

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaften

Wirkung oxidierter Fette auf das antioxidative Schutzsystem an Ratten und Meerschweinchen
bei variierender Konzentration von Vitamin E und Vitamin C in der Diät

Der Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

als
Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ernährungswissenschaften
(Dr. troph.)

vorgelegt von:

Diplom-Trophologin
Uta Keller

geb. am 03.02.1976
in Halle/Saale

Gutachter: Prof. Dr. K. Eder
Prof. Dr. G. Stangel
PD Dr. M. Brandsch

Direktor: Prof. Dr. K. Eder
Dekan: Prof. Dr.-Ing. P. Pickel

Verteidigung am: 19.01.2004

Halle/Saale 2004

urn:nbn:de:gbv:3-000006192

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006192>]

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	5
2.1	Versuchsdesign.....	5
2.2	Zusammensetzung und Herstellung der Diäten.....	7
2.3	Charakterisierung der Diätfette.....	9
2.3.1	Aufbereitung der eingesetzten Diätfette.....	9
2.3.2	Tocopherolkonzentration.....	11
2.3.3	Peroxidzahl.....	11
2.3.4	Säurezahl.....	12
2.3.5	UV-Spektrum.....	12
2.3.6	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen.....	13
2.3.7	Gesamt-Carbonylverbindungen.....	15
2.3.8	Polare Verbindungen.....	15
2.4	Versuchstiere und deren Haltung.....	16
2.5	Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials.....	17
2.5.1	Blutaufbereitung und Organentnahme.....	17
2.5.2	Gewinnung von Leberhomogenat und -zytosol.....	18
2.5.3	Extraktion der Gesamtlipide.....	18
2.6	Analytische Methoden.....	19
2.6.1	Proteinbestimmung.....	19
2.6.2	Cholesterin und Triglyzeride.....	19
2.6.3	Fettsäurenspektrum.....	20
2.6.4	Tocopherole und Vitamin E-Verdaulichkeit.....	20
2.6.5	Konzentration von Ascorbinsäure und Harnsäure im Plasma.....	21
2.6.6	Lipidperoxidationsprodukte in Geweben.....	22
2.6.6.1	Cholesterinoxidationsprodukte in der Leber.....	22
2.6.6.2	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen in Leber und Serum bzw. Plasma.....	22
2.6.7	Aktivitätsbestimmung antioxidativer Enzyme.....	23
2.6.7.1	Superoxiddismutase.....	23
2.6.7.2	Katalase.....	24
2.6.7.3	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase.....	24
2.6.7.4	Glutathionperoxidase.....	25
2.6.8	Glutathion.....	26

2.6.9	Hämolyseempfindlichkeit.....	27
2.6.9.1	Osmotische Hämolyseresistenz von Erythrozyten (<i>in vitro</i>)	27
2.6.9.2	Hämolysemarker (<i>in vivo</i>)	28
2.6.9.2.1	Laktat-Dehydrogenase.....	28
2.6.9.2.2	Saure Phosphatase.....	28
2.6.9.2.3	Freies Hämoglobin.....	29
2.6.9.2.4	Kalium.....	29
2.6.10	Oxidationsempfindlichkeit der LDL.....	30
2.6.11	Spezifischen Aufnahme von markierten LDL durch Makrophagen.....	31
2.6.11.1	LDL-Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff.....	31
2.6.11.2	Inkubation von Makrophagen mit fluoreszenz-markierten LDL.....	32
2.6.12	Auftrennung der Apolipoproteine von LDL durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	33
2.7	Statistische Auswertung.....	34
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Lebendmasseentwicklung der Versuchstiere.....	35
3.2	α -Tocopherolkonzentration in Geweben und scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E.....	37
3.3	Vitamin C- und Harnsäurekonzentration im Plasma.....	41
3.4	Endogenes antioxidatives Schutzsystem.....	42
3.4.1	Aktivität antioxidativer Enzyme in Leber und Serum bzw. Plasma	42
3.4.2	Konzentration von Glutathion in der Leber.....	44
3.5	Lipidperoxidationsprodukte.....	45
3.5.1	Konzentration von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen.....	45
3.5.2	Konzentration von Cholesterinoxidationsprodukten in der Leber.....	46
3.6	Hämolyseempfindlichkeit.....	47
3.6.1	Osmotische Hämolyseresistenz von Erythrozyten (<i>in vitro</i>).....	47
3.6.2	Hämolysemarker (<i>in vivo</i>).....	48
3.6.3	Aktivität antioxidativer Enzyme im Erythrozytenzytosol.....	49
3.6.4	Enzymaktivität der GSHPx und Konzentration von Glutathion im Erythrozytenzytosol.....	50
3.6.5	Konzentration von α -Tocopherol in Erythrozyten.....	51
3.7	Lipoproteine.....	52
3.7.1	Cholesterin- und Triglyzeridkonzentration in Lipoproteinen und Geweben.....	52
3.7.2	Oxidationsstabilität der LDL (<i>in vitro</i>).....	56
3.7.3	Parameter des antioxidativen Status der LDL.....	58
3.7.4	Aufnahme von fluoreszenz-markierten LDL durch Makrophagen.....	61
3.7.5	Apolipoproteinzusammensetzung der LDL.....	62

4	Diskussion	63
4.1	Versuchsdesign.....	63
4.2	Lebendmasseentwicklung der Versuchstiere.....	65
4.3	Vitamin E-Status und –Verdaulichkeit.....	67
4.4	Vitamin C- und Harnsäure-Status.....	69
4.5	Endogenes antioxidatives Schutzsystem.....	70
4.6	Lipidperoxidationsprodukte.....	73
4.6.1	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen.....	73
4.6.2	Cholesterinoxidationsprodukte.....	75
4.7	Hämolyseempfindlichkeit.....	77
4.7.1	Osmotische Hämolyseresistenz (<i>in vitro</i>).....	77
4.7.2	Hämolysemarker (<i>in vivo</i>).....	78
4.7.3	Antioxidative Enzyme und Antioxidantien.....	79
4.8	Lipoproteine.....	82
4.8.1	Cholesterin und Triglyzeride.....	82
4.8.2	Charakterisierung der LDL.....	84
5	Zusammenfassung	88
	Summary	92
6	Literatur	95

Abbildungsverzeichnis

Abb.1:	Das antioxidative Schutzsystem der Zelle nach CHOW (1988)	2
Abb.2:	UV-Absorptionsspektrum des Diätfettes K1	14
Abb.3:	UV-Absorptionsspektrum des Diätfettes Ox1	14
Abb.4:	UV-Absorptionsspektrum des Diätfettes Ox2	14
Abb.5:	UV-Absorptionsspektrum des Diätfettes Ox3	14
Abb.6:	UV-Absorptionsspektrum des Diätfettes K2	14
Abb.7:	UV-Absorptionsspektrum des Diätfettes Ox4	14
Abb.8:	Dünnschichtchromatographie ausgewählter Fetteluat	16
Abb.9:	Schematischer Extinktionsverlauf während der Lipidperoxidation von LDL nach KLEINVELD (1992)	30
Abb.10:	SDS-Polyacrylamidgradientengel 6-20%	34
Abb.11:	Hämolyseresistenz von Erythrozyten in hypotonen NaCl-Lösungen (Versuch 3)	47

Tabellenverzeichnis

Tab.1:	Versuchsdesign von den Versuchen 1 bis 3	6
Tab.2:	Zusammensetzung der Diäten	7
Tab.3:	Mineralstoffkonzentration in der Diät	7
Tab.4:	Vitaminskonzentration in der Diät	8
Tab.5:	Fettkennzahlen der verschiedenen Diätfette	10
Tab.6:	Einteilung der Tiere in Gruppen	16
Tab.7:	Zusammensetzung des Gradientengels (6-20 %)	33
Tab.8:	Lebendmasse, Lebendmassezunahme und relatives Lebergewicht der Versuchstiere	35
Tab.9:	Konzentration von α -Tocopherol in relevanten Geweben	37
Tab.10:	Scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E	39
Tab.11:	Konzentration von Ascorbinsäure und Harnsäure im Plasma	41
Tab.12:	Aktivitäten antioxidativer Enzyme in Leber und Serum/Plasma	42
Tab.13:	Konzentration von GSH, GSSG und GSH _{red} in der Leber	44
Tab.14:	Konzentration von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) in Leber und Serum bzw. Plasma	45
Tab.15:	Konzentrationen von Cholesterinoxidationsprodukten in der Leber	46
Tab.16:	Aktivität und Konzentration der Hämolysemarker in Serum (Versuch 1) und Plasma (Versuch 3)	48
Tab.17:	Aktivitäten antioxidativer Enzyme im Erythrozytenzytosol	49
Tab.18:	Enzymaktivität von GSHPx sowie Konzentration von GSH, GSSG und GSH _{red} im Erythrozytenzytosol	50
Tab.19:	Konzentration an α -Tocopherol in Erythrozyten (Versuch 3)	51
Tab.20:	Konzentration von Cholesterin in Serum/Plasma und Lipoproteinen sowie der Quotient aus Gesamtcholesterin/HDL-Cholesterin	52
Tab.21:	Konzentration von Triglyzeriden in Serum/Plasma und Lipoproteinen	54
Tab.22:	Konzentration von Cholesterin und Triglyzeriden in der Leber	55
Tab.23:	Parameter der Oxidationsempfindlichkeit von LDL nach <i>in vitro</i> Induktion	56
Tab.24:	α -Tocopherol, Konzentration an SFA und PUFA sowie Quotient PUFA/(SFA+ MUFA)	58
Tab.25:	Fettsäurezusammensetzung der LDL [mg/100 mg Fettsäure]	60
Tab.26:	Aufnahme von fluoreszenz-markierten LDL bei Hemmung des Scavenger-Rezeptors durch Polyinosinsäure	61
Tab.27:	Aufnahme von fluoreszenz-markierten LDL bei Hemmung des LDL-Rezeptors durch Heparin	61
Tab.28:	Apolipoproteinzusammensetzung der LDL in Prozent	62

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of variance
APS	Ammoniumpersulfat
COP	Cholesterinoxidationsprodukte
DGF	Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3'-Tetramethylindocarbocyanin-Perchlorat
DMEM	Dulbecco's Mod Eagle Medium
DMSO	Dimethyl-Sulphoxid
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure)
EC	Enzyme Catalogue (Enzymnomenklatur)
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
FFAP	Fused fatty acid phase
FKS	Fetales Kälberserum
GR	Glutathionreduktase
G-6-P-DH	Glukose-6-Posphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion
GSH _{Px}	Glutathion-Peroxidase
GSH _{red}	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
Hb	Hämoglobin
HDL	High density lipoproteins
HMG CoA	Hydroxylmethylglutaryl-Coenzym A
HMW	High molecular weight
Hp	Haptoglobin
ID	Innendurchmesser
K1	Kontrollfett 1 (frisches Fettgemisch aus SB und SS 31:69)
K2	Kontrollfett 2 (frisches Fettgemisch aus SB und SS 19:81)
KH-Puffer	K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ -Puffer
LDL	Low density lipoproteins
LMW	Low molecular weight
MDA	Malondialdehyd
MetHb	Met-Hämoglobin
MUFA	Monounsaturated fatty acid
NADP ⁺	oxidiertes Nicotin-Adenin-Dinucleotidphosphat
NADPH	reduziertes Nicotin-Adenin-Dinucleotidphosphat
ODS	Octadecylsilan
Ox1	Oxidiertes Fett 1 (Fettgemisch aus SB und SS 50:50; 50°C; 38 d)
Ox2	Oxidiertes Fett 2 (Fettgemisch aus SB und SS 50:50; 105°C; 3,4 d)
Ox3	Oxidiertes Fett 3 (Fettgemisch aus SB und SS 50:50; 190°C; 1 d)
Ox4	Oxidiertes Fett 4 (Fettgemisch aus SB und SS 50:50; 55°C; 49)

PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PiS	Polyinosinsäure
POZ	Peroxidzahl
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP	Reverse phase
SB	Sonnenblumenöl
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFA	Saturated fatty acid
SIM	Selected ion monitoring
SOD	Superoxiddismutase
SS	Schweineschmalz
SZ	Säurezahl
Tab.	Tabelle
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamine
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VLDL	Very low density lipoproteins

1 Einleitung

Die Schnellebigkeit der Wohlstandsgesellschaften prägt immer mehr die Essgewohnheiten der Menschen. Schnellimbiss und Fertiggerichte gehören mittlerweile zur täglichen Ernährung. Einer der Hauptbestandteile dieser Produkte sind Fette. Während der industriellen Fertigung und Zubereitung werden die Lebensmittel oftmals hohen Temperaturen ausgesetzt. Folgen sind die Beeinträchtigungen der ernährungsphysiologischen und auch sensorischen Qualität der Fette durch Abbau- und Verderbsprozesse. Der Verzehr von thermisch behandelten Fetten steigt demnach stetig.

Ausgangspunkt der Verderbsprozesse von Nahrungsfetten ist die thermische, photochemische oder auch enzymatische Aktivierung der Fettsäuremoleküle, wobei ein Wasserstoffradikal abgespalten wird. Im weiteren Verlauf der Kettenreaktion entstehen Peroxidradikale, aus denen wiederum die Hydroperoxide als Primärprodukt der Autoxidation hervorgehen (MÖRSEL, 1990). Sekundär bilden sich aus den Lipidhydroperoxiden Epoxyhydroperoxide, Ketohydroperoxide und zyklische Peroxide (COHN, 2002). Für den ranzigen Geruch und Geschmack verdorbener Fette sind vor allem sekundäre Zerfallsprodukte wie Aldehyde, Ketone, Alkohole, Hydrocarbone und Ester verantwortlich. Auch Oxidations- und Polymerisationsprodukte aus Sterolen und Triglyzeriden bilden sich während der Autoxidation von Fetten.

Im Organismus selbst entstehen reaktive Stoffwechselprodukte, die z. B. membrangebundene Lipide oxidieren und dadurch eine radikalische Kettenreaktion auslösen können. Zum Schutz vor Lipidperoxidation besitzt die Zelle ein antioxidatives Abwehrsystem, das sich in Antioxidantien (α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Glutathion) und antioxidative Enzyme (Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase) unterteilt. Wie die einzelnen Wirkmechanismen ineinander greifen, ist in der Abbildung 1 dargestellt. Eine wesentliche Rolle in der Bekämpfung der Lipidperoxidation spielt das α -Tocopherol. Es fängt die Lipidperoxyradikale ab. Dabei entsteht das reaktionsträge Tocopheroxyradikal, welches wiederum von der Ascorbinsäure in α -Tocopherol überführt wird. Die Regenerierung der entstandenen Dehydroascorbinsäure verläuft dagegen über das Redoxsystem von Glutathion. Somit wirken viele Antioxidantien synergistisch.

Oftmals ist der Konsum von geringen Konzentrationen an thermisch behandelten Fetten unvermeidbar, da diese während der Verarbeitung und Lagerung in fast allen fetthaltigen Lebensmitteln entstehen. Aus Humanstudien ist bekannt, dass Lipidperoxidationsprodukte über das Intestinum absorbiert und in Lipoproteine eingebaut werden (STAPRĀNS et al., 1999; URSINI et al., 1998; STAPRĀNS et al., 1994).

Sie werden mit Krankheiten wie Krebs, Alzheimer und Arteriosklerose in Verbindung gebracht (AVI-RAM, 1992; CHISOLM u. STEINBERG, 2000; SMITH et al., 2000; TABET et al., 2000).

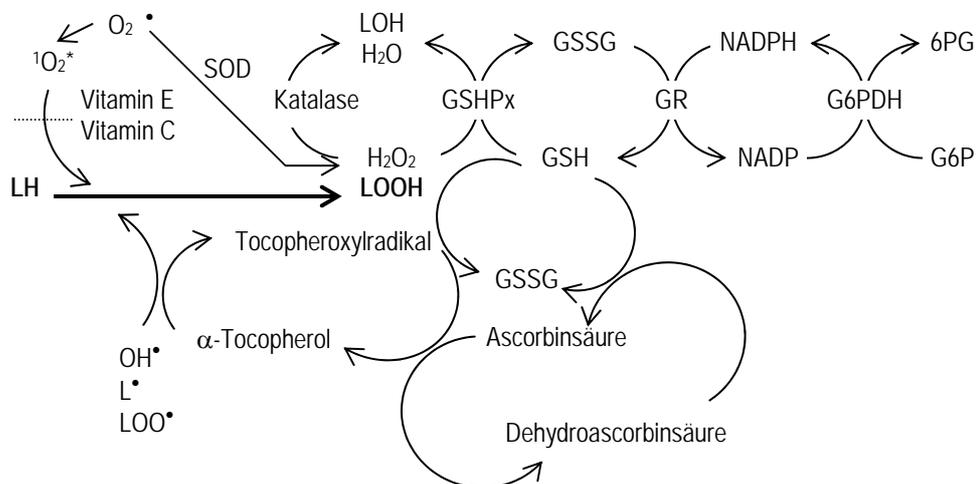


Abb.1: Das antioxidative Schutzsystem der Zelle nach CHOW (1988)

(G6P) Glucose-6-Phosphat; (G6PDH) Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase; (GR) Glutathionreduktase; (GSH) reduziertes Glutathion; (GSSG) oxidiertes Glutathion; (GSHPx) Glutathionperoxidase; (L^\bullet) freies Radikal einer mehrfach ungesättigte Fettsäure oder eines Membranlipids; (LH) mehrfach ungesättigte Fettsäure oder Membranlipid; (LOH) Hydroxysäure; (LOO^\bullet) Peroxyradikal; (LOOH) Lipidhydroperoxid; (NADP) oxidiertes Nicotin-Adenin-Dinucleotid; (NADPH) reduziertes Nicotin-Adenin-Dinucleotid; (O_2^\bullet) Superoxidradikal; ($^1O_2^*$) Singulett-Sauerstoff; (OH^\bullet) Hydroxylradikal; (6PG) 6-Phosphogluconat; (SOD) Superoxiddismutase

Bislang ist noch nicht eindeutig geklärt, welche zellulären Abwehrmechanismen durch absorbierte Lipidperoxidationsprodukte aktiviert werden. Um die Wirkweisen thermisch behandelter Fette auf das antioxidative Schutzsystem im Einzelnen zu untersuchen, liegt der Schwerpunkt der Arbeit auf der Bestimmung des Antioxidantienstatus in verschiedenen Geweben und auf der Messung der Aktivität antioxidativer Enzyme.

Aufgrund der ungleichen enteralen Absorptionsrate von primären und sekundären Lipidperoxidationsprodukten besitzen sie eine unterschiedliche physiologische Relevanz (ORADA et al., 1986; KANAZAWA et al., 1985). Welche der beiden Klassen von Lipidperoxidationsprodukten den maßgebenden Einfluss auf das antioxidative Schutzsystem ausübt, ist bislang unbekannt. Daher sollen im ersten Rattenversuch drei erhitzte Fettgemische gefüttert werden, die sich deutlich in ihrer Konzentration an primären und sekundären Lipidperoxidationsprodukten unterscheiden. Entscheidend für die Entstehung von Lipidperoxidationsprodukten sind die Art und Zusammensetzung der verwendeten Nahrungsfette (Konzentration an ungesättigten Fettsäuren, Metallionen und Antioxidantien) sowie die Reaktionsbedingungen (Temperatur, Luftzufuhr, Zeit, Lichteinstrahlung, Katalysatoren), unter denen der oxidative Zer-

fall abläuft. Problem früherer Untersuchungen war der Einsatz von stark oxidierten Fetten, der zu toxischen Symptomen bei den Versuchstieren führte (ALEXANDER et al., 1987; GABRIEL et al., 1977). Deshalb sollen die thermischen Behandlungen der Fettgemische unter definierten Bedingungen und moderat erfolgen. Anhand von Fettkennzahlen (Peroxidzahl, Säurezahl, Konzentration konjugierter Diene, Gesamt-Carbonylverbindungen, polare Verbindungen) sollen die oxidierten Fettgemische charakterisiert werden.

Der Verzehr von thermisch behandelten Fetten kann oxidativen Stress ausüben, in dem die absorbierten Lipidperoxidationsprodukte die Autoxidation endogener ungesättigter Fettsäuren induzieren. Eine weitverbreitete Methode für die Bestimmung einer Lipidperoxidation in Geweben sind die Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen. Jedoch ist dies ein sehr unspezifischer Parameter, der von vielen äußeren Faktoren abhängig ist. Im Rahmen der Autoxidation von membrangebundenen Lipiden können auch Cholesterinoxidationsprodukte entstehen, deren Messung spezifisch ist (BRANDSCH et al., 2002; RINGSEIS u. EDER, 2002). Deshalb erfolgt erstmalig nach Fütterung oxidierter Fette die Konzentrationsbestimmung von Cholesterinoxidationsprodukten in der Leber.

Von Bedeutung für den Schutz membranständiger Lipide ist vor allem α -Tocopherol (WANG u. QUINN, 1999; SIES, 1989). Deshalb müsste eine erhöhte Supplementierung von Vitamin E die Effekte von oxidierten Fetten abschwächen. Um dies zu prüfen, wurden für den ersten Rattenversuch zwei Stufen einer Vitamin E-Supplementierung ausgewählt. Da Vitamin E durch Vitamin C regeneriert werden kann (LEUNG et al., 1981), ist zu vermuten, dass auch eine vermehrte Zufuhr von Vitamin C oxidativen Stress vermindert. Wie der Mensch sind auch Meerschweinchen nicht zur Eigensynthese von Ascorbinsäure befähigt und daher geeignete Modelltiere, um möglichen Effekten des Vitamin C nachzugehen.

Die Metabolisierung freier Radikale im Plasma erfolgt zum größten Teil in den Erythrozyten. Bei einer zu hohen oxidativen Belastung können Erythrozyten hämolysieren. Daher lässt die Untersuchung der Hämolyseempfindlichkeit von Erythrozyten *in vitro* und *in vivo* Rückschlüsse auf mögliche oxidative Schädigungen durch thermisch behandelte Fettgemische zu.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass nach Verzehr erhitzter Fette die Konzentration an Cholesterin im Plasma von Ratten und Meerschweinchen erhöht war (LIU u. LEE, 1998; HOCHGRAF et al., 1997). Mit einer erhöhten Cholesterinkonzentration in den LDL wird ein verstärktes Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen assoziiert. Deshalb sollte zur Beurteilung des atherogenen Risikos von erhitzten Fetten die Verteilung des Plasmacholesterins innerhalb der Lipoproteine bestimmt werden.

Als gesichert gilt, dass vor allem oxidierte LDL die Bildung von Schaumzellen beschleunigen und somit die Arteriosklerose fördern (YUAN u. BRUNK, 1998; JIALAL u. DEVARAJ, 1996). Die oxidative Modifikation von LDL verändert auch deren Apolipoproteinzusammensetzung und hemmt dadurch die Bindung an den LDL-Rezeptor. Andererseits werden oxidierte LDL vom Scavenger-Rezeptor der Makrophagen erkannt und aufgenommen. In dieser Studie sollte erstmals untersucht werden, ob die Fütterung von oxidiertem Fett zu einer vermehrten Bildung von oxidierten LDL führt. Aus diesem Grund sollen in einem weiteren Versuch nach Fütterung erhitzter Diätfette an Ratten die LDL isoliert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Anschließend werden in einem *in vitro*-Zellsystem Makrophagen mit den Fluoreszenz-markierten LDL inkubiert und die Scavenger-Rezeptor sowie LDL-Rezeptor vermittelte Aufnahme untersucht.

Ein Großteil der bisherigen Untersuchungen zu den Wirkungen oxidierter Fette sind mit methodischen Problemen behaftet. Die thermische Behandlung beeinträchtigt die sensorischen und nutritiven Eigenschaften der Diätfette. Folge ist eine verminderte Aufnahme der Diäten, die oxidierte Fette enthalten. Somit unterscheiden sich die Energie- und Nährstoffzufuhr der Versuchstiere, die die Ursache für eine verminderte Lebendmasseentwicklung sein können (LIU et al., 2000; NWANGUMA et al., 1999). Neben dem Abbau von essentiell ungesättigten Fettsäuren werden auch native Antioxidantien wie Vitamin E verbraucht. Viele Effekte, wie z.B. Wachstumsdepression, die den oxidierten Fetten zugeschrieben werden, basieren demnach auf einer differierenden Verzehrsmenge der Tiere sowie unterschiedlichen Fettsäurenmuster und Vitamin E-Konzentrationen in den Diäten. Um diese methodischen Probleme auszuschließen, sollen in der vorliegenden Arbeit erstens Fettgemische verwendet werden, um die Fettsäurenmuster der Diäten auszugleichen, zweitens die Vitamin E-Zufuhr angeglichen und drittens die Tiere restriktiv gefüttert werden, damit eine einheitliche Energie- und Nährstoffzufuhr gewährleistet wird.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsdesign

Untersucht werden sollte, ob erhitzte Lipidgemische in Abhängigkeit der Konzentration an primären und sekundären Lipidperoxidationsprodukten das antioxidative Schutzsystem beeinflussen und inwieweit sie oxidativen Stress induzieren. Zudem sollte die Wirkung einer Supplementierung von Vitamin E und Vitamin C bei Fütterung von oxidierten Fetten überprüft werden. Um die Problemstellung umfassend bearbeiten zu können, waren drei Versuche mit zwei verschiedenen Tierspezies (Ratte, Meerschweinchen) notwendig.

Im Versuch 1 war das Ziel der thermischen Behandlung, 3 Fettgemische zu erzeugen, die sich durch unterschiedliche Peroxidzahlen deutlich voneinander abgrenzen, aber ein annähernd gleiches Fettsäurenmuster aufweisen. Beim Erhitzen des Fettgemisches von Versuch 2 und 3 wurde sich ausschließlich an der Peroxidzahl orientiert.

Der Einfluss von Vitamin E auf die Fütterung oxidierter Fette wurde anhand von unterschiedlichen bedarfsdeckenden Versorgungsstufen untersucht. Für die Überprüfung eines möglichen Vitamin E-Spareffektes (*in vivo*) durch eine Vitamin C-Supplementierung wurden im Versuch 3 Meerschweinchen verwendet.

Inwiefern oxidierte Fette prooxidativ und/oder hämolytisch wirksam sind, vielleicht sogar das atherogene Risiko erhöhen, sollte die Bestimmung folgender Parameter klären:

Antioxidatives Schutzsystem und Lipidperoxidation

- Die Charakterisierung des exogenen aber auch endogenen antioxidativen Status der Versuchstiere erfolgte zum einen über die Bestimmung der Gewebekonzentrationen von Vitamin E und Vitamin C, zum anderen über die Aktivitätsbestimmung der Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase sowie der Konzentration an Glutathion und seiner Redoxformen in der Leber sowie der Plasmakonzentration an Harnsäure.
- Die Bildung von Lipidperoxidationsprodukten in Leber und im Serum bzw. Plasma wurde anhand des Gehaltes von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen und der Konzentration von Cholesterin-oxidationsprodukten überprüft.

Hämolyseempfindlichkeit

- Die osmotische Hämolyseempfindlichkeit der Erythrozyten gegenüber hypotonen Kochsalzlösungen und die Konzentration verschiedener Hämolysemarker wie freies Hämoglobin, Kalium sowie die Enzymaktivität der sauren Phosphatase und Laktat-Dehydrogenase im Serum bzw. Plasma dienen der Beschreibung der Hämolyseempfindlichkeit der Erythrozyten *in vitro* wie auch *in vivo*.

- Ob thermisch veränderte Fette den antioxidativen Schutzmechanismus der Erythrozyten beeinflussen, sollte die Aktivitätsbestimmung der Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase sowie die Konzentration an Glutathion, seinen Redoxformen und α -Tocopherol zeigen.

Lipoproteinprofil

- Der Cholesterin- und Triglyzeridspiegel im Serum bzw. Plasma und in den Lipoproteinfraktionen diene der Einschätzung des atherogenen Risikos nach Fütterung oxidierter Fette.
- Die Oxidationsempfindlichkeit, der α -Tocopherolgehalt und das Fettsäurenmuster der LDL gaben Aufschluss über deren Oxidationsstabilität *in vitro* und *in vivo*.
- Die Untersuchungen zur spezifischen Aufnahme von fluoreszenz-markierten LDL durch Makrophagen sollten klären, ob nach Fütterung oxidierter Nahrungsfette verstärkt modifizierte LDL vorhanden sind.
- Die Zusammensetzung der Apolipoproteine gab ebenfalls Aufschluss über eine mögliche Modifikation der LDL durch oxidativen Stress. Insgesamt ergab sich eine Versuchsanordnung wie folgt:

Tab.1: Versuchsdesign von den Versuchen 1 bis 3

Gruppe	Fett	Behandlung				Vitamin E [TÄ/kg Diät]	Vitamin C [mg/kg Diät]	Versuchsdauer [d]
		Verhältnis SB:SS ¹	Temperatur [°C]	Zeit [d]	Luft eintrag [l Luft/min]			
Versuch 1 - Ratten								63
K1/25	K1	31:69	—	—	—	25		
K1/250						250		
Ox1/25	Ox1	50:50	50 ± 1	38	1,3	25		
Ox1/250						250		
Ox2/25	Ox2	50:50	105 ± 2	3,4	1,3	25		
Ox2/250						250		
Ox3/25	Ox3	50:50	190 ± 5	1	1,3	25		
Ox3/250						250		
Versuch 2 - Ratten								53
K2/25	K2	19:81	—	—	—	25		
Ox4/25	Ox4	50:50	55 ± 1	49	0,7	25		
Versuch 3 - Meerschweinchen								29
K2/35/300	K2	19:81	—	—	—	35	300	
Ox4/35/300	Ox4	50:50	55 ± 1	49	0,7	35	300	
Ox4/35/1000						35	1000	
Ox4/175/300						175	300	
Ox4/175/1000						175	1000	

TÄ = Tocopherol-Äquivalente

¹ SB = Sonnenblumenöl und SS = Schweineschmalz (w/w)

2.2 Zusammensetzung und Herstellung der Diäten

Die Zusammensetzung der semisynthetischen Diäten ist der Tabelle 2 zu entnehmen. Die Mineralstoff- (Tab.3) und Vitaminzulagen (Tab.4) entsprachen den Empfehlungen des American Institute of Nutrition (REEVES et al., 1993) und des NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1995) für wachsende Nager.

