

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

(Leiter: Univ. Prof. Dr.med.vet. Michael Hess Dipl.ECPVS)

Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe

(Leiter: Univ. Prof. Dr.sc.agr. Qendrim Zebeli)

**Bestimmung des Thymolgehaltes mittels SPME-GC/MS in verschiedenen
Gewebeproben nach Verfütterung von Thymol an Kaninchen**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Gesine Karas-Räuber

Wien, im August, 2021

Betreuerin: Ao.Univ.-Prof. Mag.pharm. Dr.rer.nat. Karin Zitterl-Eglseer
Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe
Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen
in der Veterinärmedizin
Veterinärmedizinische Universität Wien

Begutachter: Ao.Univ.-Prof. Dr.phil. Remigius Chizzola

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung und Fragestellung..... | 1 |
| 2. Literaturübersicht..... | 3 |
| 2.1. Thymian (Thymus ssp.)..... | 3 |
| 2.2. <i>Thymus vulgaris</i> L. | 3 |
| 2.2.1. Herkunft und Botanik..... | 3 |
| 2.2.2. Verwendung..... | 4 |
| 2.3. Thymol..... | 7 |
| 2.3.1. Herstellung..... | 7 |
| 2.3.2. Chemische Eigenschaften..... | 8 |
| 2.4. Futtermittelzusatzstoffe..... | 8 |
| 2.5. Die Besonderheiten der Verdauungsphysiologie des Hauskaninchens (<i>Oryctolagus cuniculi</i>)..... | 9 |
| 3. Material und Methoden..... | 13 |
| 3.1. Versuchsaufbau..... | 13 |
| 3.2. Tierhaltung..... | 14 |
| 3.3. Thymolbestimmung in den Gewebeproben..... | 14 |
| 3.4. Probenvorbereitung..... | 16 |
| 3.5. Kalibrierungskurve und Nachweisgrenze..... | 17 |
| 3.6. Bestimmung der Trockenmasse..... | 17 |
| 3.7. Statistische Auswertung..... | 18 |
| 4. Ergebnisse..... | 19 |
| 4.1. Thymolgehalt im Muskel-, Nieren- und Lebergewebe der Gruppe T1..... | 19 |

| | |
|--|----|
| 4.2. Thymolgehalt im Muskel-, Nieren- und Lebergewebe der Gruppe T2 | 21 |
| 4.3. Vergleich zwischen T1 und T2 | 21 |
| 5. Diskussion | 22 |
| 5.1. Thymolgehalt im Nierengewebe | 23 |
| 5.2. Thymolgehalt im Muskelgewebe | 26 |
| 5.3. Thymolgehalt im Lebergewebe | 27 |
| 6. Zusammenfassung | 28 |
| 7. Summary..... | 29 |
| Abkürzungen | 30 |
| Literaturverzeichnis | 32 |
| Abbildungs- und Tabellenverzeichnis | 36 |
| Anhang | 38 |
| PAPER: Bacova K., Zitterl-Eglseer K., Karas-Räuber G., Chrastinova L., Laukova A., Takacsova M., Placha I. (2021): Effect of Sustained Administration of Thymol on Its Bioaccessibility and Bioavailability in Rabbits. Originalarbeit, erschienen in der Zeitschrift „ANIMALS“, September 2021 | 43 |
| Danksagung | 53 |

1. Einleitung und Fragestellung

Thymol ist einer der Hauptbestandteile des ätherischen Öls von Thymian (*Thymus vulgaris* L., Lamiaceae). Thymian wird schon seit Jahrhunderten in der Naturheilkunde vielfältig verwendet (Salehi et al. 2018). Er besitzt unter anderem antioxidative, antimikrobielle, antihelminthische und antiinflammatorische Eigenschaften, die auf die Wirkung des ätherischen Öls zurückzuführen sind (Salehi et al. 2018; Bacova et al. 2020). Durch diese Eigenschaften ist das Interesse an der ätherischen Ölkomponente Thymol und anderen ätherischen Ölen als Futterzusatzstoff in der Tierhaltung in den letzten Jahren gewachsen.

Dies hängt auch mit dem Verbot der Europäischen Union zusammen, Antibiotika als Futterzusatzstoff für die Wachstumsförderung in der Tierzucht zu verwenden, welches seit 2006 in Kraft ist (EU-Parlament und der Rat der europäischen Union 18.10.2003).

Es gibt einige Untersuchungen, vor allem bei Masthühnern, über die positiven Auswirkungen von bzw. Thymol als Futterzusatzstoff auf die Gesundheit von Tieren. Ocel'ová et al. (2019) untersuchte mittels eines Fütterungsversuchs bei Masthühnern den Gehalt von Thymol im Plasma und in verschiedenen Abschnitten des Darmgewebes.

Auch Haselmeyer et al. (2015) untersuchte die Auswirkung, besonders im Hinblick auf die Futteraufnahme, Futtermittelverwertung, tägliche Gewichtszunahme und das Schlachtgewicht, durch Zufütterung von Thymiankraut an Masthühner. Zusätzlich wurde der Thymolgehalt in Jejunum, Caecum, Plasma, Leber- und Nierengewebe bestimmt.

Aber nicht nur bei Vögeln, auch bei Säugetieren wie zum Beispiel Schweinen, wurden die positiven Eigenschaften, die durch phytobiotische Futterzusatzstoffe hervorgerufen werden, untersucht. Bei Absetzferkeln wurde die Nährstoffverdaulichkeit und die Bioverfügbarkeit der Hauptkomponenten des Futterzusatzstoffes Biomin® im Vergleich zu Avilamycin und einer Kontrollgruppe mittels eines Fütterungsversuches untersucht (Zitterl-Egelseer et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit sollte der Metabolismus des pflanzlichen Futterzusatzstoffes Thymol in Kaninchen durch die Bestimmung des Thymolgehalts in Gewebeproben von Niere, Leber und Muskel untersucht werden. Dafür wurde den Tieren 250 mg Thymol pro kg Futter verfüttert und die Gewebeproben durch Schlachtung gewonnen. Diese wurden mittels

Festphasenmikroextraktion und Gaschromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometrie, auf ihren Thymolgehalt untersucht.

Der gesamte Versuch umfasste 48 Kaninchen, wobei der Gehalt von Thymol im Gewebe von Niere, Leber und Muskel nach 21-tägiger Fütterung und sieben Tage nach dem Absetzen des Futterzusatzstoffes bestimmt wurde. Für alle Gewebearten wurden sowohl nach 21-tägiger Fütterung als auch 7 Tage nach dem Absetzen des Futterzusatzes Kalibrierungsgeraden im Gewebe von Kontrolltieren ermittelt.

Bei diesem Versuch handelt es sich um eine Forschungskooperation zwischen dem Institut für Tierphysiologie der slowakischen Akademie der Wissenschaften in Kosice, Slowakei, und dem Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe der Veterinärmedizinischen Universität Wien, Austria. Der Fütterungsversuch wurde am Institut für Tierphysiologie in Kosice, Slowakei, durchgeführt. Die Gewebeproben wurden anschließend nach Wien transferiert und am Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe der Veterinärmedizinischen Universität, in der Arbeitsgruppe „funktionelle Pflanzenstoffe“ untersucht. Bei dieser Forschungskooperation wurde neben dem Thymolgehalt in unterschiedlichen Geweben vor allem auch die Auswirkung des Thymols auf verschiedene biochemische und antioxidative Blutparameter sowie die Wachstumsrate und der Gehalt von Fettsäuren im Muskel untersucht.

Ziel der Arbeit war es, den Gehalt von Thymol nach Absorption in den verschiedenen Geweben zu untersuchen. Im Gewebe liegt Thymol vor allem als Glucuronoid- und Sulfatverbindungen vor und wird hauptsächlich über die Niere ausgeschieden (Salehi et al. 2018; Kohlert et al. 2002). In diesem Versuch wurde der Gesamtgehalt an Thymol in den Geweben nach Abspaltung der Gluconsäure und des Sulfats mit Hilfe eines Enzyms bestimmt. Es wurde angenommen, dass der Gehalt in den Geweben unterschiedlich hoch ist. Weiters wurde erwartet, dass nach der Fütterungspause Thymol nur in sehr geringen Mengen oder überhaupt nicht mehr nachweisbar sein würde.

2. Literaturübersicht

2.1. Thymian (*Thymus ssp.*)

Thymian gehört zur Familie der Lippenblütengewächse (Lamiaceae) und zählt zu einer der wichtigsten und größten Gattungen innerhalb dieser. Je nach Literatur und welche Kriterien zur Taxonomie herangezogen werden, variiert die Anzahl der Arten, für die sich Zahlen von 150 bis 215 in der Literatur finden (Morales 2002; Stahl-Biskup 2000). Durch die Bildung von ätherischen Ölen sind in der Pflanzenfamilie der Lamiaceae auch viele andere Gewürz-, Heil- und Duftpflanzen zu finden (Gemeinholzer 2018).

Thymian, hier vor allem die Art *Thymus vulgaris*, wird schon seit vielen Jahrhunderten fast überall auf der Erde als Gewürz- und Heilpflanze verwendet. So haben zum Beispiel schon die Ägypter Thymianextrakt zur Konservierung der Mumien verwendet. Im traditionellen Sprachgebrauch wird das Wort Thymian oft für die Gattung und die am häufigsten verwendete Art *Thymus vulgaris* gleichermaßen verwendet (Salehi et al. 2018; Morales 2002).

2.2. *Thymus vulgaris* L.

Thymus vulgaris, auch als Gartenthymian, Echter Thymian oder Gemeiner Thymian bezeichnet, ist die am häufigsten verwendete Thymianart. Sie ist neben *Thymus zygis* als eine von zwei Thymianarten im Europäischen Arzneibuch als Stammpflanze für die Herstellung von Arzneimitteln zugelassen (Sticher 2010). Im österreichischen Lebensmittelcodex ist neben den beiden genannten noch *Thymus pulegioides* als Gewürz für den Handel aufgelistet (Österreichisches Lebensmittelbuch 2021).

2.2.1. Herkunft und Botanik

Ursprünglich ist die Pflanze in den mediterranen Regionen im Süden von Europa wie Portugal, Südfrankreich, Italien und Griechenland beheimatet, kommt aber mittlerweile weltweit vor. Sie ist an das heiße und trockene Klima in den Regionen gut angepasst und wächst dort vor allem auf kargen, steinigen und kalkhaltigen Böden.

Der echte Thymian ist ein bis zu 50 cm groß werdender mehrjähriger immergrüner Halbstrauch. Die Pflanze ist mit einer langen Pfahlwurzel im Boden verankert. Die aufrechten Äste verholzen mit zunehmendem Alter, wobei jedes Jahr neue grüne Triebe an den Hauptästen austreiben. An

ihnen befinden sich die kleinen, grau-grünen, acht bis zwölf Millimeter langen, rund bis länglich geformten Blätter. An den Rändern sind die kurz gestielten Blätter nach unten eingerollt, die Blattunterseite ist filzig behaart. Sie haben den für die Pflanze so typischen kräftig-aromatischen Geruch. Die Blüten sind violett bis rosa und sitzen in den Blattachseln. Aufgrund der Anordnung der Blütenstände werden diese auch als Scheinquirle bezeichnet, was typisch für die Blütenstände der Lippenblütler (Lamiaceae) ist. Die nachfolgenden Früchte sind kleine kugelige bis ovale Nüsschen von dunkelbrauner Farbe, in denen sich die Samen befinden. Die Blütezeit ist von Juni bis Oktober. Ein weiteres Merkmal sind die unzähligen Drüsenhaare, in denen das ätherische Öl enthalten ist (Chevallier 2016; Gesundheitsportal 2021; kraeuter-buch.de 2021).

2.2.2. Verwendung

Die Verwendung von Thymian ist sehr vielfältig. So findet er Anwendung als Gewürz, Tee, Heilkraut, in der Phytotherapie, aber auch in der kosmetischen und pharmazeutischen Industrie sowie in der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie. In der traditionellen Medizin findet er Anwendung für die Behandlung bei Erkrankungen des Respirationstraktes, wie Bronchitis, Keuchhusten und Laryngitis, des Gastrointestinaltrakts (GIT; z.B. Verdauungsstörungen, Gastritis, Diarrhoe) sowie bei Bluthochdruck, als Antiparasitikum und sogar als Sedativum (Salehi et al. 2018).

Diese vielfältige Anwendung beruht auf der großen Zahl an positiven Eigenschaften. Sowohl das ätherische Öl als auch der Pflanzenextrakt haben pharmakologisch nachgewiesene Wirkungen (Zarzuelo und Crespo 2002). Die meisten dieser Eigenschaften sind auf das im Thymian enthaltene ätherische Öl zurückzuführen und hier besonders auf den Hauptbestandteil Thymol.

Die Pflanze besitzt antibakterielle, antiseptische, spasmolytische, karminative, antioxidative, antifungale, antihelminthische, antivirale, antitussive, sekretomotorische, adstringierende, antirheumatische, blutdrucksenkende und beruhigende Wirkung (Fachini-Queiroz et al. 2012; Barnes et al. 2007).

Aufgrund der guten Wirksamkeit des Thymians bei Erkrankungen des oberen Atmungstraktes hat die Kommission E des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) in

Deutschland Thymian zur symptomatischen Behandlung von Entzündungen der oberen Atemwege, Bronchitis und Keuchhusten zugelassen (Barnes et al. 2007). Auch könnte Thymianextrakt laut einer Studie von Engelbertz et al. (2008) zur unterstützenden Behandlung als Bronchospasmolytikum bei COPD und Asthma angewendet werden.

Äußerlich findet Thymian Anwendung zur Behandlung von (infizierten) Wunden und Hautpilzinfektionen, zur Linderung bei Insektenstichen, bei rheumatischen Schmerzen, als Mittel gegen Läuse und in der Aromatherapie. Außerdem wird Thymol als Zusatz in vielen Kosmetikprodukten wie Cremes, Deos, Zahnpaste, Mundspüllösungen etc. verwendet (Chevallier 2016).

In der Lebensmittelindustrie ist er nicht nur als Gewürz beliebt, sondern es wird sich die antioxidative Wirkung des Thymols zu Nutze gemacht, so dass Thymian Nahrungsmitteln zugesetzt wird, um deren Haltbarkeit zu verlängern, ohne künstliche Konservierungsstoffe zuzugeben (Sticher 2010).

Auch in der Veterinärmedizin findet die Pflanze und ihr ätherisches Öl vielfältige Verwendung. So ist auch hier die Anwendung bei Atemwegserkrankungen, Hauterkrankungen und zur Behandlung von Wunden sowohl in der Nutztier- als auch in der Heimtierhaltung gebräuchlich. Eine weitere sehr wichtige Anwendung ist als Akarizid zur Bekämpfung der Varroa-Milbe (*Varroa destructor*) bei Bienen und der roten Vogelmilbe (*Dermanyssus gallinae*) (Brendieck-Worm et al. 2018).

Nach dem Verbot der EU von Antibiotika als Leistungsförderer in der Tierzucht seit 2006 (EU-Parlament und der Rat der europäischen Union 18.10.2003) ist das Interesse an Thymian bzw. Thymol als Futtermittelzusatz gestiegen. Es gibt etliche Studien, die positive Auswirkungen auf das Wachstum, das Wohlbefinden und die Tiergesundheit durch die Zugabe von ätherischem Öl von *Thymus vulgaris* bzw. reinem Thymol zum Tierfutter belegen. Des Weiteren wurde die Möglichkeit der alternativen Anwendung im Gegensatz zu den verbotenen Leistungsförderern zur Verbesserung der Gesundheit und zur Steigerung der Leistung untersucht.

