The Physiology of Fishes*, Fourth Edition. Hoboken. CRC Press.
- Evans, H. M., Bishop, K. S. (1922). On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science*. 56 (1458), 650-651.
- Faizan, M., Stubhaug, I., Menoyo, D., Esatbeyoglu, T., Wagner, A. E., Struksnæs, G., Koppe, W., Rimbach, G. (2013). Dietary Alpha-Tocopherol Affects Tissue Vitamin E and Malondialdehyde Levels but Does not Change Antioxidant Enzymes and Fatty Acid Composition in Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 83 (4), 238-245.
- FAO Fisheries technical paper (2014). *The State of World Fisheries and Aquaculture, Opportunities and challenges*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO/WHO, Fisheries and Aquaculture Report No. 978 (2010). *Joint FAO/WHO Expert Consultation on the Risks and Benefits of Fisch Consumption*.
- Farasat, M., Khavari-Nejad, R-A., Nabavi, S M B. (2013). Antioxidant Properties of two Edible Green Seaweeds from Northern Coasts of the Persian Gulf. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 8 (1), 47-52.
- Filho, D W., Giulivi, C., Boveris, A (1993). Antioxidant defences in marine fish—I. Teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 106 (2), 409-413.

- Fontagné-Dicharry, S., Godin, S., Liu, H., Antony Jesu Prabhu, P., Bouyssière, B., Bueno, M., Tacon, P., Médale, F., Kaushik, S. J. (2015). Influence of the forms and levels of dietary selenium on antioxidant status and oxidative stress-related parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *British Journal of Nutrition*. 113 (12), 1876-1887.
- Førde-Skjærvik, O., Skjærvik, O., Mørkøre, T (2006). Dietary influence on quality of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*). Effect on glycolysis and buffering capacity in white muscle. *Aquaculture*. 252 (2-4), 409-420.
- Forman, H J., Torres, M (2002). Reactive Oxygen Species and Cell Signaling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 166 (1), 4-8.
- Formica, J.V. und Regelson, W. (1995). Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*. 3(12), 1061-80.
- Fraga, C G., Galleano, M., Verstraeten, S V., Oteiza, P I. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*. 31 (6), 435-445.
- Frank, J (2005). Beyond vitamin E supplementation. An alternative strategy to improve vitamin E status. *Journal of Plant Physiology*. 162 (7), 834-843.
- Frank, J., Budek, A., Lundh, T., Parker, R., Swanson, J., Lourenco, C., Gago, B., Laranjinha, J., Vessby, B., Kamal-Eldin, A. (2006). Dietary flavonoids with a catechol structure increase -tocopherol in rats and protect the vitamin from oxidation in vitro. *The Journal of Lipid Research*. 47 (12), 2718-2725.
- Gee, J. M., Du Pont, M. S., Rhodes, M. J., Johnson, I. T. (1998). Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radical Biology & Medicine*. 25 (1), 19-25.
- Gee, J. M., Du Pont, M.S., Day, A.J., Plump, G.W., Williamson, G. und Johnson, I.T. (2000). Intestinal transport of quercetin glycosides in rat involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *Journal of Nutrition*. 130 (11), 2765-2771.
- Goldblatt, D., Thrasher, A. J. (2000). Chronic granulomatous disease- Immunodeficiency review. *Clinical and Experimental Immunology*. 122 (1), 1-9.
- Gomez-Guillen, M. C., Montero, M. P (2007). Polyphenol Uses in Seafood Conservation. *American Journal of Food Technology*. 2 (7), 593-601.
- Gómez-Zubeldia, M., Hernandez, R., Viguera, J., Arbues, J. J., Aparicio, A., Millán, J. C. (2000). Effect of Bilateral Ovariectomy and Ovarian Steroid Hormones on the Antioxidant Systems and Plasma Malondialdehyde Levels in Wistar Rats. *Endocrine Research Journal*. 26 (1), 97-107.
- Graefe, E U., Wittig, J., Mueller, S., Uehleke, B., Drewelow, B., Pforte, H., Jacobasch, G., Derendorf, H., Veit, M. (2001). Pharmacokinetics and Bioavailability of Quercetin Glycosides in Humans . *The Journal of Clinical Pharmacology*. 41 (5), 492-499.
- Graf, B.A., Ameho, C., Dolnikowski, G.G., Milbury, P.E., Chen, C.Y., Blumberg, J.B. (2006). Rat gastrointestinal tissues metabolize quercetin. *Journal of Nutrition*. 136 (1), 39-44.
- Greenlund, L J.S., Deckwerth, T L., Johnson, E M (1995). Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis. A role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron*. 14 (2), 303-315.
- Grotewold, Erich (2006). In: *The science of flavonoids*". New York. Springer.
- Guiguen, Y., Baroiller, J. F., Ricordel, M. J., Iseki, K., Mcmeel, O. M., Martin, S., Fostier, A. (1999). Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species. *The*

- rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Molecular Reproduction and Development*. 54 (2), 154-162.
- Guo, Y., Mah, E., Bruno, R S. (2014). Quercetin bioavailability is associated with inadequate plasma vitamin C status and greater plasma endotoxin in adults. *Nutrition*. 30 (11-12), 1279-1286.
- Haard, N.F. (1992). Control of chemical-composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Research International Journal*. 25 (4), 289-307.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C (1999). In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3th ed. Oxford University Press, Oxford, Vereinigtes Königreich.
- Halver, J E., Ashley, L M. (1972). In: *Fish Nutrition*. New York. Academic Press.
- Ham Y. M., Yoon, W.J., Roh S.W., Jeon Y.J., Oda T., Kang ,S. M, Kang, M.C., Kim, E.A., Kim, D., Kim K.N. (2012). Quercitrin protects against ultraviolet B-induced cell death in vitro and in an in vivo zebrafish model. *Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biology*. 114, 126-131.
- Hamre, K. (2010). Metabolism, interactions, requirements and functions of vitamin E in fish. *Aquaculture Nutrition*. 17 (1), 98-115.
- Hatcher, J.F. und Bryan, G.T. (1985). Factors affecting the mutagenic activity of quercetin for *Salmonella typhimurium* TA98: metal ions, antioxidants and pH. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 148(1-2), 13-23.
- He, F., Mu, L., Yan, G L (2010). Biosynthesis of Anthocyanins and Their Regulation in Colored Grapes. *Molecules*. 15 (12), 9057-9091.
- Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in biology and biochemistry. Role of free radicals". In: Storey, K.B. (Ed.), *Functional Metabolism. Regulation and Adaptation*. Wiley-Liss, Hoboken, 319-368.
- Hertog, M G. L., Hollman, P C. H., Venema, D P. (1992). Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40 (9), 1591-1598.
- Hidalgo, M.C., Expósito, A., Palma, JM., de la Higuera, M. (2002). Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency. *Studies in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 34 (2), 183-193.
- Higson, F.K., Jones, O.T.G. (1984). The generation of active oxygen species by stimulated rainbow trout leucocytes in whole blood. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B. Comparative Biochemistry*. 77 (3), 583-587.
- Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers, M J., Katan M B (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 62 (6), 1276-1282.
- Hollman, P C. H., van Trijp, J M. P., Buysman, M N. (1996). Fluorescence Detection of Flavonols in HPLC by Postcolumn Chelation with Aluminum. *Analytical Chemistry*. 68 (19), 3511-3515.
- Hollman, P C.H. (2004). Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. *Pharmaceutical Biology*. 42 (s1), 74-83.
- Hollman, P C.H., van Trijp, J M.P., Buysman, M N., van der Gaag, MS., Mengelers, M. J., de Vries, JH., Katan, MB. (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 418 (1-2), 152-156.

- Hollman, P C.H., Bijlsman, M N., van Gameren, Y., Cnossen, EP., de Vries, JH., Katan, MB. (1999). The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research*. 31 (6), 569-573.
- Hu J, Chen L, Lei F, Tian Y, Xing DM, Chai YS, Zhao S, Ding Y, Du L.J. (2012). Investigation of quercetin stability in cell culture medium. Role in in vitro experiment. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 6(14), 1069-1076.
- Hung, S.S.O., Moon, T.W., Hilton, J.W., Slinger, S.J. (1982). Uptake, transport and distribution of DL-alpha-tocopheryl acetate compared to D-alpha-tocopherol in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Nutrition*. 112 (8), 1590-1599.
- Hur, W., Gray, N S (2011). Small molecule modulators of antioxidant response pathway. *Current Opinion in Chemical Biology*. 15 (1), 162-173.
- Huss, H H (1995). Quality and quality changes in fresh fish. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 92-5-103507-5.
- Ioku, K., Pongpiriyadacha, Y., Konishi, Y., Takei, Y., Nakatani, N., Terao, J. (1998). β -Glucosidase Activity in the Rat Small Intestine toward Quercetin Monoglucosides. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 62 (7), 1428-1431.
- Janisch, K M., Williamson, G., Needs, P., Plumb, G W. (2004). Properties of Quercetin Conjugates. Modulation of LDL Oxidation and Binding to Human Serum Albumin. *Free Radic Research*. 38 (8), 877-884.
- Janssen-Heininger, Y M. W., Macara, I., Mossman, B T. (1999). Cooperativity between Oxidants and Tumor Necrosis Factor in the Activation of Nuclear Factor (NF)- κ B. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 20 (5), 942-952.
- Jensen, G.E., Clausen, J. (1984). Glutathione peroxidase and reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and catalase activities in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*. 63 (1), 45-53.
- Jensen, S.K., Engberg, R.M., Hedemann, M. S. (1997). All-rac-a-tocopherol acetate is a better vitamin E source than all-rac-a-tocopherol succinate for broilers. *Journal of Nutrition*. 129 (7), 1355-1360.
- Jovanovic, S V., Steenken, S., Hara, Y., Simic, M G. (1996). Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity? *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*. (11), 2497.
- Jung, C. H., Cho, I., Ahn, J., Jeon, T I., Ha, T Y. (2012). Quercetin Reduces High-Fat Diet-Induced Fat Accumulation in the Liver by Regulating Lipid Metabolism Genes. *Phytotherapy Research*. 27 (1), 139-143.
- Jurczuk, M., Brzóska, M., Moniuszko-Jakoniuk, J., Gałazyn-Sidorczuk, M., Kulikowska-Karpińska, E. (2004). Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food and Chemical Toxicology*. 42 (3), 429-438.
- Justino, G. C., Santos, M. R., Canário, S., Borges, C., Florêncio, M. H., Mira, L. (2004). Plasma quercetin metabolites. Structure-antioxidant activity relationships. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 432 (1), 109-121.
- Kaempf-Rotzoll, D E., Traber, M G., Arai, H (2003). Vitamin E and transfer proteins. *Current Opinion in Lipidology*. 14 (3), 249-254.

