Auswirkungen einer gestaffelten Langzeitversorgung mit L-Arginin auf metabolische und klinische Reaktionen gegenüber *Escherichia coli* Endotoxin bei genetisch divergenten Reinzuchtjunghennen

M.-A. Lieboldt[1], J. Frahm[1], I. Halle[1], S. Görs[2], C.C. Metges[2], S. Weigend[3], S. Schrader[4], R. Preisinger[5], G. Breves[6] und S. Dänicke[1]

[1]*Institut für Tierernährung, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Bundesallee 50, 38116 Braunschweig*

[2]*Institut für Ernährungsphysiologie „Oskar Kellner", Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf*

[3]*Institut für Nutztiergenetik, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Friedrich-Loeffler-Institut, Höltystraße10, 31535 Neustadt-Mariensee*

[4]*Institut für Tierschutz und Tierhaltung, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Friedrich-Loeffler-Institut, Dörnbergstraße 25/27, 29223 Celle*

[5]*Lohmann Tierzucht GmbH, Am Seedeich 9-11, 27472 Cuxhaven*

[6]*Physiologisches Institut, Tierärztliche Hochschule Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover*

Einleitung

L-Arginin (Arg) ist eine essentielle Aminosäure (AS) beim Huhn, die neben ihrer anabolen Wirkung eine Vielzahl von regulativen Aufgaben bei der Futteraufnahme, Hormonfreisetzung und Immunantwort besitzt. Lipopolysaccharid (LPS), ein Zellwandbestandteil und Endotoxin gramnegativer Bakterien aktiviert die angeborene Immunantwort und löst eine Akute-Phase-Reaktion (APR) mit gravierenden Veränderungen des Protein- und AS-Stoffwechsels bei Säugern und Vögeln aus (Xie *et al.*, 2000; Barnes *et al.*, 2002). Studien an APR-Modellen mit Nagern (Saito *et al.*, 1987) zeigen, dass der Plasmaspiegel von Arg unter den Bedingungen einer APR vermindert ist und dass eine zusätzliche enterale Arg-Gabe pathologischen Veränderungen im Proteinstoffwechsel wie einer verschlechterten N-Bilanz entgegenwirken kann. Das Ziel der aktuellen Studie war daher, die Effekte einer gestaffelten Arg-Versorgung auf den N-Metabolismus von 18-Wochen-alten Junghennen (JH) vier genetisch divergenter Reinzuchtlegelinien im Rahmen einer *E.coli* LPS-induzierten APR zu untersuchen.