Tab.2: Zusammensetzung der Diäten

Komponente	Rattendiät	Meerschweinchendiät [g/kg Diät]
Casein	200	300
Stärke	300	160
Saccharose	298	241
Fett ¹	100	100
Cellulose	40	130
Vitaminvormischung ²	20	20
Mineralstoffvormischung	40	40
DL-Methionin	2	-
L-Arginin	-	9

¹ thermisch behandeltes Gemisch aus Sonnenblumenöl und Schweineschmalz

² Vitamin E freie Vormischung bei Rattendiät, Vitamin E und C freie Vormischung bei Meerschweinchendiät

Vitamine sowie Mineralstoffe wurden als Vormischung entsprechend mit Saccharose aufgefüllt und anschließend unter das gesamte Grundfutter gemischt.

Tab.3: Mineralstoffkonzentration in der Diät

Komponenten	Rattendiät	Meerschweinchendiät
<i>Mengenelemente</i>		[g/kg Diät]
Calciumcarbonat (Ca 37%)	8,21	7,63
Di-Calciumphosphat (Ca 22%, P 17%)	9,18	23,5
Kaliumchlorid (K 52%, Cl 17%)	6,87	1,06
Kaliumsulfat (K 45%)	-	9,88
Magnesiumoxid (Mg 50%)	1,01	2,00
Natriumcarbonat (Na 27%)	3,77	-
Natriumhydrogencarbonat (Na 27%)	-	1,58
<i>Spurenelemente</i>		[mg/kg Diät]
Eisensulfat (Fe 30%)	116	167
Zinkoxid (Zn 79%)	38,0	25,3
Manganoxid (Mn 62%)	16,1	64,5
Kupfersulfat (Cu 25%)	24,0	24,0
Calciumiodat (J 62%)	0,32	0,24
Natriumselenit (Se 45%)	0,33	0,33
Ammoniummolybdän (Mo 54%)	-	0,28

Tab.4: Vitaminkonzentration in der Diät

Komponenten	[Konzentration/g]	Rattendiät	Meerschweinchendiät
			[mg/kg Diät]
Vitamin A	5000 IE	800	4400
Vitamin D ₃	5000 IE	200	200
Vitamin K	510 mg	1,5	9,8
Vitamin B ₁	1000 mg	5,0	4,0
Vitamin B ₂	800 mg	7,5	7,5
Vitamin B ₆	1000 mg	6,0	6,0
Vitamin B ₁₂	1 mg	25,0	30,0
Biotin	20 mg	10,0	10,0
Pantothensäure	1000 mg	15,0	20,0
Nikotinsäure	990 mg	30,3	30,3
Folsäure	1000 mg	2,0	6,0
Cholinchlorid	500 mg	2000	3600

IE = Internationale Einheit

Die Art des Fettes sowie der Gehalt an Vitamin E und C in den Diäten variierten entsprechend der Versuchsanordnung. Das Vitamin E wurde in Form von 50%igem DL- α -Tocopherylacetat bereits unter das aufbereitete Fett gemischt. Bei der Berechnung der zuzusetzenden DL- α -Tocopherylacetat-Rationen wurde der Gehalt an nativen α -Tocopherol aus den Fettgemischen berücksichtigt. Dabei war zu beachten, dass 1,49 mg DL- α -Tocopherylacetat gleich 1 mg α -TÄ entspricht. Wiederum ist 1 mg α -TÄ gleich 1 mg α -Tocopherol. Das Vitamin C wurde als reine Ascorbinsäure in entsprechender Menge bei der Herstellung der Trockenmischung zugegeben. Die Diätzubereitung erfolgte durch Mischen von 900 g Trockenfutter mit 100 g Fett unter Zugabe von Wasser. Die anschließende Gefriertrocknung und Lagerung bei 4°C ermöglichten einen optimalen Schutz vor Verfallsprozessen.

Der Trockensubstanzgehalt der Diäten lag durchschnittlich bei 94%. Für dessen Bestimmung im „Wägetrocknungsverfahren“ bei 105°C über 3 h wurde eine Methode von NAUMANN u. BASSLER (1976) herangezogen.

2.3 Charakterisierung der Diätfette

Während der thermischen Behandlung bildeten sich in Abhängigkeit der Einflussfaktoren, wie Temperatur und Sauerstoffeintrag, verschiedene primäre und sekundäre Oxidationsprodukte in unterschiedlichen Konzentrationen. Um die Fettgemische bezüglich dieser Inhaltsstoffe besser charakterisieren zu können, wurden eine Reihe von Fettkennzahlen bestimmt, die in Tabelle 5 dargestellt sind.

2.3.1 Aufbereitung der eingesetzten Diätfette

Als Ausgangsfett wurde eine Mischung aus Sonnenblumenöl (Buttela, Brökelmann u. Co., Hamm, Deutschland) und Schweineschmalz (Laru, Langensiepen u. Ruckebier, Bottrop, Deutschland) im Verhältnis 50:50 (w/w) hergestellt. Die Bedingungen, unter denen die thermische Behandlung stattfand, sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Um eine kontinuierliche Temperaturführung zu gewährleisten, kam ein voll automatisierter Trockenschrank (memmert GmbH u. Co. KG, Schwabach, Deutschland) bei den Fetten Ox1 und Ox4 zum Einsatz. Ein Glycerinbad ermöglichte das Erhitzen der Fette Ox2 und Ox3 auf über 100°C. Die Wärmebehandlung verlief unter Lichtausschluss. Das Erreichen der angestrebten Peroxidzahl bestimmte die Dauer der thermischen Behandlung. Die vorgegebenen Peroxidzahlen waren entscheidend für die Erzeugung von Fettgemischen mit jeweils unterschiedlichen Anteilen an primären Lipidperoxidationsprodukten. Um eine nahezu identische Versorgung an Fettsäuren zu gewährleisten, wurde der oxidative Abbau der Fettsäuren fortlaufend überprüft. Mit Einstellung eines annähernd gleichen Fettsäurespektrums (2.6.3) wurde die thermische Behandlung beendet. Hierbei diente die Konzentration an Linolsäure (C 18:2) als Richtwert.

Bei der thermischen Behandlung der Fettgemische Ox1 und Ox4 wurde ein hohe Peroxidzahl angestrebt, die kennzeichnend ist für einen hohen Anteil an primären Lipidperoxidationsprodukten. Unter Berücksichtigung des oxidativen Linolsäureabbaus wurden die Fettgemische Ox2 und Ox3 bis zur Einstellung einer mittleren bzw. niedrigen Peroxidzahl erhitzt.

Die Berechnung der Mischungsverhältnisse von Sonnenblumenöl und Schweineschmalz für die Kontrollfette K1 (Versuch 1) und K2 (Versuch 2 und 3) erfolgte anhand des Gehaltes von Linolsäure in den oxidierten Fetten.

Berechnung:

$$\begin{aligned} a \cdot X + b \cdot Y &= c \\ X &= \frac{c - b}{- \Sigma a \cdot b} \end{aligned}$$

Nebenbedingung: $1 = X + Y$

a = Linolsäuregehalt im Schweineschmalz

b = Linolsäuregehalt im Sonnenblumenöl

c = Linolsäuregehalt im oxidierten Fettgemisch

X = Anteil an Schweineschmalz im Kontrollfett

Y = Anteil an Sonnenblumenöl im Kontrollfett

Tab.5: Fettkennzahlen der verschiedenen Diätfette

Fettart	K1	Ox1	Ox2	Ox3	K2	Ox4
Fettsäurespektrum, g/ 100 g Fettsäure						
14:0	1,1	0,9	0,9	0,9	1,3	1,0
16:0	19,2	17,4	17,8	17,5	22,5	20,9
18:0	11,5	9,8	10,4	10,2	13,8	12,8
18:1	35,6	36,9	35,6	34,7	35,5	36,4
18:2 (n-6)	26,1	26,9	26,6	27,2	20,6	20,2
18:3 (n-3)	0,6	0,3	0,3	0,3	0,8	0,2
Tocopherole, mg/ kg Fett						
α -Tocopherol ¹	202	< 1	< 1	28	90	< 1
andere Tocopherole ¹	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
all-rac- α -Tocopherylacetat ²	72 / 3454	372 / 3725	372 / 3725	331 / 3683	238 / 387	372 / 522 / 2608
α -Tocopherol Äquivalent ³	250 / 2500	250 / 2500	250 / 2500	250 / 2500	250 / 350	250 / 350 / 1750
Peroxidationsprodukte vor Einschluss in die Diät						
Säurezahl, g KOH/ kg	0,8	2,9	2,2	2,0	0,6	3,2
Peroxidzahl, mEq O ₂ / kg	1,6	804	149	3,5	3,1	666
Konjugierte Diene, mmol/ kg	13,4	295	178	103	—	—
TBARS, mmol/ kg	0,1	10	2,2	0,3	—	—
Gesamt-Carbonyle, mmol/ kg	< 0,1	430	426	365	< 0,1	479
Polare Verbindungen, %	2,3	41	46	38	3,2	53
Peroxidationsprodukte nach Einschluss in Diät						
Peroxidzahl, mEq O ₂ / kg	4,7 / 4,4	920 / 915	239 / 224	39 / 37	21 / 23	1159 / 1438 / 1629
Konjugierte Diene, mmol/ kg	13,9 / 13,6	259 / 295	195 / 163	107 / 99	12 / 10	206 / 180 / 212
TBARS, mmol/ kg	< 0,1	23 / 21	2,2 / 2,3	0,2 / 0,2	2,3 / 3,6	7,4 / 12 / 16

¹ analysierter Wert

² supplementierte Menge

³ kalkulierter Wert

2.3.2 Tocopherolkonzentration

Für die Berechnung des Vitamin E-Minimalbedarfs wurde die Menge an zugeführten Polyenfettsäuren zu Grunde gelegt (MUGGLI, 1994), wobei der native Tocopherolgehalt der Fettgemische mit einbezogen wurde. Der Tocopherolgehalt der Diäten wurde nach der Supplementierung überprüft. In der Tabelle 5 wurden die analysierten, supplementierten sowie kalkulierten Werte aus allen Versuchen zusammengefasst. Die Methodenbeschreibung zur Bestimmung der Tocopherol-Konzentration ist unter Kapitel 2.6.4 zu finden.

2.3.3 Peroxidzahl

Die verwendete DGF-Einheitmethode C-VI 6a (84) beruht auf der Methode von Wheeler. Die Peroxidzahl (POZ) ist eine Kenngröße für den peroxidisch gebundenen Sauerstoff in Fetten. Als primäre Oxidationsprodukte entstehen insbesondere Hydroperoxide neben geringen Mengen anderer Peroxide infolge der Autoxidation. Bei fortschreitender Oxidation ungesättigter Fettsäuren kommt es zum Zerfall der Peroxide, so dass die Peroxidzahl abnimmt.

Definition

Die POZ bezeichnet die erfassbare Menge an peroxidisch gebundenem Sauerstoff, die in 1 kg Fett enthalten ist.

Methode

Die Fetteinwaage von 1 bis 4 g wurde in 30 ml Eisessig-Chloroform-Gemisch (3:2, v/v) gelöst und mit 4 ml gesättigter Kaliumiodidlösung versetzt. Die durch Reaktion mit den Peroxidgruppen freigesetzte Iodmenge wurde anschließend durch Rücktitration mit 0,05 N Natriumthiosulfat-Lösung bestimmt.

Berechnung

$$\text{POZ [mEqO}_2\text{]} = \frac{(a - b) \cdot N \cdot 1000}{E}$$

a	Verbrauch an Na ₂ S ₂ O ₃ -Maßlösung im Hauptversuch in ml
b	Verbrauch an Na ₂ S ₂ O ₃ -Maßlösung im Blindversuch in ml
N	Normalität von Na ₂ S ₂ O ₃
E	Fetteinwaage in g

2.3.4 Säurezahl

Für die Bestimmung der Säurezahl (SZ) wurde die DGF-Einheitsmethode C-V 2 (81) herangezogen. Die SZ ist ein Maß für den in Fetten und Fettsäuren auftretenden Gehalt an freien Säuren. Die Kenntnis des Gehaltes an freien Fettsäuren lässt Rückschlüsse auf die stattfindenden thermischen Zersetzungsprozesse zu.

Definition

Die Säurezahl bezeichnet die Menge an Kaliumhydroxid in g, die zur Neutralisation von in 1 kg Fett enthaltenen freien Säuren notwendig ist.

Methode

Es wurden 10 g Fett in 50 ml Ethanol-Toluol-Gemisch (1:1, v/v) unter leichter Erwärmung gelöst. Mit einer 0,1 N Kalilauge wurden die anwesenden Säuren gegen eine 1%ige Phenolphthaleinlösung titriert.

Berechnung

$$SZ [gKOH/kg] = \frac{a \cdot N \cdot 56,1}{E}$$

a	Verbrauch an KOH-Maßlösung in ml
N	Normalität von KOH
E	Fetteinwaage in g
56,1	Molare Masse von KOH

2.3.5 UV-Spektrum

Mit fortschreitender Wärmebehandlung nimmt der Anteil an konjugierten Dien-Strukturen infolge von Spaltung und Umlagerung der Doppelbindungen zu. Aus den Isolen-Strukturen der Fettsäuren entstehen Konjuen-Strukturen, die auf Grund ihrer Doppelbindung eine optische Aktivität besitzen. Beim Abbau der autoxidativ entstandenen Hydroperoxide können sich sogar Trien- und Tetraen-Fettsäuren bilden. Demzufolge wurde ein UV-Spektrum zur qualitativen Analyse der Substanzen (Auswertung der Bandenlage) als auch zur quantitativen Bestimmung (Extinktionskoeffizient) herangezogen.

Qualitative Analyse

Eine Einwaage von 0,1 g Fett wurde mit Isooctan auf 25 ml aufgefüllt und entsprechend verdünnt. Von der in Isooctan gelösten Fettprobe wurde ein UV-Spektrum (Abb.2 bis Abb.7) im Wellenlängenbereich von 190 bis 350 nm (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) aufgenommen (HADORN,1966). Im kurzwelligeren UV-Bereich sind die Isolen- (<210 nm) und Dien-Banden (230-240 nm) erkennbar. Dagegen treten die Trien- (258, 268, 279 nm) und Tetraen-Banden (300-316 nm) infolge der höheren Konjugation der Doppelbindungen erst bei längeren Wellenlängen auf. Eine 1%ige Stearinsäuremethylester-Lösung in Isooctan diente zur Gegenkompensation.

Quantitative Analyse

Die Verfahrensweise zur Ermittlung des Diengehaltes in den Fettgemischen beruht auf einer Methode von RECKNAGEL (1984). Die in 10 ml Hexan gelöste Fettmenge von 0,01 g wurde in einer Quarzküvette gegen Hexan als Blindwert bei einer Wellenlänge von 234 nm (Ultraspec 2000) gemessen. Je nach Konzentration an Dienen ist eine Verdünnung der Probe erforderlich.

Berechnung

Unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten wurde der Diengehalt wie folgt berechnet:

$$c \text{ [}\mu\text{mol / ml]} = \frac{\Delta E}{\varepsilon \cdot d}$$

c	Konzentration an Dienen
ΔE	Extinktionsänderung
d	Schichtdicke
ε	Molarer Extinktionskoeffizient der konjugierten Diene ($29.500 \cdot \text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) bei 234 nm

2.3.6 Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen

Die Bestimmung der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) erfolgte nach der Methode von SIDWELL (1954). Die TBARS sind ein Maß für die Konzentration der Carbonylverbindungen in oxidierten Fetten. Die durch die Spaltung von Hydroperoxiden entstandenen Aldehyde bilden mit Thiobarbitursäure (TBA) ein gefärbtes Reaktionsprodukt, wie bei PARDUN (1976) nachzulesen ist.

Methode

Nach der Zugabe von 4 ml TBA-Reagenz (23,3 mM) und 4 ml Chloroform auf die Fetteinwaage von 0,2 g setzte sich während der 4 min Schütteln eine wässrige Phase ab. Beim Erhitzen der wässrigen Phase auf 95°C über 30 min bildete sich ein rotes Pigment, das bei 532 nm absorbierte. Die Extinktion wurde mittels Spektralphotometer (Ultraspec 2000) erfasst.

Berechnung

Unter Verwendung von 1,1,3,3-Tetraethoxypropan als Standard wurde eine Gerade erstellt, über deren lineare Gleichung die Menge an TBARS in mmol/kg errechnet wurde.

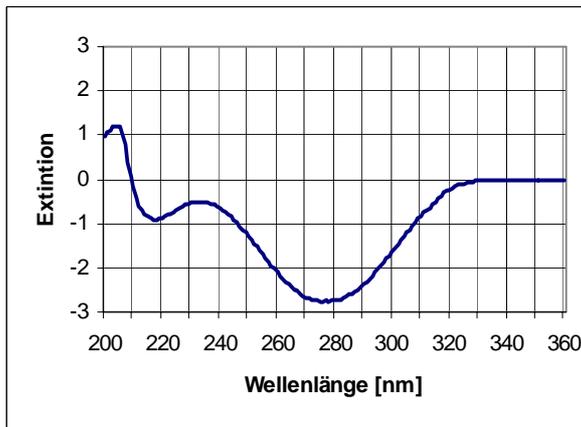


Abb.2: UV-Absorptionsspektrum des Diätfettes K1

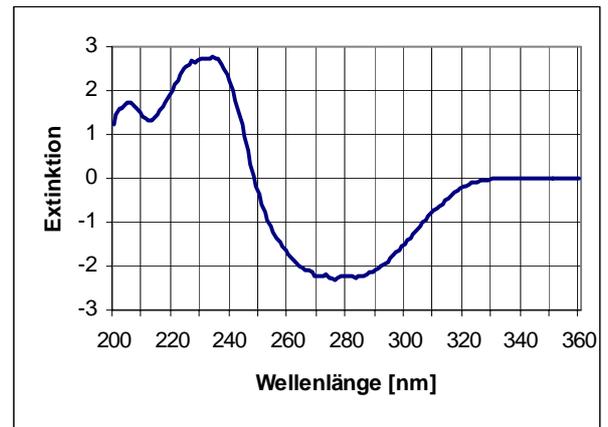


Abb.3: UV-Absorptionsspektrum des Diätfettes Ox1

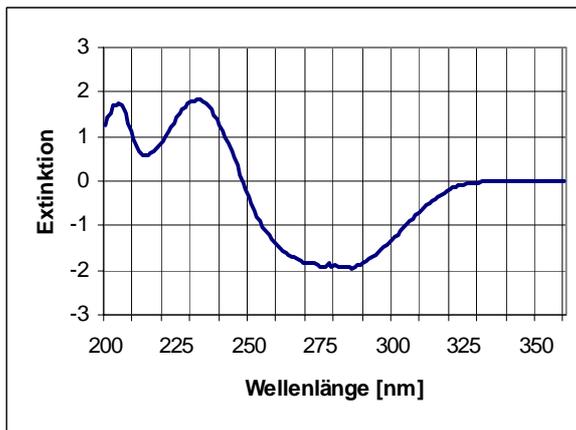


Abb.4: UV-Absorptionsspektrum des Diätfettes Ox2

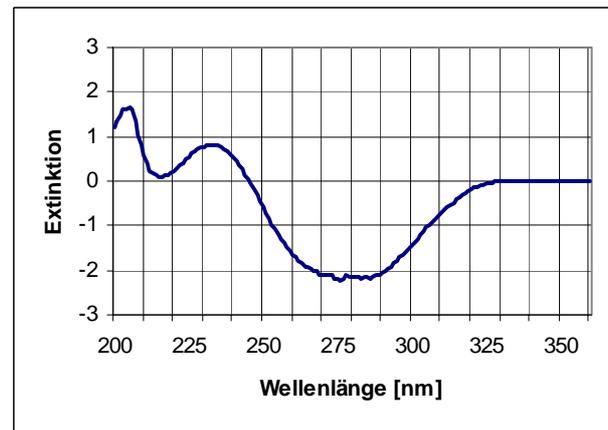


Abb.5: UV-Absorptionsspektrum des Diätfettes Ox3

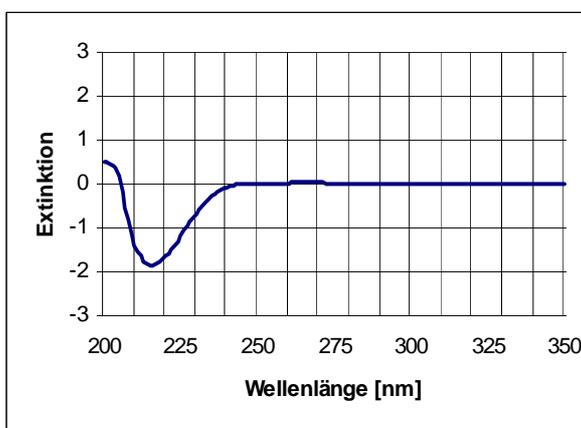


Abb.6: UV-Absorptionsspektrum des Diätfettes K2

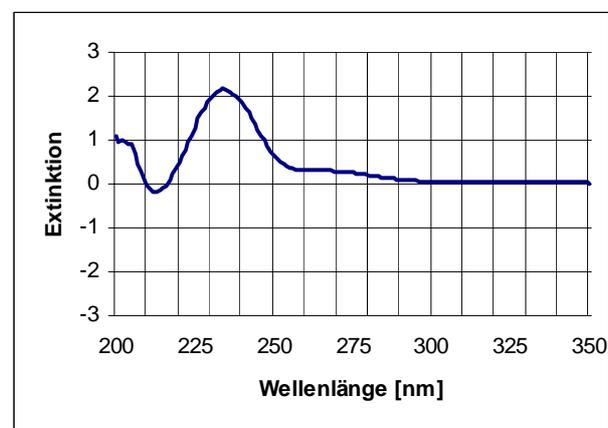


Abb.7: UV-Absorptionsspektrum des Diätfettes Ox4

2.3.7 Gesamt-Carbonylverbindungen

Die Analysemethode von ENDO et al. (2001) wurde für die Bestimmung der Gesamt-Carbonylverbindungen genutzt. Sie beruht auf der Reaktion von 2,4-Dinitrophenylhydrazin (2,4-DNP) mit den Aldehyden und Ketonen zu 2,4-Dinitrophenylhydrazon (2,4-DNPH).

Methode

Es wurde eine Fettmenge von 0,1 g in 5 ml aldehydfreiem Isopropanol gelöst. Um weitere Oxidationen zu vermeiden wurde Triphenylphosphin zugesetzt. Die anschließende Derivatisierung verlief bei 40°C im Wasserbad über 20 min. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit jeweils 1 ml 2%iger Kalilauge versetzt und für 2 min bei 15.000 U/min zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland). Der Gehalt an Carbonylverbindungen wurde im Überstand bei einer Wellenlänge von 420 nm (Ultraspec 2000) gemessen.

Berechnung

Anhand einer Standardgeraden von n-Hexanal erfolgte die Berechnung der Gesamt-Carbonylverbindungen in mmol/kg.

2.3.8 Polare Verbindungen

Die Trennung von polaren und unpolaren Verbindungen in den Lipidgemischen erfolgte nach einer Standardmethode von DOBARGANES (2000).

Methode

Die Fetteinwaage von 1 g wurde bis 10 ml mit Petroleumbenzin:Diethylether-Gemisch (90:10, v/v) aufgefüllt, gelöst und auf eine Kieselgelsäule (0,2-0,5 mm Korngröße) aufgetragen. Durch die Zugabe von 60 ml Petroleumbenzin:Diethylether-Gemisch wurde die unpolare Fraktion des Fettgemisches eluiert. Für die Elution der polaren Verbindungen wurde mit 50 ml Diethylether gespült. Die Überprüfung der vollständigen Trennung erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (Abb.8). Die gewonnenen unpolaren und polaren Eluate wurden über einem Rotationsverdampfer bis zur Trockenheit eingengt und deren Gewicht durch Rückwaage bestimmt.

Berechnung

Aus dem Verhältnis Rückwaage zu Einwaage wurde der prozentuale Anteil an polaren und unpolaren Verbindungen ermittelt.

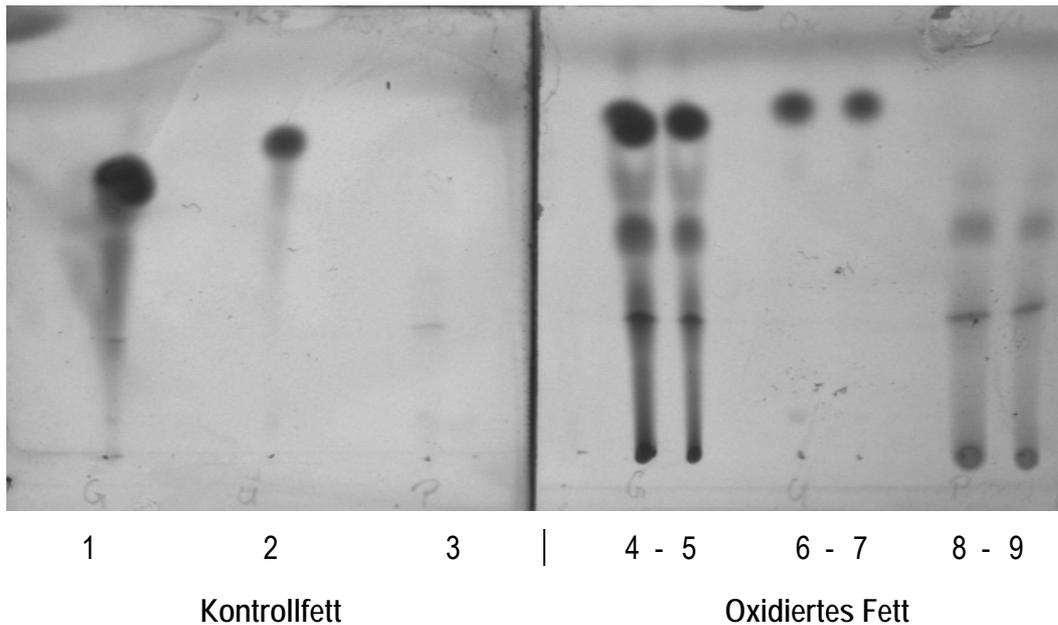


Abb.8: Dünnschichtchromatographie ausgewählter Fetteluate

(1) Fettgemisch,(2) unpolare Fraktion und (3) polare Fraktion von Kontrollfett
 (4-5) Fettgemisch,(6-7) unpolare Fraktion und (8-9) polare Fraktion von oxidiertem Fett

2.4 Versuchstiere und deren Haltung

Als Versuchstiere dienten in den Versuchen 1 und 2 wachsende männliche CD-Ratten der Firma Charles-Rivers Wiga (Sulzfeld, Deutschland) mit einer mittleren Lebendmasse von 103 g bzw. 133 g. Die Dunkin Hartley Meerschweinchen von Versuch 3 waren Auszuchttiere und wurden ebenfalls von Charles-Rivers Wiga bezogen. Ihre durchschnittliche Lebendmasse betrug zu Versuchsbeginn 218 g.

Bei allen Versuchsdurchführungen erfolgte die Zuordnung der Tiere in die jeweiligen Gruppen nach Gewicht, so dass zum Fütterungsbeginn gleiche mittlere Körpermassen vorlagen. In der Tabelle 6 sind die Gruppierungen der Versuchstiere für die einzelnen Versuche aufgeführt.

Tab.6: Einteilung der Tiere in Gruppen

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Gesamte Tieranzahl	80	20	50
Gruppenanzahl	8	2	5
Tiere pro Gruppe	10	10	10
Tiere pro Käfig	1	1	2

Die Haltung der Tiere erfolgte in Makrolonkäfigen mit Metallgitterabdeckung auf Einstreu. In den Versuchsterräumen herrschte eine Umgebungstemperatur von durchschnittlich 22°C bei 50-60% relativer Luftfeuchtigkeit. Die Hellphase des Lichtzyklus betrug 12 Stunden. Die lichtundurchlässigen Zwischen-

böden der Regale gewährleisteten eine von der Beleuchtung abgeschirmte Deckung für die Meerschweinchen.

In allen drei Versuchen verlief die Fütterung restriktiv, um bei jedem Tier die gleiche Verzehrmenge zu gewährleisten. Die Futterrationen waren angepasst an den geringsten täglichen Verzehr. Wasser stand in allen Versuchen *ad libitum* zur Verfügung. Die Lebendmasseentwicklung wurde im 1. Versuch 14-täglich, im 2. und 3. Versuch wöchentlich protokolliert.