- Kaldas, M I., Walle, U. K., van der Woude, H., McMillan, J M., Walle, T. (2005). Covalent Binding of the Flavonoid Quercetin to Human Serum Albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (10), 4194-4197.
- Kehrer, JP (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 149 (1), 43-50.
- Kimura, S., Warabi, E., Yanagawa, T., Ma, D., Itoh, K., Ishii, Y., Kawachi, Y., Ishii, T. (2009). Essential role of Nrf2 in keratinocyte protection from UVA by quercetin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 387 (1), 109-114.
- Klaunig, E., Xu, Y., Isenberg, J S., Bachowski, S., Kolaja, K. L., Jiang, J., Stevenson, DE., Walborg, EF Jr. (1998). The Role of Oxidative Stress in Chemical Carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*. 106 (1), 289.
- Kleczkowski, M., Klucinski, W., Sikora, J., Zdanoicz, M., Dziekan, P (2003). Role of the antioxidants in the protection against oxidative stress in cattle – nonenzymatic mechanisms (Part 2). *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 6(4), 301-8.
- Kobayashi, S., Yuki, R (1954a). Differences in Catalase Activity in the Tissues and Blood between the Smolt and Parr of Masu, *Oncorhynchus Masou*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University*.
- Kobayashi, S., Yuki, R (1954b). On The Specificity of kidney Catalase Activity in Salmonid Fishes. *Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University*. 5(2). 137-148.
- Koes, R E., Quattrocchio, F., Mol, J N. M. (1994). The flavonoid biosynthetic pathway in plants. Function and evolution. *Bioessays*. 16 (2), 123-132.
- Kono, Y., Fridovich, I (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *The Journal of Biological Chemistry*. 257 (10), 5751-5754.
- Košinová, P., Berka, K., Wykes, M., Otyepka, M., Trouillas, P. (2012). Positioning of Antioxidant Quercetin and Its Metabolites in Lipid Bilayer Membranes. Implication for Their Lipid-Peroxidation Inhibition. In. *The Journal of Physical Chemistry. B*. 116 (4), 1309-1318.
- Krasnov, A., Reinisalo, M., Pitkänen, T I., Nishikimi, M., Mölsä, H. (1998). Expression of rat gene for l-gulonolactone oxidase, the key enzyme of l-ascorbic acid biosynthesis, in guinea pig cells and in teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1381 (2), 241-248.
- Kremer, B.T., Stahly, T.S., Sebranek, J.G. (1998b). Effect of dietary quercetin on pork quality. *Iowa State Swine Report*. Iowa State University, USA, 30– 34.
- Kurhalyuk, N., Tkachenko, H (2011). Induction of oxidative stress and antioxidant defenses in the livers of sea trout, *Salmo trutta L.*, with ulcerative dermal necrosis. *Archives of Polish Fisheries*. 19 (4), 229-240.
- Lebovitz, R. M., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright, J Jr., Dionne, L., Lu , N., Huang, S., Matzuk, MM. (1996). Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93 (18), 9782-9787.
- Lee, Y., Lee, D. M., Lee, S. H. (2015). Nrf2 Expression and Apoptosis in Quercetin-treated Malignant Mesothelioma Cells. *Molecules and Cells*. 38 (5), 416-425.

- Lee-Hilz, Y. Y., Boerboom, A.M J. F., Westphal, A. H., Berkel, WJ., Aarts, JM., Rietjens, IM. (2006). Pro-Oxidant Activity of Flavonoids Induces EpRE-Mediated Gene Expression. *Chemical Research in Toxicology*. 19 (11), 1499-1505.
- Lemańska, K., van der Woude, H., Szymusiak, H., Boersma, M. G., Gliszczyńska-Swigło, A., Rietjens, I. M., Tyrakowska, B. (2004). The effect of catechol Omethylation on radical scavenging characteristics of quercetin and luteolin -a mechanistic insight. *Free Radic Research* .38 (6), 639–47.
- Lesser, S., Cermak, R., Wolfram, S. (2004). Bioavailability of quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. *Journal of Nutrition*.134 (6), 1508–1511.
- Lesser, S., Wolfram, S. (2006). Oral availability of the flavonol quercetin – A review. *Current topics in Nutraceutical Research* 4 (3-4), 239-256.
- Lopez, M.C., Satue, M.T., Gonzalez, M. L., Agramont, A. (1995). α -Tocopherol content in trout oil. *Food Chemistry*. 53 (1), 67–70.
- Lykkesfeldt, J. (2007). Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica Chimica Acta*. 380 (1-2), 50-58.
- Lykkesfeldt, J., Svendsen, O. (2007). Oxidants and antioxidants in disease. *Oxidative stress in farm animals*. *The Veterinary Journal*. 173 (3), 502-511.
- Macesic, L. J., Summers, A. P. (2012). Flexural stiffness and composition of the batoid propterygium as predictors of punting ability. *Journal of Experimental Biology*. 215 (12), 2003-2012.
- Manach, C., Morand, C., Crespy, V., Demigné, C., Texier, O., Régéat, F., Rémésy, C. (1998). Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 426 (3), 331-336.
- Manach, C., Morand, C., Demigne, C., Texier, O., Régéat, F., Rémésy, C. (1997). Bioavailability of rutin and quercetin in rat. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 409 (1), 12–16.
- Manach, C., Morand, C., Texier, O., Favier, M.-L., Agullo, G., Demigné, C., Régéat, F., Rémésy, C. (1995). Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *Journal of Nutrition*. 125 (7), 1911-1922.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004). Polyphenols food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 79(5), 727-747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 81(1 Suppl), 230-242.
- Marikovsky, M., Nevo, N., Vadai, E., Harris-Cerruti, C. (2002). Cu/Zn superoxide dismutase plays a role in angiogenesis. *International Journal of Cancer*. 97 (1), 34.
- Marikovsky, M., Ziv, V., Nevo, N., Harris-Cerruti, C. Mahler, O. (2003). Cu/Zn Superoxide Dismutase Plays Important Role in Immune Response. *The Journal of Immunology*. 170 (6), 2993-300.1
- Martín, M. Á., Serrano, A. B. G., Ramos, S., Pulido, MI., Bravo, L., Goya, L. (2010). Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 21 (3), 196-205.