Material und Methoden

Die verwendeten Reinzuchtlinien sind Bestandteil eines 4-Linien-Modells, das zwei hochleistende Linien (WLA und BLA) aus dem Zuchtprogramm der Lohmann Tierzucht GmbH (Cuxhaven) mit zwei minderleistenden Linien (R11 und L68) des Instituts für Nutztiergenetik (FLI, Neustadt-Mariensee) vergleicht. WLA und R11 gehören der Herkunft White Leghorn an, die sich genetisch stark von den braunen Rhode Island Red (BLA) und New Hampshire (L68) unterscheidet. Für den aktuellen Versuch wurden je sechs 18 Wochen alte JH pro Linie und Futtergruppe verwendet, die seit ihrem Schlupf mit 70, 100 und 200 % der nach NRC (1994) empfohlenen Arg-Konzentration *ad libitum* aufgezogen wurden. In ihrer 16. Lebenswoche (LW) erfolgte eine Operation unter Vollnarkose, in der ein Datenlogger (DS1921H-F5 Thermochron iButton®, Maxim Integrated) zur Erfassung der Körperkerntemperatur in 10-Minuten-Intervallen in die Leibeshöhle der JH implantiert wurde. Nach der Operation wurden die JH einzeln in Stoffwechselkäfigen aufgestallt und weiterhin mit den drei Rationen von 70 (LA), 100 (AA) und 200 (HA) % der empfohlenen Arg-Konzentration (NRC, 1994) *ad libitum* gefüttert. Die Rationen enthielten 4.7, 6.4 und 13.4 g Arg pro kg Ration und entsprechend 20.5, 21.9 und 23.1 g N pro kg Ration. Nach einer 10-tägigen Erholungs- und Anpassungsphase fand der eigentliche Versuch in der 18. LW statt, unterteilt in 5 Tage unter physiologischen (*ante injectionem; a. inj.*) und 2 Tage unter pathophysiologischen Bedingungen (*post injectionem; p. inj.*). Zu Beginn des 6. Versuchstages wurden pro Versuchsgruppe je 3 JH 2 mg *E.coli* LPS pro kg Körpergewicht und je 3 JH 1 ml 0.9 %ige Kochsalzlösung (Kontrolle) intramuskulär injiziert. In den nachfolgenden 48 Stunden wurden klinische Symptome und Körperkerntemperatur der JH erfasst. Zu Beginn eines jeden Versuchstages wurden die Lebendmasse und das Restfutter der Tiere dokumentiert. Während der Versuchswoche wurden außerdem sämtliche Exkremente der JH zweimal täglich gesammelt, für die Tage 1-5 zu einer Probe gepoolt und für die Tage 6 und 7 jeweils separat gesammelt. Diese Exkremente wurden homogenisiert und über 48 Stunden gefriergetrocknet. Anschließend erfolgte die Vermahlung der Proben durch ein 0.5 mm Sieb sowie die Analyse auf Restfeuchte, Trockensubstanz und Dumas Stickstoff. Futterproben wurden auf Restfeuchte, Trockensubstanz und Kjeldahl Stickstoff analysiert. Alle Analysen erfolgten auf Grundlage der Methodensammlung der VDLUFA (Bassler, 1997). Ausgehend von den durchgeführten Messungen und Analysen wurden die tägliche Gewichtszunahme, Futteraufnahme sowie die N-Aufnahme, N-

In: A. Zeyner, H. Kluth, M. Bulang, M. Bochnia und M. Glatter (Hrsg.)
13. Tagung Schweine- und Geflügelernährung, 24.-26. November 2015, Lutherstadt Wittenberg,
Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Universität Halle-Wittenberg, ISBN: 978-3-86829-748-590

Ausscheidung und N-Retention für jede JH individuell unter physiologischen (Tag 1-5) und pathophysiologischen Bedingungen (Tag 6 und 7) berechnet. Um Legelinien-abhängige Unterschiede in der Lebendmasse bei Wachstums- und N-Bilanz-assoziierten Parametern zu berücksichtigen, wurden alle Daten auf das metabolische Körpergewicht ($kg^{0.67}$) bezogen. Am Ende des Versuches (48 Stunden *p. inj.*) erfolgte zudem die Schlachtung der Tiere durch Ausbluten über die Halsgefäße. Hierbei wurden 10 ml heparinisiertes Blut gesammelt, zentrifugiert (1500 x *g*, 4 °C, 15 min) und das gewonnene Blutplasma mittels HPLC-Methode nach Kuhla *et al.* (2010) quantitativ auf AS analysiert.

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte unter Verwendung der Prozedur MIXED des Softwarepaketes SAS 9.4 (SAS Institute Inc., 2012). Als fixe Effekte wurden „Genotyp" (WLA, BLA, R11, L68), „Futter" (LA, AA, HA), „Behandlung" (LPS vs. Kochsalz-Kontrolle) und „Zeit" (Tag 1-5, Tag 6, Tag 7) sowie deren Interaktionen berücksichtigt. Für Merkmale, die am selben Tier wiederholt gemessen wurden, beinhaltete das statistische Model einen *repeated* Ausdruck zur Berücksichtigung von Ähnlichkeiten innerhalb eines Individuums. Der multiple Mittelwertvergleich wurde mittels des Tukey-Kramer-Test durchgeführt. Unterschiede zwischen Gruppen gelten als statistisch signifikant für $p \leq 0.05$. Nachfolgend sind die Daten als LSMeans mit dem gepoolten Standardfehler des Mittelwertes dargestellt.