2.5 Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials

2.5.1 Blutaufbereitung und Organentnahme

Nach Versuchsende wurden die Tiere unter Etherbetäubung dekapitiert und entblutet. Bei Versuch 2 und 3 wurden die Tiere 12 h vor der Tötung genüchert.

Aus dem Blut wurde Serum (Versuch 1) oder Plasma (Versuch 2 und 3) durch Zentrifugation bei 3.000 U/min und 4°C über 10 min gewonnen. Anschließend wurde das Probenmaterial aliquotiert und bei -20°C gelagert. Zwecks Stabilisierung des Vitamin C wurden 500 µl Plasma mit 500 µl einer 10%igen Metaphosphorsäurelösung versetzt und bei -80°C aufbewahrt. Die Erythrozyten wurden nach dreimaligem Waschen mit 0,9%iger Natriumchloridlösung ebenfalls bei -20°C gelagert. Die Gewinnung des Erythrozytenzytosols resultierte aus der Zentrifugation (4.000 U/min, 5 min) der gewaschenen Erythrozyten.

Die Auftrennung der einzelnen Lipoproteinfraktionen erfolgte nach einer Methode von TIEDINK u. KATAN (1989) mittels Dichtegradienten-Zentrifugation. 600 µl Serum bzw. Plasma wurde zunächst mit 300 µl Natriumchloridlösung (0,195 M) versetzt und bei 150.000 U/min, 4°C für 1 h zentrifugiert (Ultrazentrifuge RC M 100 GX, Rotor S150-AT, SORVALL, Kendo Laboratory Products, Hanau, Deutschland). Anschließend wurden die Lipoproteine sehr geringer Dichte (VLDL) mit einer Dichte (δ) von <1,006 g/ml abpipettiert. Nach Zugabe von 300 µl Natriumbromid-Natriumchlorid-Lösung (2,44 M NaBr, 0,195 M NaCl) und wiederholter Zentrifugation über 1,5 h bei 150.000 U/min und 4°C wurden die Lipoproteine geringer Dichte (LDL) ($1,006 < \delta < 1,063$ g/ml) abgenommen. Die verbliebene Fraktion beinhaltete die Lipoproteine hoher Dichte (HDL) ($\delta < 1,063$ g/ml). Die Lagerung sämtlicher Lipoproteine erfolgte bei -20°C.

Die entsprechenden Organe wurden entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Leber wurde bei -80 und das abdominale Fettgewebe bei -20°C gelagert.

2.5.2 Gewinnung von Leberhomogenat und -zytosol

Für die Gewinnung des Leberhomogenates sowie –zytosols wurde 1,5 g zerhackte Leber in ein Homogenisatorgefäß eingewogen und mit 4 ml eisgekühltem 0,1 M Phosphatpuffer mit 0,25 M Saccharose versetzt. Die Proben wurden mittels Homogenisators (Potter S, B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland) bei 500 U/min über 1 min aufbereitet. Die anschließende Zentrifugation bei 4.000 U/min und 4°C über 10 min diente dem Separieren größerer Zelltrümmer. Das Homogenat wurde abpipettiert, aliquotiert und bei –20°C gelagert. Die Abtrennung der Zytosolfraction erfolgte durch die Zentrifugation (46.000 U/min, 4°C, 1 h, Ultrazentrifuge RC M 100 GX) des Leberhomogenates. Es wurde ebenfalls bei –20°C aufbewahrt.

2.5.3 Extraktion der Gesamtlipide

Die Anwendung der modifizierten Methode von EDER u. KIRCHGESSNER (1994) nach HARA u. RADIN (1978) ermöglichte die Gewinnung der Gesamtlipide aus Leber (0,4 g) und gemahlene Diätproben (1,6 g).

Methode

Die Extraktion erfolgte mittels 4 ml Hexan:Isopropanol-Gemisch (3:2, v/v) über 18 h bei Raumtemperatur im Schüttelinkubator (G 25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey, USA). Anschließend wurde das Extrakt in ein Braunglasfläschchen überführt, mit Teflonbeschichtetem Deckel verschlossen und bei –20°C deponiert.

Für die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung der LDL wurden 50 µl Probe in 1 ml Chloroform:Methanol-Gemisch (2:1, v/v) extrahiert, eingengt und anschließend methyliert sowie analysiert, wie unter 2.6.3 beschrieben.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976).

Prinzip

Auf Grund der Bindung des Farbstoffes Coomassi-Brilliantblau an Proteine tritt eine Verschiebung des Absorptionsmaximum von 465 auf 595 nm ein. Die Konzentration an Proteinen verhält sich proportional zur Extinktion der Farbreaktion.

Methode

Von einer entsprechenden Probenverdünnung wurden 50 µl mit 200 µl Bradfordreagenz vermischt und 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion des Reaktionsproduktes bei 595 nm spektralphotometrisch erfasst (Spectro Fluor Plus, TECAN, Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland). Parallel dazu lief eine Albuminstandardreihe unter gleichen Bedingungen mit.

Berechnung

Über eine Standardgerade wurde die Proteinkonzentration der Proben ermittelt.

2.6.2 Cholesterin und Triglyzeride

Unter Verwendung von 2 Testkits (ECOLINE 25, MERCK Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland) wurden die Konzentrationen an Cholesterin und Triglyzeriden im Serum bzw. Plasma, in der HDL- und VLDL-Fraktion sowie in der Leber bestimmt.

Prinzip

Cholesterin und seine Ester werden aus Lipoproteinen durch Detergenzien freigesetzt, anschließend hydrolysiert und oxidiert, wobei Wasserstoffperoxid entsteht. Dieser reagiert mit 4-Aminoantipyrin und Salicylalkohol zu einem farbigen Chinonimin, das bei einer Wellenlänge von 500 nm (Ultraspec 2000) gemessen wird.

Die Triglyzeride werden bei ihrer Bestimmung mittels Lipasen durch enzymatische Hydrolyse zu Glycerin und freien Fettsäuren abgebaut. In einer Umsetzungsreaktion des Glycerin entsteht ebenfalls Wasserstoffperoxid. Auch hierbei wird die Konzentration an Triglyzeriden über die Bildung von farbigem Chinonimin spektralphotometrisch bestimmt.

Methode

Die Cholesterin- und Triglyzeridkonzentration von Serum bzw. Plasma sowie den Lipoproteinen wurde direkt im Medium bestimmt. Für die Ermittlung der Konzentrationen an Cholesterin und Triglyzeriden in der Leber wurde ein Aliquot der Lipidextrakte (2.5.3) in einem Zentrifugalverdampfer (RC 10.22., Jouan,

Frankreich) eingeengt, in 20 µl Gemisch aus TritonX 100:Chloroform (1:1, v/v) aufgenommen und erneut eingeengt. Im Anschluss daran wurde laut Anweisung der Testkits verfahren.

Berechnung

Anhand von mit geführten Standards wurden die Konzentrationen von Cholesterin und Triglyzeriden in den Proben mittels Verhältnisgleichung berechnet und auf die Einwaage bezogen.

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{E_P \cdot c_{\text{St}}}{E_{\text{St}}}$$

E_P	Extinktion der Probe
E_{St}	Extinktion des Standards
c_{St}	Konzentration des Standards
c	Konzentration an Cholesterin bzw. Triglyzeriden in der Probe

2.6.3 Fettsäurenspektrum

Zur Bestimmung des Fettsäurenmusters wurden entsprechende Mengen der verschiedenen Fettextrakte mit Trimethylsulfoniumhydroxid methyliert (BUTTE, 1989). Die dabei gebildeten Fettsäuremethylester wurden mit einem Gaschromatographen (HP 5890, Hewlett Packard GmbH, Waldbronn, Deutschland) getrennt und mittels Flammenionisationsdetektor quantifiziert (DÄNICKE et al., 1999). Die Trennung fand an einer 30 m langen FFAP-Si-Säule (0,53 mm ID, Fa. Macherey und Nagel, Düren, Deutschland) statt. Die Flussrate des Trägergases Helium betrug 8,4 ml/min. Das Injektionsvolumen umfasste 1 µl. Mit der HP 3365 Datastation erfolgte die Berechnung der Messergebnisse.

2.6.4 Tocopherole und Vitamin E-Verdaulichkeit

Um die Tocopherole mittels HPLC qualifizieren und quantifizieren zu können, ist es erforderlich, dass sie in gelöster Form vorliegen, wie bei BALZ et al. (1993) beschrieben.

Methode

Dafür wurden entsprechende Mengen an Leber, abdominalem Fett, gemahlenem Kot, Serum bzw. Plasma, Erythrozyten und LDL sowie extrahiertem Fett aus den Diäten mit 1 ml Pyrogallollösung (1% in absolutem Ethanol, w/v) versetzt und anschließend durch 150 µl gesättigte Natriumhydroxidlösung verseift. Die Inkubation verlief bei 70°C über 30 min. Nach der Extraktion der Tocopherole mit 2 ml n-Hexan erfolgte die chromatographische Auftrennung.

Für die chromatographische Auftrennung der Tocopherole wurde eine modifizierte Methode nach COORS (1991) verwendet.

Methode

Die Trennung der Tocopherolisomeren fand an einer Kieselgelsäule (LiChrospher^R Si 60, 5 µm, 250x4 mm², Agilent Technologies, Waldbronn) der HPLC-Anlage 1100-er Serie (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) unter folgenden Bedingungen statt: Flussrate von 1 ml/min des Laufmittel n-Hexan:1,4-Dioxan (94:6, v/v) bei einer Säulentemperatur von 30°C. Die Tocopherolisomere wurden über Fluoreszenzdetektion (Extinktion: 295 nm, Emission: 330 nm) in Bezug auf externe Tocopherolstandards (SIGMA-ALDRICH, Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) quantifiziert.

Für die Berechnung der scheinbaren Verdaulichkeit (V_s) von Vitamin E nach KIRCHGESSNER (1986) wurde der Vitamin E-Gehalt des Kotes und der Diät herangezogen. Vor der Analyse wurde der Kot gefriergetrocknet, gewogen und gemahlen.

$$V_s [\%] = \frac{\text{Aufnahme von Vitamin E über Diät} - \text{Ausscheidung von Vitamin E über Kot} \cdot 100}{\text{Aufnahme von Vitamin E über Diät}}$$

2.6.5 Konzentration von Ascorbinsäure und Harnsäure im Plasma

Die Konzentration von Ascorbinsäure (Vitamin C) und Harnsäure im Plasma wurde über eine reversed-phase HPLC in Anlehnung an die Methode von ROSS (1994) ermittelt.

Methode

Die Zugabe von Metaphosphorsäure (2.5.1) bewirkte die Denaturierung der Proteine, welche durch Zentrifugation abgetrennt wurden. Die Trennung der im proteinfreien Überstand befindlichen Antioxidantien Vitamin C und Harnsäure vollzog sich an einer ODS 5 µm Säule (25 x 0,46; MERCK Eurolab GmbH) mit einer RP 18 4x4 Vorsäule. Die mobile Phase (pH 5,5) bestand aus 25 mM Myristhyltrimethylammoniumbromid und 0,05 M Natriumhydroxid, die in 0,06 M Essigsäure mit einem Anteil von 7,5% Acetonitril gelöst waren. Erst kurz vor Gebrauch wurden Homocystein (100 mg/l) und EDTA (200 mg/l) dem Laufmittel zugesetzt. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Der Messbereich der UV-Detektion lag bei einer Wellenlänge von 262 nm.

Die Identifizierung und Kalibrierung der Peaks erfolgte anhand eines Mischstandards bestehend aus Ascorbinsäure (SIGMA-ALDRICH, Chemie GmbH) und Harnsäure (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

2.6.6 Lipidperoxidationsprodukte in Geweben

2.6.6.1 Cholesterinoxidationsprodukte in der Leber

Die Bestimmung der Cholesterinoxidationsprodukte (COP) erfolgte mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie nach der Methode von MORI et al. (1996).

Methode

Nach Zugabe von 200 µl internem Standard zu 3 ml Lipidextrakt aus der Leber (2.5.3) wurde der gesamte Ansatz eingeeengt und anschließend mit 2 ml methanolischer KOH (1 M) über 18 h im Schüttelinkubator (G 25 Incubator Shaker) bei 250 U/min und Raumtemperatur verseift. Die 4 ml zugesetztes Reinstwasser bewirkten das Abstoppen der Verseifung. Die Extraktion des unverseifbaren Anteils erfolgte mit Diethylether über 3 h. Das Einengen der Diethyletherphase bis zur Trockenheit fand unter Stickstoffbegasung statt. Die anschließende Derivatisierung mit 100 µl Pyridin und 100 µl bis (Trimethylsilyl) trifluoroacetamid (BSTFA) verlief für 1 h bei 60°C.

Die Trennung der COP an einer 30 m langen DB-5 Fused Si-Trennsäule (0,25 mm ID; 0,25 µm Filmdecke) (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland) ermöglichte deren Qualifizierung und Quantifizierung mittels QP 500 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS Shimadzu Japan Manufacturing PTIY. LTD, Kiyoto, Japan) im SIM-Modus. Die Flussrate des Trägergases Helium betrug 7,6 ml/min.

Von den COP waren folgende von Interesse: 7-β-Hydroxycholesterin, 7-Ketocholesterin, Cholestantriol und 25-Hydroxycholesterin. Sie dienten als externe Standardsubstanzen. Die Kalibrierung erfolgte anhand eines internen Standards (5-α-Cholestan) (SIGMA-ALDRICH, Chemie GmbH).

2.6.6.2 Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen in Leber und Serum bzw. Plasma

Die Bestimmung der TBARS im Leberhomogenat und Serum bzw. Plasma erfolgte unter Verwendung der Methode von CONTI et al. (1991). Die Reaktion von TBA mit Malondialdehyd (MDA), einem sekundären Lipidperoxidationsprodukt, führt zu einer Komplexbildung, die jedoch nicht spezifisch für MDA ist. Aldehyde, Zucker und Gallenpigmente bilden mit TBA einen Komplex, der bei gleicher Wellenlänge Licht absorbiert (HALLIWELL u. GUTTERIDGE, 1988).

Prinzip

Das Prinzip des TBA-Testes beruht auf der Komplexbildung von zwei Molekülen TBA mit einem Molekül MDA unter Einwirkung von Hitze in einem sauren Milieu. Dieser MDA-TBA-Komplex absorbiert Licht bei 532 nm.

Methode

Nach der Zugabe von 750 µl TBA-Reagenz zu 100 µl Probe bzw. Standard schloss sich eine Inkubation von 1 h bei 95°C an. Danach wurden die TBARS mit 3 ml Butanol extrahiert und bei 532 nm spektralphotometrisch (Ultrospec 2000) bestimmt.

Berechnung

Mit Hilfe einer Standardreihe aus 1,1,3,3-Tetraethoxypropan (SIGMA-ALDRICH, Chemie GmbH) wurde der Gehalt an TBARS in den Proben über eine lineare Gleichung ermittelt.

2.6.7 Aktivitätsbestimmung antioxidativer Enzyme

Die Aktivitäten der nachstehend angeführten Enzyme wurden mit Ausnahme der Glutathion-Peroxidase (Serum bzw. Plasma, Leberzytosol) im Leberhomogenat bestimmt. Zusätzlich wurden in den Versuchen 2 und 3 die Aktivitäten dieser Enzyme in den Erythrozyten ermittelt. Die Enzymaktivität wurde auf den Proteingehalt der Proben bezogen. Je nach Höhe der Aktivität war eine entsprechende Verdünnung der jeweiligen Proben notwendig.

2.6.7.1 Superoxiddismutase

Die Aktivität der Superoxiddismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) wurde nach einer Methode von MARKLUND u. MARKLUND (1974) gemessen. Der Test umfasst sowohl das Cu, Zn-abhängige Enzym, als auch die Mn-abhängige Form. Erythrozyten enthalten jedoch nur die Cu, Zn-abhängige SOD (KURATA et al., 1993).

Prinzip

Pyrogallol oxidiert in wässriger Lösung. Das Prinzip der Messung beruht auf der Hemmung dieser Autoxidation durch die SOD. Das oxidierte Pyrogallol ist spektralphotometrisch messbar. Je größer also die Extinktionsänderung pro min ist, desto geringer ist die SOD-Aktivität.

Methode

Zuerst wurden 25 µl verdünnte Probe mit 700 µl Tris-Succinat-Puffer (0,05 M) gemischt und für 10 min bei 25°C temperiert. Nach Zugabe von 25 µl Pyrogallollösung (0,65 mM) wurde der Extinktionsverlauf bei 420 nm (Ultrospec 2000) und Raumtemperatur über 2 min erfasst. Für die Bestimmung des 100%-Wertes wurde anstelle der Probe Reinstwasser verwendet.

Berechnung

1 Unit ist definiert als die Enzymmenge, die benötigt wurde, um eine 50%ige Inhibierung der Pyrogallol-Autoxidation zu erreichen.

$$\text{SOD [U/ml]} = \frac{(\Delta E / \text{min}_{100\% \text{ Wert}} - \Delta E / \text{min}_{\text{Probe}}) \cdot V}{v \cdot \frac{\Delta E / \text{min}_{100\% \text{ Wert}}}{2}}$$

V	Ansatzvolumen (750 µl)
v	Probenvolumen (25 µl)
ΔE	Extinktionsänderung

2.6.7.2 Katalase

Die Erfassung der Katalaseaktivität beruhte auf der Anleitung von AEBI (1986).

Prinzip

Die Katalase (EC 1.11.1.6) beschleunigt die Umsetzung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zu Wasser und Sauerstoff. Der Abbau von H₂O₂ wurde ebenfalls spektralphotometrisch bei 280 nm (Ultraspec 2000) gemessen. Die Extinktionsabnahme korreliert mit der Aktivität der Katalase.

Methode

Nach der Zugabe von 250 µl H₂O₂-Lösung (30 mM) zu 500 µl verdünnter Probe begann die Messung der Extinktionsabnahme bei Raumtemperatur über 30 s.

Berechnung

1 Unit entspricht der Enzymmenge, die 1 µmol H₂O₂ pro Minute zersetzte.

$$\text{Katalase [U/l]} = \frac{V \cdot 1000 \cdot \Delta E / \text{min}}{\varepsilon \cdot v \cdot d}$$

V	Ansatzvolumen (750 µl)
v	Probenvolumen (500 µl)
ε	Molarer Extinktionskoeffizient H ₂ O ₂ (0,036 l·mmol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
d	Schichtdicke (1 cm)
ΔE	Extinktionsänderung

2.6.7.3 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Die Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) (EC 1.1.1.49) wurde nach einer Methode von DEUTSCH (1985) bestimmt.

Prinzip

Im Testsystem bewirkt die G6PDH eine Umsetzung von Glucose-6-Phosphat und NADP⁺ zu 6-Phosphogluconolacton und NADPH. Die Menge an gebildetem NADPH ist dabei proportional der Aktivität von G6PDH.

Methode

Die Zugabe von 50 µl Probe zu 1 ml Testmedium (50 mM TRIS; 0,4 mM NADP⁺; 6,3 mM MgCl₂; 3,3 mM Glucose-6-Phosphat; 5 mM Maleinimid) führte nach einer Inkubation von 2 min bei Raumtem-

peratur zu einer Extinktionsänderung, die über 2 min spektralphotometrisch bei 339 nm (Ultraspec 2000) verfolgt wurde.

Berechnung

1 Unit ist als die Menge definiert, die 1 μmol NADPH pro min umsetzt.

$$\text{G6PDH [U/g Protein]} = \frac{V \cdot \Delta E / \text{min}}{\epsilon \cdot v \cdot d}$$

V	Ansatzvolumen (1,05 ml)
v	Probenvolumen (0,05 ml)
ϵ	Molarer Extinktionskoeffizient NADPH ($6,3 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
d	Schichtdicke (1 cm)
ΔE	Extinktionsänderung

2.6.7.4 Glutathionperoxidase

Die Verfahrensweise zur Aktivitätsbestimmung der Glutathionperoxidase (GSHPx) (EC 1.11.1.12) stütze sich auf die von PAGLIA u. VALENTINE (1967) entwickelte und von LEVANDER et al. (1983) modifizierte Methode.

Prinzip

Die GSHPx baut das *tert*-butyl Hydroperoxid (t-BHP) zu seinen Alkoholen ab. Als Reduktionsmittel dient Glutathion (GSH). Die Regeneration des dabei entstandenen oxidierten Glutathion (GSSG) verläuft über eine Reaktion mit Glutathionreduktase (GR) und NADPH als Coenzym. Der Verbrauch an NADPH wurde spektralphotometrisch festgehalten bei einer Wellenlänge von 340 nm (Ultraspec 2000). Die Extinktionsabnahme ist proportional der GSHPx-Aktivität.

Methode

Der Testansatz setzt sich wie folgt zusammen:

	200 μl	GR-Lösung	(5.000 U/l)
+	50 μl	Glutathion-Lösung	(40 mM)
+	50 μl	verdünnte Probe	
+	450 μl	Pufferlösung	(pH 7,4)
+	220 μl	Reinstwasser	

Im Anschluss an eine Inkubation von 10 min bei 25°C wurden 10 μl NADPH-Lösung (20 mM) zugesetzt. Nach Ablauf einer weiteren Inkubationsphase von 2 min erfolgte durch Zugabe von 20 μl t-BHP-Lösung (15 mM) der Reaktionsstart, wobei der Extinktionsabfall spektralphotometrisch registriert wurde. Anstelle von Probenmaterial wurde beim Leerwert Reinstwasser verwendet. Die Konzentration an t-BHP im Testansatz beträgt 0,3 mM und lag damit im Sättigungsbereich der Se-abhängigen und nicht der Se-unabhängigen GSHPx (2,3 bis 5,3 mM).

Berechnung

1 Unit entspricht der Enzymaktivität, die eine Menge von 1 μmol NADPH pro Minute umsetzt.

$$\text{GSHPx [U/l]} = \frac{V \cdot 1000 \cdot \Delta E / \text{min}}{\epsilon \cdot v \cdot d}$$

V	Ansatzvolumen (1000 μl)
v	Probenvolumen (50 μl)
ϵ	Molarer Extinktionskoeffizient NADPH ($6,3 \cdot 10^3 \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
d	Schichtdicke (1 cm)
ΔE	Extinktionsänderung

2.6.8 Glutathion

Der Gesamtgehalt an Glutathion (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG) wurden nach Modifizierung der Methode von TIETZE (1969) bestimmt, wobei das gesamte GSH sich in reduziertes (GSH_{red}) und oxidiertes GSH (GSSG) unterteilt.

Prinzip

GSH_{red} reagiert in einer nicht-enzymatischen Reaktion mit 5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB) zu GSSG und 2-Nitro-5-Thiobenzoessäure (TNB). GR mit NADPH als Coenzym reduziert GSSG zu GSH_{red} . Damit ist sichergestellt, dass im Test sowohl GSH_{red} als auch GSSG in die Erfassung des Gesamtgehaltes an GSH mit einfließen. Die Konzentrationen an DTNB, NADPH und GR wurden so gewählt, dass die Entstehung von TNB der GSH-Konzentration proportional ist. Die TNB-Bildung wird spektralphotometrisch bei 412 nm (Ultraspec 2000) gemessen.

Um den Anteil an GSSG bestimmen zu können, wurde das vorhandene GSH_{red} durch den Zusatz von 2-Vinylpyridin derivatisiert und die GR gleichzeitig deaktiviert.

Methode

Im ersten Schritt wurden die Proteine mit 10%iger Trichloressigsäure ausgefällt. Im Anschluss daran wurde ein Ansatz, bestehend aus 100 μl Probenüberstand, 700 μl NADPH-Pufferlösung (0,3 mM) und 100 μl DTNB-Reagenz (6 mM), für 4 min bei 30°C temperiert. Die Zugabe von GR (6000 U/l) löste den Reaktionsstart aus, wodurch eine Extinktionsänderung eintrat.

Die vollständige Derivatisierung des GSH_{red} erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur durch die Zugabe von 5 μl 2-Vinylpyridin zu 100 μl Probenüberstand. Anschließend wurde nach beschriebener Anleitung fortgefahren.

Berechnung

Über die Gleichung einer Kalibrationsgeraden wurden die GSH- und GSSG-Konzentrationen berechnet. Da zwei Moleküle GSH_{red} einem Molekül GSSG entsprechen (KOOLMAN, 1998), war der errechnete Wert der GSSG-Bestimmung durch 2 zu teilen.

2.6.9 Hämolyseempfindlichkeit

2.6.9.1 Osmotische Hämolyseresistenz von Erythrozyten (*in vitro*)

Zur Beurteilung der Membranstabilität von Erythrozyten wurde deren Resistenz gegenüber hypotonen Natriumchloridlösungen bestimmt. Dafür kam eine von O`DELL et al. (1987) modifizierte Methode nach CARTWRIGHT (1963) zum Einsatz.

Prinzip

Das Verfahren beruht auf der Tatsache, dass die Hämolyse von der Konzentration der Natriumchloridlösung sowie der Stabilität der Erythrozytenmembran abhängig ist. Je größer die Instabilität der Erythrozytenmembran und je hypotoner die Natriumchloridlösung, desto größer ist der Austritt von Hämoglobin (Hb) in das ungebundene Medium, welches als Maß für die Hämolyse dient.

Methode

Von dem frisch gewonnenen, heparinisierten Vollblut wurden jeweils 15 µl in 1,5 ml der unterschiedlich konzentrierten Natriumchloridlösungen (0,36; 0,38; 0,41; 0,43; 0,46; 0,90%) pipettiert. Unter erst vorsichtigem Schwenken inkubierten dann die Proben über 15 min bei Raumtemperatur. Nach anschließender Zentrifugation (Biofuge, Heraeus) der Proben für 5 min bei 3.000 U/min wurde der Überstand abgenommen und spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm (Ultraspec 2000) gemessen.

Berechnung

Das Ausmaß der Hämolyse im prozentualen Verhältnis zur Totalhämolyse bei Reinstwasser berechnete sich folgendermaßen:

$$\text{Hämolyse [\%]} = \frac{E_x \cdot 100\%}{E_0}$$

E_x Extinktion bei x%iger NaCl-Lösung
 E_0 Extinktion bei Reinstwasser

2.6.9.2 Hämolysemarker (*in vivo*)

2.6.9.2.1 Laktat-Dehydrogenase

Die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase (LDH) (EC 1.1.1.27) wurde mit Hilfe eines konventionellen Testkits (Ecoline 15, Merck Eurolab GmbH) bestimmt. Die Durchführung und Berechnung erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll.

Prinzip

LDH katalysiert die Reaktion von Pyruvat zu Lactat unter NADH-Verbrauch. Die Geschwindigkeit der NADH-Abnahme ist direkt proportional der LDH-Aktivität im Probenmaterial und wird spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm (Ultraspec 2000) erfasst.

Berechnung

Die Berechnungsformel lautete:

$$\text{LDH [U/l]} = \Delta E / \text{min} \cdot 8095 \quad \Delta E \quad \text{Extinktionsänderung}$$

2.6.9.2.2 Saure Phosphatase

Die Aktivitätsbestimmung der sauren Phosphatase (EC 3.1.3.2) erfolgte unter Verwendung eines Testkits (Merckotest 3305, Merck Eurolab GmbH). Auch hier wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll verfahren.

Prinzip

Phosphatasen katalysieren die Hydrolyse von Phosphorsäureestern. Die Unterscheidung in saure und alkalische Phosphatasen ist abhängig vom pH-Bereich ihrer Wirkungsoptima. Bei der Aktivitätsbestimmung der sauren Phosphatase entstehen durch die enzymbedingte Spaltung des Substrates p-Nitrophenylphosphat p-Nitrophenol und Phosphorsäure. Die Zugabe von Natronlauge unterbricht die Reaktion. Die Überführung des freigesetzten p-Nitrophenols in das gelb gefärbte Anion wird spektralphotometrisch bei 405 nm (Ultraspec 2000) erfasst.

Berechnung

Da die Menge des in der Zeiteinheit freigesetzten p-Nitrophenols direkt proportional der Phosphataseaktivität war, leitet sich daraus die angeführte Formel ab.

$$\text{saure Phosphatase [U/l]} = E_p \cdot 101 \quad E_p \quad \text{Extinktion der Probe}$$

2.6.9.2.3 Freies Hämoglobin

Die Ermittlung der Konzentration an freiem Hämoglobin im Serum bzw. Plasma erfolgte unter Nutzung eines Kits (Verfahren Nr. 527, SIGMA DIAGNOSTICS, SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH).

Prinzip

Der Farbtest von Plasmahämoglobin basiert auf der katalytischen Wirkung von Hämoglobin auf 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. Bei der Umsetzung von TMB kommt es zur Bildung eines Chromogen, welches bei einer Wellenlänge von 600 nm (Ultraspec 2000) gemessen wird.

Berechnung

Auch hier verhielt sich die Menge des gebildeten Farbstoffes proportional zur Hämoglobinkonzentration der Proben. Die Berechnung erfolgte anhand eines Standards.

$$\text{Hb } [\mu\text{mol/l}] = \frac{(E_P - E_L) \cdot c_{\text{St}} \cdot 0,155}{(E_{\text{St}} - E_L)}$$

E_P	Extinktion der Probe
E_{St}	Extinktion des Standards
E_L	Extinktion des Leerwertes
c_{St}	Standardkonzentration (30 mg/ dl)

2.6.9.2.4 Kalium

Für die Beurteilung der Hämolyseempfindlichkeit der Erythrozyten wurde als weiterer Parameter die Kaliumkonzentration im Serum bzw. Plasma mit herangezogen.