Bei der Wachstumsleistung von Masthühnern konnte in Untersuchungen von Ocel'ová, Chizzola, Písarčíková, Novak, Ivanišinová et al. (2016) und Haselmeyer et al. (2015) kein

signifikanter Unterschied durch die Zugabe von ätherischem Öl des Thymians bzw. von Thymian (*Thymus vulgaris*) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gefunden werden. Auch Bacova et al. (2020) haben bei Kaninchen durch Zugabe von reinem Thymol zur Futtermischung keine Veränderung der Wachstumsrate feststellen können.

Mitsch et al. (2004) konnten durch den Futterzusatz von Mischungen von ätherischen Ölkomponenten, die auch Thymol beinhalteten, eine verminderte Konzentration von *Clostridium perfringens* in verschiedenen Darmabschnitten und im Kot von Masthühnern und somit einen positiven Einfluss auf die Darmflora nachweisen.

In einem Fütterungsversuch mit Kaninchen, in dem ätherisches Öl von Thymian als Futterzusatzstoff dem Futter zugegeben wurde, stellten Placha et al. (2013) eine positive Auswirkung auf die Gesundheit fest. Es wurde eine signifikante Verbesserung der Darmintegrität durch Messung des transepithelialen Widerstands (TEER) festgestellt. Außerdem waren in der Versuchsgruppe sowohl die Werte des Antioxidationsstatus im Blutplasma als auch die Glutathion-Peroxidase-Aktivität in der Leber erhöht. Im Duodenum der Kaninchen war die Malondialdehyd-Konzentration (MDA) vermindert.

Eine ähnliche Untersuchung bei Masthühnern zeigte auch hier, dass durch die Zugabe von ätherischem Thymian-Öl zum Futter der TEER signifikant höher war als bei der Kontrollgruppe. Zudem wurde auch hier eine signifikant verminderte MDA in Duodenum und den Nieren vorgefunden (Placha et al. 2014).

2.3. Thymol

Thymol ist ein natürlich vorkommender Stoff, der zu der Gruppe der Monoterpene gehört und als Phenolderivat vorliegt (Salehi et al. 2018). Sein Strukturisomer ist das Carvacrol. Die Strukturformeln beider Stoffe sind in Abb. 1 und Abb. 2 dargestellt.

Thymol ist der Hauptbestandteil des ätherischen Öls des Thymians (*Thymus vulgaris*), kommt aber auch in anderen Pflanzenarten der Gattungen Thymus, Origanum, Satureja, Trachyspermum, Rosmarinus und Monarda vor, wie z.B. Oregano (*Origanum vulgare*), Ajowan (*Trachyspermum ammi*), Bohnenkraut (*Satureja ssp.*), Goldmelisse (*Monarda didyma*) oder Rosmarin (*Rosmarinus officinalis*).

2-(1-Methylethyl)-5-methyl-phenol

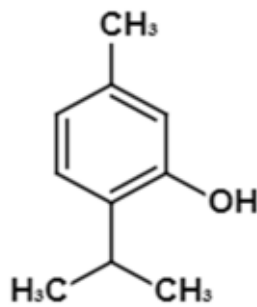


Abbildung 1: Strukturformel Thymol

2-Methyl-5-(1-methylethyl)-phenol

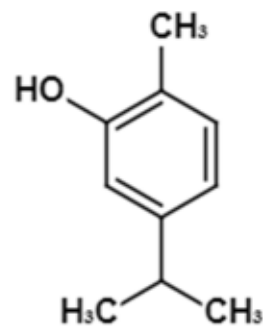


Abbildung 2: Strukturformel Carvacrol

2.3.1. Herstellung

Die Gewinnung von reinem Thymol kann entweder aus dem ätherischen Öl des Thymians (*Thymus vulgaris*), Ajowan (*Trachyspermum ammi*) oder der Pferdeminze (*Monarda punctata*) erfolgen, wobei heute hauptsächlich Ajowan (*Trachyspermum ammi*) verwendet wird. Eine andere Möglichkeit ist die synthetische Herstellung aus m-Cresol (Sticher 2010; Berufsgenossenschaft der Chemischen Industrie 2000).

2.3.2. Chemische Eigenschaften

Thymol kommt, im Gegensatz zu den meisten ätherischen Ölkomponenten, bei Raumtemperatur in Reinform als Feststoff vor (Haselmeyer 2007). Die farblosen Kristalle haben einen „phenolisch-medizinischen“ Geruch (Sticher 2010). Die Kristalle sind nur schwer wasserlöslich, aber dafür lipophil und dadurch gut in organischen Lösemitteln wie z. B. Ethanol, Ether, Chloroform oder in ätherischen und fetten Ölen löslich (Berufsgenossenschaft der Chemischen Industrie 2000).

Weitere physikalisch-chemische Eigenschaften sind in Tab. 1 aufgelistet.

Tabelle 1: physikalisch chemische Eigenschaften von Thymol (Berufsgenossenschaft der Chemischen Industrie, Heidelberg 2000)

| | |
|-----------------------------|--|
| Molekularmasse | 150,217 |
| Schmelzpunkt in °C | 49,6 |
| Siedepunkt in °C | 233 |
| Dampfdruck in hPa bei 50°C | 2,5 |
| Dichte in g/cm ³ | 0,970 |
| pH-Wert | 4%ige Lösung in Alkohol (50%) ist pH-neutral |

2.4. Futtermittelzusatzstoffe

Laut Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 Art. 2 Abs. 2 a des Europäischen Parlaments und des Rates sind Futtermittelzusatzstoffe Stoffe, Mikroorganismen oder Zubereitungen, die keine Futtermittel-Ausgangserzeugnisse oder Vormischungen sind und bewusst Futtermitteln oder Wasser zugesetzt werden, um insbesondere eine oder mehrere der in Artikel 5 Absatz 3 genannten Funktionen zu erfüllen.

Die in Art. 5 Abs. 3 genannten Funktionen sind:

- die Beschaffenheit des Futtermittels positiv beeinflussen
- die Beschaffenheit der tierischen Erzeugnisse positiv beeinflussen
- die Farbe von Zierfischen und -vögeln positiv beeinflussen
- den Ernährungsbedarf der Tiere decken
- die ökologischen Folgen der Tierproduktion positiv beeinflussen

- die Tierproduktion, die Leistung oder das Wohlbefinden der Tiere, insbesondere durch Einwirkung auf die Magen- und Darmflora oder die Verdaulichkeit der Futtermittel, positiv beeinflussen
- kokzidiostatisch oder histomonostatisch wirken

(EU-Parlament und der Rat der europäischen Union 18.10.2003)

Im Anhang 1 der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 sind die verschiedenen Funktionsgruppen mit den jeweiligen Untergruppen aufgelistet. Thymian (*Thymus vulgaris* L.) ist unter der Kategorie 2 b, zu finden. Kategorie 2 sind die sensorischen Zusatzstoffe, Funktionsgruppe b die Aromastoffe.

Thymianöl ist unter der Kategorie 4 d- zootechnische Zusatzstoffe, -sonstige zootechnische Zusatzstoffe zu finden.

Eine vollständige Liste der in der europäischen Union zugelassenen Futterzusatzstoffe ist unter https://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed/feed-additives/eu-register_en zu finden

(EU-Register 2021).

2.5. Die Besonderheiten der Verdauungsphysiologie des Hauskaninchens (*Oryctolagus cuniculi*)

Das Hauskaninchen ist die domestizierte Form des europäischen Wildkaninchens (*Oryctolagus cuniculus*) und gehört zur Familie der Hasen (*Leporidae*).

Als Pflanzenfresser ist das Kaninchen darauf angewiesen, sehr faserreiches Futter zu verdauen und alle wichtigen Nährstoffe daraus zu beziehen. Da sie aber nicht in der Lage sind, Zellulose enzymatisch aufzuspalten, spielt das Caecum und das Colon für die Verdauung eine tragende Rolle.

Durch ihre kleine Körpergröße haben die Tiere eine hohe Stoffwechselrate und unterscheiden sich von anderen Pflanzenfressern wie Wiederkäuern (z.B. Rindern und Schafen) und anderen Dickdarmfermentierern (z.B. Pferden) durch ganz eigene Mechanismen zur Nährstoff- und Energiegewinnung. Kaninchen gehören auch zu den Dickdarmfermentierern, aber im

Gegensatz zum Pferd, bei welchem die Fermentation vor allem im Colon stattfindet, findet diese beim Kaninchen im Caecum statt.

Die Verdauung ist darauf ausgerichtet, große Mengen Nahrung aufzunehmen, aus dieser dann die leicht verdaulichen Stoffe zu extrahieren und die langsamer zu fermentierenden, sehr faserreichen Nahrungsbestandteile schnell wieder auszuscheiden (Rees Davies und Rees Davies 2003).

Kaninchen sind Monogastrier und die Verdauung im Magen und Dünndarm unterscheidet sich nicht sehr von anderen monogastrischen Säugetieren. Der Magen des Kaninchens ist im Verhältnis zur Größe der Tiere groß und nimmt ca. 15% des Gesamtvolumen des GIT ein (Harcourt-Brown 2008). Er hat einen starken Kardiasphinkter und einen stark bemuskelten Pylorusbereich. Die Magenwand hat dagegen nur eine schwache Muskelschicht, besonders im Bereich der Kardia. Die Schleimhaut der Kardia ist drüsenlos, so dass der Fundus mit seinen verschiedenen Drüsenzellen für die Sekretion von Säuren, Intrinsic Factor und Pepsinogen zuständig ist. Der pH-Wert beim adulten Kaninchen ist sehr sauer mit 1-2, der Inhalt damit fast steril. Der Magen wird nie vollständig entleert; es befindet sich auch nach längerer Nahrungskarenz immer etwas Futterbrei, vermischt mit Flüssigkeit und Haaren darin (O'Malley 2008).

Im anschließenden relativ kurzen Dünndarm (Duodenum, Jejunum und Ileum) findet die Verdauung und Resorption von Nährstoffen wie bei anderen Monogastriern statt. Die Darmpassagezeit ist im Vergleich mit anderen Pflanzenfressern schnell (Rees Davies und Rees Davies 2003). Das Ileum erweitert sich an seinem Ende zum *Sacculus rotundus*. Diese für das Kaninchen spezifische Erweiterung ist die Verbindungsstelle zwischen Ileum, Caecum und Colon. Durch die Ileocaecalklappe (liegt zwischen Ileum und *Sacculus rotundus*) wird der Weitertransport der Nahrung in das Caecum gesteuert und ein Rückfluss dieser verhindert.

Als Dickdarmfermentierer spielt der Dickdarm eine tragende Rolle bei der Verdauung von Kaninchen. Er besteht aus dem Caecum und dem Colon. Das Caecum ist sehr groß und fasst 40 - 60% des gesamten GIT Volumens. Das proximale Colon trennt die unverdaulichen, faserreichen Partikel mit einer Größe $>100 \mu\text{m}$ von den kleinen ($<100 \mu\text{m}$) leicht verdaulichen Partikeln und der Flüssigkeit. Dabei werden die verschiedenen Partikel gleichzeitig in entgegengesetzte Richtungen transportiert. Die großen Partikel werden schnell über das Colon

als harte und trockene Kotkugeln ausgeschieden. Die Flüssigkeit und kleinen Partikel kommen in den Blinddarm. Hier findet die bakterielle Fermentation statt. Es entstehen flüchtige Fettsäuren, die direkt vom Caecumepithel absorbiert werden, Proteine und Vitamine (Hirakawa 2001; Harcourt-Brown 2008). Die durch die Fermentation entstandene Masse ist reich an Bakterien, Aminosäuren, Vitaminen und Mineralstoffen. Sie wird als Blinddarmkot *Caecotrophe* bzw. weicher Kot bezeichnet (Harcourt-Brown 2008). Er wird im Colon von Becherzellen mit einer Schleimschicht (Mucin) überzogen, die von einem Vitamin B12-Mucoproteinkomplex gebildet wird (Hirakawa 2001) und die Diffusion von Elektrolyten verhindert. Der dunkle, weiche und wie Trauben aneinander gereihte Blinddarmkot wird über den Anus ausgeschieden und direkt, ohne Bodenkontakt, von den Kaninchen aufgenommen und ohne zu kauen wieder abgeschluckt. Dieses Verhalten wird als Caecotrophie bezeichnet. Im Magen angekommen ist er durch seinen Schleimüberzug länger vor Verdauung geschützt, so dass er, je nach Literatur, drei bis acht Stunden im Fundus liegen bleibt, bevor er verdaut wird. Während dieser Zeit findet in den Kotkugeln weiter Fermentation statt. Die Nährstoffe aus dem Blinddarmkot werden im Magen und Dünndarm absorbiert.

Für die ausreichende Nährstoffversorgung beim Kaninchen sind die Tiere auf die Aufnahme des Blinddarmkots angewiesen, da es sonst zu Mangelerscheinung kommen kann (Hirakawa 2001).

An das Caecum anschließend folgt das Colon. Es besteht funktionell aus drei proximalen und einem distalen Abschnitt. Der erste Abschnitt ist charakterisiert durch drei *Tänien* (longitudinale Bandstreifen), wodurch das Colon dreifach haustriert ist. Darauf folgt ein Bereich mit einer *Tänie* und einer *Haustra* und anschließend der *Fusus coli* (Kolonspindel). Das ist ein ca. 4 cm langer Abschnitt, welcher das Ende des proximalen Colons darstellt und spezifisch für Hasenartige (Lagomorpha) ist. Er ist sehr gut durchblutet und innerviert und hat eine dicke zirkuläre Muskulatur. Es folgt der distale Colonabschnitt, das Rektum und der Anus (Harcourt-Brown 2008; O'Malley 2008).

Die Bildung von hartem oder weichem Kot wird durch den *Fusus coli* gesteuert. Ob harter oder weicher Kot gebildet wird, hängt von mehreren Faktoren ab. So haben Kaninchen einen zirkadianen Rhythmus. Bei Futter *ad libitum* fressen sie vor allem nachts und ruhen tagsüber. In den Ruhephasen am Vormittag wird der Blinddarmkot produziert, in den Fressphasen der

harte Kot (Harcourt-Brown 2008). Caecotrophie wird meistens vier Stunden nach der Futteraufnahme beobachtet. Auch beeinflussen Hormone wie Aldosteron und Prostaglandine die Phasen der Kotausscheidung (Rees Davies und Rees Davies 2003).

Während der Bildung des Blinddarmkots wird durch starke Kontraktionen im Caecum der Inhalt in das Colon befördert. Aufgrund des Prostaglandineinflusses ist die Motilität hier vermindert und der Inhalt kann zügig ohne Wasser und Elektrolytresorption Richtung *Fusus coli* transportiert werden und dort mit der Muzinschicht umhüllt, ohne großen Flüssigkeitsverlust an das distale Colon weiter transportiert werden (Rees Davies und Rees Davies 2003; O'Malley 2008). Von dort wird er unter der Einwirkung des Prostaglandins, welches die Kontraktion hier fördert, schnell ins Rectum befördert und ausgeschieden.

Während der Ausscheidung von hartem Kot ist der Aldosteronspiegel im Blut hoch. Das fördert die Kontraktionen im proximalen Colon, wodurch die festen Partikel stark ausgepresst werden. Bei der Passage des *Fusus coli* wird nochmals die Flüssigkeit ausgepresst. Während der anschließenden Passage des distalen Colons werden Wasser, Elektrolyte wie Natrium und Kalium und flüchtige Fettsäuren absorbiert, so dass nur noch die unverdaulichen Fasern als trockene Kotkugeln zurückbleiben (Harcourt-Brown 2008).

3. Material und Methoden

3.1. Versuchsaufbau

Für den Versuch wurden 48 Kaninchen unterschiedlichen Geschlechts zufällig in zwei gleich große Gruppen, eine Versuchsgruppe (T) und eine Kontrollgruppe (K), unterteilt. Zum Startzeitpunkt des Versuchs hatten die Kaninchen ein Alter von 35 Tagen.

Es wurden insgesamt Gewebeproben von 32 Kaninchen auf den Thymolgehalt untersucht.