Tabelle 1. Wachstums-assoziierte Merkmale und N-Bilanz-Parameter vor und nach intramuskulärer LPS-Injektion bei Junghennen vier genetisch divergenter Reinzuchtlegelinien versorgt mit 70, 100 und 200 % der NRC (1994) empfohlenen Arg-Konzentrationen im Futter (LSMeans, PSEM, n=3).

	WLA			BLA			R11			L68			
	LA	AA	HA	LA	AA	HA	LA	AA	HA	LA	AA	HA	PSEM
Tägliche Zunahmen ($g/kg^{0.67} \cdot d$)													
a. inj. (Tag 1-5)													
NaCl	7.2^{b}	6.5^{b}	5.1^{b}	20.7^{ab}	14.5^{ab}	16.8^{ab}	9.9^{b}	8.5^{b}	10.7^{ab}	5.5^{b}	16.2^{ab}	18.9^{ab}	
LPS	8.6^{b}	2.3^{b}	8.5^{b}	14.7^{ab}	11.9^{ab}	16.0^{ab}	12.1^{ab}	11.0^{ab}	8.3^{b}	10.3^{ab}	12.8^{ab}	3.3^{b}	
24 h p. inj. (Tag 6)													
NaCl	3.6^{b}	1.4^{b}	-5.3^{b}	4.2^{b}	-17.1^{bc}	-2.9^{b}	-15.9^{bc}	-27.9^{c}	-38.3^{cd}	5.9^{b}	4.5^{b}	-2.8^{b}	10.3
LPS	-40.4^{cd}	-33.4^{cd}	-34.3^{cd}	-47.4^{cd}	-51.6^{d}	-41.0^{cd}	-55.8^{de}	-60.2^{de}	-54.0^{de}	-47.1^{d}	-32.0^{cd}	-43.1^{cd}	
48 h p. inj. (Tag 7)													
NaCl	5.0^{b}	23.6^{ab}	-1.7^{b}	11.7^{ab}	17.3^{ab}	23.5^{ab}	6.0^{b}	5.0^{b}	-0.2^{b}	14.6^{ab}	13.6^{ab}	7.0^{b}	
LPS	-4.8^{b}	10.8^{ab}	6.4^{b}	10.1^{ab}	21.8^{ab}	10.5^{ab}	4.9^{b}	28.0^{ab}	2.6^{b}	20.4^{ab}	19.3^{ab}	32.0^{a}	
Tägliche Futteraufnahme ($g/kg^{0.67} \cdot d$)													
a. inj. (Tag 1-5)													
NaCl	58.3^{bc}	62.2^{bc}	56.0^{bc}	79.6^{ab}	67.4^{bc}	73.1^{ab}	56.1^{bc}	50.0^{bc}	55.3^{bc}	86.1^{ab}	76.9^{ab}	89.8^{a}	
LPS	61.5^{bc}	52.3^{bc}	63.1^{bc}	64.2^{bc}	63.0^{bc}	69.7^{ab}	66.0^{bc}	59.1^{bc}	56.0^{bc}	88.0^{ab}	75.1^{ab}	71.4^{ab}	
24 h p. inj. (Tag 6)													
NaCl	54.1^{bc}	62.5^{bc}	44.3^{c}	65.0^{bc}	49.3^{c}	62.6^{bc}	61.0^{bc}	41.7^{c}	43.7^{c}	74.7^{b}	72.7^{b}	61.0^{bc}	9.9
LPS	5.0^{d}	6.8^{d}	15.2^{d}	11.5^{d}	9.4^{d}	7.2^{d}	10.2^{d}	10.1^{d}	11.5^{d}	19.6^{d}	19.5^{d}	23.3^{d}	
48 h p. inj. (Tag 7)													