Methode

Der Gehalt an Kalium in den verdünnten Proben wurde mittels Flammenphotometer (ELEX 6361, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 589 nm gemessen. Propan diente dabei als Brenngas. Für die Quantifizierung wurde eine Standardreihe aus einer KH_2PO_4 - und KCl-Lösung verwendet.

2.6.10 Oxidationsempfindlichkeit der LDL

Die Bestimmung der Oxidationsempfindlichkeit der LDL erfolgte *in vitro* nach einer Methode von ESTERBAUER et al. (1989) mit Modifikationen.

Methode

Das frisch gewonnene LDL wurde 12 Stunden bei 4°C gegen N-begaste Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) dialysiert und anschließend auf einen Proteingehalt von 0,05 mg/ml Ansatz eingestellt. Die Zugabe von Kupfersulfat (70 µM) bewirkte die Oxidation der LDL. Die dabei entstandenen konjugierten Diene wurden bei 234 nm spektralphotometrisch (Spekto Fluor Plus) über 10 Stunden im Abstand von je 2 min bei Raumtemperatur erfasst.

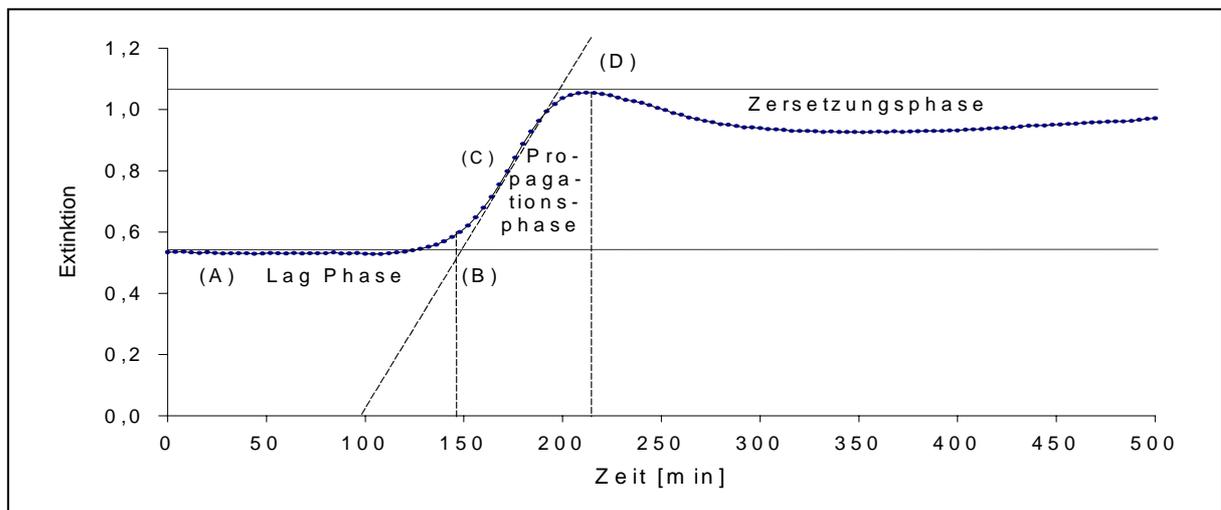


Abb.9: Schematischer Extinktionsverlauf während der Lipidperoxidation von LDL nach Kleinveld (1992)
(A) Ausgangsextinktion; (B) Lag-Time; (C) Extinktionsanstieg; (D) maximale Extinktion

Berechnung

Die in Abbildung 9 dargestellten und im fortlaufenden Text beschriebenen Indizes (A-D) charakterisieren die Oxidationsempfindlichkeit von LDL. Unter Einbeziehung der Ausgangsextinktion (A) wurde als erstes die Menge an konjugierten Dienen über deren molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt.

$$\text{Ausgangskonzentration an Dienen} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{g Protein}} \right] = \frac{E_{\text{Min}}}{\epsilon \cdot d \cdot c}$$

E_{Min}	Ausgangsextinktion
ϵ	Molarer Extinktionskoeffizient der konjugierten Diene (29.500 l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹) bei 234 nm
d	Schichtdicke (cm)
c	Proteinkonzentration (mg/ml)

Es folgte ein Zeitraum, indem noch keine Lipidperoxidation stattfand. Dieser Abschnitt wird als Lag-Time (B) oder Lag-Phase bezeichnet (SELLMER, 1994; KLEINVELD, 1992). Über den Extinktions-

verlauf wurde der Endpunkt der Lag-Phase mittels einer Formel errechnet. In der vorliegenden Arbeit ist die Lag-Time als der Zeitpunkt definiert, an dem ein Extinktionsanstieg um 5% eintrat.

Während der Lag-Phase kam es zu Verlusten der endogenen Antioxidantien. Mit der Bildung von Lipidhydroperoxiden begann die Propagationsphase. Anhand des Extinktionsanstieges (C) wurde die Produktionsrate an Dienen pro min ermittelt.

$$\text{Produktionsrate } [\mu\text{mol/g Protein} \cdot \text{min}] = \frac{\Delta E / \text{min}}{\varepsilon \cdot d \cdot c}$$

ΔE	Extinktionsänderung
ε	Molarer Extinktionskoeffizient der konjugierten Diene ($29.500 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) bei 234 nm
d	Schichtdicke (cm)
c	Proteinkonzentration (mg/ml)

Aus der maximalen Extinktion (D) lässt sich die maximale Diene-Konzentration ableiten, die während der Propagationsphase entstand. Im Anschluss daran setzte die Zersetzungsphase ein.

$$\text{Maximale Diene - Konzentration } [\mu\text{mol/g Protein}] = \frac{(E_{\text{Max}} - E_{\text{Min}}) \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot d \cdot c}$$

E_{Min}	Ausgangsextinktion
E_{Max}	Maximale Extinktion
ε	Molarer Extinktionskoeffizient der konjugierten Diene ($29.500 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) bei 234 nm
d	Schichtdicke (cm)
c	Proteinkonzentration (mg/ml)

2.6.11 Spezifischen Aufnahme von fluoreszenz-markierten LDL durch Makrophagen

Es ist bekannt, dass prooxidative Stoffwechselprozesse zur Bildung von oxidierten und acetylierten LDL führen können. Derartig modifizierte LDL werden über den Scavenger-Rezeptor von Makrophagen aufgenommen, gelangen auf diese Weise in die Intima von Gefäßwänden und können somit eine atherogene Wirkung ausüben. Die Untersuchungen zur Aufnahme von LDL durch Makrophagen sollen klären, ob nach Fütterung oxidierter Nahrungsfette verstärkt modifizierte LDL vorhanden sind.

2.6.11.1 LDL-Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff

Die Markierung der LDL mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dil (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3'-Tetramethylindocarbocyanin-Perchlorat) stützt sich auf eine Modifikation der Methode von ZOUHAIR et al. (1993). Zuerst wurden die LDL (1,2 ml) auf 37°C temperiert (Thermomixer-Comfort, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) und bei 700 U/min mit 2 µl Dil-DMSO-Lösung (36 mM) versetzt. Nach 2 h wurden weitere 2 µl Dil-DMSO-Lösung zugesetzt. Insgesamt verlief der Färbvorgang über 6 h bei 37°C und 400 U/min. Zur Stabilisierung und Vermeidung von Oxidation der LDL erfolgte eine Ascorbinsäurezugabe (2 µl, 0,1M) und Stickstoffbegasung (1 min). Im Anschluss wurde der überschüssige

Farbstoff durch Sterilfiltration und Zentrifugation (Ultrazentrifuge, 80.000 U/min, 4°C, 1h) abgetrennt. Zwecks Reinigung schloss sich eine Dialyse gegen N-begastes PBS über 12 h an.

2.6.11.2 Inkubation von Makrophagen mit fluoreszenz-markierten LDL

Um die spezifische Aufnahme von Dil-markierten LDL über Makrophagen zu ermitteln, war es notwendig, die entsprechenden Rezeptoren zu hemmen. Die Hemmung der Aufnahme von fluoreszenz-markierten LDL über den Scavenger-Rezeptor erfolgte durch Polyinosinsäure (PiS) in Anlehnung an XING et al. (1998) und SPARROW et al. (1989). Die Methode zur Hemmung des LDL-Rezeptors mittels Heparin (Hep) baute auf der Forschungsarbeit von GOLDSTEIN et al. (1976) auf.

Die Kultivierung der verwendeten adhärennten Maus-Monozyten-Makrophagen J-774A.1 (DSMZ-Nr. ACC 170) von der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Deutschland) verlief bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung im Brutschrank (Hera cell, Kendro Laboraty Products GmbH, Hanau, Deutschland). Das eingesetzte Zellkulturmedium DMEM enthielt zu 10% FKS und zu 0,5% Gentamicin. In entsprechenden Zeitabständen wurden die Makrophagen mit einer Dichte von 20.000 Zellen pro 0,5 ml Medium und Kavität in eine 24-iger Multiwellplatte (Cellstar, Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland) ausgesät. Nach 5 d Wachstumsperiode war der Zellrasen geschlossen.

Die Zellen wurden vor der Beimpfung mit 0,5 ml FKS-freiem Medium pro Kavität gewaschen. Das Testmedium (TM) bestand aus FKS-freiem DMEM mit einem Anteil von 5 µg fluoreszenz-markierten LDL-Protein/ml. Die Zellen wurden mit und ohne PiS (5 µg/ml TM) oder Heparin (80 U/ml TM) inkubiert. 200 µl Testmedium wurden pro Kavität aufgetragen. Die Inkubation verlief bei 37°C und 5% CO₂ über 2 h im Brutschrank (Hera cell). Es schloss sich das zweimalige Spülen mit je 0,5 ml PBS und das Lysieren der Zellen mit 0,3 ml Isopropanol an.

Pro Tier wurden jeweils 8 Kavitäten für die Totale-Aufnahme von fluoreszenz-markierten LDL und 8 Kavitäten für jede Art der Hemmung beimpft, so dass alle 24 Kavitäten einer Platte belegt waren. Unter Verwendung eines Fluoreszenzdetektors wurde das Fluoreszenzsignal (Extinktion 520 nm, Emission 580 nm) der fluoreszenz-markierten LDL im zentrifugierten (13.000 U/min, 5 min) Zelllysat gemessen und in Bezug zu dem des puren fluoreszenz-markierten LDL gesetzt. Durch das Verrechnen mit dem Proteingehalt pro Kavität ergab sich eine spezifische Aufnahme von fluoreszenz-markierten LDL µg/mg Zellprotein.

2.6.12 Auftrennung der Apolipoproteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Oxidation von LDL führt zu Veränderungen an den Apoproteinen B (SELMER, 1994) und E (BRUNET, 1999). Die Zusammensetzung der Lipoproteine kann somit Aufschluss über eine mögliche Modifikation der LDL geben. Für eine Auftrennung der LDL in ihre Apoproteine wurde ein Polyacrylamidgel mit einem Konzentrationsgradienten von 6-20% angefertigt.

Prinzip

Das Prinzip von LAEMMELI (1970) nutzt die elektrophoretische Beweglichkeit von Proteinen, um diese nach ihrer Molekülgröße bzw. -gewicht zu trennen. Die Wandergeschwindigkeit der einzelnen Proteinmoleküle ist von deren jeweiligen Ladung abhängig. Sie verhält sich proportional zur Feldstärke und zur Ladung des Moleküls, aber umgekehrt proportional zur Molekülgröße (WESTERMEIER, 1990).

Methode

Mit Hilfe eines Gradientenmischers wurde ein Gradientengel mit einem Porengradienten von 6-20% aus zwei Trenngelen (20 und 5%ig) gegossen. Nach dem Auspolymerisieren über Nacht bei 4°C wurde das Sammelgel (5,5%) aufgesetzt. Das gesamte System lief in einem Laufpuffer, der aus 0,025 M TRIS, 0,192 M Glycin und 0,1% SDS zusammengesetzt war. Um die Apoproteine laut ihrem Molekulargewicht identifizieren zu können, kam ein niedermolekularer und ein nativer hochmolekularer Standard (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) zum Einsatz. Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer gemischt. Außer beim hochmolekularen Standard enthielt der Probenpuffer 5% β -Mercaptoethanol. Die Inkubation der LDL-haltigen Proben und des hochmolekularen Standards verlief für 30 min bei Raumtemperatur. Der niedermolekulare Standard denaturierte bei 95°C über 5 min. Pro Probe wurden 20 μ l auf das Gel aufgetragen und eine Spannung von 60 V an der Elektrophoresekammer (Owl Separation Systems, Inc. Portsmouth, USA) angelegt, die schrittweise auf 100 V erhöht wurde. In der Tabelle 7 ist die Zusammensetzung des Gradientengels aufgeführt.

Tab.7: Zusammensetzung des Gradientengels (6-20%)

Reagenzien	Trenngel 20%	Trenngel 5%	Sammelgel 5,5%
Acryl-/Bisacrylamid (30%)			770 μ l
Acryl-/Bisacrylamid (40%)	5,0 ml	4,3 ml	
Glyzerol	1,0 ml		
Bromphenolblaulösung	668 μ l		
Reinstwasser		12,4 ml	880 μ l
Puffer ¹	3,3 ml	8,5 ml	2,5 ml
SDS (10%)	100 μ l	255 μ l	5,8 μ l
TEMED	8 μ l	21 μ l	11 μ l
APS (10%)	50 μ l	128 μ l	55 μ l

¹ Trenngelpuffer: 1,125 M TRIS pH 8,8; Sammelgelpuffer: 0,5 M TRIS pH 6,8

Im Anschluss wurde das Gel einer Silberfärbung nach NESTERENKO (1993) unterzogen. Mit einem Geldokumentationssystem (Syngene, Cambridge, Großbritannien) wurde es fotografiert und digitalisiert (Abb.10) zwecks qualitativer sowie semiquantitativer Auswertung.

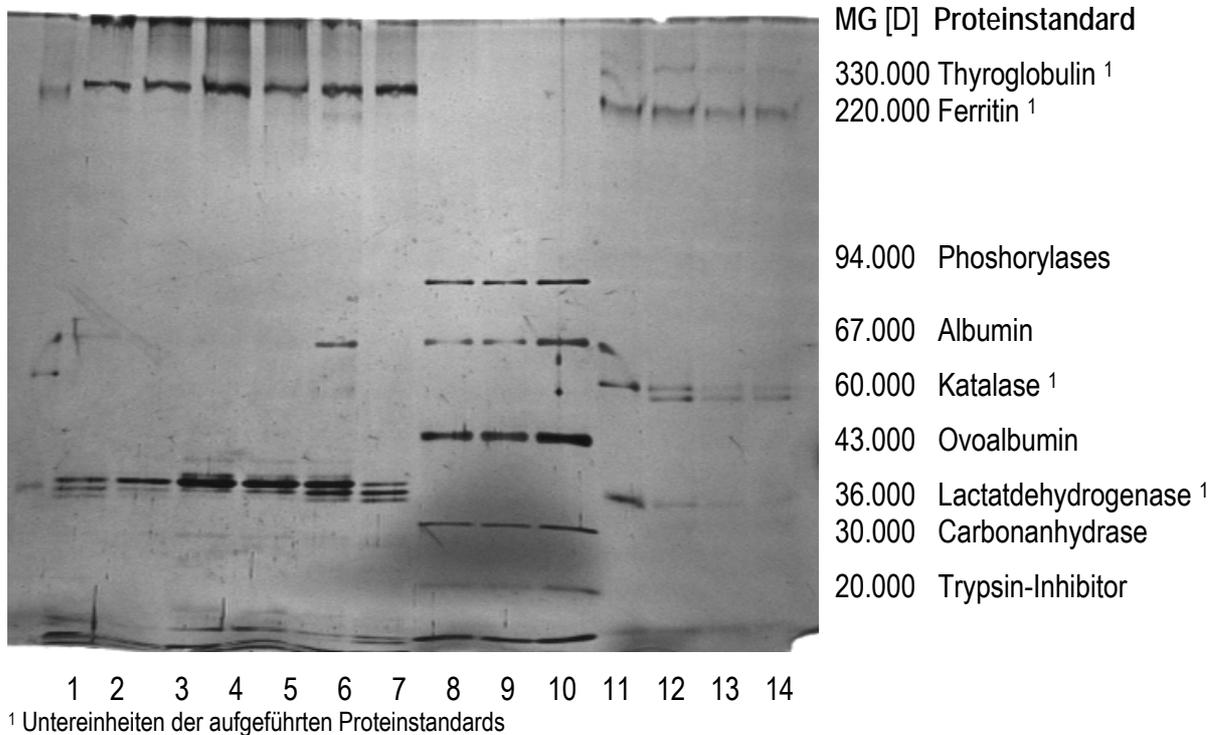


Abb.9: SDS-Polyacrylamidgradientengel 6-20%

[Bande 1: HMW-Standard (1:75); Bande 2-4: LDL von 3 Tieren Ox4/25; Bande 5-7: LDL von 3 Tieren K2/25; Bande 8-10: LMW-Standard (8-9 1:50; 10 1:25); Bande 11-14: HMW-Standard (11-12 1:50; 13-14 1:75)]

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Aufarbeitung des Datenmaterials erfolgte mit dem Statistikprogramm MINITAB (Release 13, Minitab Ltd., Michigan, USA). Die Daten aus Versuch 1 wurden zweifaktoriell mit dem General Linear Model (GLM) ausgewertet. Die Klassifikationsfaktoren waren die Art des Fettes, die Vitamin E-Konzentration der Diät und die Interaktion dieser Faktoren. Im Versuch 2 wurden die Mittelwerte der beiden Gruppen mit dem t-Test verglichen. Im Versuch 3 hingegen wurden zwei statistische Testverfahren angewandt. Zum einen wurde die Kontrollgruppe in einem t-Test mit der Gruppe, deren Diät oxidiertes Fett sowie die identische Konzentration an Vitamin E und Vitamin C enthielt, verglichen. Zum anderen wurde bei den Gruppen, deren Diät thermisch behandeltes Fett enthielt, der Einfluss der Faktoren Vitamin E, Vitamin C und deren Wechselwirkung mittels GLM ausgewertet. Als Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% zugrunde gelegt ($p < 0,05$).

3 Ergebnisse

3.1 Lebendmasseentwicklung der Versuchstiere

In der Tabelle 8 sind die Lebendmasse, Lebendmassezunahme und das relative Lebergewicht der Versuchstiere aller drei Versuche zusammengefasst. Im Versuch 3 verzehrten 8 Tiere die Diät nicht vollständig. Daher kamen nur 42 Tiere in die Versuchsauswertung. Die Tieranzahl pro Gruppe ist jeweils im Tabellenfuß aufgeführt.

Tab.8: Lebendmasse, Lebendmassezunahme und relatives Lebergewicht der Versuchstiere

Gruppe	Lebendmasse		Lebendmasse- zunahme	Relatives Lebergewicht [g/100g LM]
	Versuchsbeginn	Versuchsende [g]		
Versuch 1 - Ratte				
K1/25	103 ± 9	388 ± 12 ^a	285 ± 15 ^a	3,19 ± 0,13
K1/250	102 ± 8	378 ± 18 ^{ab}	276 ± 23 ^a	3,34 ± 0,23
Ox1/25	103 ± 8	364 ± 12 ^{bc}	261 ± 15 ^b	3,33 ± 0,12
Ox1/250	103 ± 7	374 ± 11 ^b	271 ± 16 ^{ab}	3,31 ± 0,17
Ox2/25	102 ± 8	376 ± 13 ^{ab}	275 ± 15 ^{ab}	3,43 ± 0,23
Ox2/250	103 ± 7	385 ± 8 ^a	283 ± 12 ^a	3,36 ± 0,18
Ox3/25	101 ± 7	362 ± 16 ^c	261 ± 15 ^b	3,32 ± 0,21
Ox3/250	103 ± 7	382 ± 12 ^{ab}	273 ± 12 ^a	3,29 ± 0,26
ANOVA	—	1,2,3	1,2	—
Versuch 2 - Ratte				
K2/25	133 ± 8	365 ± 16	231 ± 19	3,41 ± 0,15
Ox4/25	133 ± 7	358 ± 19	225 ± 20	3,72 ± 0,27 [*]
Versuch 3 - Meerschweinchen				
K2/35/300	218 ± 9	265 ± 31	47,2 ± 21,3	2,98 ± 0,40 ^b
Ox4/35/300	218 ± 9	244 ± 33	26,4 ± 13,6	3,97 ± 0,31 ^{a*}
Ox4/35/1000	218 ± 7	250 ± 20	40,3 ± 11,8	3,90 ± 0,33 ^a
Ox4/175/300	217 ± 12	221 ± 36	16,1 ± 4,5	4,20 ± 0,56 ^a
Ox4/175/1000	218 ± 11	243 ± 45	32,3 ± 16,4	4,31 ± 0,30 ^a
ANOVA	—	—	—	2

Werte = Mittelwert ± SD, n=10 (außer bei Ox4/35/1000 n=6, Ox4/35/300 und Ox4/175/300 n=8); a,b,c unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den Gruppen im multiplen Mittelwertsvergleich nach Fisher; 1,2,3 Signifikanz (p<0,05) der Einflussfaktoren: 1-Fett, 2-Vit.E, 3-Fett-Vit.E; * kennzeichnet signifikant (p<0,05) unterschiedliche Mittelwerte entsprechend des t-Testes (K2/25 vs. Ox4/25 bzw. K2/35/300 vs. Ox4/35/300)

LM = Lebendmasse

Im Versuch 1 betrug die Futteraufnahme pro Tier im Mittel 14 g/d. Zu Versuchsbeginn lag die Lebendmasse durchschnittlich bei 103 g. Am Ende wurde eine Interaktion zwischen Fettart und Vitamin E-Supplementierung bezüglich der Lebendmasse festgestellt. Bei geringer Vitamin E-Versorgung war die

Lebendmasse der Tiere, deren Diät oxidiertes Fett enthielt, signifikant geringer im Vergleich zu den Kontrolltieren. Innerhalb der Gruppen mit hoher Vitamin E-Zulage traten keine Unterschiede in der Lebendmasse auf. Die Art des Fettes und die Vitamin E-Versorgung übten im Versuch 1 einen signifikanten Einfluss auf die Lebendmassezunahme aus. Hier zeigte sich ebenfalls, dass bei geringer Vitamin E-Versorgung die Lebendmassezunahme der Tiere, deren Diät oxidiertes Fett enthielt, signifikant geringer war als bei den Kontrolltieren. Die Gruppen mit hoher Vitamin E-Zufuhr unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Keine Behandlungseinflüsse waren beim relativen Lebergewicht zu erkennen.

Die Tiere im Versuch 2 nahmen täglich eine Futtermenge von durchschnittlich 15 g auf. Zu Versuchsbeginn betrug die Lebendmasse im Mittel 133 g. Es war kein Einfluss der Fettart auf die Lebendmasse und Lebendmassezunahme erkennbar. Jedoch zeigte sich ein signifikanter Effekt der Fettart auf das relative Lebergewicht. Die Tiere, deren Diät oxidiertes Fett enthielt, hatten ein um 9% höheres relatives Lebergewicht als die Kontrolltiere.

Im Versuch 3 betrug die tägliche Futteraufnahme im Mittel 14 g/Tier. Die durchschnittliche Lebendmasse zu Versuchsbeginn lag bei 218 g. Wie im Versuch 2 führte die Verfütterung eines oxidierten Fettes zu keiner signifikant unterschiedlichen Lebendmasse sowie Lebendmassezunahme innerhalb der Versuchsgruppen. Auch die Vitamin E- und C-Supplementierung ließen keinen Effekt erkennen. Hingegen zeigte sich beim relativen Lebergewicht ein signifikanter Einfluss der Fettart und der Vitamin E-Versorgung. Bei geringer Vitamin E-Versorgung hatten die Tiere, deren Diät oxidiertes Fett enthielt, ein um 31% höheres relatives Lebergewicht als die Tiere der Kontrollfettgruppe. Eine hohe Vitamin E-Supplementierung bewirkte bei den Tieren, die oxidiertes Fett erhielten, eine zusätzliche Erhöhung des relativen Lebergewichtes gegenüber den Behandlungsgruppen mit niedriger Vitamin E-Versorgung.

3.2 α -Tocopherolkonzentration in Geweben und scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E

In der Tabelle 9 ist die Konzentration an α -Tocopherol in relevanten Geweben aufgeführt.

Tab.9: Konzentration von α -Tocopherol in relevanten Geweben

Gruppe	α -Tocopherolkonzentration		
	Serum/Plasma ^I [μ mol/l]	Leber [nmol/g]	Abdominalfett [nmol/g]
Versuch 1 - Ratte			
K1/25	11,6 \pm 2,4 ^c	26 \pm 5 ^c	38 \pm 10 ^b
K1/250	38,6 \pm 9,4 ^a	160 \pm 22 ^a	127 \pm 27 ^a
Ox1/25	7,6 \pm 1,7 ^e	20 \pm 5 ^d	28 \pm 9 ^c
Ox1/250	26,2 \pm 6,2 ^b	90 \pm 24 ^b	106 \pm 19 ^a
Ox2/25	9,1 \pm 1,3 ^d	19 \pm 4 ^{de}	27 \pm 6 ^c
Ox2/250	31,5 \pm 3,9 ^{ab}	89 \pm 11 ^b	121 \pm 36 ^a
Ox3/25	8,3 \pm 1,9 ^{de}	16 \pm 2 ^e	26 \pm 6 ^c
Ox3/250	30,5 \pm 5,2 ^b	94 \pm 11 ^b	135 \pm 42 ^a
ANOVA	1,2	1,2,3	1,2
Versuch 2 - Ratte			
K2/25	16,8 \pm 2,3	30,6 \pm 5,4	76,2 \pm 14,4
Ox4/25	7,4 \pm 1,1 [*]	15,8 \pm 2,6 [*]	40,7 \pm 7,4 [*]
Versuch 3 - Meerschweinchen			
K2/35/300	8,7 \pm 1,1 ^b	26,0 \pm 5,8 ^b	28,8 \pm 8,1 ^b
Ox4/35/300	3,0 \pm 0,8 ^{c*}	7,5 \pm 2,2 ^{c*}	16,1 \pm 8,0 ^{c*}
Ox4/35/1000	3,9 \pm 1,2 ^c	11,0 \pm 4,9 ^c	16,2 \pm 9,3 ^c
Ox4/175/300	10,4 \pm 1,4 ^{ab}	26,8 \pm 6,0 ^b	37,3 \pm 9,6 ^b
Ox4/175/1000	15,5 \pm 7,4 ^a	46,6 \pm 14,1 ^a	82,1 \pm 10,4 ^a
ANOVA	2,4	2,4,5	2,4,5

Werte = Mittelwert \pm SD, n=10 (außer bei Ox4/35/1000 n=6, Ox4/35/300 und Ox4/175/300 n=8); Werte für Varianzanalyse logarithmisch transformiert; ^{a,b,c,d,e} unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen im multiplen Mittelwertsvergleich nach Fisher; ^{1,2,3,4,5} Signifikanz ($p < 0,05$) der Einflussfaktoren: ¹-Fett, ²-Vit.E, ³-Fett-Vit.E, ⁴-Vit.C, ⁵-Vit.E-Vit.C; * kennzeichnet signifikant ($p < 0,05$) unterschiedliche Mittelwerte entsprechend des t-Testes (K2/25 vs. Ox4/25 bzw. K2/35/300 vs. Ox4/35/300)

^I α -Tocopherolkonzentration im Serum (Versuch 1) bzw. Plasma (Versuch 2 und 3)

In allen 3 Versuchen zeigte sich der Behandlungseffekt der Fettart anhand der Konzentrationsänderung von α -Tocopherol in allen untersuchten Geweben. Die Verfütterung von oxidierten Fetten führte zu einer signifikant geringeren α -Tocopherolkonzentration im Serum bzw. Plasma, in der Leber sowie im Abdominalfett im Vergleich zu den Kontrollfetten.

Die Vitamin E-Supplementierung übte in den Versuchen 1 und 3 einen signifikanten Einfluss auf die Konzentration an α -Tocopherol der untersuchten Gewebe aus. Die Tiere der Gruppen mit hoher Vitamin E-Zulage hatten signifikant höhere α -Tocopherolkonzentrationen in den Geweben als die Tiere der Gruppen mit geringer Vitamin E-Zulage. Zudem ergab sich im Versuch 1 eine Interaktion zwischen der Fettart und der Vitamin E-Versorgung: In der Leber der Tiere, deren Diät thermisch behandelte Fette enthielt, war der Konzentrationsunterschied an α -Tocopherol zwischen niedriger und hoher Vitamin E-Supplementierung wesentlich geringerer als zwischen den beiden Supplementierungsstufen der Kontrollgruppen.

Im Meerschweinchenversuch wurde bei gleichzeitig hoher Vitamin C- und Vitamin E-Zufuhr die höchste α -Tocopherolkonzentration im Plasma gemessen. Eine Interaktion zwischen Vitamin E- und Vitamin C-Versorgung bezüglich der α -Tocopherolkonzentration wurde in der Leber und im Abdominalfett festgestellt. Bei der Fütterung des erhitzten Fettes an die Meerschweinchen führte erstens eine höhere Vitamin E-Zufuhr zu einer höheren α -Tocopherolkonzentration und zweitens bewirkte eine höhere Vitamin C-Zufuhr bei hoher Vitamin E-Versorgung die höchste α -Tocopherolkonzentration in allen untersuchten Geweben.