Die Kontrollgruppentiere wurden über den gesamten Zeitraum mit einer Basaldiät (BD) gefüttert, die - wie auch Wasser, *ad libitum* zur Verfügung stand. Die BD wurde so zusammengesetzt, dass sie den Anforderungen wachsender Kaninchen entspricht (Blas und Wiseman 2010). Die Zusammensetzung ist in Abb. 3 dargestellt (Bacova et al. 2020). Die BD wurde den Tieren in Pelletform mit einer durchschnittlichen Größe von 3,5 mm bereitgestellt.

Es wurden jeweils acht Gewebeproben von Leber, Niere und Muskulatur (*M longissimus dorsi*) sowohl nach 21 Tagen als auch nach 28 Tagen durch Tötung der Tiere gewonnen. Die Tiere der Versuchsgruppe wurden weiter in zwei Gruppen unterteilt (T1 und T2). Beide Gruppen wurden 21 Tage mit einer BD gefüttert, der zusätzlich zu den Inhaltsstoffen des Futters der Kontrollgruppentiere, Thymol ($\geq 99,9\%$, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) in Form eines weißen Pulvers beigemischt wurde (250 mg/kg Futter). Auch diesen Tieren stand Futter und Wasser über den gesamten Zeitraum *ad libitum* zur Verfügung. Anschließend wurden die Kaninchen T1 geschlachtet und die Gewebeproben von Leber, Niere und Muskulatur zur Bestimmung des Thymolgehalts gewonnen.

Die verbliebenen Tiere T2 wurden nun sieben Tage nur mit der BD gefüttert d.h. der Thymolfutterzusatz wurde abgesetzt. Im Anschluss daran wurden ebenfalls Gewebeproben aus Leber, Niere und Muskulatur durch Tötung der Tiere gewonnen, um in diesen den Gehalt des Thymols zu bestimmen.

| Ingredients (%) | | Chemical Composition (g/kg Feed) | |
|--------------------------------------|------|----------------------------------|-------|
| Dehydrated Lucerne meal | 36.0 | Dry matter (g/kg) | 900.9 |
| Dry malting sprouts | 15.0 | Organic compounds | 831.8 |
| Oats | 13.0 | Nitrogen free extract | 444.3 |
| Wheat bran | 9.0 | Neutral detergent fibre (NDF) | 352.9 |
| Barley | 8.0 | Acid detergent fibre (ADF) | 208.1 |
| Extracted sunflower meal | 5.5 | Crude fibre | 177.8 |
| Extracted rapeseed meal | 5.5 | Crude protein | 176.6 |
| Dried distiller grains with solubles | 5.0 | Cellulose | 163.1 |
| Premix ¹ | 1.7 | Hemicellulose | 144.8 |
| Limestone | 1.0 | Starch | 133.1 |
| Sodium chloride | 0.3 | Ash | 69.2 |
| | | Fat | 33.1 |
| | | Metabolic energy, MJ/kg | 9.9 |

¹ The vitamin-mineral premix provided per kg of complete diet: Retinyl acetate 5.16 mg, Cholecalciferol 0.03 mg, Tocopherol 0.03 mg, Thiamine 0.8 mg, Riboflavin 3.0 mg, Pyridoxin 2.0 mg, Cyanocobalamin 0.02 mg, Niacin 38 mg, Folic acid 0.6 mg, Calcium 1.8 mg, Iron 70 mg, Zinc 66 mg, Copper 15 and Selenium 0.25 mg.

Abbildung 3: Zusammensetzung der Basaldiät (Bacova et al. 2020)

3.2. Tierhaltung

Der Tierversuch wurde in einem Tierversuchslabor des „National Agricultural and Food Centre, Research Institute for Animal Production“, Nitra, Slovakia, durchgeführt. Genehmigt wurde der Versuch von dem „Institutional Ethical Committee“, sowie das Versuchsprotokoll (4047/16-221) durch das staatliche Veterinär- und Lebensmittelamt der Slowakischen Republik.

Die Kaninchen waren während der gesamten Dauer in Drahtkäfigen mit einer Größe von 61 cm x 34 cm x 33 cm untergebracht. In jedem Käfig befanden sich zwei Tiere. Die Käfige befanden sich in Räumen mit automatischer Temperaturregelung (22±4 °C) und einem Hell- Dunkel-Verhältnis von 16:8 Stunden.

Die Tötung wurde mittels Elektrobetäubung (50Hz, 0,3A/Kaninchen für 5 sec) und anschließendem Ausbluten durch Durchtrennen der *Vv. jugulares* und *Aa. Caroticae* und Aufhängen an den Hinterbeinen durchgeführt.

3.3. Thymolbestimmung in den Gewebeproben

Die Bestimmung des Thymolgehalts in den Gewebeproben wurde nach einer validierten Methode (Haselmeyer et al. 2015; Ocel'ová et al. 2019; Placha et al. 2019) durch Festphasenmikroextraktion (solid phase microextraction, SPME) und anschließender Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) durchgeführt. Bei dieser Methode werden

leicht flüchtige ätherische Ölkomponenten, zu denen auch Thymol zählt, aus der Gasphase über der Gewebeprobe auf eine beschichtete Faser adsorbiert (SPME) und dann in den Injektorblock des Gaschromatographen eingebracht. Die Adsorption erfolgt sehr selektiv, wodurch viele störende Komponenten aus der Gewebeprobe abgetrennt werden können. Die Quantifizierung des Thymols wird mit Hilfe des internen Standards o-Cresol durchgeführt.

Die Analytik der Proben erfolgte mit dem Gaschromatographen (HP 6890) gekoppelt mit einem massenselektiven Detektor mit „electron impact (EI) ionization“ des Typs HP 5972 (Agilent Technologies GmbH, Wilmington, DE, USA). Zur Analyse wurde eine Kapillarsäule ROTI[®]Cap-5MS Ultra mit 30 m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser und 0,25 µm Filmdicke (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Das Trägergas Helium hatte eine Durchflussrate von 1,3 ml/min im konstanten Durchflussmodus. Die Temperatur des Injektors wurde auf 250 °C und die Temperatur der Übertragungsleitung zum massenselektiven Detektor auf 280 °C eingestellt. Die SPME-Faser (DVDB, 65µm, Supelco, Bellefonte, PA, USA) wurde mit jeder Probe in den Injektorblock des GC/MS-Geräts manuell eingeführt und dort für 5 min bei einer Temperatur von 250 °C und einem Splitverhältnis von 1:1 desorbiert. Folgendes Temperaturprogramm wurde für die Gaschromatographie verwendet: 5 min auf 60 °C, Temperaturerhöhung von 60 °C auf 120 °C bei einer Aufheizrate von 4 °C/min und anschließend um 20 °C/min bis 240 °C. Für die quantitative Analyse des Thymols wurde der massenselektive Detektor im Selektiven Ionen Monitoring (SIM)-Modus verwendet. Die charakteristischen Masse-zu-Ladung-Verhältnisse für Thymol und o-Cresol wurden aufgezeichnet. Für Thymol sind dies m/z 135 und m/z 150, für o-Cresol m/z 107 und m/z 108. Mit diesen Einstellungen werden Retentionszeiten von ca. 19 min für Thymol und 10 min für o-Cresol erreicht.

3.4. Probenvorbereitung

1 g der tiefgekühlten Gewebe-Probe wurde zerkleinert, eingewogen und in ein 10 ml Vial (Agilent, Santa Clara, CA, USA) gegeben, danach wurde 3 ml destilliertes Wasser hinzugefügt und für eine Minute mit einem Homogenisator (VDI 12, VWR, Deutschland) zerkleinert.

Anschließend wurden 100 µl 0,58 mol/L Essigsäure (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 100 µl des Enzyms β -Glucuronidase Helix pomatia Type HP-2 wässrige Lösung, ≥ 100.000 units/ml (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) dazugegeben und das Gefäß mit einem 20 mm Crimp Cap (Agilent, Santa Clara, CA, USA) mit Gummiseptum (Agilent Santa Clara, CA, USA) luftdicht verschlossen. Nun wurde der Inhalt mit Hilfe eines Minishakers (MS1, IKA, Deutschland) vermischt und bei 37 °C für 30 min in einem Wasserbad mit Magnetrührer bei einer Umdrehung von 750 rpm inkubiert. Dieser Schritt dient dazu, Thymol von seinen Glucuronoid- und Sulfatverbindungen zu lösen, da der Gesamt-Thymolgehalt in der Gewebeprobe bestimmt werden sollte. Die 0,58 mol/L Essigsäure ist an dieser Stelle notwendig, um den optimalen pH-Wert für die enzymatische Dekonjugation zu erreichen.

Anschließend wurde der Verschluss geöffnet und 1,0 g Kochsalz (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 100 µl 85%ige Phosphorsäure (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 50 µl destilliertes Wasser und 50 µl o-Cresol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) als interne Standardlösung 1:10 verdünnt hinzugefügt.

Für die Herstellung der internen Standardlösung wurden 40 mg o-Cresol in 2 ml Methanol gelöst und mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Die hergestellte Stammlösung wurde bei diesem Versuch mit einer 1:10 Verdünnung mit destilliertem Wasser für Leber, Niere und Muskel verwendet.

Das Vial wurde wieder verschlossen und der Inhalt wieder gut mit dem Minishaker vermischt. Anschließend wurde das Gummiseptum mit einer dünnen Nadel durchstochen und der SPME Faserhalter (Supelco, Bellefonte, PA, USA) mit der SPME Faser hineingeschoben und die Faser im Gasraum über der Probenlösung positioniert. Anschließend folgte erneut eine Inkubation im Wasserbad, diesmal bei 80 °C für 35 min, um Thymol an die Faser zu adsorbieren.

3.5. Kalibrierungskurve und Nachweisgrenze

Für Thymol wurden zwei Eichkurven aus den Gewebeproben der Kontrollgruppe erstellt, jeweils eine für Gruppe T1 und T2.

Hierfür wurde statt 50 µl destilliertem Wasser eine bekannte Konzentration Thymol (2000 ng/g; 1000 ng/g, 800 ng/g, 400 ng/g, 200 ng/g, 100 ng/g) den Proben der Kontrollgruppentiere hinzugefügt. Die dafür verwendete Stammlösung ist aus 40 mg Thymol (99,9%, Sigma Aldrich, St. Louis, USA), gelöst in 2ml Methanol (99,9%, p.a., ACS, ISO, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), aufgegossen mit destilliertem Wasser auf 100 ml hergestellt worden.

Die Ermittlung der Kalibrierungsgeraden erfolgte, indem die Flächenverhältnisse von Thymolkonzentration zu o-Cresol-Konzentration gegen die bekannten Thymolkonzentrationen aufgetragen wurden. Jeder Punkt der Kalibrierungsgeraden wurde mehrfach bestimmt. Die Kurven haben im Bereich von 100 ng/g bis 2000 ng/g eine gute Linearität.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze von Thymol mittels GC/MS im Gewebe wurde eine 1:50 Verdünnung der Thymolstammlösung angefertigt. Daraus wurden immer niedrigere Konzentrationen des Thymols (40 ng/g, 8 ng/g, 5,63 ng/g, 4 ng/g, 2 ng/g, 0,8 ng/g) dem Gewebe der Kontrollgruppentiere zugesetzt. Für die Auswertung wurde, wie auch bei der Kalibrierungsgeraden, die Fläche unter dem Peak für Thymol durch die Fläche unter dem Peak für o-Cresol dividiert. Das Limit of Detection (LOD) befindet sich bei diesem Versuch zwischen 5,63 ng/g und 4 ng/g.

3.6. Bestimmung der Trockenmasse

Um den Thymolgehalt der Proben in ng/g Trockenmasse (DM) angeben zu können, ist die DM der einzelnen Proben bestimmt worden. Dazu wurden jeweils Gewebeproben von Leber, Niere und Muskel vor Trocknung gewogen, dann für 48 h bei 105 °C im Trockenschrank (Memmert GmbH +Co KG, Schwabach, Deutschland) getrocknet und anschließend wieder gewogen. Aus den Ergebnissen wurde dann der Thymolgehalt aller Proben in ng/g DM berechnet.

3.7. Statistische Auswertung

Die ermittelten Thymolkonzentrationen der verschiedenen Gewebe der Gruppe T1 wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung untersucht. Als Signifikanzgrenze wurde $p < 0,05$ angenommen. Es ist für jedes Gewebe Mittelwert, Minimum, Maximum und die Standardabweichung angegeben worden. Des Weiteren wurde eine einfaktorielle ANOVA mit anschließendem *post hoc* Dunn`s multiple comparison test mit den Werten der Gruppe T1 durchgeführt. Anschließend wurden die Werte der drei verschiedenen Gewebe der Gruppen T1 und T2 mittels T-Test für unabhängige Stichproben miteinander verglichen.

Für die statistischen Auswertungen wurden *Microsoft Excel (Office 365)* und *GraphPad Prism 9* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Thymolgehalt im Muskel-, Nieren- und Lebergewebe der Gruppe T1

Der Thymolgehalt in den Proben der verschiedenen Gewebe von den Versuchstieren der Gruppe T1, welche 21 Tage einen Thymolfutterzusatz erhalten hatten, zeigte stark unterschiedliche Werte. Eine graphische Übersicht der Thymolgehalte in ng/g DM in den Geweben von Niere, Leber und Muskel der Versuchsgruppe 1 ist in Abb.4 zu sehen.

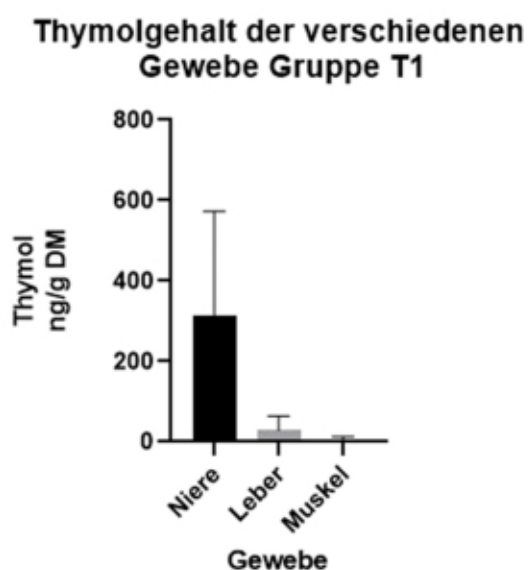


Abbildung 4: Thymolgehalt der verschiedenen Gewebe der acht Kaninchen, welche 21 Tage einen Thymolfutterzusatz erhalten hatten.

Die höchsten gemessenen Werte waren in den Proben des Nierengewebes zu finden. Die Werte zeigten eine große Streuung von 687 ng/g DM bis 39,03 ng/g DM mit einem Mittelwert von 313,73 ng/g DM. Die Standardabweichung lag bei 259,47 ng/g DM. Das Nierengewebe war das einzige Gewebe, in welchem in allen acht Proben Thymol nachweisbar war (siehe Tab.2 und Tab.3).

Der geringste Thymolgehalt konnte im Muskelgewebe gefunden werden. In nur einer von acht Proben lag Thymol mit 28,95 ng/g DM über der Nachweisgrenze, die mit ca. 5 ng/g ermittelt wurden ist (siehe Tab.2).

Im Lebergewebe konnte in fünf von acht Proben Thymol über der Bestimmungsgrenze nachgewiesen werden. Die Werte zeigten eine Spannbreite von 0 ng/g DM bis 105,85 ng/g mit

einem Mittelwert von 28,08 ng/g DM und einer Standardabweichung von 36,55 ng/g DM (siehe Tab.2 und Tab.3).