- Martínez-Álvarez, R. M., Morales, A. E., Sanz, A. (2005). Antioxidant Defenses in Fish. Biotic and Abiotic Factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 15 (1-2), 75-88.
- McCord, J. M., Fridovich, I (1969). Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*. 244 (22), 6049-6055.
- McDowell L. (2000). In: *Vitamins in Animal and Human Nutrition*. (2nd Edition). Ames. Iowa State University Press, 265-310.
- Metodiewa, D., Jaiswal, A. K., Cenas, N., Dickançaitė, E., Segura-Aguilar, J. (1999). Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radical Biology and Medicine*. 26 (1-2), 107-116.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J. (1994). Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and CU/ZN-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 17 (3), 235-248.
- Middleton, E., Jr., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells. Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* 52 (4), 673-751.
- Miglio, C., Chiavaro, E., Visconti, A., Fogliano, V., Pellegrini, N. (2008). Effects of Different Cooking Methods on Nutritional and Physicochemical Characteristics of Selected Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 (1), 139-147.
- Min, B., Ahn, D. U. (2005). Mechanism of Lipid Peroxidation in Meat and Meat Products -A Review. *The Food Science and Biotechnology*. 14 (1), 152-163.
- Mira, L., Tereza Fernandez, M., Santos, M., Rocha, R., Florêncio, M. H., Jennings, KR. (2002). Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions. A Mechanism for their Antioxidant Activity. *Free Radical Research*. 36 (11), 1199-1208.
- Molina, M. F., Sanchez-Reus, I., Iglesias, I., Benedi, J. (2003). Quercetin, a Flavonoid Antioxidant, Prevents and Protects against Ethanol-Induced Oxidative Stress in Mouse Liver. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 26 (10), 1398-1402.
- Mortelette, H., Moisan, C., Sébert, P., Belhomme, M., Amérand, A. (2010). Fish as a model in investigations about the relationship between oxygen consumption and hydroxyl radical production in permeabilized muscle fibers. *Mitochondrion*. 10 (5), 555-558.
- Mukai, R., Fujikura, Y., Murota, K., Uehara, M., Minekawa, S., Matsui, N., Kawamura, T., Nemoto, H., Terao, J. (2013). Prenylation Enhances Quercetin Uptake and Reduces Efflux in Caco-2 Cells and Enhances Tissue Accumulation in Mice Fed Long-Term. *Journal of Nutrition*. 143 (10), 1558-1564.
- Mullen, W., Graf, B. A., Caldwell, S.T., Hartley, R. C., Duthie, G. G., Edwards, CA., Lean, ME., Crozier, A. (2002). Determination of Flavonol Metabolites in Plasma and Tissues of Rats by HPLC -Radiocounting and Tandem Mass Spectrometry Following Oral Ingestion of [2- 14 C] Quercetin-4'-glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (23), 6902-6909.
- Mullen, W., Stewart, A. J., Lean, M. E. J., Gardner, P., Duthie, G. G., Crozier, A. (2002). Effect of Freezing and Storage on the Phenolics, Ellagitannins, Flavonoids, and Antioxidant Capacity of Red Raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (18), 5197-5201.
- Murakami, A., Ashida, H., Terao, J (2008). Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Letters*. 269 (2), 315-325.

- Murota, K., Cermak, R., Terao, J., Wolffram, S. (2013). Influence of fatty acid patterns on the intestinal absorption pathway of quercetin in thoracic lymph duct-cannulated rats. *British Journal of Nutrition*. 109 (12), 2147-2153.
- Murota, K., Hotta, A., Ido, H., Kawai Y., Moon J.H., Sekido, K., Hayashi, H., Inakuma, T., Terao, J. (2007). Antioxidant capacity of albumin-bound quercetin metabolites after onion consumption in humans. *The Journal of Medical Investigation*. 54 (3, 4), 370-374.
- Murota, K., Terao, J (2005). Quercetin appears in the lymph of unanesthetized rats as its phase II metabolites after administered into the stomach. *Federation of European Biochemical Societies Letts*. 579 (24), 5343-5346.
- Murray, J., Burt, J. R. (2001). *The Composition of Fish*. Torry Advisory Note No. 38, Ministry of Technology, Torry Research Station.
- Nabb, D. L., Mingoia, R. T., Yang, Han, X. (2006). Comparison of basal level metabolic enzyme activities of freshly isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and rat. *Aquatic Toxicology*. 80 (1), 52-59.
- Naumann, C., Bassler, R., (1976). In: *VDLUFA-Methodenbuch*. Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. Mit Ergänzungslieferungen von 1983, 1988, 1993 und 1997, Neumann-Neudamm, Melsungen, Germany.
- Németh, K., Plumb, G.W., Berrin, J., Juge, N., Jacob, R., Naim, H.Y., Williamson, G., Swallow, D.M., Kroon P.A. (2003). Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *European Journal of Nutrition*. 42 (1), 29-42.
- Ng, W (2004). Replacement of dietary fish oil with palm fatty acid distillate elevates tocopherol and tocotrienol concentrations and increases oxidative stability in the muscle of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*. 233 (1-4), 423-437.
- Nguyen, T., Nioi, P., Pickett, C. B. (2009). The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry*. 284 (20), 13291-13295.
- Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. (1997). Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress. Reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry*, 43 (7), 1209-14.
- Nielsen, S. E., Breinholt, V., Justesen, U., Cornett, C. & Dragsted, L. O. (1998). In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. *Xenobiotica* 28 (4), 389–401.
- Noaman, E., Zahran, A. M., Kamal, A. M., Omran, MF. (2002). Vitamin E and Selenium Administration as a Modulator of Antioxidant Defense System. *Biological Trace Element Research*. 86 (1), 55-64.
- NRC (2011). In: *Nutrient requirements of fish and shrimp*, National Research Council of the National Academies Washington, D.C (U.S.).
- Oberley, L. W., Buettner, GR. (1979). Role of superoxide dismutase in cancer. A review. *Cancer Research*. 39(4), 1141-9.
- Olsen, S. H. (2011). Quantification and characterisation of residual blood in fish muscle – Impact of slaughtering methods. University of Tromsø UIT, Faculty of Biosciences, Fisheries and Economics Department of Norwegian College of Fishery Science.