In der Tabelle 10 ist die scheinbare Verdaulichkeit nach 4 Wochen und zu Versuchsende dargestellt.

Tab.10: Scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E

Gruppe	Scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E	
	4.Woche ^I	Versuchsende ^{II}
[%]		
Versuch 1 - Ratte		
K1/25	98,4 ± 0,7 ^a	98,5 ± 1,0 ^a
K1/250	98,3 ± 1,0 ^a	96,5 ± 0,7 ^a
Ox1/25	92,9 ± 2,0 ^b	81,3 ± 3,1 ^b
Ox1/250	85,2 ± 1,0 ^d	78,1 ± 3,6 ^b
Ox2/25	88,3 ± 1,7 ^c	71,8 ± 1,4 ^c
Ox2/250	82,6 ± 2,4 ^e	71,4 ± 3,8 ^c
Ox3/25	89,2 ± 2,4 ^c	71,7 ± 6,7 ^c
Ox3/250	84,3 ± 1,5 ^{de}	74,3 ± 4,4 ^c
ANOVA	1,2,3	1
Versuch 2 - Ratte		
K2/25	93,3 ± 1,8	93,8 ± 1,3
Ox4/25	79,5 ± 3,5 [*]	73,4 ± 2,7 [*]
Versuch 3 - Meerschweinchen		
K2/35/300	—	87,5 ± 0,6
Ox4/35/300	—	82,1 ± 3,4
Ox4/35/1000	—	80,1 ± 0,9
Ox4/175/300	—	82,2 ± 4,3
Ox4/175/1000	—	84,5 ± 4,3
ANOVA	—	—

Werte = Mittelwert ± SD, n=10 (außer bei Ox4/35/1000 n=6, Ox4/35/300 und Ox4/175/300 n=8); Werte für Varianzanalyse logarithmisch transformiert; ^{a,b,c,d} unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den Gruppen im multiplen Mittelwertsvergleich nach Fisher; 1,2,3 Signifikanz (p<0,05) der Einflussfaktoren: 1-Fett, 2-Vit.E, 3-Fett*Vit.E; * kennzeichnet signifikant (p<0,05) unterschiedliche Mittelwerte entsprechend des t-Testes (K2/25 vs. Ox4/25)

^I Sammelperiode von 7 d

^{II} Ratte: Sammelperiode von 7 d; Meerschweinchen: Sammelperiode von 24 h

Im Versuch 1 wurde eine Interaktion zwischen den Behandlungsfaktoren Fettart und Vitamin E auf die scheinbare Verdaulichkeit nach 4 Wochen festgestellt. Zum einen führte die Verfütterung von oxidierten Fetten zu einer geringeren scheinbaren Verdaulichkeit um 6 bis 16% gegenüber den Kontrolltieren. Zum anderen zeigte sich, dass bei den Tieren mit hoher Vitamin E-Versorgung die scheinbare Verdaulichkeit um 5 bis 7% geringer war als bei den Tieren mit niedriger Vitamin E-Versorgung.

Am Versuchsende bewirkte die Fütterung oxidiertes Fett ebenfalls eine signifikant geringere scheinbare Verdaulichkeit als bei der Fütterung von Kontrollfett. Der Unterschied lag bei 18 bis 25%. Hierbei

traten Unterschiede in der Verdaulichkeit sogar zwischen den verschiedenen oxidierten Fetten auf. Bei Tieren, die Fett Ox1 erhielten, wurde eine signifikant höhere scheinbare Verdaulichkeit berechnet als bei den Tieren, denen das Fett Ox2 und Ox3 gefüttert wurde.

Im Versuch 2 wirkte sich die Fettart gleichfalls schon nach 4 Wochen signifikant auf die scheinbare Verdaulichkeit aus. Zum Versuchsende war die scheinbare Verdaulichkeit bei den Tieren, deren Diät oxidiertes Fette enthielt, um 20% geringer als bei den Kontrolltieren.

Auch im Versuch 3 beeinflusste die Fettart die scheinbare Verdaulichkeit, jedoch nur tendenziell ($p=0,056$). Der Vitamin E-Gehalt in der Diät hatte keinen Einfluss auf die scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E.

3.3 Vitamin C- und Harnsäurekonzentration im Plasma

Wie der Tabelle 11 zu entnehmen ist, führte im Versuch 3 die hohe Vitamin E-Supplementierung bei Fütterung eines oxidierten Fettes zu einer signifikant höheren Konzentration an Ascorbinsäure und Harnsäure im Plasma gegenüber der niedrigen Vitamin E-Zulage. Eine hohe Vitamin C-Versorgung bewirkte einen tendenziellen Anstieg der Ascorbinsäure um 30% unabhängig von der Vitamin E-Zulage. Die Vitamin C-Konzentration in der Diät zeigte keine gerichtete Wirkung auf die Harnsäurekonzentration im Plasma. Auf Grund der hohen Standardabweichungen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu erkennen.

Die Wirkung des oxidierten Fettes zeigte lediglich einen tendenziellen Einfluss ($p=0,053$) auf die Harnsäurekonzentration, sie war bei gleicher Vitaminversorgung um 37% geringer als bei den Tieren der Kontrollgruppe.

Tab.11: Konzentration von Ascorbinsäure und Harnsäure im Plasma

Gruppe	Ascorbinsäure [μM]	Harnsäure
<i>Versuch 3 - Meerschweinchen</i>		
K2/35/300	9,93 \pm 5,72	19,7 \pm 7,9 ^a
Ox4/35/300	6,97 \pm 5,79	12,4 \pm 5,4 ^b
Ox4/35/1000	9,22 \pm 3,68	12,2 \pm 5,2 ^b
Ox4/175/300	12,72 \pm 8,59	21,5 \pm 6,8 ^a
Ox4/175/1000	15,03 \pm 5,25	15,7 \pm 4,9 ^{ab}
ANOVA	1	1

Werte = Mittelwert \pm SD, n=10 (außer bei Ox4/35/1000 n=6, Ox4/35/300 und Ox4/175/300 n=8);
^{a,b,c} unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p<0,05$) zwischen den Gruppen im multiplen Mittelwertsvergleich nach Fisher; 1 Signifikanz ($p<0,05$) des Einflussfaktors: 1- Vit.E

3.4 Endogenes antioxidatives Schutzsystem

Zur Untersuchung der Wirkung oxidierter Fette auf das endogene antioxidative Schutzsystem wurden die Aktivitäten der Enzyme Katalase, SOD, GSHPx sowie der Konzentration von Glutathion, GSSG und GSH_{red} bestimmt.

3.4.1 Aktivität antioxidativer Enzyme in Leber und Serum bzw. Plasma

Die Tabelle 12 beinhaltet die Aktivitäten von relevanten Enzymen in der Leber und im Serum bzw. Plasma.

Tab.12: Aktivitäten antioxidativer Enzyme in Leber und Serum/Plasma

Gruppe	Katalase	SOD	GSHPx	GSHPx
	Leberhomogenat [U/mg Protein]	Leberhomogenat	Leberzytosol [U/g Protein]	Serum/Plasma ^I
Versuch 1 - Ratte				
K1/25	183 ± 48 ^b	8,04 ± 1,31	2806 ± 870 ^a	70,3 ± 12,3 ^a
K1/250	176 ± 29 ^b	7,71 ± 0,83	2516 ± 321 ^a	60,7 ± 11,1 ^b
Ox1/25	227 ± 41 ^a	8,53 ± 1,62	1608 ± 354 ^b	51,3 ± 8,1 ^c
Ox1/250	238 ± 32 ^a	7,91 ± 1,09	1708 ± 486 ^b	49,3 ± 7,3 ^c
Ox2/25	231 ± 36 ^a	7,85 ± 0,74	1854 ± 284 ^b	53,6 ± 9,3 ^{bc}
Ox2/250	251 ± 59 ^a	8,42 ± 1,48	2007 ± 510 ^b	50,9 ± 7,9 ^c
Ox3/25	262 ± 51 ^a	7,83 ± 1,47	1793 ± 262 ^b	56,7 ± 11,2 ^{bc}
Ox3/250	236 ± 54 ^a	7,75 ± 1,05	2479 ± 549 ^a	56,7 ± 10,5 ^{bc}
ANOVA	1	—	1,2	1
Versuch 2 - Ratte				
K2/25	306 ± 64	18,4 ± 5,1	1050 ± 180	—
Ox4/25	389 ± 59 [*]	14,1 ± 2,7 [*]	720 ± 80 [*]	—
Versuch 3 - Meerschweinchen				
K2/35/300	433 ± 100	0,33 ± 0,13	113 ± 11	16,3 ± 3,2
Ox4/35/300	565 ± 95 [*]	0,40 ± 0,07	147 ± 86	15,1 ± 2,8
Ox4/35/1000	557 ± 121	0,44 ± 0,09	93 ± 7	17,1 ± 4,4
Ox4/175/300	597 ± 171	0,40 ± 0,09	132 ± 52	14,1 ± 5,5
Ox4/175/1000	476 ± 146	0,35 ± 0,11	141 ± 66	17,1 ± 2,6
ANOVA	—	—	—	—

Werte = Mittelwert ± SD, n=10 (außer bei Ox4/35/1000 n=6, Ox4/35/300 und Ox4/175/300 n=8); ^{a,b,c} unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den Gruppen im multiplen Mittelwertsvergleich nach Fisher; ^{1,2} Signifikanz (p<0,05) der Einflussfaktoren: ¹-Fett, ²-Fett-Vit.E; * kennzeichnet signifikant (p<0,05) unterschiedliche Mittelwerte entsprechend des t-Testes (K2/25 vs. Ox4/25 bzw. K2/35/300 vs. Ox4/35/300)

^I Aktivitätsbestimmung im Serum bzw. Plasma

In allen drei Versuchen war ein signifikanter Einfluss der Fettart auf die Aktivität der Katalase zu erkennen. Die Fütterung oxidierter Fette führte zu einer höheren Katalaseaktivität, im Mittel um 34% bei Versuch 1, um 27% bei Versuch 2 und um 31% bei Versuch 3 gegenüber der Kontrolle. Bei der Fütterung eines oxidierten Fettes bewirkte eine hohe Vitamin E- und C-Versorgung im Versuch 3 eine tendenziell ($p=0,061$) geringere Aktivität der Katalase im Vergleich zur niedrigen Vitaminversorgung.

Nur im Versuch 2 wurde ein signifikanter Effekt der Fettart auf die SOD-Aktivität nachgewiesen. Infolge der Fütterung oxidierten Fettes war die Enzymaktivität geringer. In den Versuchen 1 und 3 traten keine Unterschiede innerhalb der Gruppen auf.

Im Versuch 1 war eine Interaktion zwischen den Einflussfaktoren Fett und Vitamin E bezüglich der GSHPx-Aktivität in der Leber festzustellen. Zum einen wiesen die Tiere, deren Diät oxidiertes Fett enthielt, eine geringere Enzymaktivität auf als die Kontrolltiere; vor allem bei niedriger Vitamin E-Versorgung war sie um 36-42% geringer. Zum anderen war die GSHPx-Aktivität bei hoher Vitamin E-Supplementierung stets höher als bei niedriger Vitamin E-Supplementierung und konnte bei Verfütterung von Fett Ox3 den Fetteffekt sogar aufheben. Die signifikante Wirkung des oxidierten Fettes im Versuch 2 zeigte sich in einer um 31% geringeren Enzymaktivität der GSHPx in der Leber. Im Versuch 3 waren keine signifikanten Behandlungseinflüsse zu erkennen.

3.4.2 Konzentration von Glutathion in der Leber

Die Konzentrationen von Glutathion (GSH) und seiner oxidierten (GSSG) sowie reduzierten (GSH_{red}) Form sind in der Tabelle 13 dargestellt.

Tab.13: Konzentration von GSH, GSSG und GSH_{red} in der Leber

Gruppe	GSH	GSSG [μmol/g EW]	GSH _{red} ¹
Versuch 1 - Ratte			
K1/25	4,00 ± 0,45	1,32 ± 0,21 ^{ab}	1,36 ± 0,61 ^b
K1/250	3,61 ± 0,35	1,37 ± 0,12 ^a	0,89 ± 0,35 ^c
Ox1/25	3,98 ± 0,72	0,86 ± 0,13 ^c	2,25 ± 0,70 ^a
Ox1/250	3,62 ± 0,51	0,94 ± 0,28 ^c	1,95 ± 0,67 ^a
Ox2/25	3,97 ± 0,39	1,23 ± 0,20 ^{ab}	1,31 ± 0,18 ^{bc}
Ox2/250	4,07 ± 0,22	1,14 ± 0,22 ^b	1,79 ± 0,40 ^{ab}
Ox3/25	3,92 ± 0,32	1,20 ± 0,20 ^{ab}	1,58 ± 0,73 ^{ab}
Ox3/250	4,00 ± 0,32	1,31 ± 0,23 ^{ab}	1,66 ± 0,53 ^{ab}
ANOVA	—	1	1
Versuch 2 - Ratte			
K2/25	6,23 ± 0,56	0,20 ± 0,11	5,83 ± 0,53
Ox4/25	7,13 ± 0,25 [*]	0,03 ± 0,02 [*]	6,96 ± 0,39 [*]
Versuch 3 - Meerschweinchen			
K2/35/300	2,61 ± 0,62 ^b	0,22 ± 0,14 ^b	2,39 ± 0,53 ^b
Ox4/35/300	4,25 ± 0,44 ^{a*}	0,54 ± 0,18 ^{a*}	3,91 ± 0,62 ^{a*}
Ox4/35/1000	4,37 ± 1,02 ^a	0,46 ± 0,15 ^a	3,91 ± 0,90 ^a
Ox4/175/300	4,60 ± 1,08 ^a	0,47 ± 0,11 ^a	4,13 ± 1,03 ^a
Ox4/175/1000	5,03 ± 0,64 ^a	0,59 ± 0,18 ^a	4,41 ± 0,59 ^a
ANOVA	—	—	—

Werte = Mittelwert ± SD, n=10 (außer bei Ox4/35/1000 n=6, Ox4/35/300 und Ox4/175/300 n=8); a,b,c unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den Gruppen im multiplen Mittelwertsvergleich nach Fisher; 1 Signifikanz (p<0,05) des Einflussfaktors: 1-Fett; * kennzeichnet signifikant (p<0,05) unterschiedliche Mittelwerte entsprechend des t-Testes (K2/25 vs. Ox4/25 bzw. K2/35/300 vs. Ox4/35/300)

¹ Differenz aus GSH und 2*GSSG

EW = Einwaage

Die Art des Fettes beeinflusste signifikant die Konzentration an GSH in den Versuchen 2 und 3. Infolge der Fütterung eines oxidierten Fettes war der Gehalt an GSH in der Leber höher im Vergleich zum Kontrollfett. Während des Versuches 1 ergaben sich keine statistischen Unterschiede zwischen den Gruppen.

In allen drei Versuchen wurde eine signifikante Wirkung der Fettart auf die Konzentration an GSSG und GSH_{red} in der Leber nachgewiesen. Die Tiere, deren Diät oxidiertes Fett enthielt, hatten in den Versuchen 1 und 2 eine geringere Konzentration an GSSG und demzufolge eine höhere Konzentration an

GSH_{red} im Vergleich zu den Kontrolltieren. Besonders markant war dieser Effekt bei Verfütterung des Fettes Ox1 gegenüber der Kontrolle. Die Konzentration von GSSG sank um 33%, die von GSH stieg um 87%. Im Versuch 3 hingegen war die Konzentration an GSSG und GSH_{red} höher durch die Fütterung eines oxidierten Fettes.

3.5 Lipidperoxidationsprodukte

3.5.1 Konzentration von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen

Die Tabelle 14 beinhaltet die Konzentration von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen in Geweben.

Tab.14: Konzentration von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) in Leber und Serum bzw. Plasma

Gruppe	TBARS	
	Leber	Serum/Plasma ^I
[mmol/mol] ^{II}		
Versuch 1 - Ratte		
K1/25	—	2,25 ± 0,67 ^c
K1/250	—	2,31 ± 0,80 ^c
Ox1/25	—	3,62 ± 0,51 ^b
Ox1/250	—	3,15 ± 0,62 ^{bc}
Ox2/25	—	2,88 ± 0,72 ^c
Ox2/250	—	2,44 ± 0,58 ^c
Ox3/25	—	4,88 ± 1,14 ^a
Ox3/250	—	2,61 ± 1,10 ^c
ANOVA	—	1,2,3
Versuch 2 - Ratte		
K2/25	1,18 ± 0,24	—
Ox4/25	1,66 ± 0,39 [*]	—
Versuch 3 - Meerschweinchen		
K2/35/300	7,4 ± 3,8 ^b	1,12 ± 0,29
Ox4/35/300	16,4 ± 7,5 ^{a*}	1,41 ± 0,38
Ox4/35/1000	12,1 ± 5,3 ^{ab}	1,39 ± 0,56
Ox4/175/300	13,4 ± 2,5 ^a	1,17 ± 0,32
Ox4/175/1000	12,7 ± 3,7 ^a	1,21 ± 0,35
ANOVA	—	—

Werte = Mittelwert ± SD, n=10 (außer bei Ox4/35/1000 n=6, Ox4/35/300 und Ox4/175/300 n=8);
^{a, b, c} unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den Gruppen im multiplen Mittelwertsvergleich nach Fisher; 1,2,3 Signifikanz (p<0,05) der Einflussfaktoren: 1-Fett, 2-Vit.E, 3-Fett-Vit.E; * kennzeichnet signifikant (p<0,05) unterschiedliche Mittelwerte entsprechend des t-Testes (K2/25 vs. Ox4/25 bzw. K2/35/300 vs. Ox4/35/300)

^I Serum (Versuch 1) bzw. Plasma (Versuch 3)

^{II} bezogen auf den Gesamtgehalt an Triglyzeriden und Cholesterin

In den Versuchen 2 und 3 zeigte sich ein signifikanter Effekt der Fettart auf die TBARS-Konzentration in der Leber. Eine signifikant höhere Konzentration an TBARS wurde in den Lebern der Tiere gemessen, deren Diät oxidiertes Fett enthielt. Im Versuch 3 verdoppelte sich der Gehalt an TBARS bei geringer Vitamin E- und C-Versorgung. Bei erhöhter Zufuhr an Vitamin E und C war die TBARS-Konzentration um durchschnittlich 20% geringer.

Im Versuch 1 war bei Fütterung oxidierter Fette und geringer Vitamin E-Versorgung die Konzentration an TBARS im Serum höher als bei der Kontrolle. Besonders stark war dieser Effekt bei dem Fett Ox1 und Ox3 ausgeprägt. Eine höhere Vitamin E-Zulage bewirkte bei den Tieren, deren Diät oxidiertes Fett enthielt, einen geringeren Gehalt an TBARS im Serum.

Im Versuch 3 wurde ebenfalls ein Effekt von Fettart und Vitaminsupplementierung auf den Gehalt an TBARS im Plasma beobachtet, jedoch waren die Unterschiede nicht statistisch gesichert in Folge einer hohen Streuung der Messwerte.

3.5.2 Konzentration von Cholesterinoxidationsprodukten in der Leber

In der Tabelle 15 sind die Konzentrationen von Cholesterinoxidationsprodukten (COP) in der Leber dargestellt.

Tab.15: Konzentrationen von Cholesterinoxidationsprodukten in der Leber

Gruppe	7 β -Hydroxy- cholesterin	Cholestantriol	25-Hydroxy- cholesterin	7-Ketocholesterin
	[$\mu\text{g}/\mu\text{mol}$] ¹			
Versuch 2 - Ratte				
K2/25	130 \pm 35	92 \pm 39	17,1 \pm 6,3	207 \pm 80
Ox4/25	192 \pm 44 *	210 \pm 62 *	18,0 \pm 5,7	400 \pm 118 *
Versuch 3 - Meerschweinchen				
K2/35/300	29,5 \pm 6,0 ^b	24,4 \pm 7,9 ^b	9,4 \pm 2,9	26,4 \pm 8,5 ^b
Ox4/35/300	43,5 \pm 5,7 ^{a*}	51,8 \pm 7,4 ^{a*}	10,5 \pm 2,5	49,2 \pm 11,9 ^{ab*}
Ox4/35/1000	34,9 \pm 8,4 ^{ab}	56,4 \pm 4,5 ^a	7,8 \pm 2,3	40,9 \pm 18,4 ^{ab}
Ox4/175/300	51,6 \pm 29,1 ^a	45,2 \pm 20,5 ^{ab}	9,1 \pm 1,7	40,1 \pm 2,9 ^{ab}
Ox4/175/1000	48,9 \pm 23,6 ^a	53,9 \pm 21,0 ^a	10,7 \pm 3,8	62,0 \pm 39,9 ^a
ANOVA	—	—	—	—

Werte = Mittelwert \pm SD, n=10 (außer bei Ox4/35/1000 n=6, Ox4/35/300 und Ox4/175/300 n=8); a, b unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den Gruppen im multiplen Mittelwertsvergleich nach Fisher; * kennzeichnet signifikant (p<0,05) unterschiedliche Mittelwerte entsprechend des t-Testes (K2/25 vs. Ox4/25 bzw. K2/35/300 vs. Ox4/35/300)

¹ bezogen auf den Gesamtgehalt an Triglyzeriden und Cholesterin

Nach Fütterung eines thermisch oxidierten Fettgemisches wurden in den Lebern von Ratten und Meer-schweinchen fast doppelt so hohe Konzentrationen an COP gemessen als bei den Kontrolltieren. Nur die Konzentration von 25-Hydroxycholesterins blieb unverändert. Die Vitaminsupplementierungen zeigten keinen Einfluss auf die Konzentration an COP in der Leber.

3.6 Hämolyseempfindlichkeit

3.6.1 Osmotische Hämolyseempfindlichkeit von Erythrozyten (*in vitro*)

Die Abbildung 11 veranschaulicht die prozentuale Hämolyse der Erythrozyten in verschiedenen hypoto-nen NaCl-Lösungen im Versuch 3.

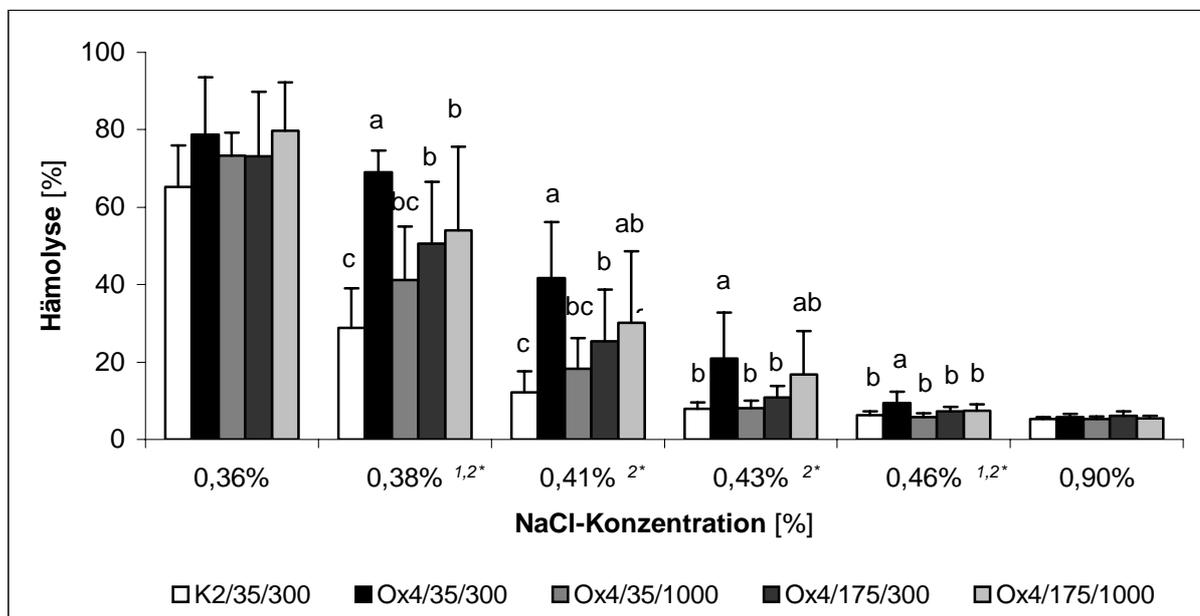


Abb.11: Hämolyseempfindlichkeit von Erythrozyten in hypotonen NaCl-Lösungen (Versuch 3)

Werte = Mittelwert \pm SD, n=10 (außer bei Ox4/35/1000 n=6, Ox4/35/300 und Ox4/175/300 n=8); a,b,c unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im multiplen Mittelwertsvergleich nach Fisher; ^{1,2,3}Signifikanz ($p < 0,05$) der Einflussfaktoren: 1-Vit.C, 2-Vit.E-Vit.C; * kennzeichnet signifikant ($p < 0,05$) unterschiedliche Mittelwerte entsprechend des t-Testes (K2/35/300 vs. Ox4/35/300)

In der Abbildung 8 ist deutlich zu sehen, dass bei allen Gruppen die Hämolyseempfindlichkeit mit steigender Hypotonie der NaCl-Lösung zunimmt. Zwischen 0,38 und 0,46%iger NaCl-Lösung zeigte sich ein signifikanter Effekt der Fettart sowie eine Interaktion zwischen der Vitamin E- und Vitamin C-Supplementierung. Die Verfütterung von oxidiertem Fett bewirkte bei niedriger Vitamin E- und C-Versorgungsstufe eine um 53 bis 145% höhere Hämolyseempfindlichkeit im Vergleich zum Kontrollfett. Durch die Zulage von Vitamin E oder C mit der Diät sank die osmotische Hämolyseempfindlichkeit. Die Vitamin C-Supplementierung (um 39 bis 61%) zeigte eine stärkere Wirkung als die von Vitamin E (um 24 bis

48%). Werden jedoch beide in höherer Menge zugesetzt, senken sie im mittleren Belastungsbereich (0,41 und 0,43%iger NaCl-Lösung) die Hämolyse nicht signifikant. Keine Gruppenunterschiede traten bei NaCl-Gehalten von 0,36% und 0,90% auf.

3.6.2 Hämolysemarker (*in vivo*)

Die gemessenen Hämolysemarker zur Beurteilung der Hämolyse *in vivo* sind der Tabelle 16 zu entnehmen.

Tab.16: Aktivität und Konzentration der Hämolysemarker im Serum (Versuch 1) und Plasma (Versuch 3)

Gruppe	Saure Phosphatase [U/g Protein]	LDH	Kalium [mmol/l]	Freies Hb [μmol/l]
Versuch 1 - Ratte				
K1/25	1,07 ± 0,44 ^a	7,60 ± 2,77	2,90 ± 0,34	1,78 ± 0,48
K1/250	0,93 ± 0,28 ^{ab}	7,60 ± 1,77	2,78 ± 0,16	2,02 ± 0,49
Ox1/25	0,78 ± 0,26 ^b	9,54 ± 2,41	2,79 ± 0,10	1,46 ± 0,44
Ox1/250	0,73 ± 0,10 ^b	9,27 ± 2,63	3,10 ± 0,78	1,51 ± 0,51
Ox2/25	0,84 ± 0,25 ^b	8,29 ± 1,20	3,01 ± 0,19	1,65 ± 0,47
Ox2/250	0,66 ± 0,17 ^b	8,60 ± 3,17	3,01 ± 0,15	1,84 ± 0,37
Ox3/25	0,97 ± 0,18 ^{ab}	10,57 ± 2,52	2,84 ± 0,18	1,88 ± 0,46
Ox3/250	0,77 ± 0,10 ^b	7,46 ± 1,91	2,91 ± 0,15	1,92 ± 0,52
ANOVA	1,2	—	—	1
Versuch 3 - Meerschweinchen				
K2/35/300	0,81 ± 0,22	7,63 ± 2,97	5,63 ± 0,42	1,66 ± 0,27
Ox4/35/300	0,88 ± 0,24	5,07 ± 1,21	5,14 ± 0,51	1,37 ± 0,34 [*]
Ox4/35/1000	0,93 ± 0,28	7,13 ± 4,16	5,08 ± 0,50	1,51 ± 0,54
Ox4/175/300	0,73 ± 0,10	5,80 ± 2,37	5,40 ± 0,89	1,38 ± 0,28
Ox4/175/1000	0,69 ± 0,23	5,84 ± 2,51	5,17 ± 0,67	1,94 ± 0,69
ANOVA	2	—	—	—

Werte = Mittelwert ± SD, n=10 (außer bei Ox4/35/1000 n=6, Ox4/35/300 und Ox4/175/300 n=8); ^{a,b} unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den Gruppen im multiplen Mittelwertsvergleich nach Fisher; 1,2 Signifikanz (p<0,05) der Einflussfaktoren: 1-Fett, 2-Vit.E; * kennzeichnet signifikant (p<0,05) unterschiedliche Mittelwerte entsprechend des t-Testes (K2/35/300 vs. Ox4/35/300)

Die Fettart übte einen signifikanten Einfluss auf die Konzentration an freiem Hämoglobin in den Versuchen 1 und 3 sowie auf die Aktivität der sauren Phosphatase im Versuch 1 aus. Dabei führte die Verfütterung von oxidierten Fetten zu einer niedrigeren Konzentration an freiem Hämoglobin sowie zu einer geringeren Aktivität an saurer Phosphatase als bei den Kontrolltieren. Gleichfalls wirkte sich die Vitamin E-Supplementierung signifikant auf die Aktivität der sauren Phosphatase in beiden Versuchen aus. Eine höhere Vitamin E-Zulage hatte eine geringere Enzymaktivität zur Folge. Im Versuch 3 trat eine

tendenzielle ($p=0,074$) Interaktion zwischen den Einflussfaktoren Vitamin E und C bezüglich des freien Hämoglobins auf. Eine erhöhte Vitamin C-Zulage führte bei niedrigerer Vitamin E-Versorgung zu einem um 10% und bei hoher Vitamin E-Versorgung zu einem um 40% höheren Gehalt an freiem Hämoglobin. Hinsichtlich der LDH-Aktivität und der Konzentration an Kalium ergaben sich bei beiden Versuchen auf Grund großer Streuungen keine statistisch gesicherten Unterschiede innerhalb der Gruppen.