Tabelle 2: Thymolgehalt in den Gewebeproben der Gruppen T1 und T2

| Leber T1 | Leber T2 | Niere T1 | Niere T2 | Muskel T1 | Muskel T2 |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Thymol in ng /g DM | Thymol in ng /g DM | Thymol in ng /g DM | Thymol in ng /g DM | Thymol in ng /g DM | Thymol in ng /g DM |
| 0 | 0 | 39,032 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 77,768 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 82,877 | 0 | 0 | 0 |
| 18,755 | 0 | 170,725 | 0 | 0 | 0 |
| 21,264 | 0 | 392,598 | 0 | 0 | 0 |
| 22,861 | 0 | 412,933 | 0 | 0 | 0 |
| 55,917 | 0 | 646,864 | 0 | 0 | 0 |
| 105,851 | 0 | 687,047 | 52,402 | 28,953 | 0 |

Tabelle 3: deskriptive Statistik T1 und T2

| | Leber T1 (ng/g DM) | Leber T2 (ng/g DM) | Niere T1 (ng/g DM) | Niere T2 (ng/g DM) | Muskel T1 (ng/g DM) | Muskel T2 (ng/g DM) |
|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Min | 0 | 0 | 39,032 | 0 | 0 | 0 |
| Q1 | 0 | 0 | 81,600 | 0 | 0 | 0 |
| Median | 20,010 | 0 | 281,661 | 0 | 0 | 0 |
| Q3 | 31,125 | 0 | 471,416 | 0 | 0 | 0 |
| Max | 105,851 | 0 | 687,047 | 52,402 | 28,953 | 0 |
| Mittelwert | 28,081 | 0 | 313,730 | 6,550 | 3,619 | 0 |
| Std. Abweic | 36,546 | 0 | 259,474 | 18,527 | 10,237 | 0 |

Mittels Kolmogorov-Smirnov-Test wurden die Daten auf Normalverteilung untersucht. Die Daten aller drei Gewebe erwiesen sich als normalverteilt. Die genauen Werte sind im Anhang in den Tabellen 5 bis 7 zu finden.

Der Kruskal-Wallis-Test zeigte, dass der Gehalt des Thymols von der Gewebeart abhängt. Der p-Wert ist mit 0,0003 ermittelt worden und zeigt, dass sich die Mediane der Gruppen signifikant unterscheiden (siehe Anhang Tab.8). Um zu erkennen, zwischen welchen Gewebearten ein signifikanter Unterschied besteht, wurde als *Post hoc Test* ein Dunn's multiple comparisons Test durchgeführt. Bei diesem Test wurden die Mittelwerte der einzelnen Gruppen untereinander verglichen.

Hier ist zu sehen, dass sich der Gehalt im Nieren- im Vergleich zum Muskelgewebe hoch signifikant unterscheidet ($p < 0,01$). Auch die Thymolkonzentration im Nieren- und Lebergewebe unterscheidet sich signifikant mit $p < 0,05$. Kein signifikanter Unterschied konnte hingegen zwischen Leber- und Muskelgewebe festgestellt werden (siehe Anhang Tab.9).

4.2. Thymolgehalt im Muskel-, Nieren- und Lebergewebe der Gruppe T2

In der Gruppe T2, bei welcher die Proben sieben Tage nach Absetzen des Thymolfutterzusatzes untersucht wurden, war weder in den Leber- noch in den Muskelgewebeproben Thymol nachweisbar (Nachweisgrenze 5 ng). Auch im Nierengewebe war lediglich in einer Probe eine Konzentration von 52,40 ng/g DM messbar, in allen anderen war auch hier nichts mehr zu finden (siehe Tab.2).

4.3. Vergleich zwischen T1 und T2

Mittels T-Test für unabhängige Stichproben wurde untersucht, ob sich der Gehalt des Thymols im Gewebe nach dem Absetzen des Futterzusatzstoffes verändert. Dazu wurden die Gewebe der Gruppe T1 mit dem jeweiligen Gewebe der Gruppe T2 verglichen.

Da im Muskelgewebe nur in einer Probe von T1 Thymol zu finden war und in keiner Probe der Kaninchen aus T2, ist hier kein signifikanter Unterschied feststellbar gewesen (siehe Anhang Tab.10).

Ein signifikanter Unterschied konnte aber zwischen Nieren- und Lebergewebe gefunden werden. Der Mittelwert des Thymolgehalts im Nierengewebe der Versuchsgruppe T1 betrug 313,7 ng/g DM, während der Mittelwert des Thymolgehalts im Nierengewebe der Versuchsgruppe T2 nur mit 6,55 ng/g DM ermittelt wurde. Hier ist auch ohne Berechnung schon ein großer Unterschied zu erkennen, welcher mittels T-Test auch bestätigt wurde ($p=0,0049$) (siehe Anhang Tab.11).

Auch im Lebergewebe konnte ein signifikanter Unterschied mit $P=0,0474$ zwischen den beiden Versuchsgruppen T1 und T2 gefunden werden (siehe Anhang Tab.11).

5. Diskussion

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass der Thymolgehalt in den untersuchten Geweben nach Fütterung des Thymolfutterzusatzes unterschiedlich hoch sein würde und sieben Tage nach dessen Absetzen Thymol nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen im Gewebe nachweisbar ist. Ziel der Arbeit war es, durch die Konzentrationsunterschiede in den verschiedenen Organen einen Einblick über den Metabolismus, die Verteilung und die Ausscheidung des Thymols beim Kaninchen zu bekommen.

Untersuchungen des Metabolismus von Phenolderivaten haben gezeigt, dass diese im vorderen GIT gut resorbiert, dann konjugiert und über den Urin ausgeschieden werden (Ocel'ová, Chizzola, Pesarčíková, Novak, Ivanišinová et al. 2016).

Im Zuge der Forschungskooperation zwischen dem Institut für Tierphysiologie der Slowakischen Akademie der Wissenschaften in Kosice, Slowakei, und dem Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe der Veterinärmedizinischen Universität Wien, Austria, wurden neben den in dieser Arbeit untersuchten Geweben noch weitere Proben auf ihren Thymolgehalt und die Auswirkungen, besonders im Hinblick auf die antioxidative Wirkung und die Fettsäuren im Blut und Muskel, untersucht. Aber auch die Thymolkonzentration im Plasma, Futter, Dünndarmwand und im Kot wurde bestimmt.

Die höchsten Thymolwerte der Gruppe T1 von allen untersuchten Geweben sind im Kot gemessen worden mit einem Mittelwert von 890 ng/g DM und einer Standardabweichung von 450 ng/g DM (Bacova et al. 2020), gefolgt vom, von mir untersuchtem, Nierengewebe mit einem Mittelwert von 313 ng/g DM und einer Standardabweichung von 259 ng/g DM. Das Auffinden von Thymol im Kot und im Nierengewebe zeigt, dass Kaninchen Thymol nach oraler Aufnahme sowohl resorbieren und verstoffwechseln, als auch unmetabolisiert über den Kot ausscheiden. Durch die Besonderheit der Verdauung beim Kaninchen, der Caecotrophie, könnte es durch Wiederaufnahme des Blinddarmkotes dazu kommen, dass Kaninchen darüber wieder einen Teil des mit dem Kot ausgeschiedenen Thymols aufnehmen. Dieses würde somit wieder in den Magen-Darm-Trakt gelangen, resorbiert, und vom Körper wieder verstoffwechselt und ausgeschieden werden. Um welche Art von Kot es sich bei dem von Bacova et al. (2020) untersuchtem handelt, ist nicht festgehalten. Es wäre interessant zu wissen,

ob es einen Unterschied im Thymolgehalt zwischen Kot und Blinddarmkot gibt, da dies einen Hinweis darauf gäbe, ob Kaninchen Thymol endgültig über den Kot ausscheiden, oder wiederverwerten.

5.1. Thymolgehalt im Nierengewebe

Wie meine Untersuchungen des Nierengewebes gezeigt haben, war im Nierengewebe bei T1 in allen Proben Thymol nachweisbar. Mit einer mittleren Konzentration von 313,73 ng/g DM waren hier die höchsten Werte von allen drei untersuchten Geweben zu finden. Die Werte zeigten aber eine sehr große Streuung von 39,03 ng/g DM bis 687,05 ng/g DM. Eine Erklärung könnten verschiedene Zeitpunkte der letzten Futter- und Wasseraufnahme sowie die unterschiedlich aufgenommenen Futtermengen vor der Probengewinnung sein. Eine größere Rolle dürften aber individuelle Unterschiede der Kaninchen bei der Verstoffwechslung des Thymols spielen.

Es liegt nahe, dass Thymol und seine Glucuronoid- und Sulfatverbindungen beim Kaninchen in der Niere akkumuliert und verstoffwechselt werden und anschließend über den Urin ausgeschieden werden. Dies konnte in Untersuchungen von Kohlert et al. (2002), Takada et al. (1979) und Ocel'ová et al. (2016) gezeigt werden.

Ocel'ová et al. (2016) führten einen ähnlichen Versuch bei Masthühnern durch. Sie bestimmten den Gesamt-Thymolgehalt im Nieren-, Leber- und Muskelgewebe, sowie im Blutplasma bei Masthühnern nach oraler Gabe von verschiedenen Konzentrationen des ätherischen Öls des Thymians. Die Proben wurden nach vierwöchiger Fütterung untersucht. Der Gehalt an Thymol war auch hier im Nierengewebe am höchsten und zeigte ab einer Konzentration von 0,05% w/w des ätherischen Öls im Futter einen signifikanten Anstieg im Vergleich zum Blutplasma (siehe Abb.5).

| Substance | Thyme oil concentration in feed (%) | | | | | |
|-----------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| | 0.01 | 0.02 | 0.03 | 0.04 | 0.05 | 0.1 |
| Feed* | 13.74 | 25.69 | 70.77 | 135.72 | 188.90 | 373.59 |
| Plasma | 90±15.9 ^a | 200±25.1 ^a | 207±78.5 ^a | 234±98.0 ^a | 455±95.3 ^b | 850±37.0 ^c |
| Liver | 21.9± 9.7 ^a | 29.5± 5.3 ^{ab} | 38.9±11.8 ^{ab} | 53.9±20.1 ^{ab} | 66.4±8.1 ^b | 168.5±33.6 ^c |
| Kidney | 134±57.9 ^a | 206±35.2 ^a | 294± 46.7 ^a | 409±138.3 ^a | 808±118.3 ^b | 1174±246.5 ^c |
| Muscle | 4.0± 1.4 ^a | 7.0±1.2 ^a | 11.1± 7.5 ^a | 11.2±2.9 ^a | 13.8±1.9 ^a | 34.5±8.7 ^b |

Data are presented as mean ± standard deviation (means of four samples per one group, each pooled from two chickens). ^{a-c} Means within the same row which do not share a common superscript are significantly different ($p < 0.05$). DM-dry matter. *Thymol content in the final feed mixtures.

Abbildung 5: Thymolgehalt in den Proben der Masthühner von Ocel'ová et al. (2016)

Eine Erklärung für die hohen Werte von Thymol in der Niere wurde in der tragenden Rolle der Niere bei der Ausscheidung und Verstoffwechslung sowie der Akkumulation des Thymols in der Niere gefunden (Ocel'ová et al. 2016).

Will man die Werte aus dem Versuch mit den Masthühnern von Ocel'ová et al. (2016) mit den Werten aus dem vorliegenden Versuch vergleichen, sind die Werte mit einer Konzentration von 0,04% bis 0,05% Thymianöl im Futter am besten geeignet. Hier entspricht der Thymolgehalt im Futter der Masthühner mit Mittelwerten von 135,73 ng/g DM bis 188,9 ng/g DM etwa dem der Kaninchen. Den Kaninchen wurden 250 mg Thymol pro Kilogramm Futter untergemischt. Im Zuge der Forschungs Kooperation wurde von Bacova et al. (2020) der Gehalt im Futter genau bestimmt und mit 148.90 ± 16.65 ng/g DM angegeben. Da die Werte im Versuch von Ocel'ová et al. (2016) in ng/g angegeben sind, wurden die ermittelten Werte des Thymols im Nierengewebe zum besseren Vergleich nicht auf die Trockenmasse bezogen und somit statt in ng/g DM in Tabelle 4 auch in ng/g angegeben.

Es fällt auf, dass der mittlere Thymolgehalt im Nierengewebe der Kaninchen mit 66,19 ng/g um das Sechs- bis Zwölfwache niedriger als bei Masthühnern ist, es aber andererseits eine sehr breite Streuung gibt. Dieser Unterschied könnte mit der besonderen Verdauung beim Kaninchen, der Caecotrophie, zusammenhängen. Aber auch durch Besonderheiten in der Anatomie und Physiologie bei Vögeln könnten höhere Werte in der Niere erreicht werden. Vögel besitzen ein Nierenpfortadersystem, welches das venöse Blut aus den Hintergliedmaßen und der caudalen Körperhälfte bezieht, was den caudalen Verdauungstrakt miteinbezieht (Froese 2013; Echols 2006). Dadurch könnte ein Teil des Thymols beim Masthuhn direkt vom

hinteren Verdauungstrakt über das Blut zu den Nieren gelangen und direkt metabolisiert und ausgeschieden werden. Dies wurde auch schon von Ocel'ová et al. (2016) vermutet.

Tabelle 4: Thymolgehalt im Nierengewebe Gruppe T1 in ng/g und ng/g DM

| Thymolgehalt im Nierengewebe der Gruppe T1 | | |
|--|-------------|----------------|
| | Thymol ng/g | Thymol ng/g DM |
| | 8,149 | 39,032 |
| | 15,829 | 77,768 |
| | 16,596 | 82,877 |
| | 35,891 | 170,725 |
| | 82,285 | 392,598 |
| | 83,69 | 412,933 |
| | 137,511 | 646,864 |
| | 149,558 | 687,047 |
| Mittelwert | 66,188 | 313,730 |
| Standardabweichung | 55,914 | 259,474 |

Kohlert et al. (2002) untersuchte die systemische Verteilung, Pharmakokinetik und Ausscheidung über den Urin von Thymol bei Menschen nach oraler Aufnahme eines thymolhaltigen Präparates (Bronchipret® Tabletten). Es zeigte sich, dass im Urin der Probanden Thymolsulfat und Thymolglucuronoid, aber kein freies Thymol, bis zu 24 Stunden nach Aufnahme nachgewiesen werden konnte.

Im vorliegenden Versuch konnte nicht festgestellt werden, ob das Thymol in Form von Sulfat, Glucuronoid oder frei im Nierengewebe vorliegt, da nur das Gesamt-Thymol nach Abspaltung der Konjugate bestimmt wurde. Hier wäre eine Analysenmethode interessant, welche die gleichzeitige Bestimmung von freiem und gebundenem Thymol erlaubt.

Takada et al. (1979) untersuchten die Ausscheidung der Konjugate Thymolglucuronoid und -sulfat über den Urin an drei Kaninchen nach oraler Aufnahme von 0,5g/kg KM Thymol über einen Zeitraum von 72 Stunden. Auch sie stellten fest, dass die Konzentration dieser Konjugate in den ersten 24 Stunden im Urin deutlich anstieg und danach wieder absank. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass der Niere eine wichtige Rolle bei der Ausscheidung von Thymol

zukommt. Da schon nach 72 Stunden kein signifikanter Unterschied mehr zu den Kontrolltieren zu erkennen war, scheint Thymol relativ schnell mit dem Urin ausgeschieden zu werden.

Im vorliegenden Versuch wurde der Gehalt im Urin zwar nicht untersucht, aber sieben Tage nach Fütterung ohne Thymolzusatz wurden wieder Proben von den Organen gewonnen. Hier zeigte sich, dass außer bei einer Gewebeprobe alle Thymol-Werte unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Es kann also angenommen werden, dass Thymol nur während der Aufnahme von thymolhaltigem Futter in der Niere akkumuliert wird, es nach dem Absetzen schnell zur Ausscheidung kommt und es nicht länger im Gewebe verbleibt. Der Wert mit 52,40 ng/g DM erscheint hier eher ein Ausreißer zu sein, der eventuell auf Grund von einem Messfehler durch Reste auf der Faser oder anderweitiger Kontamination der Gewebeprobe zustande gekommen sein könnte. Um dies genau zu überprüfen wäre ein größerer Stichprobenumfang notwendig.