- Olson, K. R. (1996). Secondary circulation in fish. Anatomical organization and physiological significance. *The Journal of Experimental Zoology*. 275 (23), 172-185.
- Otto, D.M. E., Moon, T. W. (1996). Endogenous antioxidant systems of two teleost fish, the rainbow trout and the black bullhead, and the effect of age. *Fish Physiology and Biochemistry*. 15 (4), 349-358.
- Packer, L., Obermüller-Jevic UC (2002). Vitamin E. an introduction. In: *The Antioxidant Vitamins C and E*. 131–151. Champaign IL. AOCS Press.
- Pamplona, R., Costantini, D. (2011). Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 301 (4), 843-863.
- Pan, C., Chien, Y., Wang, Y. (2011). Antioxidant defence to ammonia stress of characins (*Hypophessobrycon eques* Steindachner) fed diets supplemented with carotenoids. *Aquaculture Nutrition*, 17(3). 258-266.
- Papadopoulou, A., Green, R J., Frazier, R.A. (2005). Interaction of Flavonoids with Bovine Serum Albumin. A Fluorescence Quenching Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (1), 158-163.
- Park, K. H., de Oca, G. A. R.-M., Bonello, P., Lee, K.J., Dabrowski, K. (2008). Determination of quercetin concentrations in fish tissues after feeding quercetin containing diets. *Aquaculture International*, 17 (6): 537-544.
- Pascual, P., Pedrajas, J.R., Toribio, F., López-Barea, J., Peinado, J. (2003). Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chemico-Biological Interactions*. 145 (2), 191-199.
- Pavlović, S. Z., Mitić, S. S., Borković, R., Tijana B. (2010). Seasonal Variations of the Activity of Antioxidant Defense Enzymes in the Red Mullet (*Mullus barbatus* L.) from the Adriatic Sea. *Marine Drugs*. 8 (3), 413-428.
- Pazos, M., Gallardo, J. M., Torres, J. L., Medina, I. (2005b). Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chemistry*. 92 (3), 547-557.
- Pazos, M., González, M J., Gallardo, J M., Medina, I (2005a). Preservation of the endogenous antioxidant system of fish muscle by grape polyphenols during frozen storage. *European Food Research and Technology*. 220 (5-6), 514-519.
- Pedrajas, J.R., Peinado, J., López-Barea, J. (1995). Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu, Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chemico-Biological Interactions*. 98 (3), 267-282.
- Pedrielli, P., Skibsted, L.H., (2002). Anti-oxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-) epicatechin, and (+)-catechin on alpha-tocopherol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (24), 7138 – 7144.
- Pelissero, C., Lenczowski, M.J.P., Chinzi, D., Davail-Cuisset, B., Sumpter, J. P., Fostier, A. (1996). Effects of flavonoids on aromatase activity, an in vitro study. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 57 (3-4), 215-223.
- Pérez-Campo, R., López-Torres, M., Rojas, C., Cadenas, S., Barja, G. (1993). A comparative study of free radicals in vertebrates—I. Antioxidant enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B. Comparative Biochemistry*. 105 (3-4), 749-755.
- Perugini, C., Bagnati, M., Cau, C., Bordone, R., Zoppis, E., Paffoni, P., Re, R., Albano, E., Bellomo, G. (2000). Distribution of lipid-soluble antioxidants in lipoproteins from healthy subjects, Corre-

- lation with plasma antioxidant levels and composition of lipoproteins. *Pharmacological Research*. 41(1), 53–63.
- Pietta, P-G (2000). *ChemInform Abstract. Flavonoids as Antioxidants*. *ChemInform*. 31 (42).
- Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., Zachary, MD., Remacle, J. (1990). Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mechanisms of Ageing and Development*. 51 (3), 283-297.
- Pillariseti, S., Saxena, U. (2004). Role of oxidative stress and inflammation in the origin of Type 2 diabetes – a paradigm shift. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 8 (5), 401-408.
- Pizzorno, J. E., Murray, M.T (o. J.). (2012). In: *Textbook of natural medicine*. 4th Edition, Elsevier - Health Sciences Division, Auflage. 4.
- Plakas, S.M., Lee, T.-C., Wolke, R.E. (1985). Absence of overt toxicity from feeding the flavonol, quercetin, to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). In. *Food and Chemical Toxicology*. 23 (12), 1077-1080.
- Podda, M., Weber, C., Traber, M.G., Packer, L. (1996). Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinols, and ubiquinones. *The Journal of Lipid Research*. 37(4), 893-901.
- Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 82 (4), 513-523.
- Proctor, PH., Reynolds, E.S. (1984). Free radicals and disease in man. *Suchergebnisse Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR*. 16 (3), 175-95.
- Pryor, W A (1986). *Oxy-Radicals and Related Species. Their Formation, Lifetimes, and Reactions*. *Annual Review of Physiology*. 48 (1), 657-667.
- Radovanovic, T., Borkovic-Mitic, S., Perendija, B. u. a. (2010). Superoxide dismutase and catalase activities in the liver and muscle of barbel (*Barbus barbus*) and its intestinal parasite (*Pomphorynchus laevis*) from the Danube River, Serbia. *Archives of Biological Sciences Journal*. 62 (1), 97-105.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V. (2014). *Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay*. *BioMed Research International*. 1-19.
- Ramanathan, L., Das, N. P. (1992). Studies on the control of lipid oxidation in ground fish by some polyphenolic natural products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40 (1), 17-21.
- Ramos, F. A., Takaishi, Y., Shirotori, M., Kawaguchi, Y., Tsuchiya, K., Shibata, H., Higuti, T., Tadokoro, T., Takeuchi, M. (2006). *Antibacterial and Antioxidant Activities of Quercetin Oxidation Products from Yellow Onion (*Allium cepa*) Skin*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (10), 3551-3557.
- Ramyaa, P., krishnaswamy, R., Padma, V. V. (2014). Quercetin modulates OTA-induced oxidative stress and redox signalling in HepG2 cells up regulation of Nrf2 expression and down regulation of NF- κ B and COX-2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1840 (1), 681-692.
- Reboul, E., Klein, A., Bietrix, F., Gleize, B., Malezet-Desmoulins, C., Schneider, M., Margotat, A., Lagrost, L., Collet, X., Borel, P (2005). Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) Is Involved in Vitamin E Transport across the Enterocyte. *Journal of Biological Chemistry*. 281 (8), 4739-4745.