3.6.3 Aktivität antioxidativer Enzyme im Erythrozytenzytosol

In der Tabelle 17 sind die Aktivitäten antioxidativer Enzyme der Erythrozyten aus den Versuchen 2 und 3 zusammengefasst.

Tab.17: Aktivität antioxidativer Enzyme im Erythrozytenzytosol

Gruppe	Katalase [U/mg Protein]	SOD	G6PDH [U/g Protein]
Versuch 2 - Ratte			
K2/25	159 ± 95	9,71 ± 5,01	38,7 ± 16,5
Ox4/25	113 ± 38	7,06 ± 1,33	25,4 ± 6,3 *
Versuch 3 - Meerschweinchen			
K2/35/300	93,9 ± 59,8	3,17 ± 1,18	6,44 ± 1,45
Ox4/35/300	62,8 ± 33,7	3,05 ± 0,77	6,31 ± 1,77
Ox4/35/1000	82,4 ± 40,4	3,14 ± 0,93	6,15 ± 1,37
Ox4/175/300	103,1 ± 42,2	3,62 ± 1,06	8,08 ± 2,39
Ox4/175/1000	64,8 ± 33,7	3,68 ± 1,19	5,76 ± 2,09
ANOVA	1	—	—

Werte = Mittelwert ± SD, n=10 (außer bei Ox4/35/1000 n=6, Ox4/35/300 und Ox4/175/300 n=8); 1 Signifikanz ($p<0,05$) des Einflussfaktors: 1-Vit.E·Vit.C; * kennzeichnet signifikant ($p<0,05$) unterschiedliche Mittelwerte entsprechend des t-Testes (K2/25 vs. Ox4/25)

Im Versuch 2 übte die Fettart einen signifikanten Einfluss auf die G6PDH-Aktivität aus. Die Enzymaktivität war bei den Tieren, deren Diät oxidiertes Fett enthielt, um 34% geringer im Vergleich zu den Kontrolltieren. Gleichfalls waren durch die Behandlung mit oxidiertem Fett die Aktivitäten von Katalase und SOD geringer. Auf Grund hoher Standardabweichungen waren diese Unterschiede jedoch nicht signifikant.

Im Versuch 3 wurde eine Interaktion zwischen der Vitamin E- und C-Versorgung bezüglich der Katalaseaktivität festgestellt. Bei Fütterung von oxidiertem Fett führte die hohe Vitamin C-Gabe zu einer um 31% höheren Enzymaktivität, während eine hohe Vitamin E-Gabe einen um 64% höheren Aktivitätswert zur Folge hat. Wurde sowohl Vitamin C als auch Vitamin E in hohen Mengen verabreicht, hob sich der Vitamineffekt auf. Bei den Enzymaktivitäten der SOD und G6PDH im Versuch 3 waren keine signifikanten Veränderungen festzustellen.

3.6.4 Enzymaktivität der GSHPx und Konzentration von Glutathion im Erythrozytenzytosol

Die Tabelle 18 gibt die Enzymaktivität der GSHPx und die Konzentration an Glutathion im Erythrozytenzytosol wieder.

Tab.18: Enzymaktivität von GSHPx sowie Konzentration von GSH, GSSG und GSH_{red} im Erythrozytenzytosol

Gruppe	GSHPx [U/g Protein]	GSH [μmol/l]	GSSG [μmol/l]	GSH _{red} [†] [μmol/l]
Versuch 2 - Ratte				
K2/25	508 ± 261	620 ± 214	15,0 ± 10,0	589 ± 220
Ox4/25	404 ± 13	287 ± 116 *	5,4 ± 2,6 *	299 ± 114 *
Versuch 3 - Meerschweinchen				
K2/35/300	97,3 ± 21,1	434 ± 70 ^a	35 ± 9 ^a	363 ± 64 ^a
Ox4/35/300	74,3 ± 7,9 *	315 ± 102 ^{b*}	22 ± 10 ^{b*}	271 ± 84 ^{b*}
Ox4/35/1000	85,8 ± 11,7	230 ± 77 ^b	20 ± 9 ^b	189 ± 64 ^b
Ox4/175/300	85,0 ± 18,0	251 ± 91 ^b	21 ± 11 ^b	209 ± 72 ^b
Ox4/175/1000	90,0 ± 27,1	239 ± 123 ^b	19 ± 9 ^b	200 ± 106 ^b
ANOVA	—	—	—	—

Werte = Mittelwert ± SD, n=10 (außer bei Ox4/35/1000 n=6, Ox4/35/300 und Ox4/175/300 n=8); ^{a,b} unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den Gruppen im multiplen Mittelwertsvergleich nach Fisher; * kennzeichnet signifikant (p<0,05) unterschiedliche Mittelwerte entsprechend des t-Testes (K2/25 vs. Ox4/25 bzw. K2/35/300 vs. Ox4/35/300)

[†] Differenz aus GSH und 2-GSSG

In beiden Versuchen wirkte sich der Einflussfaktor Fett eindeutig auf die GSHPx-Aktivität sowie die Konzentration an GSH und seinen Redoxformen in den Erythrozyten aus. Bei allen Parametern führte die Fütterung von oxidiertem Fett zu einer deutlich geringerer Aktivität oder Konzentration, wobei im Versuch 2 aufgrund der großen Streuung der Messwerte keine Signifikanz bei der Aktivität von GSHPx festgestellt wurde.

3.6.5 Konzentration an α -Tocopherol in Erythrozyten

In der Tabelle 19 ist die Konzentration an α -Tocopherol in den Erythrozyten aus dem Versuch 3 aufgeführt.

Tab.19: Konzentration an α -Tocopherol in Erythrozyten (Versuch 3)

Gruppe	α -Tocopherol [μ M]	
<i>Versuch 3 - Meerschweinchen</i>		
K2/35/300	8,60	\pm 5,25 ^b
Ox4/35/300	1,67	\pm 1,25 ^{c*}
Ox4/35/1000	3,91	\pm 3,51 ^{bc}
Ox4/175/300	7,01	\pm 3,13 ^{bc}
Ox4/175/1000	14,45	\pm 9,97 ^a
ANOVA		1,2

Werte = Mittelwert \pm SD, n=10 (außer bei Ox4/35/1000 n=6, Ox4/35/300 und Ox4/175/300 n=8);
^{a,b,c} unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen im multiplen Mittelwertsvergleich nach Fisher; 1,2 Signifikanz ($p < 0,05$) der Einflussfaktoren: 1-Vit.E, 2-Vit.C; * kennzeichnet signifikant ($p < 0,05$) unterschiedliche Mittelwerte entsprechend des t-Testes (K2/35/300 vs. Ox4/35/300)

Die Fettart wie auch die Interaktion zwischen Vitamin E- und C-Konzentration übten einen signifikanten Einfluss auf den α -Tocopherol-Gehalt der Erythrozyten im Versuch 3 aus. Durch die Verfütterung von oxidiertem Fett war die α -Tocopherol-Konzentration bei niedriger Vitamin E- und C-Versorgung um 81% vermindert im Vergleich zum Kontrollfett. Jedoch führte die hohe Zufuhr von Vitamin C zu einer 2fach höheren α -Tocopherolkonzentration, während eine erhöhte Zufuhr von Vitamin E sogar eine 4fach höhere Konzentration von α -Tocopherol in den Erythrozyten bewirkte. Wurden sowohl Vitamin E als auch Vitamin C in hohen Dosen zu gefüttert, wurde eine 8,7fach höhere Konzentration an α -Tocopherol in den Erythrozyten gemessen.

3.7 Lipoproteine

3.7.1 Cholesterin- und Triglyzeridkonzentration in Lipoproteinen und Geweben

In der Tabelle 20 sind die Cholesterinkonzentrationen im Serum bzw. Plasma und in den Lipoproteinen sowie der daraus errechnete Quotient aus Gesamtcholesterin/HDL-Cholesterin aufgeführt.

Tab.20: Konzentration von Cholesterin in Serum/Plasma und Lipoproteinen sowie der Quotient aus Gesamtcholesterin/HDL-Cholesterin

Gruppe	Serum/Plasma ^I	HDL	LDL ^{II}	VLDL	Serum/HDL ^{III}
		[mmol/l]			
Versuch 1 - Ratte					
K1/25	1,72 ± 0,29 ^b	0,74 ± 0,08 ^b	0,63 ± 0,14 ^b	0,35 ± 0,22 ^a	2,34 ± 0,25 ^a
K1/250	1,86 ± 0,39 ^{ab}	0,73 ± 0,08 ^b	0,70 ± 0,15 ^b	0,20 ± 0,10 ^b	2,28 ± 0,22 ^a
Ox1/25	1,56 ± 0,25 ^b	0,85 ± 0,12 ^a	0,64 ± 0,17 ^b	0,08 ± 0,01 ^c	1,86 ± 0,17 ^b
Ox1/250	1,66 ± 0,09 ^b	0,90 ± 0,10 ^a	0,72 ± 0,10 ^b	0,06 ± 0,01 ^c	1,91 ± 0,16 ^b
Ox2/25	1,74 ± 0,14 ^{ab}	0,89 ± 0,10 ^a	0,76 ± 0,12 ^{ab}	0,08 ± 0,02 ^c	1,98 ± 0,17 ^b
Ox2/250	1,98 ± 0,27 ^a	0,91 ± 0,09 ^a	0,93 ± 0,21 ^a	0,08 ± 0,02 ^c	2,24 ± 0,29 ^a
Ox3/25	1,71 ± 0,36 ^b	0,90 ± 0,14 ^a	0,71 ± 0,19 ^b	0,05 ± 0,02 ^c	1,92 ± 0,14 ^b
Ox3/250	1,84 ± 0,13 ^{ab}	0,89 ± 0,03 ^a	0,86 ± 0,10 ^a	0,08 ± 0,04 ^c	2,05 ± 0,08 ^b
ANOVA	2	1	1,2	1,2,3	1
Versuch 2 - Ratte					
K2/25	2,40 ± 0,36	1,37 ± 0,24	0,49 ± 0,31	0,53 ± 0,15	1,76 ± 0,26
Ox4/25	2,03 ± 0,24 [*]	1,15 ± 0,47	0,77 ± 0,49	0,10 ± 0,03 [*]	1,53 ± 0,10
Versuch 3 - Meerschweinchen					
K2/35/300	1,66 ± 0,27	0,63 ± 0,22 ^b	1,11 ± 0,39 ^a	0,01 ± 0,01	3,24 ± 1,81 ^a
Ox4/35/300	1,37 ± 0,34	0,56 ± 0,27 ^b	0,73 ± 0,13 ^{b*}	0,02 ± 0,01	2,74 ± 0,84 ^{ab}
Ox4/35/1000	1,51 ± 0,54	0,52 ± 0,18 ^b	0,80 ± 0,20 ^{ab}	0,03 ± 0,02	2,64 ± 0,29 ^{ab}
Ox4/175/300	1,38 ± 0,28	0,64 ± 0,09 ^b	0,72 ± 0,21 ^b	0,03 ± 0,02	2,17 ± 0,27 ^b
Ox4/175/1000	1,94 ± 0,69	1,02 ± 0,36 ^a	0,74 ± 0,39 ^b	0,02 ± 0,01	1,84 ± 0,54 ^b
ANOVA	2	2,4	—	—	2

Werte = Mittelwert ± SD, n=10 (außer bei Ox4/35/1000 n=6, Ox4/35/300 und Ox4/175/300 n=8); a,b,c unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den Gruppen im multiplen Mittelwertsvergleich nach Fisher; 1,2,3,4 Signifikanz (p<0,05) der Einflussfaktoren: 1-Fett, 2-Vit.E, 3-Fett-Vit.E, 4-Vit.E-Vit.C; * kennzeichnet signifikant (p<0,05) unterschiedliche Mittelwerte entsprechend des t-Testes (K2/25 vs. Ox4/25 bzw. K2/35/300 vs. Ox4/35/300)

^I Serum (Versuch 1) bzw. Plasma (Versuch 2 und 3)

^{II} errechnet aus der Differenz zwischen Plasmacholesterin und HDL- + VLDL-Cholesterin

^{III} Quotient aus Plasma- bzw. Serumcholesterin und HDL-Cholesterin

Im Versuch 1 zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Fettart auf den Cholesteringehalt der HDL, LDL, VLDL sowie das Verhältnis zwischen Gesamtcholesterin und HDL-Cholesterin. Die Konzentration an Cholesterin im Serum beeinflusste der Faktor Fett nur tendenziell (p=0,058). Aufgrund der Fütterung oxidierter Fette war die Cholesterinkonzentration in den HDL und LDL höher, während das VLDL-

Cholesterin niedriger war im Vergleich zum Kontrollfett. Die Vitamin E-Supplementierung wirkte sich signifikant auf das Serum- und LDL-Cholesterin aus. Die Gruppen, deren Diät einen geringen Gehalt an Vitamin E aufwies, hatten eine niedrigere Cholesterinkonzentration im Serum bzw. in den LDL als die Gruppen mit einem höheren Vitamin E-Anteil in der Diät. Beim Parameter VLDL trat eine Interaktion zwischen den Einflussfaktoren Fett und Vitamin E auf. Während eine hohe Vitamin E-Zulage bei Fütterung des Kontrollfettes zu einem Absinken der Cholesterinwerte um 67% führte, konnte bei Fütterung von oxidierten Fetten kein gerichteter Effekt der Vitamin E-Supplementierung beobachtet werden.

Im Versuch 2 übte das oxidierte Fett einen signifikanten Einfluss auf den Cholesteringehalt im Plasma und in den VLDL aus sowie einen tendenziellen auf den Quotienten Gesamtcholesterin/HDL-Cholesterin ($p=0,061$). Die Konzentration an Cholesterin war bei der Behandlungsgruppe mit oxidiertem Fett niedriger als bei der Kontrollgruppe. Keine Behandlungseinflüsse traten bei den anderen Lipoproteinfraktionen auf.

Im Versuch 3 wirkte sich die Art des Fettes signifikant auf die Konzentration an Cholesterin in den LDL und tendenziell ($p=0,063$) im Plasma aus. In beiden Fällen war die Cholesterinkonzentration der Tiere, deren Diät oxidiertes Fett enthielt, niedriger als der Tiere, die Kontrollfett erhielten. Signifikant zeigten sich in diesem Versuch die Einflüsse der Vitamin E- und C-Konzentration. Bei der Verfütterung einer Diät mit oxidiertem Fett und hoher Vitamin C-Versorgung führte eine hohe Vitamin E-Zulage zu einer höheren Cholesterinkonzentration im Plasma gegenüber einer niedrigen Vitamin E-Zufuhr. Wegen großen Standardabweichungen gilt das Gleiche nur tendenziell ($p=0,064$) für den Behandlungsfaktor Vitamin C. Bezüglich der HDL-Cholesterinkonzentration wurde eine signifikante Wechselwirkung zwischen Vitamin E und C beobachtet. Wurde sowohl Vitamin C als auch Vitamin E in einer hohen Zulage verabreicht, hatten die Tiere signifikant höhere HDL-Cholesterinkonzentrationen als die Tiere aller anderen Gruppen. Der gleiche Effekt war beim Quotienten Gesamtcholesterin/HDL-Cholesterin festzustellen.

Die Tabelle 21 beinhaltet die Konzentration von Triglyzeriden im Serum bzw. Plasma sowie in den Lipoproteinen.

Tab.21: Konzentration von Triglyzeriden in Serum/Plasma und Lipoproteinen

Gruppe	Serum/Plasma ^I	HDL	LDL ^{II}	VLDL
		[mmol/l]		
Versuch 1 - Ratte				
K1/25	2,23 ± 1,08 ^a	0,087 ± 0,026 ^a	0,323 ± 0,190 ^a	1,82 ± 0,93 ^a
K1/250	1,67 ± 0,56 ^b	0,055 ± 0,009 ^c	0,110 ± 0,019 ^b	1,44 ± 0,42 ^a
Ox1/25	0,83 ± 0,14 ^c	0,071 ± 0,017 ^b	0,090 ± 0,048 ^b	0,68 ± 0,11 ^b
Ox1/250	0,64 ± 0,14 ^c	0,057 ± 0,005 ^c	0,066 ± 0,019 ^b	0,50 ± 0,11 ^b
Ox2/25	0,96 ± 0,29 ^c	0,071 ± 0,016 ^b	0,092 ± 0,059 ^b	0,80 ± 0,23 ^b
Ox2/250	0,81 ± 0,14 ^c	0,055 ± 0,014 ^c	0,108 ± 0,041 ^b	0,67 ± 0,16 ^b
Ox3/25	0,63 ± 0,03 ^c	0,062 ± 0,012 ^{bc}	0,091 ± 0,032 ^b	0,48 ± 0,05 ^b
Ox3/250	0,91 ± 0,37 ^c	0,053 ± 0,007 ^c	0,137 ± 0,122 ^b	0,74 ± 0,29 ^b
ANOVA	1	2	1,3	1
Versuch 2 - Ratte				
K2/25	3,43 ± 0,86	0,32 ± 0,130	0,46 ± 0,24	2,84 ± 0,74
Ox4/25	1,04 ± 0,32 [*]	0,17 ± 0,06 [*]	0,17 ± 0,03 [*]	0,75 ± 0,24 [*]
Versuch 3 - Meerschweinchen				
K2/35/300	0,584 ± 0,126	0,046 ± 0,009 ^b	0,100 ± 0,032	0,438 ± 0,117
Ox4/35/300	0,590 ± 0,106	0,040 ± 0,010 ^b	0,116 ± 0,043	0,430 ± 0,066
Ox4/35/1000	0,707 ± 0,222	0,056 ± 0,025 ^b	0,140 ± 0,082	0,511 ± 0,130
Ox4/175/300	0,644 ± 0,157	0,060 ± 0,012 ^{ab}	0,138 ± 0,065	0,461 ± 0,132
Ox4/175/1000	0,630 ± 0,126	0,077 ± 0,022 ^a	0,084 ± 0,013	0,419 ± 0,038
ANOVA	—	2,4	—	—

Werte = Mittelwert ± SD, n=10 (außer bei Ox4/35/1000 n=6, Ox4/35/300 und Ox4/175/300 n=8); a,b,c unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den Gruppen im multiplen Mittelwertsvergleich nach Fisher; 1,2,3,4 Signifikanz (p<0,05) der Einflussfaktoren: 1-Fett, 2-Vit.E, 3-Fett-Vit.E, 4-Vit.C; * kennzeichnet signifikant (p<0,05) unterschiedliche Mittelwerte entsprechend des t-Testes (K2/25 vs. Ox4/25)

^I Serum (Versuch 1) bzw. Plasma (Versuch 2 und 3)

^{II} errechnet aus der Differenz zwischen Plasma-, HDL- und VLDL-Triglyzeriden

Im Versuch 1 wurde ein signifikanter Effekt der Fettart nachgewiesen. Die Fütterung von oxidierten Fetten resultierte in einer geringeren Konzentration an Triglyzeriden im Serum und in den VLDL gegenüber den Kontrollfettgruppen. Dieser Einfluss zeichnete sich auch tendenziell (p=0,059) bei den Triglyzeridkonzentrationen der HDL ab. Hier übte vor allem die Vitamin E-Supplementierung einen signifikanten Einfluss auf die Triglyzeridkonzentration aus. Tiere, deren Diät einen hohen Gehalt an Vitamin E aufwies, hatten eine geringere Triglyzeridkonzentration in den HDL als die Tiere, deren Diät eine niedrige Dosis an Vitamin E enthielt. Bei der Lipoproteinfraktion LDL trat eine Interaktion zwischen den Einflussfaktoren Fett und Vitamin E auf. Während bei der Kontrollgruppe eine hohe Vitamin E-Zulage zu einem

66%igem Absinken der Triglyzeridkonzentration führte, konnte bei den Gruppen, die oxidiertes Fett erhielten, kein signifikanter Effekt der Vitamin E-Supplementierung festgestellt werden.

Im Versuch 2 bewirkte die Verfütterung eines oxidierten Fettes eine signifikant geringere Triglyzeridkonzentration im Plasma und den Lipoproteinfraktionen gegenüber der Kontrollgruppe.

Im Versuch 3 waren nur bei der Triglyzeridkonzentration in den HDL Unterschiede feststellbar. Mit steigendem Vitamin E- und C-Gehalt der Diät war auch eine höhere Konzentration an Triglyzeriden im HDL zu verzeichnen. Bezüglich der Triglyzeridkonzentration im Plasma, LDL und VLDL waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu beobachten.

Die Cholesterin- und Triglyzeridkonzentration der Leber sind in der Tabelle 22 zusammengefasst.

Tab.22: Konzentration von Cholesterin und Triglyzeriden in der Leber

Gruppe	Cholesterin [$\mu\text{mol/g}$]	Triglyzeride
Versuch 1 - Ratte		
K1/25	6,47 \pm 1,19 ^a	10,1 \pm 3,1 ^a
K1/250	7,13 \pm 1,01 ^a	9,3 \pm 3,3 ^b
Ox1/25	4,62 \pm 0,69 ^c	6,0 \pm 1,2 ^c
Ox1/250	5,19 \pm 0,57 ^b	6,8 \pm 2,0 ^c
Ox2/25	5,40 \pm 0,72 ^b	7,7 \pm 1,4 ^{bc}
Ox2/250	5,14 \pm 0,49 ^{bc}	6,5 \pm 1,1 ^c
Ox3/25	5,20 \pm 0,87 ^b	6,9 \pm 1,9 ^c
Ox3/250	5,49 \pm 0,67 ^b	6,7 \pm 1,3 ^c
ANOVA	1	1
Versuch 2 - Ratte		
K2/25	4,66 \pm 1,80	5,24 \pm 1,27
Ox4/25	4,32 \pm 1,29	3,25 \pm 0,70 [*]
Versuch 3 - Meerschweinchen		
K2/35/300	7,83 \pm 1,41 ^a	6,59 \pm 1,64 ^a
Ox4/35/300	5,78 \pm 0,99 ^{b*}	4,04 \pm 0,41 ^{b*}
Ox4/35/1000	6,06 \pm 1,29 ^b	4,60 \pm 1,56 ^b
Ox4/175/300	5,89 \pm 0,79 ^b	4,51 \pm 0,84 ^b
Ox4/175/100	6,00 \pm 0,77 ^b	5,09 \pm 0,78 ^b
ANOVA	—	—

Werte = Mittelwert \pm SD, n=10 (außer bei Ox4/35/1000 n=6, Ox4/35/300 und Ox4/175/300 n=8); ^{a,b,c} unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen im multiplen Mittelwertsvergleich nach Fisher; 1 Signifikanz ($p < 0,05$) des Einflussfaktors: 1-Fett; * kennzeichnet signifikant ($p < 0,05$) unterschiedliche Mittelwerte entsprechend des t-Testes (K2/25 vs. Ox4/25 bzw. K2/35/300 vs. Ox4/35/300)

Im Versuch 1 und 3 zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Fettart auf die Cholesterinkonzentration in der Leber. Die Fütterung von oxidierten Fetten führte in beiden Versuchen zu niedrigeren Konzentrationen.

nen als bei Fütterung von Kontrollfett. Besonders auffällig war dies beim Fett Ox1. Keine signifikante Wirkung der Fettart wurde im Versuch 2 beobachtet, obwohl auch hier durch die Fütterung von oxidiertem Fett der Cholesteringehalt in der Leber um 7% sank.

In allen 3 Versuchen wurde ein signifikanter Effekt der Fettart auf die Triglyzeridkonzentration in der Leber festgestellt. Tiere, deren Diät oxidiertes Fett enthielt, hatten eine signifikant niedrigere Konzentration an Triglyzeriden in der Leber als die Tiere mit Kontrollfett in der Diät.

Die Vitaminzulagen übten in keinen der 3 Versuche einen signifikanten Einfluss aus.

3.7.2 Oxidationsstabilität der LDL (*in vitro*)

In der Tabelle 23 ist die Oxidationsstabilität der LDL anhand verschiedener Parameter dargestellt.

Tab.23: Parameter der Oxidationsempfindlichkeit von LDL nach *in vitro* Induktion

Gruppe	Ausgangskonzentrationen an Dien [$\mu\text{mol/g Protein}$]	Lag-Time [min]	Produktionsrate an Dien [$\mu\text{mol/g Protein}\cdot\text{min}$]	Maximale Diene- Konzentration [$\mu\text{mol/g Protein}$]
Versuch 1 - Ratte				
K1/25	0,54 \pm 0,20 ^a	21 \pm 6 ^{ab}	4,02 \pm 0,68 ^a	414 \pm 67 ^a
K1/250	0,47 \pm 0,19 ^a	29 \pm 12 ^a	3,17 \pm 0,66 ^b	314 \pm 62 ^b
Ox1/25	0,29 \pm 0,04 ^b	18 \pm 5 ^{ab}	3,55 \pm 1,30 ^{ab}	304 \pm 100 ^b
Ox1/250	0,35 \pm 0,10 ^{ab}	26 \pm 14 ^a	2,37 \pm 0,63 ^{bc}	294 \pm 53 ^b
Ox2/25	0,30 \pm 0,06 ^b	15 \pm 5 ^b	3,16 \pm 0,40 ^b	321 \pm 51 ^b
Ox2/250	0,38 \pm 0,12 ^{ab}	16 \pm 9 ^b	2,10 \pm 0,33 ^c	281 \pm 63 ^b
Ox3/25	0,30 \pm 0,06 ^b	16 \pm 4 ^b	4,50 \pm 0,93 ^a	391 \pm 97 ^a
Ox3/250	0,45 \pm 0,18 ^a	19 \pm 8 ^{ab}	2,74 \pm 1,05 ^{bc}	266 \pm 27 ^b
ANOVA	1	1,2	1,2	1,2
Versuch 3 - Meerschweinchen				
K2/35/300	0,36 \pm 0,04	120 \pm 15 ^c	8,70 \pm 0,75 ^a	405 \pm 39
Ox4/35/300	0,38 \pm 0,04	95 \pm 23 ^{c*}	8,09 \pm 1,67 ^{ab}	421 \pm 53
Ox4/35/1000	0,36 \pm 0,03	105 \pm 17 ^c	7,37 \pm 1,25 ^{ab}	402 \pm 70
Ox4/175/300	0,35 \pm 0,04	173 \pm 9 ^b	6,50 \pm 1,74 ^b	382 \pm 92
Ox4/175/1000	0,36 \pm 0,07	203 \pm 44 ^a	5,74 \pm 2,17 ^b	363 \pm 102
ANOVA	—	2	2	—

Werte = Mittelwert \pm SD, n=10 (außer bei Ox4/35/1000 n=6, Ox4/35/300 und Ox4/175/300 n=8); a,b,c unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen im multiplen Mittelwertsvergleich nach Fisher; 1,2 Signifikanz ($p < 0,05$) der Einflussfaktoren: 1-Fett, 2-Vit.E; * kennzeichnet signifikant ($p < 0,05$) unterschiedliche Mittelwerte entsprechend des t-Testes (K2/35/300 vs. Ox4/35/300)

Im Versuch 1 zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Fettart auf alle Parameter der Oxidationsempfindlichkeit von LDL. Die Gruppen mit geringer Vitamin E-Zulage und oxidiertem Fett in der Diät wiesen eine niedrigere Ausgangskonzentration an Dien auf als die Kontrollgruppe. Bei hoher Vitamin E-

Supplementierung waren keine markanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen. Die Verfütterung von oxidierten Fetten führte signifikant zu einer kürzeren Lag-Time im Vergleich zum Kontrollfett. Der signifikante Effekt der Vitamin E-Supplementierung zeigte sich dadurch, dass bei den Tieren mit höherer Vitamin E-Zulage eine längere Lag-Time der LDL gemessen wurde als bei den Tieren mit geringer Vitamin E-Versorgung. Des Weiteren beeinflusste der Faktor Vitamin E signifikant die Produktionsrate und die maximale Konzentration an Dienen. In beiden Fällen zeigte sich, dass bei den Gruppen mit hoher Vitamin E-Zulage die Produktionsrate und die maximale Konzentration an Dienen niedriger waren als bei den Gruppen mit niedriger Vitamin E-Zulage in der Diät. Bei Fütterung oxidierter Fette war die Produktionsrate und maximale Konzentration an Dienen signifikant niedriger als bei Fütterung von Kontrollfett.