NaCl	61.3^{bc}	67.4^{bc}	55.7^{bc}	87.3^{ab}	86.7^{ab}	69.4^{ab}	61.4^{bc}	45.5^{c}	63.8^{bc}	71.6^{bc}	69.9^{b}	63.1^{bc}	
LPS	37.7^{c}	45.8^{c}	42.5^{c}	47.6^{c}	53.0^{bc}	68.4^{ab}	39.4^{c}	48.8^{c}	38.4^{cd}	54.6^{bc}	49.4^{bc}	57.0^{bc}	
Tägliche N-Aufnahme ($mg/kg^{0.67} \cdot d$)													
a. inj. (Tag 1-5)													
NaCl	1194^{bc}	1361^{bc}	1295^{bc}	1632^{ab}	1475^{bc}	1688^{ab}	1150^{bc}	1095^{bc}	1278^{bc}	1764^{ab}	1684^{ab}	2074^{a}	
LPS	1260^{bc}	1146^{bc}	1458^{bc}	1317^{bc}	1379^{bc}	1610^{ab}	1354^{bc}	1211^{bc}	1294^{bc}	1803^{ab}	1645^{ab}	1650^{ab}	
24 h p. inj. (Tag 6)													
NaCl	1110^{bc}	1368^{bc}	1023^{c}	1333^{bc}	1080^{c}	1446^{bc}	1250^{bc}	914^{cd}	1010^{c}	1531^{b}	1591^{b}	1409^{bc}	180
LPS	105^{de}	148^{de}	352^{de}	236^{de}	207^{de}	166^{de}	209^{de}	220^{de}	267^{de}	402^{de}	427^{de}	539^{d}	
48 h p. inj. (Tag 7)													
NaCl	1258^{bc}	1476^{bc}	1287^{bc}	1790^{ab}	1900^{ab}	1604^{ab}	1259^{bc}	997^{c}	1474^{bc}	1469^{bc}	1531^{b}	1458^{bc}	
LPS	773^{cd}	1004^{c}	982^{c}	975^{c}	1162^{bc}	1580^{ab}	807^{cd}	1068^{c}	886^{cd}	1118^{bc}	1083^{bc}	1318^{bc}	
Tägliche N-Retention ($mg/kg^{0.67} \cdot d$)													
a. inj. (Tag 1-5)													
NaCl	428^{bc}	721^{ab}	266^{bc}	808^{ab}	532^{b}	646^{ab}	187^{bc}	176^{bc}	81^{bc}	868^{ab}	769^{ab}	1071^{a}	
LPS	503^{b}	446^{b}	554^{ab}	478^{b}	543^{b}	589^{ab}	322^{bc}	374^{bc}	190^{bc}	811^{ab}	746^{ab}	763^{ab}	
24 h p. inj. (Tag 6)													
NaCl	127^{bc}	203^{bc}	-116^{c}	-27^{bc}	-64^{c}	33^{bc}	428^{bc}	354^{bc}	106^{bc}	523^{b}	671^{ab}	354^{bc}	205
LPS	-569^{cd}	-442^{cd}	-507^{cd}	-321^{cd}	-408^{cd}	-552^{cd}	-287^{cd}	-283^{cd}	-302^{cd}	-428^{cd}	-121^{c}	-144^{c}	
48 h p. inj. (Tag 7)													
NaCl	374^{bc}	402^{bc}	341^{bc}	489^{b}	855^{ab}	139^{bc}	439^{b}	320^{bc}	669^{ab}	626^{ab}	716^{ab}	593^{ab}	
LPS	205^{bc}	253^{bc}	71^{bc}	-10^{bc}	266^{bc}	631^{ab}	82^{bc}	184^{bc}	185^{bc}	207^{bc}	400^{bc}	328^{bc}	