- Reinboth, M., Wolfram, S., Abraham, G., Ungemach, F.R., Cermak R. (2010). Oral bioavailability of quercetin from different quercetin glycosides in dogs. *British Journal of Nutrition*. 104 (02), 198-203.
- Reiser, S., Wuertz, S., Schroeder, J.P., Kloas, W., Hanel, R. (2011). Risks of seawater ozonation in recirculation aquaculture – Effects of oxidative stress on animal welfare of juvenile turbot (*Psetta maxima* L.). *Aquatic Toxicology*. 105 (3-4), 508-517.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*. 2 (4), 152-159.
- Rings, E.H.H.M., Erik H. van Beers, S.D., Krasinski, M. V., Robert K., Montgomery, R. J., Grand, J. D and Buller, H.A. (1994). Lactase. Origin, gene-expression, localization and function. *Nutrition Research*.14 (5), 775-797.
- Roberts, R.J (2012). In: *Fish Pathology*. 4th ed. Hoboken. John Wiley & Sons.
- Robey, R.W., To, K. K.K., Polgar, O., Dohse, M., Fetsch, P., Dean, M., Bates, SE. (2009). ABCG2. A perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61 (1), 3-13.
- Rodrigo, R., Miranda, A., Vergara, L (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*. 412 (5-6), 410-424.
- Romero, M., Jiménez, R., Hurtado, B., Moreno, J.M., Rodríguez-Gómez, I., López-Sepúlveda, R., Zarzuelo, A., Pérez-Vizcaino, F., Tamargo, J., Vargas, F., Duarte, J. (2010). Lack of beneficial metabolic effects of quercetin in adult spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology*. 627 (1-3), 242-250.
- Ross, D. A. (2000). In: *Fisherman's Ocean, How Marine Science Can Help You Find and Catch More Fish* .Stackpole Books. Illustrated edition.
- Rudneva, I.I. (1997). Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranch and teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 118 (2), 255-260.
- Rupasinghe, H.P.V., Ronalds, C. M., Rathgeber, B., Robinson, R.A. (2010). Absorption and tissue distribution of dietary quercetin and quercetin glycosides of apple skin in broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90 (7), 1172-1178.
- Selma, M. V., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A. (2009). Interaction between Phenolics and Gut Microbiota. Role in Human Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 (15), 6485-6501.
- Sengupta, B., Sengupta, P. K. (2002). The interaction of quercetin with human serum albumin. a fluorescence spectroscopic study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 299 (3), 400-403.
- Serafini, M., Peluso, I., Raguzzini, A. (2010). Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*.69 (3), 273-8.
- Sesink, A. L. A. (2005). Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp1/Abcg2) Limits Net Intestinal Uptake of Quercetin in Rats by Facilitating Apical Efflux of Glucuronides. *Molecular Pharmacology*. 67 (6), 1999-2006.
- Sesink, A. L. A., O'Leary, K. A., Hollman, P.C. (2001). Quercetin Glucuronides but Not Glucosides Are Present in Human Plasma after Consumption of Quercetin-3-Glucoside or Quercetin-4'-Glucoside. *Human Nutrition and Metabolism Research Communication*. 131(7), 1938-1941.

- Sesink, A. L., Arts, I. C., Faassen-Peters, M. and Hollman, P. C. (2003). Intestinal uptake of quercetin-3-glucoside in rats involves hydrolysis by lactase phlorizin hydrolase. *Journal of Nutrition*. 133 (3), 773-776.
- Sevcikova, M., Modra, H., Slaninova, A., Svobodova, Z. (2011). Metals as a cause of oxidative stress in fish. a review. University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic. 56, (11). 537-546.
- Sharp, G.J.E., Secombes, C.J. (1993). The role of reactive oxygen species in the killing of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. *Fish & Shellfish Immunology*. 3 (2), 119-129.
- Shen, G., Jeong, H. R., Kong, A. N. (2005). Regulation of Nrf2, NF- κ B, and AP-1 Signaling Pathways by Chemopreventive Agents. *Antioxidants & Redox Signaling*. 7 (11-12), 1648-1663.
- Sheridan, M.A. (1988). Lipid dynamics in fish. Aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B. Comparative Biochemistry*. 90 (4), 679-690.
- Shin, H. S., Yoo, J. H., Min, T. S., Choi, C. Y. (2010b). Effect of Quercetin on the Activity and mRNA Expression of Antioxidant Enzymes and Physiological Responses in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Exposed to Cadmium. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 23 (6), 742-749.
- Shin, H. S., Yoo, J. H., Min, T. S., Lee, K-Y., Choi, C. Y. (2010a). The Effects of Quercetin on Physiological Characteristics and Oxidative Stress Resistance in Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 23 (5), 588-597.
- Sies, H (1997). Oxidative stress. Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 82 (2), 291-295.
- Smith, A.C. (1976). Catalase in fish red blood cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B. Comparative Biochemistry*. 54 (3), 331-332.
- Souza, P.C. de., Bonilla-Rodriguez, G.O. (2007). Fish hemoglobins. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 40 (6), 769-778.
- Spencer, J. P. E., Abd El Mohsen, M.M., Minihaane, A., Mathers, J.C. (2007). Biomarkers of the intake of dietary polyphenols. Strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition*. 99 (01), 12-22.
- Szent-Györgyi. Nobel Lecture (1937). Oxidation, Energy Transfer, and Vitamins.
- Tanigawa, S., Fuiii, M., Hou, D. (2007). Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. *Free Radical Biology and Medicine*. 42 (11), 1690-1703.
- Thannickal VJ, Fanburg BL. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology Lung Cellular*. 279 (6), 1005-28.
- Tichivangana, J.Z., Morrissey, P.A. (1985). Metmyoglobin and inorganic metals as pro-oxidants in raw and cooked muscle systems. *Meat Science*. 15 (2), 107-116.
- Tierney, K P., Farrell, A P, Brauner, C J. (2014). In: *Fish Physiology. Organic Chemical Toxicology of Fishes*. Fish Physiology Band 33.
- Tiwari, S (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Cells. *Global Journal For research Analysis*. 3 (8), 11-14.