Im Versuch 3 zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Einfluss der Fettart auf die Lag-Time der LDL laut t-Test. Die Verfütterung des oxidierten Fettes bewirkte bei der Gruppe mit niedrigerer Vitamin E und C-Versorgung eine kürzere Lag-Time im Vergleich zur Kontrollgruppe. Jedoch bestätigte der multiple Mittelwertsvergleich keinen signifikanten Effekt der Fettart. Der signifikante Einfluss des Vitamin E führte bei höherer Supplementierung zu einer längeren Lag-Time gegenüber der Kontrolle. Gleiches galt tendenziell ($p=0,076$) für die Vitamin C-Versorgung. Die längste Lag-Phase wurde bei gleichzeitig hoher Supplementierung von Vitamin E und Vitamin C gemessen. Vitamin E zeigte ebenfalls eine signifikante Wirkung auf die Produktionsrate an Dienen. Bei Fütterung des oxidierten Fettes hatten die Tiere mit hoher Vitamin E-Versorgung eine geringere Produktionsrate als die Tiere mit niedriger Vitamin E-Versorgung. Es ergaben sich keine statistischen Unterschiede in der Ausgangskonzentration sowie maximalen Konzentration an Dienen.

3.7.3 Parameter des antioxidativen Status der LDL

Die Konzentration an α -Tocopherol, der Anteil an gesättigten (SFA) sowie mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) üben Einfluss auf die Oxidationsempfindlichkeit der LDL aus. Sie sind in der Tabelle 24 dargestellt.

Tab.24: α -Tocopherolkonzentration, Anteil an SFA und PUFA von LDL sowie Quotient PUFA/(SFA+MUFA)

Gruppe	α -Tocopherol-Konzentration [μ mol/mmol] ^I	SFA ^{II} [mg/100 mg Fettsäure]	PUFA ^{III}	PUFA/(SFA+MUFA) ^{IV}
Versuch 1 - Ratte				
K1/25	7,1 \pm 2,1 ^c	34,9 \pm 2,7 ^b	35,2 \pm 2,6 ^b	0,67 \pm 0,10 ^b
K1/250	26,4 \pm 4,3 ^a	36,5 \pm 1,8 ^{ab}	39,3 \pm 2,1 ^a	0,77 \pm 0,08 ^a
Ox1/25	7,2 \pm 1,7 ^c	36,6 \pm 1,6 ^{ab}	32,4 \pm 2,4 ^c	0,58 \pm 0,08 ^c
Ox1/250	24,8 \pm 2,3 ^a	36,5 \pm 2,4 ^{ab}	36,6 \pm 3,5 ^b	0,68 \pm 0,11 ^{ab}
Ox2/25	6,3 \pm 1,0 ^c	38,3 \pm 1,1 ^a	36,4 \pm 2,0 ^b	0,67 \pm 0,07 ^b
Ox2/250	21,3 \pm 2,7 ^b	37,6 \pm 1,0 ^a	39,2 \pm 2,0 ^a	0,76 \pm 0,05 ^a
Ox3/25	6,2 \pm 1,4 ^c	35,7 \pm 1,6 ^b	39,6 \pm 2,0 ^a	0,76 \pm 0,07 ^a
Ox3/250	20,6 \pm 3,9 ^b	37,2 \pm 0,9 ^{ab}	39,5 \pm 1,7 ^a	0,75 \pm 0,06 ^a
ANOVA	1,2,3	1	1,2,3	1,2
Versuch 3 - Meerschweinchen				
K2/35/300	4,73 \pm 1,58 ^b	29,9 \pm 2,2 ^b	34,9 \pm 3,4 ^a	0,69 \pm 0,08 ^a
Ox4/35/300	2,31 \pm 0,56 ^{c*}	30,8 \pm 1,8 ^{ab}	34,0 \pm 2,4 ^{ab}	0,62 \pm 0,06 ^b
Ox4/35/1000	2,94 \pm 0,93 ^{bc}	32,6 \pm 1,3 ^a	32,0 \pm 0,9 ^b	0,56 \pm 0,02 ^b
Ox4/175/300	7,18 \pm 0,89 ^a	30,5 \pm 2,2 ^b	32,3 \pm 2,5 ^b	0,58 \pm 0,07 ^b
Ox4/175/1000	7,80 \pm 2,40 ^a	29,7 \pm 1,7 ^b	30,9 \pm 1,6 ^b	0,57 \pm 0,05 ^b
ANOVA	2	2	2	—

Werte = Mittelwert \pm SD, n=10 (außer bei Ox4/35/1000 n=6, Ox4/35/300 und Ox4/175/300 n=8); a,b,c unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen im multiplen Mittelwertsvergleich nach Fisher; 1,2,3,4 Signifikanz ($p < 0,05$) der Einflussfaktoren: 1-Fett, 2-Vit.E, 3-Fett-Vit.E; * kennzeichnet signifikant ($p < 0,05$) unterschiedliche Mittelwerte entsprechend des t-Testes (K2/35/300 vs. Ox4/35/300)

^I bezogen auf den Gesamtgehalt an Triglyzeriden und Cholesterin

^{II} Saturate Fatty Acids

^{III} PolyUnsaturate Fatty Acids

^{IV} MonoUnsaturate Fatty Acids

Im Versuch 1 führte die Fütterung oxidierter Fette bei allen Parametern zu signifikanten Unterschieden gegenüber den Kontrollgruppen. Bezüglich der α -Tocopherolkonzentration in den LDL wurde eine Interaktion zwischen Fettart und Vitamin E-Konzentration festgestellt. Trotz Fütterung oxidierter Fette war bei niedriger Vitamin E-Versorgung die α -Tocopherolkonzentration in den LDL nicht signifikant geringer gegenüber dem Kontrollfett. Jedoch wurde nach Gabe einer hohen Vitamin E-Zulage eine geringere α -Tocopherolkonzentration in den LDL der Tiere, deren Diät erhitztes Fett enthielt, gemessen. Dieser Effekt trat vor allem bei den Lipidgemischen auf, die bei sehr hohen Behandlungstemperaturen oxidiert

wurden. Die Tiere, deren Diät oxidiertes Fett enthielt, hatten eine leicht, aber signifikant geringere Konzentration an SFA in den LDL als die Kontrolltiere. Es wurde eine Interaktion zwischen Fett und Vitamin E bezüglich der Konzentration an PUFA festgestellt. Bei der Verfütterung von Fettgemischen, die bei hohen Temperaturen oxidiert wurden, traten weder bei niedriger noch hoher Vitamin E-Versorgung signifikante Unterschiede im Anteil an PUFA auf im Vergleich zu der entsprechenden Kontrollgruppe. Nur die Tiere, deren Diät das Fett Ox1 enthielt, hatten bei geringer sowie hoher Vitamin E-Zulage eine signifikant geringere Konzentration an PUFA in den LDL als die Tiere der Kontrollgruppe. Der signifikante Effekt der Fettart und der Vitamin E-Supplementierung auf den Quotienten PUFA/(SFA+MUFA) verhielt sich ähnlich der Interaktion hinsichtlich Konzentration an PUFA.

Im Versuch 3 stellte sich ein signifikanter Einfluss des oxidierten Fettes auf die α -Tocopherol-Konzentration der LDL heraus. Bei niedriger Vitamin E- und C-Versorgung war der α -Tocopherol-Gehalt der Behandlungsgruppe mit oxidiertem Fett um die Hälfte geringer gegenüber der Kontrollgruppe. Die Abnahme des Quotienten PUFA/(SFA+MUFA) ist tendenziell auf die Fütterung des oxidierten Fettes zurückzuführen ($p=0,058$). Der Verzehr eines thermisch behandelten Fettes bewirkte bei niedriger Vitamin E-Versorgung eine signifikant geringere α -Tocopherolkonzentration in den LDL als bei hoher Vitamin E-Versorgung. Auch das Vitamin E übte einen signifikanten Einfluss auf die Anteile an SFA sowie PUFA aus und führte bei hoher Supplementierung zu geringeren Konzentrationen an SFA und PUFA in den LDL als bei niedriger Vitamin E-Versorgung. Es wurde keine statistisch gesicherte Wirkung der Vitamin C-Supplementierung nachgewiesen.

Die Tabelle 25 zeigt einen Ausschnitt der Fettsäurezusammensetzung der LDL.

Tab.25: Fettsäurezusammensetzung der LDL [mg/100 mg Fettsäure]

Gruppe	C16:0	C18:0	C18:1, n-9 [mg/100 mg Fettsäure]	C18:2, n-6	C20:4, n-6
Versuch 1 - Ratte					
K1/25	19,4 ± 1,1 ^b	14,9 ± 3,6	16,1 ± 5,8	18,1 ± 1,8 ^a	15,7 ± 3,8 ^b
K1/250	20,4 ± 1,0 ^{ab}	15,8 ± 1,8	13,0 ± 3,7	18,0 ± 1,8 ^a	20,2 ± 3,6 ^a
Ox1/25	21,1 ± 1,2 ^a	15,1 ± 1,2	17,7 ± 4,0	14,2 ± 1,9 ^b	16,8 ± 2,5 ^b
Ox1/250	21,6 ± 1,6 ^a	14,6 ± 1,5	16,5 ± 4,2	14,5 ± 2,6 ^b	20,6 ± 3,5 ^a
Ox2/25	20,7 ± 1,2 ^{ab}	17,3 ± 2,1	15,4 ± 3,6	15,9 ± 1,7 ^b	19,0 ± 3,3 ^{ab}
Ox2/250	20,4 ± 1,1 ^{ab}	16,9 ± 0,4	12,8 ± 1,0	15,6 ± 0,9 ^b	22,3 ± 2,6 ^a
Ox3/25	19,5 ± 1,3 ^b	15,9 ± 1,6	15,1 ± 3,1	17,1 ± 1,3 ^a	21,1 ± 2,3 ^a
Ox3/250	20,0 ± 1,0 ^b	16,9 ± 1,6	13,9 ± 2,5	16,6 ± 1,2 ^{ab}	21,5 ± 2,0 ^a
ANOVA	1	1	2	1	1,2
Versuch 3 - Meerschweinchen					
K2/35/300	15,4 ± 1,1 ^b	13,6 ± 2,4 ^{ab}	19,0 ± 1,7 ^b	27,4 ± 3,6	3,9 ± 0,9 ^a
Ox4/35/300	16,0 ± 0,6 ^b	14,1 ± 1,7 ^a	22,6 ± 2,8 ^{a*}	28,5 ± 3,0	2,6 ± 0,7 ^{bc}
Ox4/35/1000	17,0 ± 1,0 ^a	14,9 ± 1,4 ^a	22,4 ± 1,5 ^a	26,6 ± 2,0	3,0 ± 0,7 ^b
Ox4/175/300	17,2 ± 0,8 ^a	12,2 ± 2,5 ^b	23,1 ± 3,4 ^a	27,1 ± 3,0	2,1 ± 0,3 ^c
Ox4/175/1000	16,7 ± 1,1 ^a	12,0 ± 1,5 ^b	22,1 ± 2,6 ^a	26,4 ± 2,0	2,1 ± 0,7 ^c
ANOVA	3	2	—	—	2

Werte = Mittelwert ± SD, n=10 (außer bei Ox4/35/1000 n=6, Ox4/35/300 und Ox4/175/300 n=8); a,b,c unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den Gruppen im multiplen Mittelwertsvergleich nach Fisher; 1,2,3 Signifikanz (p<0,05) der Einflussfaktoren: 1-Fett, 2-Vit.E, 3-Vit.E·Vit.C; * kennzeichnet signifikant (p<0,05) unterschiedliche Mittelwerte entsprechend des t-Testes (K2/35/300 vs. Ox4/35/300)

Im Versuch 1 wirkte sich die Art des Fettes zwar signifikant auf den Anteil an gesättigten (C16:0; C18:0) und mehrfach ungesättigten (C18:2; C20:4) Fettsäuren aus. Jedoch waren die Veränderungen außer bei der Linolsäure (C18:2) unerheblich. In Folge der Zufuhr von oxidiertem Fett war der Anteil an C18:2 bei den behandelten Tieren geringer als bei den Kontrolltieren. Dieser Effekt war vor allem beim Fett Ox1 zu beobachten. Nicht zu erkennen war dieser Einfluss beim Fett Ox3. Gleichfalls einen signifikanten Einfluss übte die Vitamin E-Supplementierung auf den Anteil an Ölsäure (C18:1) und Arachidonsäure (C20:4) aus. Der Anteil an C18:1 war bei hoher Vitamin E-Zufuhr geringer als bei niedriger Vitamin E-Zulage. Dagegen war der Anteil an Arachidonsäure bei hoher Vitamin E-Versorgung höher als bei niedriger mit Ausnahme von Ox3.

Im Versuch 3 veränderte sich der Anteil an Ölsäure und Arachidonsäure in den LDL signifikant durch die Verfütterung von oxidiertem Fett, die zu einem höheren Anteil an C18:1 und einem niedrigeren an C20:4 führte. Bei den Tieren, die oxidiertes Fett erhielten, bewirkte eine höhere Vitamin E-Versorgung einen signifikant geringeren Anteil an Stearinsäure (C18:0) und Arachidonsäure in den LDL. Die Vitamin

E- sowie Vitamin C-Zufuhr beeinflussten die Konzentration an Palmitinsäure (C16:0) in den LDL. Bei den Tieren, deren Diät eine geringe Vitamin E-Konzentration und oxidiertes Fett enthielt, führte eine hohe Vitamin C-Zulage zu einem höheren Gehalt an Palmitinsäure gegenüber einer geringen Vitamin C-Zulage. Keine weiteren Erhöhungen waren bei hoher Vitamin C- und Vitamin E-Versorgung zu erkennen.

3.7.4 Aufnahme von fluoreszenz-markierten LDL durch Makrophagen

Die Tabellen 26 und 27 zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen zur Aufnahme von markierten LDL durch Makrophagen der Zelllinie J774.

Tab.26: Aufnahme von fluoreszenz-markierten LDL bei Hemmung des Scavenger-Rezeptors durch Polyinosinsäure

Gruppe	Totale Aufnahme	Aufnahme bei PiS-Hemmung	Rezeptor-Spezifische Aufnahme ¹	Hemmung
		[µg Dil-LDL/mg Zellprotein]		[%]
Versuch 2 - Ratte				
K2/25	2,49 ± 1,81	2,44 ± 1,83	0,09 ± 0,13	5,3 ± 7,4
Ox4/25	2,80 ± 2,51	2,72 ± 2,39	0,11 ± 0,13	3,9 ± 3,4
<i>t-Test</i>	—	—	—	—

Werte = Mittelwert ± SD, n=10

¹ Differenz zwischen Totaler Aufnahme und Aufnahme bei Hemmung des Scavenger-Rezeptors mit PolyinosinSäure

Tab.27: Aufnahme von fluoreszenz-markierten LDL bei Hemmung des LDL-Rezeptors durch Heparin

Gruppe	Totale Aufnahme	Aufnahme bei Heparin-Hemmung	Rezeptor-Spezifische Aufnahme ¹	Hemmung
		[µg Dil-LDL/mg Zellprotein]		[%]
Versuch 2 - Ratte				
K2/25	2,49 ± 1,81	1,34 ± 1,08	1,15 ± 0,83	53,0 ± 12,0
Ox4/25	2,80 ± 2,51	1,66 ± 1,49	1,14 ± 1,06	59,0 ± 11,4
<i>t-Test</i>	—	—	—	—

Werte = Mittelwert ± SD, n=10

¹ Differenz zwischen Totaler Aufnahme und Aufnahme bei Hemmung des LDL-Rezeptors mit Heparin

Im Versuch 2 waren keine signifikanten Unterschiede in der Aufnahme von markierten LDL durch Behandlungseinflüsse festzustellen. Weder bei der Hemmung durch Polyinosinsäure noch Heparin zeigten sich Unterschiede innerhalb der beiden Gruppen. Somit übte die Fettart keinen signifikanten Einfluss auf die totale und spezifische Aufnahme der LDL durch Makrophagen aus.

3.7.5 Apolipoproteinzusammensetzung der LDL

Die Tabelle 28 stellt prozentual die Apolipoproteinzusammensetzung der LDL dar.

Tab.28: Apolipoproteinzusammensetzung der LDL in Prozenten

Gruppe	Apo B 100	Apo B 48	Σ Apo B	Apo E
			[%]	
<i>Versuch 2 - Ratte</i>				
K2/25	11,8 \pm 1,8	48,7 \pm 14,6	60,5 \pm 13,3	39,5 \pm 13,3
Ox4/25	12,4 \pm 1,3	42,7 \pm 2,9	55,1 \pm 2,6	44,9 \pm 2,6
<i>t-Test</i>	—	—	—	—

Werte = Mittelwert \pm SD, n=3

Wie der Tabelle 28 zu entnehmen ist, traten im Versuch 2 keine Veränderungen in der prozentualen Verteilung der Apolipoproteine in den LDL durch die Behandlung mit oxidiertem Fett innerhalb der beiden Gruppen auf.

4 Diskussion

4.1 Versuchsdesign

Das Ziel der Arbeit bestand darin zu untersuchen, inwieweit erhitzte Nahrungsfette in Abhängigkeit ihres Oxidationsgrades eine oxidative Belastung im tierischen Organismus induzieren. Da Temperatur, Behandlungsdauer und Lufteintrag (Tab.1) einen entscheidenden Einfluss auf die Autoxidation der ungesättigten Fettsäuren und dem daraus resultierenden oxidativen Verderb der Lipide ausüben, lief die thermische Oxidation der Fettgemische unter kontrollierten Bedingungen ab. Während der Lipidperoxidation kommt es zur Bildung von primären Oxidationsprodukten (Peroxide), aus denen sekundäre Zerfallsprodukte (Carbonyle, Aldehyde, Polymere) entstehen können (MÖRSEL u. MEUSEL, 1990; PARDUN, 1976). Neben den oxidierten Fettsäuren entstehen auch zyklische Derivate, Di- und Trimere der Triglyzeride (BILLEK, 1979). Frühere Untersuchungen zeigten, dass Lipidperoxidationsprodukte die nutritiven Eigenschaften von Fetten beeinflussen (POLING et al., 1970; NOLEN et al., 1967) und toxisch, kanzerogen, atherogen sowie inflammatorisch wirken können (ESTERBAUER et al., 1993; CORCOS BENEDETTI et al., 1987; IZAKI et al., 1984; ALEXANDER, 1981).

Eine ausführliche Charakterisierung von primären und sekundären Lipidperoxidationsprodukten in thermisch behandelten Fettgemischen ist mit methodischen Problemen behaftet. Zum einen entstehen während der Hitzebehandlung zahlreiche verschiedene Reaktionsverbindungen, zum anderen ist ein Großteil davon instabil und zerfällt. Um den Oxidationsgrad der Fettgemische einigermaßen einschätzen zu können, wurden die POZ, die Konzentration an konjugierten Dienen, TBARS, Carbonylen sowie der prozentuale Anteil an polaren Verbindungen in den Diätfetten bestimmt. Die Lipidgemische, deren Behandlung sich über eine lange Periode bei niedriger Temperatur erstreckte, enthielten eine hohe Anzahl an Peroxiden und eine hohe Konzentration an konjugierten Dienen sowie TBARS, was auf einen großen Anteil an primären Lipidperoxidationsprodukten in der entsprechenden Diät schließen lässt. Im Gegensatz dazu wiesen die Fette, die bei hoher Temperatur über einen kurzen Zeitraum erhitzt wurden, eine wesentlich geringere POZ und Konzentration an konjugierten Dienen sowie TBARS auf als die Fette mit niedriger Behandlungstemperatur. Dies dürfte ein Beleg für den Zerfall von primären Oxidationsprodukten bei hohen Temperaturen sein. Auch ist anzunehmen, dass flüchtige Lipidperoxidationsprodukte durch das Erreichen des Siedepunktes entweichen konnten. Der prozentuale Anteil an polaren Verbindungen und die Konzentration an Carbonylen war bei allen oxidierten Diätfetten hoch, weil diese Verbindungen durch Pyrolyseprozesse entstehen (MÖRSEL u. MEUSEL, 1990). Der leichte Anstieg der Fettkennzahlen nach dem Einschluss der Fette in die Diät verdeutlicht, dass es sich bei der

Lipidperoxidation um ein dynamisches System handelt. Vor allem durch die Zugabe von Metallionen wurde die Oxidation in der Diät offensichtlich nochmals vorangetrieben.

Die Verwendung eines Fettgemisches aus Sonnenblumenöl und Schweineschmalz ermöglichte zum einen die Angleichung des Fettsäurenusters und zum anderen eine moderate Behandlung der Diätfette. Der Bedarf an Linolsäure von 6 g pro kg Diät für wachsende Ratten und 4 g pro kg Diät für Meerschweinchen (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1995) wurde gedeckt. An den Versuchstieren waren keine Auffälligkeiten wie Seborrhoe, Dermatitis, Diarrhö, Polyurie oder Haarausfall zu beobachten. Andere Autoren führten sie als markante toxische Symptome von stark oxidierten Fetten an (ALEXANDER et al., 1987; GABRIEL et al., 1977). Demnach wurde durch die moderate Behandlung der Fettgemische eine Intoxikation durch Lipidperoxidationsprodukte vermieden.

Durch eine Supplementierung von Vitamin E und Vitamin C sollte die Wirksamkeit von Antioxidantien auf die Effekte von oxidierten Fetten überprüft werden. Vitamin E bietet den effektivsten Schutz vor Lipidperoxidation in pflanzlichen Ölen sowie in Biomembranen (PONGRACZ, 1995; NAMIKI, 1990). Das Erhitzen der Fettgemische führte in Abhängigkeit von Temperatur und Dauer zum Vitamin E-Abbau. Infolgedessen war eine Supplementierung erforderlich, um den Bedarf der PUFA an Vitamin E (MUGGLI, 1994) zu decken. Aufgrund des angeglichenen Fettsäurenusters war der Minimalbedarf an Vitamin E bei allen Diäten gleich. Als Supplement wurde DL- α -Tocopherylacetat eingesetzt, da verschiedene Untersuchungen (PONGRACZ, 1995; MORRISSEY et al., 1994; COHN, 1993) zeigten, dass DL- α -Tocopherylacetat gegenüber nativem α -Tocopherol wesentlich stabiler ist.

Das NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1995) empfiehlt bei einer Rattendiät mit einem Fettanteil von 10% einen Mindestgehalt von 18 mg α -TÄ/kg Diät. Diese Empfehlung wurde bei keinem der Rattenversuche unterschritten. Jedoch ist der Bedarf an Vitamin E abhängig von der Zufuhr an ungesättigten Fettsäuren. Daher war es angebracht den Vitamin E-Bedarf nach MUGGLI (1994) zu berechnen. Die 2. Stufe der Vitamin E-Supplementierung (250 mg α -TÄ/kg Diät) bei den Ratten betrug das 10fache des Bedarfes und lag um ein 5faches über der Empfehlung von 50 mg α -TÄ/kg Diät des American Institute of Nutrition (REEVES et al., 1993).

Laut HSIEH u. NAVIA (1980) verhindert bereits eine Zufuhr von 26,7 mg α -TÄ/kg Diät das Auftreten von Wachstumsdepressionen bei Meerschweinchen. Damit wurde bei einer Dosierung von 35 mg α -TÄ/kg Diät eine Mangelsituation vermieden. Anhand des Meerschweinchenversuches wurde getestet, ob eine geringere Vitamin E-Dosierung (5fache des Bedarfes) ähnliche Effekte erzielt wie eine Supplementierung um das 10fache des Bedarfes im 1. Rattenversuch.

Die Gefahr einer Überdosierung an Vitamin E war nicht gegeben, da die aus der Literatur bekannten Angaben zur Intoxikation nicht überschritten wurden. Die höchste Vitamin E-Zulage führte zu einer täglichen Aufnahme von 14 mg α -TÄ/kg Körpergewicht¹. Bei KAPPUS u. DIPLOCK (1992) ist zu lesen, dass selbst eine Aufnahme von 7,5 g α -TÄ/kg Körpergewicht zu keinen toxischen Effekten führt.

Der Synergismus zwischen Vitamin C und Vitamin E vor allem in Bezug auf die Abwehr von Lipidperoxidationsprodukten ist teilweise in der Literatur beschrieben (LIU u. LEE, 1998; BIESALSKI et al., 1997; CHAN, 1993). Da Meerschweinchen Vitamin C nicht selbst synthetisieren können, sind sie geeignete Modelltiere, um den Einfluss verschiedener Ascorbinsäuredosierungen auf den Vitamin E-Status zu untersuchen. Gleichzeitig sollte die Studie Aufschluss darüber geben, inwieweit Vitamin C einer Lipidperoxidation und anderen oxidativen Belastungen vorbeugt. MANNERING (1949) empfiehlt für Meerschweinchen 200 mg Ascorbinsäure/kg Diät. Somit ist bei einer Supplementierung von 300 bis 1.000 mg Ascorbinsäure/kg Diät von einer adäquaten bzw. leicht erhöhten Versorgung der Meerschweinchen auszugehen.

4.2 Lebendmasseentwicklung der Versuchstiere

Es ist bekannt, dass stark oxidierte Fette aufgrund ihrer Sensorik sowie Toxizität zu vermindertem Futtermittelverzehr (BLANC et al., 1992; YOSHIDA u. KAJIMOTO, 1989) führen können. Auch die Fettverdaulichkeit (HUANG et al., 1988) und die Absorption anderer Nährstoffe werden beeinträchtigt (BØRSTING et al., 1994). Folge sind geringeres Wachstum der Tiere, wie für Ratten (AMMOUCHE et al., 2002; NWANGUMA et al., 1999; ALEXANDER et al., 1987; GABRIEL et al., 1977) und Meerschweinchen (LIU et al., 2000, LIU u. LEE, 1998) beschrieben wurde. Daher wurde in allen 3 Versuchen dieser Studie ein restriktives Fütterungsregime eingeführt. Im Vergleich zur *ad libitum* Fütterung ermöglichte die restriktive Fütterung eine gleiche Verzehrmenge bei allen Tieren, wie auch die Untersuchungen von EDER u. STANGL (1999) sowie EDER u. KIRCHGESSNER (1999) zeigten. Die in der Literatur beschriebenen Wachstumsveränderungen bei *ad libitum* Fütterung wären daher primär auf die geringere Verzehrmenge zurückzuführen und nur indirekt auf den Einfluss von oxidierten Fetten.

Im 2. Rattenversuch und bei den Meerschweinchen traten keine signifikanten Gruppenunterschiede in der Lebendmasseentwicklung auf. Im Versuch 1 der vorliegenden Arbeit hatte die Fütterung der oxidierten Fette bei erhöhter α -Tocopherolzulage ebenfalls keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der Tiere. Lediglich bei Fütterung von oxidierten Fetten und niedriger Vitamin E-Zulage wurde eine niedrige-

¹ Für die Berechnung wurde eine durchschnittliche Futteraufnahme von 14 g / d / Tier bei einem durchschnittlichen Gewicht von 250 g / Tier angesetzt.

re Endlebensmasse festgestellt als bei den Tieren der Kontrolle. Dieses Resultat stimmt mit den Ergebnissen von LIU u. HUANG (1996, 1995) sowie YOSHIDA u. KAJIMOTO (1989) überein, die einen Zusammenhang zwischen verringerter Lebendmasseentwicklung bei Fütterung oxidierter Fette und einer knappen α -Tocopherolverorgung beschrieben haben.

Im Versuch 1 war das relative Lebergewicht aller Gruppen gleich. Jedoch kam es in den Versuchen 2 und 3 bei Ratten und Meerschweinchen, welche oxidiertes Fett verzehrten, zu einer Zunahme der relativen Lebermasse. Interessant ist, dass in diesen beiden Versuchen ein Lipidgemisch verwendet wurde, das einen hohen Anteil an primären Lipidperoxidationsprodukten aufwies. Andere Autoren stellten ebenfalls nach Fütterung oxidierter Fette ein erhöhtes Lebergewicht bei Ratten (AMMOUCHE et al., 2002; NWANGUMA et al., 1999; ALEXANDER et al., 1987; IZAKI et al., 1984) und Meerschweinchen (LIU et al., 2000; LIU u. Lee, 1998) fest. Einer der ersten waren GABRIEL et al. (1977), die nach Gabe von oxidierten Fetten histologische Veränderungen in verschiedenen Geweben beobachteten, unter anderem auch in der Leber. Mit dem Verzehr von thermisch behandelten Fetten ist das Auftreten einer Hypertrophie der Leber möglich (AMMOUCHE et al., 2002; LOPEZ-VARELA et al., 1995; SANCHEZ-MARTIN et al., 1993; HIROAKI et al., 1987). CHAO et al. (2001) und MARTIN et al. (2000) führten den Anstieg des relativen Lebergewichtes bei Ratten auf die Peroxisomenproliferation zurück, die durch oxidierte Fette induziert wurde. Es ist erwiesen, dass eine Peroxisomenproliferation die Lebermasse erhöhen kann (CATTLEY, 2003). Peroxisomen entstehen durch Abschnürungen vom endoplasmatischen Reticulum. In den Untersuchungen von LIU u. HUANG (1989) sowie HUANG et al. (1988) zeigte sich, dass die Verwendung von erhitzten Ölen eine Proliferation des hepatischen glatten endoplasmatischen Reticulums bei Ratten verursachte.