5.2. Thymolgehalt im Muskelgewebe

Im Muskelgewebe der Kaninchen war nur in einer einzigen Probe der Gruppe T1 eine geringe Thymolkonzentration messbar. In Versuchsgruppe T2 gab es in keiner Probe eine messbare Konzentration. Es scheint zu keiner Akkumulation in diesem Gewebe zu kommen. Eine mögliche Begründung könnte die schnelle Biotransformation in die wasserlöslichen Substanzen Thymlosulfat und Thymolglucuronidase sein, die dann wieder ausgeschieden werden.

Auch bei den Untersuchungen an Masthühnern, welche ätherisches Öl des Thymians oder Thymiankraut zugefüttert bekamen, zeigten sich ähnliche Ergebnisse (Haselmeyer et al. 2015, Ocel'ová et al. 2016). In beiden Versuchen waren nur sehr geringe Mengen Thymol im untersuchten Muskelgewebe zu finden, wobei nur in der Arbeit von Haselmeyer et al. (2015) das *limit of quantitation (LOQ)* mit 3 ng/g angegeben wurde und die Werte des Gewebes auch in diesen Bereich fielen. Eine mögliche Begründung für diese niedrigen Werte im Muskelgewebe könnte die geringe Aufnahmefähigkeit von Thymol und seiner Konjugate durch die Zellmembran sein oder eine hohe Aktivität bzw. Anzahl an Effluxtransportern im Muskelgewebe, durch die es zu einer schnellen Wieder-Ausscheidung kommt (Ocel'ová, Chizzola, Pisarčíková, Novak, Ivanišínová et al. 2016)

5.3. Thymolgehalt im Lebergewebe

Der Thymolgehalt im Lebergewebe von den Kaninchen der Gruppe T1 war mit einem Mittelwert von 28,08 ng/g DM signifikant niedriger als im Nierengewebe. Auffällig ist auch hier die sehr große Streuung der Werte. Während in drei Proben der Gehalt unter der Nachweisgrenze lag, liegt der Höchstwert bei 105,85 ng/ DM.

Diese um mehr als das Zehnfache niedrigeren Werte stimmen mit den Ergebnissen von Ocel'ová et al. (2016) überein. Auch in ihrer Studie war der Gehalt in der Leber bei Masthühnern signifikant niedriger als im Nierengewebe. So kann ihre Annahme, dass Thymol in der Leber sehr schnell metabolisiert und wieder ausgeschieden wird, bestätigt werden.

Sasaki et al. (2005) stellten bei Untersuchungen an Mäusen fest, dass die Enzyme, die an der Biotransformation von Thymol und Carvacrol beteiligt sind, in der Leber signifikant ansteigen, wenn höhere Konzentrationen dieser Stoffe vorliegen. So kann die Leber auf die hohen Konzentrationen von Thymol reagieren und sie schneller durch Glucuronidierung und Sulfatierung in wasserlösliche Substanzen umwandeln, die dann wiederum über die Blutbahn zur Niere transportiert und ausgeschieden werden. Das könnte auch eine Erklärung sein, weshalb in der Gruppe T2 der Thymolgehalt in allen Proben unterhalb der Nachweisgrenze lag. So könnte angenommen werden, dass, trotz der wesentlich niedrigeren Werte im Lebergewebe, im Vergleich zur Niere, diese auch beim Kaninchen maßgeblich an der Verstoffwechslung beteiligt ist. Die geringen Konzentrationen in den Proben könnten ein Resultat der schnellen Verstoffwechslung sein und schließen keineswegs die Beteiligung der Leber an der Verstoffwechslung aus.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung und Akkumulation von Thymol im Gewebe von Leber, Niere und Muskel nach oraler Aufnahme über das Futter beim Kaninchen untersucht. Hierfür wurde an 48 Kaninchen ein Fütterungsversuch durchgeführt. Allen Kaninchen außer den Kontrollgruppentieren wurde 21 Tage lang Thymol (250 mg/kg Futter) dem Futter beigemischt. Anschließend wurden die Kaninchen in zwei Gruppen geteilt. Die eine Gruppe wurde getötet und Gewebeproben entnommen, die andere Gruppe erhielt sieben Tage lang weiterhin nur die Basaldiät, genauso wie die Kontrollgruppentiere über den gesamten Zeitraum der Studie. Die Probengewinnung von Leber, Niere und Muskel erfolgte in der zweiten Gruppe am Tag 28. Diese Gewebeproben wurden nach einer Festphasenmikroextraktion mittels Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie auf ihren Thymolgehalt untersucht. Ziel der Arbeit war es, die Verteilung des Thymols in den verschiedenen Geweben nach der Zufütterung und sieben Tage nach dem Absetzen zu untersuchen. Die ermittelten Konzentrationsunterschiede lassen eine Vermutung über den Metabolismus, die Verteilung und die Ausscheidung des Thymols beim Kaninchen zu.

Die höchsten Thymolkonzentrationen nach 21-tägiger Fütterung wurden im Nierengewebe gefunden mit einem Mittelwert von 313,73 ng/g DM. Die Thymolkonzentrationen des Lebergewebes zeigten eine sehr breite Streuung von 0 bis 105,85 ng/g DM. Im Muskelgewebe war nur in einer Probe eine sehr geringe Konzentration von Thymol nachweisbar. Sieben Tage nach Absetzen des Futterzusatzes zeigte sich lediglich in einer Probe des Nierengewebes eine messbare Konzentration.

Man kann also davon ausgehen, dass die Ausscheidung über die Niere respektive den Urin erfolgt, wobei die Leber auch maßgeblich an der Biotransformation und Verstoffwechslung beteiligt zu sein scheint. Da es nach dem Absetzen des Futterzusatzstoffes zu einem schnellen Absinken in allen Gewebeproben kommt, scheint es zu keiner längerfristigen Akkumulation von Thymol in den in diesem Versuch untersuchten Geweben des Kaninchens zu kommen.

7. Summary

In the present thesis, the distribution and accumulation of thymol in the tissues of liver, kidney and muscle after oral ingestion via the diet were studied in rabbits. For this purpose, a feeding experiment was performed on 48 rabbits. Thymol (250 mg/kg feed) was added to the feed of all rabbits for 21 days except the rabbits of the control groups. Following, the rabbits were divided into two groups. The first group was slaughtered and tissue samples were taken, the second group was subsequently fed with the basal diet for seven days, in the same way as the control group animals throughout the feeding trial. Samples of liver, kidney and muscle were collected in the second group at day 28. These tissue samples were analyzed for thymol content after solid phase microextraction by gas chromatography coupled with mass spectrometry.

The aim of the study was to investigate the distribution of thymol in the different tissues after feeding and after withdrawal of the feed additive. The determined concentration differences allow a conjecture about the metabolism, distribution and excretion of thymol in rabbits.

The highest thymol concentration at day 21 was found in the kidney with a mean of 313,73 ng/g DM. Thymol concentrations in liver tissue ranged from 0 to 105.85 ng/g DM. In muscle tissue, a very low concentration was detectable in only one sample. Seven days after withdrawal of the feed additive, only one sample of kidney tissue showed a measurable concentration of thymol.

It can therefore be assumed, that excretion takes place via the kidney and urine, though the liver also seems to be significantly involved in biotransformation and metabolism. Since there is a rapid decrease of thymol in all tissue samples after withdrawal of the feed additive, it can be concluded that no long term accumulation occurs in the rabbit tissues studied in this experiment.

Abkürzungen

| | |
|-------|--|
| °C | Grad Celsius |
| Abb. | Abbildung |
| Abs. | Absatz |
| Art. | Artikel |
| BD | Basaldiät |
| BfArM | des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte |
| bzw. | beziehungsweise |
| cm | Zentimeter |
| COPD | chronisch obstruktive Lungenerkrankung |
| DM | Trockenmasse |
| EI | electron impact |
| EO | ätherisches Öl |
| EU | Europäische Union |
| g | Gramm |
| GC | Gaschromatographie |
| GIT | Gastrointestinaltrakt |
| hPa | Hektopascal |
| kg | Kilogramm |
| L | Liter |
| LOD | limit of detection |
| LOQ | limit of quantitation |
| MDA | Malondialdehyd |
| m | Meter |

| | |
|------|---|
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mol | Mol |
| MS | Massenspektrometrie |
| m/z | Masse-zu-Ladung-Verhältnis |
| Nr. | Nummer |
| SIM | Selektives Ionen Monitoring |
| SPME | Solid Phase Micro Extraction |
| TEER | transepithelialer Widerstand |
| T1 | Versuchsgruppe von Kaninchen die nach 21tägiger Thymolfütterung geschlachtet wurden |
| T2 | Versuchsgruppe von Kaninchen die sieben Tage nach absetzen des Thymolfutterzusatzes geschlachtet wurden |
| z.B. | zum Beispiel |

Literaturverzeichnis

- Bacova K, Zitterl-Eglseer K, Chrastinova L, Laukova A, Madarova M, Gancarcikova S, Sopkova D, Andrejckakova Z, Placha I. 2020. Effect of Thymol Addition and Withdrawal on Some Blood Parameters, Antioxidative Defence System and Fatty Acid Profile in Rabbit Muscle. *Animals : an open access journal from MDPI*, 10 (8). DOI 10.3390/ani10081248.
- Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. 2007. *Herbal medicines*. Dritte. ed. London: Pharmaceutical Press, 710.
- Berufsgenossenschaft der Chemischen Industrie, Heidelberg. 2000. *Toxikologische Bewertung Thymol Nr.259*, (06).
- Blas C de, Wiseman J. 2010. *Nutrition of the rabbit*. Zweite ed. Cambridge, MA: CABI, 275.
- Brendieck-Worm C, Melzig MF, Hrsg. 2018. *Phytotherapie in der Tiermedizin*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 599.
- Brendieck-Worm C, Melzig MF. 2018. Wundbehandlung. In: Brendieck-Worm C, Melzig MF, Hrsg. *Phytotherapie in der Tiermedizin*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 366–389.
- Brendieck-Worm C, Melzig MF, Vollstedt S. 2018. Atemwegserkrankungen. In: Brendieck-Worm C, Melzig MF, Hrsg. *Phytotherapie in der Tiermedizin*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 199–240.
- Brendieck-Worm, C, Melzig MF, Stöger E. 2018. Hauterkrankungen. In: Brendieck-Worm C, Melzig MF, Hrsg. *Phytotherapie in der Tiermedizin*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 390–436.
- Chevallier A. 2016. *Encyclopedia of herbal medicine*. Third edition. London: DK/Penguin Random House, 336.
- Echols SM. 2006. Evaluating and Treating the Kidneys. In: Harrison GJ, Lightfoot TL, Hrsg. *Clinical avian medicine*. Palm Beach, FL: Spix Pub, 451–491.
- Engelbertz J, Schwenk T, Kinzinger U, Schierstedt D, Verspohl EJ. 2008. Thyme extract, but not thymol, inhibits endothelin-induced contractions of isolated rat trachea. *Planta medica*, 74 (12): 1436–1440. DOI 10.1055/s-2008-1081349.

EU Register. 2021. https://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed/feed-additives/eu-register_en (Zugriff 29.01.2021).

EU-Parlament und der Rat der europäischen Union. 18.10.2003. VERORDNUNG (EG) Nr. 1831/2003, 15.

Fachini-Queiroz FC, Kummer R, Estevão-Silva CF, Carvalho MDdB, Cunha JM, Grespan R, Bersani-Amado CA, Cuman RKN. 05/07/2012. Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM, 2012. DOI 10.1155/2012/657026.

Froese F. 2013. Vergleichende Untersuchung zur Nierendiagnostik bei Falken mittels bildgebender Verfahren unter besonderer Berücksichtigung der Computertomographie [Dissertation]. Berlin, 166.

Gemeinholzer B. 2018. Systematik der Pflanzen kompakt. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 379.

Gesundheitsportal. 04/02/2021. <https://www.gesundheit.gv.at/leben/ernaehrung/kraeuter-gewuerze/kraeuter/thymian> (Zugriff 04.02.2021).

Harcourt-Brown F. 2008. Textbook of rabbit medicine. Reprinted. Edinburgh: Butterworth-Heinemann, 410.

Haselmeyer A. 2007. Wirkung von Thymian als Futtermittelzusatz beim Broiler [Dissertation]. Veterinärmedizinische Universität Wien, 165.

Haselmeyer A, Zentek J, Chizzola R. 2015. Effects of thyme as a feed additive in broiler chickens on thymol in gut contents, blood plasma, liver and muscle. *Journal of the science of food and agriculture*, 95 (3): 504–508. DOI 10.1002/jsfa.6758.

Hirakawa H. 2001. Coprophagy in leporids and other mammalian herbivores. *Mammal Review*, 31 (1): 61–80. DOI 10.1046/j.1365-2907.2001.00079.x.

Kohlert C 2001. Systemische Verfügbarkeit und Pharmakokinetik von Thymol nach oraler Applikation einer thymianhaltigen Zubereitung im Menschen. [Dissertation]. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 180.

Kohlert C, Schindler G, März RW, Abel G, Brinkhaus B, Derendorf H, Gräfe E-U, Veit M. 2002, Systemic Availability and Pharmacokinetics of Thymol in Humans. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 42:731-737. DOI: 10.1177/009127002401102678

kraeuter-buch.de. 04/02/2021. <https://www.kraeuter-buch.de/kraeuter/Thymian.html> (Zugriff 04.02.2021).

Mitsch P, Zitterl-Eglseer K, Köhler B, Gabler C, Losa R, Zimpernik I. 2004. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. *Poultry science*, 83 (4): 669–675. DOI 10.1093/ps/83.4.669.

Morales R. 2002. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: Stahl-Biskup E, Hrsg. *Thyme. The genus thymus*. London: Taylor & Francis, 1–43.

Ocel'ová V, Chizzola R, Pisarčíková J, Novak J, Ivanišinová O, Faix Š, Plachá I. 2016. Effect of Thyme Essential Oil Supplementation on Thymol Content in Blood Plasma, Liver, Kidney and Muscle in Broiler Chickens. *EFSA Journal*, 10 (2): 2573.

Ocel'ová V, Chizzola R, Battelli G, Pisarcikova J, Faix S, Gai F, Placha I. 2019. Thymol in the intestinal tract of broiler chickens after sustained administration of thyme essential oil in feed. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 103 (1): 204–209. DOI 10.1111/jpn.12995.

O'Malley B. 2008. *Klinische Anatomie und Physiologie bei kleinen Heimtieren, Vögeln, Reptilien und Amphibien*. Erste. Aufl. München, Jena: Elsevier Urban & Fischer, 318.

Österreichisches Lebensmittelbuch. 04/02/2021. <https://www.lebensmittelbuch.at/> (Zugriff 04.02.2021).

Placha I, Ocelova V, Chizzola R, Battelli G, Gai F, Bacova K, Faix S. 2019. Effect of thymol on the broiler chicken antioxidative defence system after sustained dietary thyme oil application. *British poultry science*, 60 (5): 589–596. DOI 10.1080/00071668.2019.1631445.

Placha I, Takacova J, Ryzner M, Cobanova K, Laukova A, Stropfova V, Venglovska K, Faix S. 2014. Effect of thyme essential oil and selenium on intestine integrity and antioxidant status of broilers. *British poultry science*, 55 (1): 105–114. DOI 10.1080/00071668.2013.873772.

Placha I, Chrastinova L, Laukova A, Cobanova K, Takacova J, Stropfova V, Chrenkova M, Formelova Z, Faix S. 2013. Effect of thyme oil on small intestine integrity and antioxidant

status, phagocytic activity and gastrointestinal microbiota in rabbits. *Acta veterinaria Hungarica*, 61 (2): 197–208. DOI 10.1556/AVet.2013.012.

Rees Davies R, Rees Davies JA. 2003. Rabbit gastrointestinal physiology. *Vet Clin Exot Anim*, (6): 139–153.