- Touhata, K., Toyohara, H., Mitani, T., Kinoshita, M., Satou, M., Sakaguchi, M. (1995). Distribution of L-Gulonolactone Oxidase among Fishes. *Fisheries Science*. 61, 729-730.
- Trenzado, C., Hidalgo, M. C., García-Gallego, M., Amalia, E., Moralesa, M., Alberto Domezainb, Julio Domezainb, A.S. (2006). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture*. 254 (1-4), 758-767.
- Trischitta, F., Faggio, C (2006). Effect of the flavonol quercetin on ion transport in the isolated intestine of the eel, *Anguilla Anguilla*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicology & Pharmacology*. 143 (1), 17-22.
- Tsuji, P.A., Walle, T. (2008). Cytotoxic effects of the dietary flavones chrysin and apigenin in a normal trout liver cell line. *Chemico-Biological Interactions*. 171 (1), 37-44.
- Uygun, R., Yagmurca, M., Alkoc, O. A., Genc, A., Songur, A., Uçok, K., Ozen, O. (2013). Effects of quercetin and fish n-3 fatty acids on testicular injury induced by ethanol in rats. *Andrologia*. 46 (4), 356-369.
- Vagni, S., Saccone, F., Pinotti, L., Antonella, B. (2011). Vitamin E Bioavailability. Past and Present Insights. *Food and Nutrition Sciences*. 02 (10), 1088-1096.
- Van Acker, F.A., Schouten, O., Haenen, G.R., Van der Vijgh, W.J., Bast, A. (2000). Flavonoids can replace alpha-tocopherol as an anti-oxidant. *Federation of European Biochemical Societies Letts*. 473 (2), 145 – 148.
- Varela-Valencia, R., Gómez-Ortiz, N., Oskam, G., Del Río-García, M., Albores-Medina, A., Zapata-Perez, O. (2014). The effect of titanium dioxide nanoparticles on antioxidant gene expression in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Nanoparticle Research*. 16 (4).
- Vasyukiv, Olena Yu., Kubrak, Olga I., Storey, Kenneth B., Lushchak, V (2011). Catalase activity as a potential vital biomarker of fish intoxication by the herbicide aminotriazole. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 101 (1), 1-5.
- Vélez-Alavez, M., De Anda-Montañez, J. A., Galván-Magaña, F., Zenteno-Savín, T. (2015). Comparative study of enzymatic antioxidants in muscle of elasmobranch and teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A. Molecular & Integrative Physiology*. 187, 61-65.
- Watjen W, Michels G, Steffan B, Niering P, Chovolou Y, Kampkotter A., Tran-Thi, Q. H., Proksch, P., Kahl, R. (2005). Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *Journal of Nutrition*, 135 (3), 525–531.
- Wein, S., Behm, N., Petersen, R. K., Kristiansen, K., Wolffram, S. (2010). Quercetin enhances adiponectin secretion by a PPAR- γ independent mechanism. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 41 (1), 16-22.
- Wein, S., Wolffram, S. (2013). Oral Bioavailability of Quercetin in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*. 33 (6), 441-445.
- Weiser, H. and M. Vecchi (1981). Stereoisomers of alpha-tocopheryl acetate. Characterization of the samples by physico-chemical methods and determination of biological activities in the rat resorption-gestation test. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 51(2), 100-13.
- Weydert, C. J., Cullen, J. J (2009). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols*. 5 (1), 51-66.