WLA: Weißes Leghorn hochleistend; BLA: Rhode Island Red hochleistend; R11: Weißes Leghorn minderleistend; L68: New Hampshire minderleistend; LA, AA, HA: L-Arginin minder-, adäquat-, überversorgte Ration; PSEM: gepoolter Standardfehler des Mittelwertes; NaCl: Kochsalzlösung (Kontrolle); LPS: Lipopolysaccharid; $^{a-e}$: LSMeans eines Parameters unterscheiden sich signifikant mit unterschiedlichem Buchstaben ($p < 0.05$)

Ergebnisse und Diskussion

In der aktuellen Studie löste LPS binnen einer Stunde *p. inj.* eine APR aus, die durch schwere Anorexie, Lethargie, intensivierte Atmung, gesträubtes Gefieder und vereinzelten Durchfall über 10 Stunden *p. inj.* sowie eine Genotyp-spezifische Fieberantwort über 24 Stunden *p. inj.* klinisch geprägt war ($p < 0.001$). Dieses unspezifische Krankheitsverhalten entsteht durch die zentrale Wirkung pro-inflammatorischer Zytokine auf den Hypothalamus der Vögel (Xie *et al.*, 2000; Barnes *et al.* 2002).

Die variierende Menge an gefüttertem Arg hatte jedoch keinen Einfluss auf das klinische Erscheinungsbild und die Körpertemperatur der JH ($p = 0.268$). Ein Einfluss des Arg auf die Wachstums-

In: A. Zeyner, H. Kluth, M. Bulang, M. Bochnia und M. Glatter (Hrsg.)
13. Tagung Schweine- und Geflügelernährung, 24.-26. November 2015, Lutherstadt Wittenberg,
Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Universität Halle-Wittenberg, ISBN: 978-3-86829-748-591

assoziierten Parameter sowie die Messungen der N-Bilanz, wie bei Saito *et al.* (1987) in Ratten beschrieben, konnten ebenfalls nicht festgestellt werden (Tabelle 1). Die in Tabelle 1 aufgeführten Parameter wurden lediglich durch „Genotyp", „Behandlung" und „Zeit" ($p < 0.001$) sowie durch die Interaktionen „Genotyp x Zeit" und „Behandlung x Zeit" ($p < 0.05$) beeinflusst. Entsprechend ihres schwereren Körperbaus zeigten braune JH während der gesamten Versuchsdauer höhere tägliche Zunahmen, Futter- und N-Aufnahmen als die weißen JH ($p < 0.001$). Ebenfalls retenierte L68 N zu einem höherem Maße als die übrigen Genotypen ($p < 0.001$). Innerhalb der ersten 24 Stunden *p. inj.* verloren die LPS-JH signifikant an Körpermasse bei gleichzeitiger Verminderung der Futter- und N-Aufnahme auf ca. 20 % des Ausgangs- bzw. Kontrollgruppenwertes ($p < 0.001$). Der Körpermasseverlust war mit einem erheblichen Verlust an Körperprotein verbunden. In den zweiten 24 Stunden *p. inj.* stiegen Futter- und N-Aufnahme der LPS-JH wieder auf ca. 75 % des Ausgangs- bzw. Kontrollgruppenwertes. Auch die täglichen Zunahmen und die N-Retention wiesen wieder auf eine anabole Stoffwechsellage hin. Die LPS-bedingte Anorexie sowie die metabolische Aktivierung des Immunsystems bewirken eine generalisierte Dysregulation der Nährstoff-Homöostase und Veränderung des AS-Bedarfs (Humphrey and Klasing, 2004). Trotz der sich in den zweiten 24 Stunden *p. inj.* abzeichnenden Regeneration der N-Bilanz konnte im Schlachtblut der JH weiterhin eine erhebliche Dysregulation der AS-Homöostase nachgewiesen werden. Der niedrigere Plasma-AS-spiegel der LPS-JH ($p < 0.001$) lässt sich mit ihrer geringeren Futteraufnahme erklären. Im Plasma der LPS-JH waren hingegen die Konzentrationen an Anserin, β-Alanin, 1- und 3-Methylhistidin erhöht ($p < 0.001$). Diese Indikator-AS deuten auf eine entzündungsbedingte Proteolyse von Muskelproteinen zur Freisetzung benötigter AS hin. Eine gleichzeitige Erniedrigung der Plasmakonzen-tration aromatischer AS ($p < 0.01$) könnte deren erhöhten hepatischen Verbrauch zur Bildung Akuter-Phase-Proteine andeuten (Humphrey and Klasing, 2004). Als weiterer Beweis für den LPS-induzierten Hungerstoffwechsel könnte die Verminderung glukoplastischer AS wie Alanin, Arg, Asparagin, Glutaminsäure, Glyzin, Methionin und Prolin im Plasma der LPS-JH ($p < 0.01$) eine gesteigerte Glukoneogenese zur Bildung von Energieträgern für den Zellstoffwechsel und die Generierung einer ausreichend starken Fieberantwort anzeigen. Des Weiteren kann die Abnahme von Plasma-Arg im Rahmen der LPS-induzierten APR auch mit dessen erhöhtem Verbrauch durch induzierte Immunprozesse wie die Bildung von Stickoxiden interpretiert werden. Obwohl die Arg-Staffelung im Futter die N-Bilanz nicht beeinflusste, zeigte die Plasmaanalyse einen starken Anstieg der Plasma-konzentrationen von Arg und seinen Metaboliten Ornithin und Citrullin bei steigendem Arg im Futter ($p < 0.001$).