Salehi B, Mishra AP, Shukla I, Sharifi-Rad M, Del Contreras MM, Segura-Carretero A, Fathi H, Nasrabadi NN, Kobarfard F, Sharifi-Rad J. 2018. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy research : PTR*, 32 (9): 1688–1706. DOI 10.1002/ptr.6109.

Sasaki K, Wada K, Tanaka Y, Yoshimura T, Matuoka K, Anno T. 2005. Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Leaves and Its Constituents Increase the Activities of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Mouse Liver. *Journal of Medicinal Food*, 8 (2): 184–189. DOI 10.1089/jmf.2005.8.184.

Stahl-Biskup E. 2000. Thymus. In: Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G, Hrsg. *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*. Fünfte., vollständig neubearbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer, 966–968.

Sticher O. 2010. Ätherische Öle und Drogen, die ätherisches Öl enthalten. In: Hänsel R, Sticher O, Steinegger E, Hrsg. *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. Neunte., überarb. und aktualisierte Aufl. Heidelberg: Springer Medizin, 941–1050.

Takada M. 1979. on the metabolic detoxication of thymol in rabbit and man. *The Journal of Toxicological Sciences*, (4): 341–350.

Takada M, Agata I, Sakamoto M, Yagi N, Hayashi N. 1979. On the metabolic detoxication of thymol in rabbit and man. *The Journal of Toxicological Sciences*, 1979 (4): 341–350.

Zarzuelo A, Crespo E. 2002. The medicinal and non-medicinal uses of thyme. In: Stahl-Biskup E, Hrsg. *Thyme. The genus thymus*. London: Taylor & Francis, 263–292.

Zitterl-Eglseer, K; Wetscherek, W; Stoni, A; Kroismayr, A; Windisch, W 2008. Bioverfügbarkeit der ätherischen Öle eines phytobiotischen Futterzusatzes und der Einfluss auf die Leistung bzw. Nährstoffverdaulichkeit bei Absetzferkeln. *Die Bodenkultur*: (59) 1–4 121–129.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Strukturformel Thymol..... | 7 |
| Abbildung 2: Strukturformel Carvacrol..... | 7 |
| Abbildung 3: Zusammensetzung der Basaldiät (Bacova et al. 2020)..... | 14 |
| Abbildung 4: Thymolgehalt der verschiedenen Gewebe der acht Kaninchen, welche 21 Tage einen Thymolfutterzusatz erhalten hatten. | 19 |
| Abbildung 5: Thymolgehalt in den Proben der Masthühner von Ocel'ová et al. (2016)..... | 24 |
| | |
| Tabelle 1: physikalisch chemische Eigenschaften von Thymol (Berufsgenossenschaft der Chemischen Industrie, Heidelberg 2000) | 8 |
| Tabelle 2: Thymolgehalt in den Gewebeproben der Gruppen T1 und T2 | 20 |
| Tabelle 3: deskriptive Statistik T1 und T2 | 20 |
| Tabelle 4: Thymolgehalt im Nierengewebe Gruppe T1 in ng/g und ng/g DM..... | 25 |
| Tabelle 5: Kolmogorov-Smirnov-Test T1 Niere | 38 |
| Tabelle 6: Kolmogorov-Smirnov-Test T1 Leber | 38 |
| Tabelle 7: Kolmogorov-Smirnov-Test T1 Muskel..... | 38 |
| Tabelle 8: Kruskal-Wallis Test..... | 39 |
| Tabelle 9: Dunn's multiple comparisons test T1 | 39 |
| Tabelle 10: Ergebnisse des T-Tests für unabhängige Stichproben der Proben T1 und T2 des Muskelgewebes | 40 |

Tabelle 11: Ergebnisse des T-Tests für unabhängige Stichproben der Proben T1 und T2 des Nierengewebes

..... 41

Tabelle 12: Ergebnisse des T-Tests für unabhängige Stichproben der Proben T1 und T2 des Lebergewebes

..... 42

Anhang

Kolmogorov-Smirnov-Test T1

Tabelle 5: Kolmogorov-Smirnov-Test T1 Niere

| Rang | Thymol Niere (ng/g DM) | (Rang-1)/n | tats. Kummulierter Anteil | Differenz | Anzahl | 8 |
|------|------------------------|------------|---------------------------|------------|-----------------|-------------|
| 1 | 39,03162 | 0 | 0,144873519 | 0,14487352 | | |
| 2 | 77,76816 | 0,125 | 0,181572712 | 0,05657271 | Mittelwert | 313,7304588 |
| 3 | 82,87669 | 0,25 | 0,186813544 | 0,06318646 | Std. Abweichung | 259,4737709 |
| 4 | 170,725 | 0,375 | 0,290770062 | 0,08422994 | Max. Abweichung | 0,150408537 |
| 5 | 392,5976 | 0,5 | 0,619417138 | 0,11941714 | Kritischer Wert | 0,4543 |
| 6 | 412,933 | 0,625 | 0,648888745 | 0,02388875 | | |
| 7 | 646,8644 | 0,75 | 0,900408537 | 0,15040854 | | |
| 8 | 687,0472 | 0,875 | 0,92488869 | 0,04988869 | | |

Tabelle 6: Kolmogorov-Smirnov-Test T1 Leber

| Rang | Thymol Leber (ng/g DM) | (Rang-1)/n | tats. Kummulierter Anteil | Differenz | Anzahl | 8 |
|------|------------------------|------------|---------------------------|------------|-----------------|-------------|
| 1 | 0 | 0 | 0,221133522 | 0,22113352 | | |
| 2 | 0 | 0,125 | 0,221133522 | 0,09613352 | Mittelwert | 28,08105036 |
| 3 | 0 | 0,25 | 0,221133522 | 0,02886648 | Std. Abweichung | 36,54623235 |
| 4 | 18,75476831 | 0,375 | 0,399287659 | 0,02428766 | Max. Abweichung | 0,221133522 |
| 5 | 21,26446404 | 0,5 | 0,42601868 | 0,07398132 | Kritischer Wert | 0,4543 |
| 6 | 22,86088273 | 0,625 | 0,443209312 | 0,18179069 | | |
| 7 | 55,91691926 | 0,75 | 0,776869058 | 0,02686906 | | |
| 8 | 105,8513685 | 0,875 | 0,983331385 | 0,10833139 | | |

Tabelle 7: Kolmogorov-Smirnov-Test T1 Muskel

| Rang | Thymol Muskel (ng/g DM) | (Rang-1)/n | tats. Kummulierter Anteil | Differenz | Anzahl | 8 |
|------|-------------------------|------------|---------------------------|------------|-----------------|-------------|
| 1 | 0 | 0 | 0,361836805 | 0,3618368 | | |
| 2 | 0 | 0,125 | 0,361836805 | 0,2368368 | Mittelwert | 3,619163191 |
| 3 | 0 | 0,25 | 0,361836805 | 0,1118368 | Std. Abweichung | 10,23653934 |
| 4 | 0 | 0,375 | 0,361836805 | 0,0131632 | Max. Abweichung | 0,388163195 |
| 5 | 0 | 0,5 | 0,361836805 | 0,1381632 | Kritischer Wert | 0,4543 |
| 6 | 0 | 0,625 | 0,361836805 | 0,2631632 | | |
| 7 | 0 | 0,75 | 0,361836805 | 0,3881632 | | |
| 8 | 28,95330553 | 0,875 | 0,993335836 | 0,11833584 | | |

Tabelle 8: *Kruskal-Wallis Test*

| | |
|---|-------------|
| Kruskal-Wallis test | |
| P value | 0,0003 |
| Exact or approximate P value? | Approximate |
| P value summary | *** |
| Do the medians vary signif. (P < 0.05)? | Yes |
| Number of groups | 3 |
| Kruskal-Wallis statistic | 16,19 |
| | |
| Data summary | |
| Number of treatments (columns) | 3 |
| Number of values (total) | 24 |
| | |
| Number of families | 1 |
| Number of comparisons per family | 3 |
| Alpha | 0,05 |
| | |
| Number of families | 1 |
| Number of comparisons per family | 3 |
| Alpha | 0,05 |

Tabelle 9: *Dunn's multiple comparisons test T1*

| Dunn's multiple comparisons test | Mean rank diff, | Significant? | Summary | | | |
|----------------------------------|-----------------|--------------|-----------------|----|----|-------|
| Niere vs. Leber | 9,063 | Yes | * | | | A-B |
| Niere vs. Muskel | 13,44 | Yes | *** | | | A-C |
| Leber vs. Muskel | 4,375 | No | ns | | | B-C |
| | | | | | | |
| Test details | Mean rank 1 | Mean rank 2 | Mean rank diff, | n1 | n2 | Z |
| Niere vs. Leber | 20 | 10,94 | 9,063 | 8 | 8 | 2,66 |
| Niere vs. Muskel | 20 | 6,563 | 13,44 | 8 | 8 | 3,945 |
| Leber vs. Muskel | 10,94 | 6,563 | 4,375 | 8 | 8 | 1,284 |

Tabelle 10: Ergebnisse des T-Tests für unabhängige Stichproben der Proben T1 und T2 des Muskelgewebes

| Table Analyzed | T-Test |
|--|-----------------|
| Column F | Muskel 2 |
| vs. | vs. |
| Column E | Muskel 1 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,3343 |
| P value summary | ns |
| Significantly different (P < 0.05)? | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=1,000, df=14 |
| How big is the difference? | |
| Mean of column E | 3,619 |
| Mean of column F | 0 |
| Difference between means (F - E) ± SEM | -3,619 ± 3,619 |
| 95% confidence interval | -11,38 to 4,143 |
| R squared (eta squared) | 0,06667 |
| F test to compare variances | |
| F, DFn, Dfd | Infinity, 7, 7 |
| P value | <0,0001 |
| P value summary | **** |
| Significantly different (P < 0.05)? | Yes |
| Data analyzed | |
| Sample size, column E | 8 |
| Sample size, column F | 8 |

Tabelle 11: Ergebnisse des T-Tests für unabhängige Stichproben der Proben T1 und T2 des Nierengewebes

| Table Analyzed | T-Test |
|--|------------------|
| Column D | Niere 2 |
| vs. | vs. |
| Column C | Niere 1 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0049 |
| P value summary | ** |
| Significantly different (P < 0.05)? | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=3,340, df=14 |
| How big is the difference? | |
| Mean of column C | 313,7 |
| Mean of column D | 6,55 |
| Difference between means (D - C) ± SEM | -307,2 ± 91,97 |
| 95% confidence interval | -504,4 to -109,9 |
| R squared (eta squared) | 0,4435 |
| F test to compare variances | |
| F, DFn, Dfd | 196,1, 7, 7 |
| P value | <0,0001 |
| P value summary | **** |
| Significantly different (P < 0.05)? | Yes |
| Data analyzed | |
| Sample size, column C | 8 |
| Sample size, column D | 8 |

Tabelle 12: Ergebnisse des T-Tests für unabhängige Stichproben der Proben T1 und T2 des Lebergewebes

| Table Analyzed | T-Test |
|--|-------------------|
| Column B | Leber 2 |
| vs. | vs. |
| Column A | Leber 1 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0474 |
| P value summary | * |
| Significantly different (P < 0.05)? | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=2,173, df=14 |
| How big is the difference? | |
| Mean of column A | 28,08 |
| Mean of column B | 0 |
| Difference between means (B - A) ± SEM | -28,08 ± 12,92 |
| 95% confidence interval | -55,79 to -0,3682 |
| R squared (eta squared) | 0,2523 |
| F test to compare variances | |
| F, DFn, Dfd | Infinity, 7, 7 |
| P value | <0,0001 |
| P value summary | **** |
| Significantly different (P < 0.05)? | Yes |
| Data analyzed | |
| Sample size, column A | 8 |
| Sample size, column B | 8 |



Article

Effect of Sustained Administration of Thymol on Its Bioaccessibility and Bioavailability in Rabbits

Kristina Bacova ^{1,2}, Karin Zitterl Eglseer ³, Gesine Karas Rauber ³, Lubica Chrastinova ⁴, Andrea Laukova ¹, Margareta Takacsova ¹, Monika Pogany Simonova ¹ and Iveta Placha ^{1,*}

¹ Centre of Biosciences, Slovak Academy of Sciences, Institute of Animal Physiology, Soltesovej 4-6, 040 01 Kosice, Slovakia; bacovak@saske.sk (K.B.); laukova@saske.sk (A.L.); takacsova@saske.sk (M.T.); simonova@saske.sk (M.P.S.)

² University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Komenskeho 73, 041 81 Kosice, Slovakia

³ Institute of Animal Nutrition and Functional Plant Compounds, University of Veterinary Medicine Vienna, Veterinarplatz 1, A-1210 Wien, Austria; karin.zitterl@vetmeduni.ac.at (K.Z.E.); raeuber.gesine@gmail.com (G.K.R.)

⁴ National Agricultural and Food Centre, Hlohovecka 2, 951 41 Nitra-Luianky, Slovakia; lubica.chrastinova@mppc.sk

* Correspondence: placha@saske.sk; Tel.: +421-55-792-2969

Citation: Bacova, K.; Eglseer, K.Z.; Rauber, G.K.; Chrastinova, L.; Laukova, A.; Takacsova, M.; Simonova, M.P.; Placha, I. Effect of Sustained Administration of Thymol on Its Bioaccessibility and Bioavailability in Rabbits. *Animals* **2021**, *11*, 2595. <https://doi.org/10.3390/ani11092595>

Academic Editors: Alessandro Dal Bosco and Cesare Castellini

Received: 3 August 2021
Accepted: 1 September 2021
Published: 3 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: The purpose of this study was to investigate the bioavailability and metabolic path of thymol, a major constituent of *Thymus vulgaris* L., in the rabbit organism. Oral bioavailability is a key parameter affecting the efficacy of substances, but it is not surprising that it does not correlate satisfactorily with efficacy. The main limitation factors are rate of absorption, metabolism, and excretion processes. In this work, the thymol metabolic path in the rabbit organism was determined for the first time after its sustained oral administration. We confirm intensive absorption of thymol from the gastrointestinal tract; our results point to metabolism and accumulation in kidney tissue and intensive metabolic and excretion processes in the liver. Some metabolic processes were present also after thymol withdrawal. Thymol as a lipophilic substance was found only in trace amounts in fat and muscle tissue as a consequence of its conversion into hydrophilic metabolite and greater elimination in the rabbit organism. This paper highlights the insufficient knowledge of modes of action of plant compounds in animal organisms.

Abstract: The objective of this study was the detection of thymol in rabbit plasma, tissues, large intestinal content, and faeces. Forty-eight rabbits were divided into control and experimental groups (thymol 250 mg/kg feed). Thymol was administered for 21 days and then withdrawn for 7 days. Concentration of thymol in the intestinal wall (IW) was significantly higher than in plasma ($p < 0.05$) and liver ($p < 0.05$); in the kidneys it was significantly higher than in plasma ($p < 0.05$) and liver ($p < 0.05$) during thymol addition. Thymol in IW was significantly higher than in plasma also after withdrawal ($p < 0.01$). Significant correlation ($r_s = -1.000$, $p < 0.01$) between IW and plasma points to the intensive absorption of thymol from the intestine, while the correlation between plasma and liver ($r_s = 0.786$, $p < 0.05$) indicates intensive biotransformation and excretion processes in liver. Significant correlation between liver and kidney ($r_s = 0.738$, $p < 0.05$) confirms the intensive metabolism of thymol in the kidney. During the withdrawal period, thymol was detected above trace amounts only in faeces, and was significantly higher than in the colon during both periods ($p < 0.01$). Results show intensive biotransformation of thymol in the rabbit organism.