- Wiegand, H., Boesch-Saadatmandi, C., Wein, S., Wolfram, S., Frank, J., Rimbach, G. (2009). Dietary flavonoids do not affect vitamin E status in growing rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 94 (3), 307-318.
- Williams, P. L., James, R. C., Roberts, S. M. (2000). In: *Principles of toxicology*. New York. Wiley. Biotransformation reactions. S.77.
- Williams, R. J., Spencer, J.P.E., Rice-Evans, C (2004). Flavonoids. Antioxidants or signalling molecules?. *Free Radical Biology and Medicine*. 36 (7), 838-849.
- Williamson, G., Aeberli, I., Miguet, L., Zhang, Z., Sanchez, M. B., Crespy, V., Barron, D., Needs, P., Kroon, P. A., Glavinias, H., Krajcsi, P., Grigorov, M. (2007). Interaction of Positional Isomers of Quercetin Glucuronides with the Transporter ABCC2 (cMOAT, MRP2). *Drug Metabolism and Disposition*. 35 (8), 1262-1268.
- Wink, M (o. J.). In: *Annual Plant Reviews, Volume 39, 2nd Edition, Functions and biotechnology of plant secondary metabolites*. Chichester, West Sussex, UK. Wiley-Blackwell.
- Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid Biosynthesis A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology*. 126 (2), 485-493.
- Wolfram, S., Block, M., Ader, P. (2002). Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *Journal of Nutrition* 132 (4), 630-635.
- Wong, C.C., Akiyama, Y., Abe, T., Lippiat J.D., Orfila, C., Williamson, G. (2012). Carrier-mediated transport of quercetin conjugates. Involvement of organic anion transporters and organic anion transporting polypeptides. *Biochemical Pharmacology*. 84 (4), 564-570.
- Xu, B., Chang, S. K. C. (2009). Total Phenolic, Phenolic Acid, Anthocyanin, Flavan-3-ol, and Flavonol Profiles and Antioxidant Properties of Pinto and Black Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as Affected by Thermal Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 (11), 4754-4764.
- Yoshie, Y., Hsieh, Y.P., Suzuki, T. (2003). Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. *Journal of the Tokyo University of Fisheries*. 89. 1-6
- Yoshie, Y., Wang, W., Petillo, D., Suzuki, T. (2000). Distribution of catechins in Japanese seaweeds. *Fisheries Science*. 66 (5), 998-1000.
- Zeng, L.M., Wang, C.J., Su, J.Y., Li, D., Owen, N.L., Lu, Y., Lu, N., Zheng, Q.T (2010). Flavonoids from the red alga *Acanthophora spicifera*. *Chinese Journal of Chemistry*. 19 (11), 1097-1100.
- Zhai, S. W., Liu, S. L (2013). Effects of dietary quercetin on growth performance, serum lipids level and body composition of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Italian Journal of Animal Science*. 12 (4), 523- 32.
- Zou, Y., Lu, Y., Wei, D (2005). Hypocholesterolemic Effects of a Flavonoid-Rich Extract of *Hypericum perforatum* L. in Rats Fed a Cholesterol-Rich Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (7), 2462-2466.
- Zsila, F., Bikádi, Z., Simonyi, M (2003). Probing the binding of the flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modeling methods. *Biochemical Pharmacology*. 65 (3), 447-456.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die mir während der Promotionszeit fachlich wie auch privat zur Seite gestanden haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wolfram. Ich danke Ihnen für die Bereitstellung des hochinteressanten Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Projektbearbeitung. In jeder Phase meiner Arbeit wurde ich intensiv, professionell und sehr warmherzig von ihm begleitet.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Dr. Ralf Blank für die fachliche Betreuung sowie die umfangreiche Unterstützung bedanken.

Ich danke ganz herzlich Priv.-Doz. Dr. Silvia Wein. Ihr kompetenter Rat und ihre Hilfe kamen mir in zahlreichen Angelegenheiten sehr zugute.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Carsten Schulz sowie den Kollegen vom GMA für die hervorragende Zusammenarbeit sowie die Hilfe bei der Durchführung der Tierversuche. Insbesondere möchte ich mich ganz herzlich bei Markus Griese für seine Unterstützung und Hilfestellung während der Tierversuche in Büsum bedanken.

An dieser Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei allen Kollegen sowie allen (ehemaligen) Doktoranden des Instituts für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie der Universität Kiel. Ich werde mich immer gerne an das gemeinsame Arbeiten erinnern. Sie waren für mich nicht nur nette Kollegen, sondern wie eine zweite Familie in Deutschland. Vielen Dank für alles.

Birgit, Anika, Franziska, Simon, Charlotte, Kristina und Sandra danke ich ganz herzlich für ihre Freundschaft, Hilfsbereitschaft und jeden anderen wertvollen, unterstützenden Beistand.

Mein Dank geht ebenso an das technische Personal des Instituts. Ich bedanke mich ganz herzlich bei Wiebke, Monika, Petra, Jessica, Maike und Annette für die Unterstützung bei sämtlichen Laborarbeiten sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ein großes Dankeschön geht auch an Anita Käseberg.

Von Herzen danke ich meinen Freunden, insbesondere Babak, Samira, Michel und Michaela für ihre seelische Unterstützung sowie alle aufmunternden Worte.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, die es mir überhaupt erst ermöglichte in Deutschland zu studieren, bedanken. Vielen Dank für ihre Motivation sowie die seelische als auch finanzielle Unterstützung. Ich bin stolz darauf, euer Sohn zu sein.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Faraz Ansari
Anschrift: Elfriede-Dietrich-Str 112
24106 Kiel
Geburtsdatum/-ort: 26.01.1982/Täbriz
Staatsangehörigkeit: deutsch/persisch
Familienstand: ledig

Hochschulausbildung

09/2001 - 02/2006 **Studium der Agrarwissenschaften** an der Azad Universität Shabestar (Iran)
Thema der Diplomarbeit: „Optimierung von Haltung und Ernährung der Masthähnchen“

Abschluss: Diplom-Ingenieur

10/2008 - 01/2011 **Studium der Agrarwissenschaften** an der **Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**
Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät, Studiengang: Nutztierwissenschaften

Thema der Masterarbeit: „Kallikrein B1 als Kandidatengen für somatische Zellzahl beim Deutschen Holstein“

Abschluss: Master of Science (M.Sc.) Agrarwissenschaften

07/2012 - 07/2016 **Promotion** an der **Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**
Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät, Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie

Berufstätigkeit

07/2012 – 12/15 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter** am Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Praktika

04/2005-10/2005 Praktikum bei Fa. Morghak Vertriebs Händler von Legehennen der Rasse Hy-Line (Iran).