Schlussfolgerungen

Die aktuelle Studie bestätigte, dass LPS beim Huhn sehr wirkungsvoll die APR auslöst und deutliche Veränderungen im klinischen Erscheinungsbild sowie N-Metabolismus verursachte. Die Langzeitversorgung der Hühner mit unterschiedlichen Mengen von Futter-Arg beeinflusste weder den Verlauf der APR noch wirkte es den pathologischen Veränderungen der N-Bilanz entgegen. Dennoch wurde deutlich, dass eine Zulage von Arg über den Bedarfsempfehlungen der NRC (1994) eine Zunahme der Arg-Plasmakonzentration bewirkte. Diese erhöhte Arg-Verfügbarkeit könnte wiederum metabolische Vorgänge unterstützen, die insbesondere im Rahmen der APR einen Mehrbedarf an Arg aufweisen.

Literatur

Barnes D.M., Song Z., Klasing K.C., Bottje W. (2002) Protein metabolism during an acute phase response in chickens. Amino acids 22, 15-26

Bassler R. (1997) VDLUFA-Methodenbuch. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. 3. Aufl. VDLUFA-Verlag. Darmstadt, Germany

Humphrey, B. D, Klasing K.C. (2004) Modulation of nutrient metabolism and homeostasis by the immune system. World's Poultry Science Journal 60, 90-100

Kuhla B., Kucia M., Görs S., Albrecht D., Kuhla S., Metges C.C. (2010) Effect of a high protein diet on food intake and liver metabolism during pregnancy, lactation and after weaning in mice. Proteomics 10, 2573-2588

NRC, National Research Council. (1994) Nutrient Requirements of Poultry. 9th Revised Edition. National Academy Press. Washington D.C.

Saito H., Trocki O., Wang S.L., Gonce S.J., Joffe S.N., Alexander J.W. (1987) Metabolic and immune effects of dietary arginine supplementation after burn. Archives of Surgery 122, 784-789

Xie H., Rath N.C., Huff G.R., Huff W.E., Balog J.M. (2000) Effects of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide on broiler chickens. Poultry Science 79, 33-40

In: A. Zeyner, H. Kluth, M. Bulang, M. Bochnia und M. Glatter (Hrsg.)
13. Tagung Schweine- und Geflügelernährung, 24.-26. November 2015, Lutherstadt Wittenberg,
Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Universität Halle-Wittenberg, ISBN: 978-3-86829-748-592