Keywords: rabbit; thymol; absorption; distribution; accumulation; excretion

1. Introduction

In recent years, natural products have assumed great importance as antibiotic replacement additives and as growth promoting agents in food animals. There is large pressure on the animal production industry to improve animal treatment as well as production performance, and to ensure the safety of products for human consumption while minimizing economic losses [1]. Even though, the benefits of herbal additives depend on the biological activities of their compounds and their pharmacokinetics, their precise mode of action at the molecular level has not yet been fully elucidated [2,3].

To our knowledge, bioaccessibility, bioavailability, and metabolism of phenolic compounds have been studied *in vitro* in humans [4,5] and in chickens [6]. No information is available about absorption, distribution, and deposition of natural compounds at target sites in the rabbit organism. The rabbit gastrointestinal tract has characteristic features compared with other animal species, such as the relative importance of the well-developed caecum, and a separation mechanism within the proximal colon [7]. The efficiency of the rabbit's digestion depends in large part on the production and ingestion of caecotrophes, which must be considered as an integral part of the rabbit's digestion system. The process of caecotrophy may be considered as "pseudorumination" which improves feed utilization [8,9].

One of the crucial aspects of the beneficial effect of natural compounds is the amount present in the gut as a result of their release from feed, and their consequent ability to pass through the intestinal barrier. Intestinal absorption of many compounds is limited by a range of biological and physiological barriers in the gastrointestinal tract. Biological barriers are represented mainly by the mucus layer and epithelial cell layer, which is composed of villus and crypt cells. Physiological factors include enzymatic activities in the intestinal lumen, specific transport mechanisms which are able to limit absorption, and intestinal transit time [10].

In terms of the potential role of thymol as feed additive for animals, the aim of our study was to try to produce a more detailed view and better understanding of the mechanism of its absorption, distribution, and accumulation in the rabbit organism after its sustained application into the rabbit's diet.

2. Materials and Methods

2.1. Animals Care and Use

The trial was carried out at the experimental rabbit facility of the National Agricultural and Food Centre, Research Institute for Animal Production, Nitra, Slovakia. The protocol was approved by the Institutional Ethical Committee, and the State Veterinary and Food Office of the Slovak Republic approved the experimental protocol (4047/16-221).

2.2. Animals and Housing

After weaning at 35 days of age, 48 rabbits of both sexes (meat line M9) were randomly divided into a control group (CG) fed a standard diet and an experimental group (EG) fed a standard diet into which 250 mg/kg of thymol was incorporated in powder form ($\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). All experimental wire-net cages (61 cm \times 34 cm \times 33 cm) were kept in rooms with automatic temperature control (22 ± 4 °C) and photoperiod (16L:8D). The rabbits could feed *ad libitum* and had free access to drinking water. The experiment lasted 28 days. The rabbits received feed with thymol addition for 21 days (56 d of age) and for the next 7 days (63 d of age) the thymol was withdrawn. Initial live weight was 1006 ± 98 g in CG and 1035 ± 107 g in EG (2044 ± 24 g in CG, 1965 ± 58.7 g in EG at 56 d of age, and 2671 ± 72 g in CG, 2796 ± 60 g in EG at 63 d of age). Eight rabbits in each group were killed at 56 or 63 d of age using electronarcosis (50 Hz, 0.3A/rabbit for 5 s), immediately hung by the hind legs on the processing line and quickly bled by cutting the jugular veins and the carotid arteries.

2.3. Diet and Chemical Analyses

The standard diet consisted of a commercial diet for growing rabbits (KKZK, Liahrensky podnik Nitra a.s., Nitra, Slovakia) with ingredients and chemical composition as shown in Table 1. The diet was administered in the form of pellets with an average size of 3.5 mm. The feed was stored in darkness to protect against degradation processes. The Association of Official Analytical Chemists (AOAC) methods [11] were used to determine the proportions of crude protein (no. 990.03, CP), ash (no. 942.05), and dry matter (no. 967.03, DM) in the diet, while DM amount was also determined for the tissues, gut content, and faeces. Neutral detergent fibre (NDF) and acid detergent fibre (ADF) were analysed according to Van Soest et al. [12].

Table 1. Ingredients (%) and chemical composition (g/kg feed) of experimental diet.

| Ingredients (%) | | Chemical Composition (g/kg Feed) | |
|--------------------------------------|------|----------------------------------|-------|
| Dehydrated lucerne meal | 36.0 | Dry matter (g/kg) | 900.9 |
| Dry malting sprouts | 15.0 | Organic compounds | 831.8 |
| Oats | 13.0 | Nitrogen free extract | 444.3 |
| Wheat bran | 9.0 | Neutral detergent fibre (NDF) | 352.9 |
| Barley | 8.0 | Acid detergent fibre (ADF) | 208.1 |
| Extracted sunflower meal | 5.5 | Crude fibre | 177.8 |
| Extracted rapeseed meal | 5.5 | Crude protein | 176.6 |
| Dried distiller grains with solubles | 5.0 | Cellulose | 163.1 |
| Premix ¹ | 1.7 | Hemicellulose | 144.8 |
| Limestone | 1.0 | Starch | 133.1 |
| Sodium chloride | 0.3 | Ash | 69.2 |
| | | Fat | 33.1 |
| | | Metabolic energy, MJ/kg | 9.9 |

¹The vitamin-mineral premix provided per kg of complete diet: Retinyl acetate 5.16 mg, Cholecalciferol 0.03 mg, Tocopherol 0.03 mg, Thiamin 0.8 mg, Riboflavin 3.0 mg, Pyridoxin 2.0 mg, Cyanocobalamin 0.02 mg, Niacin 38 mg, Folic acid 0.6 mg, Calcium 1.8 mg, Iron 70 mg, Zinc 66 mg, Copper 15, Selenium 0.25 mg.

2.4. Thymol Stability in Feed

Thymol evaporation in feed was analysed every week during thymol application using high-performance liquid chromatography (HPLC) according to the modified method of Ocelová [6] and Písarčíková et al. [13]. Samples were analysed in triplicate. Briefly, 2 mL of methanol was added into a glass tube containing 0.2 g of milled feed and thymol was extracted in an ultrasonic bath. The methanolic extract was then analysed using the HPLC method with an Ultimate 3000 HPLC-system liquid chromatograph (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). The chromatographic analyses were evaluated by means of Chromleon® Software Version 6.80 SR10 Build 2906.

2.5. Sampling

To determine the thymol content in plasma, blood (1.5 mL) from eight rabbits was collected from the marginal ear vein (*vena auricularis*) into heparinized Eppendorf tubes and plasma was obtained after centrifugation at 1180 × *g* for 15 min. The gastrointestinal tract was removed from the body cavity and was divided into small intestine, caecum, and colon (*n* = 8). Caecum and colon content were removed, and the small intestinal lumen was gently washed with 0.9% NaCl solution. Obtained samples of gut content and intestinal wall together with plasma, liver, kidney, muscle (*musculus longissimus dorsi*) and spleen tissue, fat, and faeces were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at −70 °C until analysis. All samples were collected at both experimental days (56 or 63 d of age).

2.6. Thymol Analyses in Plasma, Tissues, Large Intestinal Content and Faeces

Detection of thymol in samples of plasma, tissues and faeces was performed using headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography coupled with the mass spectrometry method as described by Bacova et al. [14] and Placha et al. [15]. Briefly, detection and quantification were carried out using a GC/MS (type HP 6890 GC) system coupled with a 5972-quadrupole mass-selective detector (Agilent Technologies GmbH, Wilmington, DE, USA). Detection of thymol was confirmed by comparing its specific mass spectrum and retention time with those of the reference compound. Additionally, the Kovats index was calculated. Calibration curves were generated by plotting the peak-area ratios of thymol to *o*-cresol used as an internal standard (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) against the known thymol concentrations. The selective ion mode was used for quantitative analysis of thymol. The mass fragments m/z 135 and m/z 150, as well as m/z 107 and m/z 108, were monitored as characteristic for thymol and *o*-cresol, respectively. Calibration curves were prepared from blank samples spiked directly with 50 μ L thymol (Applichem, Darmstadt, Germany) in standard solutions with known concentrations as follows: for plasma 48, 100, 200, 400, and 800 ng of thymol per mL, for intestinal wall 100, 200, 400, 800, 1000 ng; for liver, kidney, muscle, caecum and colon content 100, 200, 400, 800, 1000, 2000 ng; spleen, fat 24, 50, 100, 200, 400 ng; faeces 200, 400, 800, 1600, 2000, 4000 ng of thymol per g of tissue. Each point on the calibration curve was analysed as a duplicate. The peak of thymol was detected around 19 min and the *o*-cresol peak occurred around 10 min in all samples. Samples for thymol detection were prepared using the method described by Ocelová et al. [16]. Enzyme β -Glucuronidase *Helix pomatia* Type HP-2 (aqueous solution, $\geq 100,000$ units/mL, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was added to samples to cleave thymol from its glucuronide and sulphate, since only free thymol should be detected in the GC system.

2.7. Statistical Analysis

Data collected were analysed using the Kolmogorov–Smirnov test for normal and non-normal distribution. All data were not accepted as parametric. The Kruskal–Wallis test with post hoc Dunn’s Multiple Comparison test was used to determine the differences between plasma and tissues or caecal, colon content and faeces. Results are presented as mean value \pm standard error of mean (SEM). Differences were considered significant at $p < 0.05$. Correlations of thymol concentrations between plasma and intestinal wall, plasma and liver, and liver and kidney were analysed using nonparametric Spearman’s Rank Correlation and expressed as Spearman’s correlation coefficient (r_s). Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The experimental unit was the animal’s cage.

3. Results

3.1. Thymol Stability in Feed

Concentration of thymol in feed during the period of the experiment with its addition was relatively stable at 274 μ g/g DM-0 d; 255 μ g/g DM-7 d; 236 μ g/g DM-14 d.

3.2. Thymol in Plasma and Tissues

Level of thymol in the intestinal wall was significantly higher than in plasma ($p = 0.0211$) and liver ($p = 0.0305$), and in the kidneys it was significantly higher than in plasma ($p = 0.0259$) and liver ($p = 0.0415$) during the period of thymol addition (Table 2). Thymol in fat (19.9 ± 7.36 ng/g DM, $n=2$) and muscle (26.6 ng/g DM, $n=1$) during this period was found only in a small number of samples, and only in trace amounts in others. For this reason, those samples were not included in the statistical evaluation. Significant correlation was established between thymol concentration in plasma and intestinal wall ($r_s = -1.0$, $p < 0.01$), plasma and liver ($r_s = 0.786$, $p < 0.05$) and liver and kidney ($r_s = 0.738$, $p < 0.05$, Figures 1–3). Even though thymol content was determined only in trace amounts during

the period without thymol addition, the differences were statistically evaluated. Thymol in intestinal wall was significantly higher than in plasma in this period ($p = 0.0035$, Table 2).

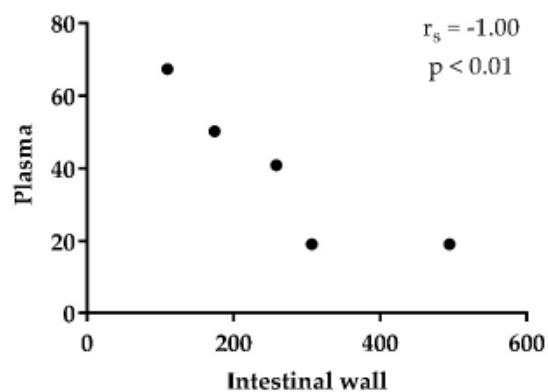


Figure 1. Correlation between plasma (ng/mL) and intestinal wall (ng/g DM).

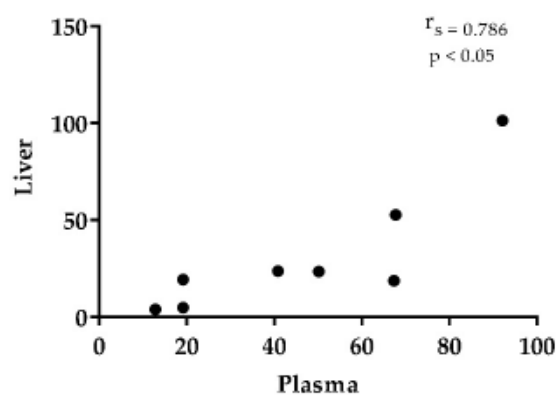


Figure 2. Correlation between liver (ng/g DM) and plasma (ng/mL).

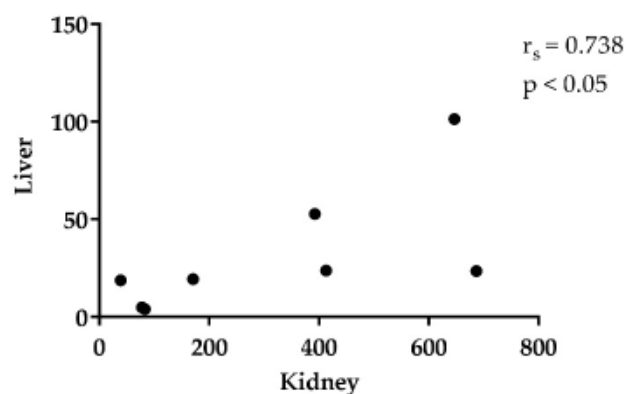


Figure 3. Correlation between liver and kidney (ng/g DM).

Table 2. Thymol content in plasma (ng/mL) and tissue (ng/g DM).

| | 56 d of Age (with Thymol) | | 63 d of Age (without Thymol) | |
|-----------------|---------------------------|------|------------------------------|-------|
| | Mean | SEM | Mean | SEM |
| Plasma | 46.2 ^b | 10.0 | 2.73 ^b | 0.458 |
| Intestinal wall | 268 ^a | 65.9 | 20.4 ^a | 2.70 |
| Liver | 39.9 ^b | 13.4 | 5.93 ^{ab} | 0.285 |
| Kidney | 314 ^a | 91.7 | 16.1 ^{ab} | 6.53 |
| Spleen | 181 ^{ab} | 40.1 | ND | - |

^{ab} Values within a column with different superscript letters differ significantly ($p < 0.05$). Data are presented as mean \pm standard error of mean (SEM).

3.3. Thymol in Caecum, Colon and Faeces

Thymol in faeces was significantly higher than in the colon during both experimental periods, even if only in trace amounts without further thymol addition ($p < 0.01$, Table 3). During this period only thymol in faeces was detected above trace amount.

Table 3. Thymol content in caecum, colon, and faeces (ng/g DM).

| | 56 d of Age (with Thymol) | | 63 d of Age (without Thymol) | |
|--------|---------------------------|-----|------------------------------|-------|
| | Mean | SEM | Mean | SEM |
| Caecum | 882 ^{ab} | 231 | 45.8 ^{ab} | 12.44 |
| Colon | 672 ^b | 330 | 16.4 ^b | 9.44 |
| Faeces | 2444 ^a | 451 | 150 ^a | 40.54 |

^{ab} Values within a column with different superscript letters differ significantly ($p < 0.05$). Data are presented as mean \pm standard error of mean (SEM).

4. Discussion

The epithelial cells in the small intestine wall contain various metabolic enzymes and transporters. The intestinal microflora possesses a wide range of metabolic processes including hydrolysis of glucuronides, sulphate esters, and amides. Enzymes in the intestinal microflora can hydrolyse drug metabolites, especially glucuronide conjugates, and convert them back to the parent compound [10]. The parent drugs excreted and/or released

by the action of gut microflora are reabsorbed by intestinal cells. Metabolites are continuously excreted into the large intestine, where they are again hydrolysed and reabsorbed [17].

After being absorbed from the GIT, thymol becomes metabolized during processes of biotransformation and becomes more hydrophilic. The metabolites, mainly sulphates and glucuronides, are transported across the intestinal epithelium by active processes involving transmembrane proteins. Many transporters such as peptides, vitamins, amino acids, and sugars play important roles in the translocation of drugs and were identified in large amounts in the GIT [18].

Rubió et al. [19] and Písarčíková et al. [13] have confirmed that thymol, which is a small lipophilic molecule, is not detected in unmetabolized form in plasma, as they detected only its conjugates (thymol sulphate and glucuronide). They also detected thymol conjugates in the duodenal wall, which points to active biotransformation of thymol in the organism.

Significant correlation ($r_s = -1.00$, $p < 0.01$) between thymol content in the intestinal wall and plasma in our experiment indicates intensive absorption of thymol from the intestine. Placha et al. [15] and Očeľová et al. [20] also confirmed the intensive absorption of thymol from all intestinal segments in broiler chickens after four weeks of diet supplementation with thyme essential oil. They found significant correlation between thymol content in plasma and individual intestinal segments. Although we found six times lower concentration of thymol in plasma during its addition and seven times lower after its withdrawal (even if only in trace amounts) in comparison with the intestinal wall, we can confirm that some metabolic processes were still active after thymol withdrawal from feed (Tables 2 and 3).

The rabbit caecum is the largest part of the large intestine and contains approximately 40% of the intestinal content. The primary mechanism by which nutrients are released from intestinal content is microbial fermentation, and its products are absorbed through the intestinal wall or are reingested as caecotrophes. The retained particles from the proximal part of the colon also provide substrate for caecal microbiota. The mucus which coats the caecotrophes protects them and allows the fermentation processes to continue in them until they reach the intestine. The composition of the intestinal flora depends to a large extent on the caecotrophic microbial population [21].

Intestinal microflora and epithelial cells play a crucial role in metabolic processes because they produce a wide range of metabolic enzymes [22]. The counts of bacterial flora are highly variable in different parts of the gastrointestinal tract [23]. We assume that the metabolic enzymes responsible for thymol biotransformation in the caecum and consequently in caecotrophes are expressed in large enough amounts that they can affect metabolic activities and consequently exert influence on the amount of thymol and its metabolites in the caecum.

There are some conditions affecting the absorption of compounds in the GIT. In addition to their rate of dissolution in the intestinal fluids, they must also be able to cross membranes in each part of the GIT. In case they are not able to cross these membranes by the time they reach the colon, the extent of intestinal absorption is not sufficient, and the compounds are excreted in faeces [24]. All these circumstances may explain the high concentrations of thymol in the caecum and faeces, not only during its addition but also after its withdrawal from feed (Table 3).

The first study which confirmed the presence of thymol metabolites (thymol sulphate and glucuronide) in the duodenal wall of broiler chickens after sustained consumption of thyme essential oil also confirmed the key role of the intestine in the metabolism of thymol [13]. Očeľová [6] detected thymol in the liver at a level of 8.9% of its concentration in the intestinal wall and observed significant correlation between thymol concentrations in liver and plasma, and liver and intestinal wall, which might indicate sufficient absorption of thymol from the intestinal wall to the liver through the vena portae. We found 15% (with thymol) and 29% (without thymol) of thymol in liver compared with its content in

the intestinal wall, and significant correlation between thymol concentrations in plasma and liver ($r_s = 0.7857$, $p < 0.05$). These results are in agreement with the findings of the above-mentioned authors and point to intensive biotransformation and excretion processes in the liver.

Between the enzyme systems and efflux transporters there exist mutual processes which can affect the efficiency of drugs in the intestine. These couplings can prolong the exposure of drugs *in vivo* and are crucial for enteric and enterohepatic recycling. Some parent compounds are absorbed and metabolized in the intestinal cells, while some portions are effluxed back into the intestinal lumen or transported to the mesenteric vein and are taken up by hepatocytes [17]. Excreted metabolites from enterocytes are converted back to the parent compound and again reabsorbed. Compounds in the liver are metabolized and together with parent compounds are excreted with bile into the duodenum and are then reabsorbed there [14,17]. These repeating processes together with processes of caecotrophy could explain the thymol content in plasma, tissues, and intestinal content after thymol withdrawal, although only in trace amounts. We must point out that we detected the sum of metabolized and non-metabolized thymol, as the thymol metabolites were cleaved by added enzyme, β -glucuronidase. However, the extent of absorption of compounds (drugs) and the contribution to their bioavailability by metabolic enzymes and transporters or receptors present on the intestinal membrane are still not clear.

In the present study, a significantly higher level of thymol in the kidney in comparison with liver tissue and plasma confirmed its metabolism and/or accumulation in this organ (Table 2). Our results are in agreement with our previous study [6], in which we detected a significantly higher thymol concentration in the kidney of chickens with thyme essential oil diet supplementation. Takada [25] detected thymol glucuronide and thymol sulphate in the urine of rabbits, and to our knowledge this is the only study concerned with the metabolic path of thymol in these animals. Data available so far indicate that thymol sulphate could be reabsorbed in the proximal tubule after glomerular filtration, and that cleavage of this metabolite is achieved by enzymes located at the luminal brush border, so that subsequently thymol could be reabsorbed [26]. These authors demonstrated that although the liver is the most important organ for biotransformation, kidney microsomes demonstrate more effective metabolic processes than liver or intestinal microsomes. The significantly higher content of thymol in the kidney and the correlation between liver and kidney ($r_s = 0.7381$, $p < 0.05$) in our study also confirm the intensive metabolism in kidney tissue. However, further study of renal metabolism mechanisms is necessary to confirm these findings.

Before drug compounds can reach systemic circulation and therapeutic targets, several barriers must be overcome [18]. Although lipophilic molecules evidently pass the barriers with ease by transcellular routes, various efflux transporters are preferentially bound with lipophilic molecules, seriously limiting their absorption. The first-pass metabolism which occurs in the intestinal wall decreases the chance of molecules which get into epithelial cells to reach the systemic circulation. Once compounds are absorbed in the GIT, the next major barrier awaits in the form of the first-pass metabolism in the liver. Drugs passing through the portal vein encounter hepatocytes and are metabolized there [18]. Based on these processes we can explain the trace amounts of thymol detected in rabbit muscle and fat in our experiment. Trace amounts of thymol in the muscle tissue of broiler chickens were also detected by Haselmeyer et al. [27] after thymol addition (55 mg/kg DM feed), and by Očeľová [6] after thyme essential oil application. Lipophilic substances which are not metabolized during the process of biotransformation are less readily eliminated and accumulate in fat tissue [22]. As we found only traces of thymol in this tissue, we can hypothesize that the majority of thymol was metabolized and converted into hydrophilic substances.

Finally, little is known about the bioactivity of thymol and thymol metabolites, further studies are needed to evaluate the distribution of thymol in different tissues at different levels and establish its suitable concentration for a beneficial effect on animal health.

5. Conclusions

Our results showed that, thymol was efficiently absorbed from the intestinal lumen and intensive metabolic processes in liver and kidney were observed, while accumulation in fat and muscle tissue was low, probably due to its intensive biotransformation into hydrophilic substances which were then excreted. We confirm some metabolic processes involving thymol even after its withdrawal from feed, as a consequence of caecotrophy. Oral bioavailability of plant compounds is a challenge for scientists because their metabolic processes in the animal organism should be understood at molecular level.

Author Contributions: Conceptualization: I.P.; methodology: I.P., K.B.; validation: I.P.; formal analysis: I.P., K.Z.E., K.B., G.K.R., M.T.; M.P.S.; investigation: I.P., K.B.; resources: I.P., K.Z.E.; data curation: I.P., L.C., A.L.; writing—original draft preparation: I.P., K.B.; writing—review and editing: K.Z.E.; visualization: I.P., K.B.; project administration: I.P.; funding acquisition: I.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Scientific Grant Agency of the Ministry for Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic and the Slovak Academy of Sciences (VEGA 2/0009/20), as well as the Austrian Federal Ministry for Science, Research and Economics, OeAD, Ernst Mach Grant Action Austria-Slovakia.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the State Veterinary and Food Office of the Slovak Republic on 1 December 2016 (approval number SK CH 17016).

Data Availability Statement: Data availability upon reasonable request to the corresponding author.

Acknowledgments: The authors gratefully acknowledge the technical support provided by M. Madarova at the University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Kosice, Slovakia and L. Ondruska, V. Parkanyi and R. Jurcik at the National Agricultural and Food Centre, Research Institute for Animal Production, Nitra, Slovakia. The authors also thank Andrew Billingham for improving the written English of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Kostadinović, L.; Lević, J. Effect of phytoadditives in poultry and pig diseases. *J. Agron. Technol. Eng. Manag.* **2018**, *1*, 1–7.
2. Diaz-Sanchez, S.; D'Souza, D.; Biswas, D.; Hanning, I. Botanical alternatives to antibiotics for use in organic poultry production. *Poult. Sci.* **2015**, *94*, 1419–1430, doi:10.3382/ps/pev014.
3. Gadde, U.; Kim, W.H.; Oh, S.T.; Lillehoj, H.S. Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: A review. *Anim. Health Res. Rev.* **2017**, *18*, 26–45, doi:10.1017/S1466252316000207.
4. Rubió, L.; Farràs, M.; de La Torre, R.; Macià, A.; Romero, M.P.; Valls, R.M.; Solà, R.; Farré, M.; Fitó, M.; Motilva, M.J. Metabolite profiling of olive oil and thyme phenols after a sustained intake of two phenol-enriched olive oils by humans: Identification of compliance markers. *Food Res. Int.* **2014**, *65*, 59–68, doi:10.1016/j.foodres.2014.05.009.
5. Rubió, L.; Macià, A.; Castell-Auvi, A.; Pinent, M.; Blay, M.T.; Ardévol, A.; Romero, M.P.; Motilva, M.J. Effect of the co-occurring olive oil and thyme extracts on the phenolic bioaccessibility and bioavailability assessed by in vitro digestion and cell models. *Food Chem.* **2014**, *149*, 277–284, doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.075.
6. Ocel'ová, V. Plant Additives in Relation to the Animal Gastrointestinal Tract and Metabolism of Their Main Compounds. Ph.D Thesis, Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovakia, 2017.
7. Sakaguchi, E. Digestive strategies of small hindgut fermenters. *Anim. Sci. J.* **2003**, *74*, 327–337, doi:10.1046/j.1344-3941.2003.00124.x.
8. Hirakawa, H. Coprophagy in leporids and other mammalian herbivores. *Mammal Rev.* **2001**, *31*, 61–80, doi:10.1046/j.1365-2907.2001.00079.x.
9. Irlbeck, N.A. How to feed the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) gastrointestinal tract. *J. Anim. Sci.* **2001**, *79*, E343–E346, doi:10.2527/JAS2001.79E-SUPPLE343X.
10. Ho, P.C. Biological and physiological features of the gastrointestinal tract relevant to oral drug absorption. In *Oral Bioavailability: Basic Principles, Advanced Concepts, and Applications*; Hu, M., Li, X., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2011; pp. 51–61.

11. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *International Official Methods of Analysis*, 18th ed.; AOAC: Gaithersburg, MD, USA, 2005.
12. Van Soest, P.J.; Robertson, J.B.; Lewis, B. A methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* **1991**, *74*, 3583–3597, doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.
13. Písarčíková, J.; Ocelová, V.; Faix, Š.; Plachá, I.; Calderón, A.I. Identification and quantification of thymol metabolites in plasma, liver and duodenal wall of broiler chickens using UHPLC-ESI-QTOF-MS. *Biomed. Chromatogr.* **2017**, *31*, e3881, doi:10.1002/bmc.3881.
14. Bacova, K.; Zitterl-Eglseer, K.; Chrastinova, L.; Laukova, A.; Madarova, M.; Gancarcikova, S.; Sopkova, D.; Andrejckakova, Z.; Placha, I. Effect of thymol addition and withdrawal on some blood parameters, antioxidative defence system and fatty acid profile in rabbit muscle. *Animals* **2020**, *10*, 1248, doi:10.3390/ani10081248.
15. Placha, I.; Ocelova, V.; Chizzola, R.; Battelli, G.; Gai, F.; Bacova, K.; Faix, S. Effect of thymol on the broiler chicken antioxidative defence system after sustained dietary thyme oil application. *Br. Poult. Sci.* **2019**, *60*, 589–596, doi:10.1080/00071668.2019.1631445.
16. Ocel'ová, V.; Chizzola, R.; Písarčíková, J.; Novak, J.; Ivanišínová, O.; Faix, Š. Effect of thyme essential oil supplementation on thymol content in blood plasma, liver, kidney and muscle in broiler chickens. *Nat. Prod. Commun.* **2016**, *11*, 1545–1550, doi:10.1055/s-0037-1608317.
17. Singh, R.; Hu, M. Drug metabolism in gastrointestinal tract. In *Oral Bioavailability: Basic Principles, Advanced Concepts, and Applications*; Hu, M., Li, X., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2011; pp. 91–109.
18. Hu, M.; Li, X. Barriers to oral bioavailability—an overview. In *Oral Bioavailability: Basic Principles, Advanced Concepts, and Applications*; Hu, M., Li, X., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2011; pp. 1–5.
19. Rubió, L.; Serra, A.; Macià, A.; Borràs, X.; Romero, M.P.; Motilva, M.J. Validation of determination of plasma metabolites derived from thyme bioactive compounds by improved liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2012**, *905*, 75–84, doi:10.1016/j.jchromb.2012.07.040.
20. Ocel'ová, V.; Chizzola, R.; Battelli, G.; Písarčíková, J.; Faix, S.; Gai, F.; Placha, I. Thymol in the intestinal tract of broiler chickens after sustained administration of thyme essential oil in feed. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2018**, *103*, 204–209, doi:10.1111/jpn.12995.
21. Campbell-Ward, M.L. Gastrointestinal physiology and nutrition. In *Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*, 3rd ed.; Quesenberry, K.E., Carpenter, J.W., Eds.; Elsevier: Saint-Louis, MO, USA, 2012; pp. 183–192.
22. Skálová, L.; Boušová, I. *Metabolismus Léčivých a jiných Xenobiotik*; Karolinum: Praha, Czech Republic, 2011; pp. 162.
23. Ding, X.; Kaminsky, L.S. Human extrahepatic cytochromes P450: Function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2003**, *43*, 149–173, doi:10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140251.
24. Park, M.S.; Chang, J.H. Absorption of drugs via passive diffusion and carrier-mediated pathways. In *Oral Bioavailability: Basic Principles, Advanced Concepts, and Applications*; Hu, M., Li, X., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2011; pp. 63–75.
25. Takada, M.; Agata, I.; Sakamoto, M.; Yagi, N.; Hayashi, N. On the metabolic detoxication of thymol in rabbit and man. *J. Toxicol. Sci.* **1979**, *4*, 341–350, doi:10.2131/jts.4.341.
26. Kohlert, C.; Schindler, G.; März, R.W.; Abel, G.; Brinkhaus, B.; Derendorf, H.; Gräfe, E.U.; Veit, M. Systemic availability and pharmacokinetics of thymol in humans. *J. Clin. Pharmacol.* **2002**, *42*, 731–737, doi:10.1177/009127002401102678.
27. Haselmeyer, A.; Zentek, J.; Chizzola, R. Effects of thyme as a feed additive in broiler chickens on thymol in gut contents, blood plasma, liver and muscle. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *95*, 504–508, doi:10.1002/jsfa.6758.

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an meine Betreuerin Karin Zitterl-Eglseer für die großartige Unterstützung. Sie war von Beginn bis zum Ende immer für all meine Fragen und Probleme da und hat mir immer wieder mit sehr hilfreichen und konstruktiven Vorschlägen weitergeholfen.

Auch möchte ich mich bei Kristina Bacova für das zur Verfügung-stellen der Proben und das damit in mich gesetzte Vertrauen bedanken. Vielen Dank auch für das Einführen in die Laborarbeit und bei der Hilfe der Auswertung der Daten.

Danke auch an meine Familie, Freunde und Studienkolleginnen. Sie haben mich nicht nur bei dem Entstehen dieser Arbeit immer unterstützt. Sie haben mir durch das gesamte Studium geholfen, immer an mich geglaubt und mich motiviert, immer weiterzumachen. Ohne sie wäre das Studium so nicht möglich gewesen.