Insgesamt konnte geschlossen werden, dass bei Einsatz von moderat oxidierten Fetten und ausreichender Vitamin E-Versorgung keine Effekte auf die Lebendmasse sowie deren Entwicklung zu erkennen waren. Jedoch zeigte sich auch, dass die Fütterung von thermisch behandeltem Fett zu Unterschieden im relativen Lebergewicht bei Ratte und Meerschweinchen führen kann. Demnach könnten die Lipidperoxidationsprodukte eine Peroxisomenproliferation in der Leber induziert haben, welche den Anstieg der relativen Lebermasse zur Folge hatte. Laut einigen Literaturquellen ist die Empfänglichkeit für eine Proliferation der Peroxisomen von der Tierspezies abhängig. Meerschweinchen neigen kaum zu einer Peroxisomenproliferation (PALUT, 1997). Die Vermutung liegt nahe, dass das erhöhte Lebergewicht bei den Meerschweinchen im Zusammenhang mit einer Proliferation des endoplasmatischen Retiklums steht, die durch den Verzehr von oxidiertem Fett ausgelöst wurde (LIU u. HUANG, 1989; HUANG et al., 1988).

4.3 Vitamin E-Status und -Verdaulichkeit

In Abhängigkeit des Oxidationsgrades können thermisch behandelte Fette eine Verschlechterung des Vitamin E-Status bei verschiedenen Spezies hervorrufen (ŠKUFCÁ, 2002; SRINIVASAN u. PUGALENDI, 2000; EDER u. KIRCHGESSNER, 1999; LIU u. LEE, 1998; ENGBERG et al., 1996; SHEEHY et al., 1994; D'AQUINO et al., 1985). Für die gesteigerte Abwehr von Lipidperoxidationsprodukten wird mehr Vitamin E benötigt, was den Umsatz an α -Tocopherol im Organismus erhöhen kann. Eine Supplementierung mit Vitamin E verbessert die Tocopherolkonzentration in verschiedenen Organen (LIU u. HUANG, 1996; LIU u. HUANG, 1995; D'AQUINO et al., 1985) und kompensiert teilweise die Wirkung oxidierter Fette auf den Vitamin E-Status (EDER u. KIRCHGESSNER, 1999; EDER u. KIRCHGESSNER, 1998b). Bei Meerschweinchen bewirkte eine vermehrte Vitamin C-Zufuhr den Anstieg des α -Tocopherol- und Ascorbinsäurespiegels in den Geweben trotz oxidierter Fette in der Diät (LIU u. LEE, 1998). CHEN u. CHANG (1978) beobachteten bei Meerschweinchen, dass bereits eine adäquate Versorgungslage mit Vitamin C gegenüber einer marginalen einen Anstieg der Tocopherolkonzentration im Plasma herbeiführen kann.

In allen 3 Versuchen senkte bei geringer Vitamin E-Versorgung die Fütterung oxidierter Fette den α -Tocopherolstatus in Leber, Abdominalfett und Plasma. Diese Beobachtung weist auf eine gesteigerte Abwehr von Lipidperoxidationsprodukten hin. Andere Autoren beobachteten gleiches (EDER u. STANGL, 2000; SRINIVASAN u. PUGALENDI, 2000; EDER u. KIRCHGESSNER, 1999; EDER u. KIRCHGESSNER, 1998a, 1998b; ENGBERG et al., 1996; LIU u. HUANG, 1995). Im ersten Rattenversuch übte der Oxidationsgrad der verfütterten Lipidgemische kaum Einfluss auf die α -Tocopherolkonzentration der untersuchten Organe aus.

Trotz Fütterung oxidierter Fette verbesserte eine Vitamin E-Supplementierung bei Ratte sowie Meerschweinchen den α -Tocopherolstatus der untersuchten Gewebe erheblich. Demnach wirkte eine hohe Vitamin E-Supplementierung der vermehrten oxidativen Belastung durch Lipidperoxidationsprodukte entgegen.

Unter prooxidativen Bedingungen war bei den Meerschweinchen in allen Organen ein signifikanter Spareffekt von Vitamin E durch eine Vitamin C-Zulage in der Diät nachweisbar. Wie die eigenen Untersuchungen zeigten, ist eine höhere Dosierung von Vitamin E und Vitamin C beim Verzehr von thermisch behandelten Fetten empfehlenswert, um ein Defizit an Vitamin E sowie dem damit verbundenen oxidativen Stress vorzubeugen.

Die lipophile Struktur von Vitamin E ermöglicht die Absorption über die Nahrungsfette. Pathologische Prozesse, die die Fettverdauung beeinträchtigen, vermindern gleichzeitig die Absorption von Tocopherolen. Ferner belegten mehrere Studien die verringerte Verdaulichkeit von oxidierten Fetten (HOCHGRAF et al., 1997; BØRSTING et al., 1994; ENGBERG u. BØRSTING, 1994), die vermutlich auf toxische Effekte der Lipidperoxidationsprodukte am Darmepithel zurückzuführen ist (BLANC et al., 1992). Der Verzehr von thermisch veränderten Fetten kann somit eine verminderte Vitamin E-Verdaulichkeit und reduzierte Fettabsorption verursachen (ŠKUFCA, 2002; LIU u. HUANG, 1995; HUANG et al., 1988). HUANG et al. (1988) stellten bei Ratten nach dem Verzehr erhitzter Fette eine Verminderung der scheinbaren Verdaulichkeit von Vitamin E um 10% fest.

Die eigenen Daten belegen eine wesentlich massivere Beeinträchtigung der scheinbaren Verdaulichkeit von Vitamin E durch die Verfütterung von oxidierten Fetten. Die Abnahme der scheinbaren Verdaulichkeit von Vitamin E verstärkte sich im Laufe des ersten Rattenversuches, wie aus dem Vergleich von Versuchsmitte und -ende hervor ging. Der Verzehr von Fett Ox2 und Ox3 führte bei den Ratten zu einer signifikant geringeren scheinbaren Verdaulichkeit von Vitamin E gegenüber den Fettgemischen Ox1 und Ox4. Die Fettgemische Ox1 und Ox4 unterscheiden sich durch einen erheblich höheren Anteil an primären Oxidationsprodukten von den Fettgemischen Ox2 und Ox3. Demnach übte der Oxidationsgrad der erhitzten Fette einen signifikanten Einfluss auf die scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E aus. Es ist bekannt, dass die physiologischen Wirkungen von primären und sekundären Lipidperoxidationsprodukten unterschiedlich sind. Primäre Lipidperoxidationsprodukte sind bei parenteralen Zufuhr stark toxisch. Jedoch ist ihre Toxizität bei oraler Aufnahme beträchtlich gemindert, vermutlich durch eine niedrige Absorptionsrate (KANAZAWA et al., 1985; FINDLAY et al., 1970). Andererseits sind sekundäre Lipidperoxidationsprodukte besser oral absorbierbar und besitzen daher eine höhere physiologische Relevanz (ORADA et al., 1986). Die scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E war unabhängig von der Vitamin E- und Vitamin C-Supplementierung.

4.4 Vitamin C- und Harnsäure-Status

Die wesentliche Aufgabe von Antioxidantien besteht im Abbruch von radikalischen Kettenreaktionen. Sie sind in hydrophile Radikalfänger, die eher in extrazellulären Flüssigkeiten lokalisiert sind, und in hydrophobe Radikalfänger, die hauptsächlich im Zellinneren vorkommen (MARKANT et al., 1995; SLADE et al., 1993; NIKI, 1988) zu unterscheiden. Vitamin C und Harnsäure quenchen reaktive Sauerstoffspezies in wässriger Phase und schützen daher indirekt die Membranstruktur vor Lipidperoxidation. Im Redoxsystem reduziert Ascorbinsäure das Tocopheroxyl-Radikal und regeneriert dadurch α -Tocopherol (HALLIWELL, 1994; LEUNG et al., 1981). Die eigenen Untersuchungsergebnisse zeigten, dass Vitamin C die antioxidative Aktivität von Vitamin E steigert. Der Synergismus zwischen Vitamin E und C führt sogar zu einem beiderseitigen Spareffekt (LIU u. LEE, 1998; CADENAS et al., 1996; FIELDS et al., 1984; WARTANOWICZ et al., 1984; HRUBA et al. 1982). In der Literatur gehen jedoch die Meinungen bezüglich eines *in vivo* Synergismus zwischen Vitamin E und Vitamin C auseinander. Zum Beispiel konnten CHEN u. CHANG (1979) in ihren Versuchen keinen beiderseitigen Spareffekt von Vitamin E und Vitamin C nachweisen. Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass Vitamin C in Gegenwart von Übergangsmetallen z.B. der Metalle Cu und Fe prooxidativ wirken kann (HALLIWELL, 1994; HUNT et al., 1992). Harnsäure stabilisiert die Ascorbinsäure (MARKANT et al., 1995) und fungiert gleichfalls als Plasmaantioxidans (KAUR u. HALLIWELL, 1990). Auffällig ist, dass Lebewesen, die nicht zur Eigensynthese von Vitamin C befähigt sind wie Primaten und Meerschweinchen, einen höheren Plasmaspiegel an Harnsäure aufweisen als z.B. Ratten. Vermutlich gleicht Harnsäure, ein Metabolit des Purinstoffwechsels, dieses Defizit aus (WITTENSTEIN et al., 2002; CHOW, 1988). Besonders hoch ist die Konzentration an Harnsäure während kritischer Versorgungsphasen, wie Geburt (CHOW, 1988) und Sport (MIKAMI et al., 2000), aber auch bei akutem oxidativen Stress durch Ischämie (GARIBALLA et al., 2002), um das Defizit an anderen Antioxidantien auszugleichen. POLIDORI u. MECOCCI (2002) wiesen bei Alzheimer-Patienten eine niedrigere Konzentration an Antioxidantien (Vitamin C, Harnsäure und Thiole) im Plasma nach als bei gesunden Probanden, dafür aber eine höhere an Lipidperoxidationsprodukten. Dies lässt auf eine gesunkene antioxidative Kapazität durch gesteigerten oxidativen Stress schließen. Somit kann auch die Harnsäurekonzentration zur Beurteilung des antioxidativen Status im Plasma herangezogen werden (WITTENSTEIN et al., 2002; POLIDORI u. MECOCCI, 2002). Zu bedenken ist jedoch, dass die Harnsäure beim Menschen auch an pathophysiologischen Prozessen beteiligt ist.

In der vorliegenden Studie stieg die Ascorbinsäure- und Harnsäurekonzentration im Plasma der Meerschweinchen in Abhängigkeit des Vitamin E-Gehaltes der Diät an. Die Harnsäurekonzentration überschritt aber nicht die obere Grenze des Referenzwertes von 190 μ M für Meerschweinchen (KRAFT,

1989). ROJAS et al. (1996) und CADENAS et al. (1995) hingegen konnten keinen signifikanten Einfluss einer Vitamin E-Supplementierung auf den Ascorbin- und Harnsäuregehalt im Herzen und in der Leber von Meerschweinchen feststellen. Die erhöhte Vitamin C-Zufuhr mit der Diät führte auch bei Fütterung von erhitztem Fett zur Zunahme der Vitamin C-Konzentration im Plasma. Gleiches zeigte sich bei Versuchen von LIU u. LEE (1998). Der Harnsäurespiegel blieb mit steigender Vitamin C-Versorgung unverändert. Bei Fütterung des oxidierten Fettes mit niedriger Vitaminzulage zeigte sich ein leichter Abfall der Plasmakonzentrationen an Ascorbinsäure, wenn auch nicht signifikant wie bei LIU u. CHANG (2000) und LIU u. LEE (1998). Anders als bei den Untersuchungen von CORCOS BENEDETTI (1987) an Ratten sank der Harnsäurespiegel der Meerschweinchen aufgrund des oxidierten Fettes in der Diät.

Aus den Ergebnissen ging hervor, dass eine erhöhte Vitamin E-Zufuhr unter prooxidativen Bedingungen zu einem Vitamin C-Spareffekt führte. Die Fütterung von thermisch behandeltem Fett bewirkte eine Verschlechterung des antioxidativen Status im Plasma, da die Konzentration an Vitamin C und Harnsäure sank. Eine Supplementierung von Vitamin E und Vitamin C konnte dieses Defizit ausgleichen.

4.5 Endogenes antioxidatives Schutzsystem

Im aeroben Stoffwechsel kommt es ständig zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Gleichzeitig erfolgt eine externe Belastung in Form verschiedenster Radikale. Daher ist das Zusammenspiel zwischen den Oxidoreduktasen SOD, Katalase und GSHPx sowie das Antioxidans GSH elementar für die intrazelluläre Abwehr von radikalischen Verbindungen. Das mitochondriale Mn-abhängige und das zytosolische Cu,Zn-abhängige Metalloprotein sind die Hauptvertreter der SOD. Die extrazelluläre Form der SOD ist im Plasma sowie an der Oberfläche von Endothelzellen lokalisiert (KRAUS, 1996). Die SOD katalysiert die Entgiftung von Superoxidradikalen durch Erhöhung des physiologischen pH-Wertes (MARKANT et al., 1995). Dabei entstehen O_2 und H_2O_2 . Die Regulierung der intrazellulären H_2O_2 -Konzentration übernehmen Katalase und GSHPx. Gleichzeitig beugen Katalase und GSHPx direkt einer Lipidperoxidation vor durch die Reduktion von Hydrogen- bzw. Hydroperoxiden. Ihre höchste Aktivität ist in der Leber und in den Erythrozyten messbar (MARKANT et al., 1995; CHOW, 1988). Das Häm-Protein Katalase ist bei Ratten ausschließlich im Peroxisomen zu finden (BIESALSKI u. FRANK, 1995; WEISS u. KUMAR, 1988; CHANCE et al., 1979). Wohingegen es bei Meerschweinchen zu 60% im Zytosol vorliegt (BULITTA et al., 1996; YAMAMOTO et al., 1988). Die bedeutendsten Vertreter der Se-abhängigen Glutathion-Peroxidasen sind die „klassische“ GSHPx im Zytosol sowie in den Mitochondrien und die membranassoziierte Phospholipidhydroperoxid-GSHPx (PHGSHPx). Die PHGSHPx ist in der Lage Hydroperoxide in membrangebundenen Phospholipiden und Cholesterinestern umzusetzen ohne vorherige Freisetzung der oxidierten Fettsäuren mittels Phospholipase A₂, wozu die „klassi-

sche“ GSHPx nicht befähigt ist (THOMAS et al., 1990; URSINI, 1988). Jedoch ist es der PHGSHPx nicht möglich H_2O_2 abzubauen. Die Aktivität der „klassischen“ GSHPx ist wesentlich größer als die der PHGSHPx. Über die Reduktion von Hydroperoxiden ist die GSHPx mit der Oxidation von reduziertem GSH verbunden. Dabei entsteht GSSG, welches mit Hilfe der NADPH-abhängigen Glutathionreduktase wieder zu GSH regeneriert wird (MALMEZAT et al. 2000; KINALSKI et al., 1999; MEISTER, 1994b; BRAY u. TAYLOR, 1993).

Das ubiquitär verteilte Tripeptid GSH (L- γ -Glutamyl-L-Cysteinylglycin) reagiert direkt mit freien Radikalen und spielt daher eine zentrale Rolle im Zellschutz. Die endogene Synthese aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin erfolgt in der Leber. GSH dient der Aufrechterhaltung des reduktiven Milieus in der Zelle und ist in die Regenerierung der Vitamine C und E involviert (MEISTER, 1994a, 1994b, 1995; ISHIKAWA u. SIES, 1989; CHO et al., 1981).

Die prooxidative Belastung durch thermisch behandelte Fette führte bei allen 3 Versuchen zu einer Aktivitätssteigerung der Katalase um rund 30% in der Leber. Auch CHRISTOVA et al. (2002), KRAVCHENKO et al.(2002), AMMOUCHE et al. (2002) sowie CHAO et al. (2001) berichteten von einer gesteigerten Katalaseaktivität in Verbindung mit oxidierten Fetten. Bei den Meerschweinchen zeigte das oxidierte Fett der Diät keine Auswirkungen auf die Enzymaktivitäten von SOD und GSHPx. Auch bei den Ratten war keine merkliche Veränderung der SOD-Aktivität zu verzeichnen. In anderen Studien kam man zu dem gleichen Ergebnis (RAMACHANDRAN et al., 2002; HAYAM et al., 1995; CORCOS BENEDETTI et al., 1990; PERCIBALLI u. PINTAURO, 1985). Die Aktivität der GSHPx hingegen sank infolge der Behandlung mit oxidierten Fetten bei Ratten, wie auch von anderen beobachtet (ENGBERG et al., 1996; HAYAM et al., 1995; KOK et al., 1988; IZAKI et al., 1984).

Im 1. Rattenversuch kompensierte eine hohe Vitamin E-Zulage die verminderte GSHPx-Aktivität in der Leber nach Verzehr von Diätfetten, die bei hoher Temperatur oxidiert wurden. Keine Wirkung auf die Aktivität der GSHPx zeigte eine hohe Vitamin E-Versorgung bei Verfütterung des Diätfettes mit dem größten Anteil an primären Lipidperoxidationsprodukten. Ansonsten übte die Vitamin E- und/oder Vitamin C-Supplementierung bei Ratten und Meerschweinchen keinen weiteren Einfluss auf die Aktivität der antioxidativen Enzyme aus (CADENAS et al., 1995; BARAJA et al., 1994). Eine Veränderung der Enzymaktivität der GSHPx bei Meerschweinchen erzielte CADENAS et al. (1994) erst durch Mangel oder Megadosierung von Vitamin C.

Somit war der Einfluss von oxidierten Fetten sowie der Supplementierung von Vitamin E und Vitamin C auf das intrazelluläre enzymatische Schutzsystem nur geringfügig. Eine Stimulation der Expression antioxidativer Enzyme durch Oxidationsprodukte der erhitzten Fette wäre demnach nicht zu erwarten. Lediglich die Katalase bildete eine Ausnahme. Auch CHAO et al. (2001) konnten an Ratten zeigen, dass die Fütterung von oxidierten Fetten zu einem Anstieg der Katalaseaktivität führte. Außerdem stellten sie fest, dass oxidiertes Fett die Proliferation der Peroxisomen induzierte sowie die microsomale Proteinkonzentration an Cytochrom P-450 in der Leber steigerte. Mit einer Peroxisomenproliferation verbunden ist die vermehrte Bildung von H_2O_2 , die wiederum die Katalaseaktivität steigern kann. Das erhöhte relative Lebergewicht der Tiere in den Versuchen 2 und 3 wäre ein weiterer Hinweis für eine Proliferation der Peroxisomen in der Leber durch Lipidperoxidationsprodukte (CHAO et al., 2001; MARTIN et al., 2000).

Durch alle Versuche hinweg waren deutliche Auswirkungen der thermisch behandelten Fette auf das Redoxsystem des GSH zu sehen. Infolge der Zufuhr von Lipidperoxidationsprodukten war die Konzentration an GSSG in der Leber der Ratten vermindert, an GSH_{red} wiederum erhöht. Dies kann auf der verminderten GSHPx-Aktivität im Leberzytosol beruhen. Ähnliche Beobachtungen wurden in den Studien von KRAVCHENKO et al. (2002) und WANG et al. (1997) beschrieben. Trotz unveränderter GSHPx-Aktivität war bei den Meerschweinchen die Konzentration an GSSG als auch an GSH_{red} in der Leber erhöht. Zudem wurde nach Verzehr von oxidiertem Fett eine höhere GSH-Konzentration bei Ratten und Meerschweinchen bestimmt. Demnach traten unter prooxidativen Bedingungen Veränderungen im Redoxsystem des GSH auf, was die Arbeit von SAKA et al. (2002) bestätigte. Gleichfalls ist zu berücksichtigen, dass oxidierte Fette eine Verschlechterung des Se-Status bewirken können (ŠKUFCA, 2002), was wiederum eine verminderte GSHPx-Aktivität nach sich ziehen kann. Bei einem Aktivitätsabfall der GSHPx um 1% beobachteten REITER u. WENDEL (1984, 1983) an Mäusen eine Änderung der Aktivität von Enzymen, die an Cytochrom P-450-abhängigen Reaktionen und der Phase-II-Konjugation beteiligt waren. Die gesunkene GSHPx-Aktivität der Mäuse beruhte vermutlich auf einem induzierten Se-Mangel (TOYODA et al., 1990). In der Studie von LIU et al. (2000) zeigte sich bei Meerschweinchen ebenfalls eine durch erhitzte Fette erhöhte Proteinkonzentration an Cytochrom P-450 in der Leber sowie eine gesteigerte Aktivität von Phase-II-Enzymen des Xenobiotika-Metabolismus. Demnach können thermisch behandelte Fette die Aktivitätssteigerung von Enzymen des Xenobiotikametabolismus induzieren.

Die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigen die aus der Literatur bekannten Speziesunterschiede zwischen Ratte und Meerschweinchen. So weisen Meerschweinchen eine 2 bis 3fach höhere Katalaseaktivität auf als Ratten (HIMENO et al., 1993; PEREZ-CAMPO et al., 1993). Im Gegensatz dazu ist die der GSHPx vermindert (HIMENO et al., 1993). Die Vitaminversorgung zeigte keine Wirkung bezüglich des GSH-Status (CADENAS et al., 1995; BARJA et al., 1994).

Aus den Untersuchungen ging hervor, dass die Adaption an die oxidative Belastung durch Lipidperoxidationsprodukte über das Redoxsystem des GSH verlief, was auf einen aktivierten Xenobiotika-Metabolismus rückschließen läßt. Die vermehrte Katalaseaktivität könnte auf einer vermehrten Peroxisomenproliferation beruhen.

4.6 Lipidperoxidationsprodukte

Im Rahmen der Lipidperoxidation treten verstärkt Membranschäden auf, die zu Störungen des Zellstoffwechsels führen können. Für die Einschätzung möglicher oxidativer Schädigungen wurde zuerst die Oxidationsempfindlichkeit der Gewebe unter prooxidativen Bedingungen *in vitro* mittels TBA-Test geprüft. Neben diesem eher unspezifischen Parameter wurde die Konzentration an Cholesterinoxidationsprodukten in der Leber als *in vivo* Parameter bestimmt. Beide Lipidperoxidationsprodukte wurden auf den Gesamtlipidgehalt der Leber bezogen, um die Auswirkungen der thermisch behandelten Fette auf die Konzentration an Triglyzeriden und Cholesterin in den untersuchten Geweben zu berücksichtigen.

4.6.1 Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen

Die spektralphotometrische Erfassung der TBARS birgt zwei grundsätzliche Schwierigkeiten in sich. Erstens geht TBA nicht nur mit MDA sondern auch mit anderen Aldehyden, Gallenpigmenten, Aminosäuren und Kohlenhydraten Komplexbildungen ein (VALENZUELA, 1991; DRAPER et al., 1988; MARCUSE u. JOHANSSON, 1973). Zweitens begünstigen die Reaktionsbedingungen (Hitze, saures Milieu) die Entstehung von weiteren Chromogenen mit gleichem Absorptionsspektrum (HALLIWELL u. GUTTERIDGE, 1988). Bei der Ermittlung von MDA mittels HPLC werden in der gleichen Probe wesentlich geringere Konzentrationen bestimmt als beim TBA-Test (LOPEZ-TORRES et al., 1993). Deswegen ist es angebracht beim TBA-Test von TBA-reaktiven Substanzen zu sprechen und nicht von MDA.

Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass thermisch veränderte Fette in der Diät einen Anstieg der Konzentration an TBARS und MDA bei Ratte (BATTINO et al., 2002; LIU u. HUANG, 1995; HAGEMAN et al., 1991; IZAKI, 1984; IRITANI et al., 1980) und Meerschweinchen (LIU u. CHANG, 2000; AREVALO et al., 1998; LIU u. LEE et al., 1998) bedingen können. Die eigenen Daten bestätigen diese

Aussage für Leber und Serum bzw. Plasma. Nur CORCOS BENEDETTI et al. (1987) konnten diesen Effekt nicht beobachten. Nach Zufuhr der Lipidgemische Ox3 (1d bei 190°C) und Ox1 (38d bei 50°C) war die Konzentration an TBARS in der Leber am höchsten. Im Unterschied zu den meisten anderen Studien waren beide Fette trotz verschiedener Behandlungstemperaturen mäßig oxidiert. Demnach induzieren auch moderat oxidierte Fettgemische eine Lipidperoxidation im Organismus.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass bei Fütterung erhitzter Fette eine Vitamin E-Supplementierung die gestiegene Konzentration an TBARS in den Geweben im ersten Rattenversuch vollständig kompensiert und bei den Meerschweinchen eine Verminderung herbeiführte. Andere Autoren belegten ebenfalls in ihren Arbeiten einen präventiven Schutz von Vitamin E gegenüber der Lipidperoxidation. Eine Supplementierung mit Vitamin E führt sowohl unter normalen physiologischen Bedingungen (LII et al., 1998; BARJA et al., 1996; ROJAS et al., 1996; CADENAS et al., 1996a, 1996b; CADENAS et al., 1995) als auch bei Stresssituationen (EDER u. KIRCHGESSNER, 1998a; LIU u. HUANG, 1995; SHEEHY et al., 1994; YOSHIDA et al., 1989) zur Senkung der Lipidperoxidationsprodukte in verschiedenen Organen.

Auch wenn der Einfluss von Vitamin C auf die Bildung von TBARS in der Leber im Meerschweinchenversuch nicht statistisch gesichert war, senkte eine erhöhte Vitamin C-Zufuhr die Peroxidationsneigung im Lebergewebe um 20% bei geringer Vitamin E-Versorgung. Die TBARS-Konzentration im Plasma blieb unverändert. In der Literatur ist die präventive Wirkung von Vitamin C gegenüber der Lipidperoxidation umstritten. Bereits mehrfach zeigte sich, dass Vitamin C oxidative Schäden unterdrückt (CHEN et al., 2000; BARJA et al., 1994; CADENAS et al., 1994). Anhand eines Meerschweinchenversuches konnten z.B. LIU u. LEE (1998) demonstrieren, dass bei Fütterung eines oxidierten Fettes eine Vitamin C-Supplementierung den signifikanten Rückgang der TBARS-Konzentrationen in den Organen bewirken kann. Andere wiederum beobachteten keinen Einfluss von Vitamin C auf die Oxidation von Lipiden in Geweben (CADENAS et al., 1996a; ROJAS et al., 1994). Allerdings zeigten sich in einigen Humanstudien auch prooxidative Effekte von Vitamin C. Zum Beispiel riefen pharmakologische Dosen von Eisen in Verbindung mit erhöhter Vitamin C-Zufuhr bei Schwangeren eine unkontrollierte Lipidperoxidation hervor (LACHILI et al.; 2001). LEE et al. (2001) belegten in einer *in vitro* Untersuchung, dass Vitamin C die Zerlegung von Lipidhydroperoxiden induziert. Unter anderem entsteht dabei das DNA-reaktive 4,5-Epoxy-2(E)-Decanal, ein Vorläufer des genotoxischen Etheno-2'-Deoxyadenosin.

4.6.2 Cholesterinoxidationsprodukte

Die Bildung von Cholesterinoxidationsprodukten kann auf zwei verschiedene Weisen erfolgen. Im Rahmen der Gallensäure- und Steroidhormonbiosynthese katalysieren Enzyme der Familie Cytochrom P-450 die Oxidation von Cholesterin in der Leber. Zum anderen induzieren ROS eine nicht-enzymatische Cholesterinoxidation und erzeugen dadurch Oxysterole im Organismus sowie in der Nahrung. Der Sättigungsgrad der Fettsäuren sowie ihre Menge, die Cholesterinkonzentration und die Anwesenheit von Antioxidantien beeinflussen maßgebend die nicht-enzymatische Entstehung von COP. Von Natur aus sind 7 β -Hydroxycholesterin und 7-Ketocholesterin anteilmäßig in der Leber sehr stark vertreten (MAEDA et al., 2002; PARK u. ADDIS, 1985). Beim Erhitzen von Fetten entstehen vorrangig 7-Ketocholesterin und Epoxyde des Cholesterins. Dabei machen Cholestantriol, 7 α - und 7 β -Hydroxycholesterin nur einen geringen Anteil aus (PANIANGVAIT et al., 1995; OSADA et al., 1993). Die Absorption von COP ist mit der von nicht modifiziertem Cholesterin vergleichbar (LINSEISEN, 1998). Die Absorptionsrate von 7 β -Hydroxycholesterin ist bei Ratten größer als die von 7-Ketocholesterin und Cholestantriol (OSADA et al., 1994). Unter oxidativen Bedingungen dominieren *in vivo* die Derivate 7 β -Hydroxycholesterin, 25-Hydroxycholesterin, 7-Ketocholesterin und Cholestantriol (BREUER u. BJÖRKHEM, 1995; HODIS et al., 1992). Auf diesem Wege dienen sie als Marker der Lipidperoxidation. Für Oxysterole sind atherogene und zytotoxische Wirkungen beschrieben (SEVANI et al., 1995; AVIRAM, 1992). Folgen können veränderte Zusammensetzung und gestörte Funktion von Membranen sein (LINSEISEN u. WOLFRAM, 1998a, GUARDIOLA et al., 1996), wodurch es zur Beeinträchtigung der Aktivität membranständiger Enzyme kommen kann und zu Störungen in der Zell-Zell-Kommunikation (GUO et al., 1993).

In den eigenen Versuchen an Ratten und Meerschweinchen stellte sich nach Verzehr eines oxidierten Fettes eine Verdoppelung der Konzentration an 7 β -Hydroxycholesterin, 7-Ketocholesterin und Cholestantriol in der Leber heraus. Auch ARIYOSHI et al. (2002), BRANDSCH et al. (2002) und ADACHI et al. (2001) beobachteten unter oxidativer Belastung eine vermehrte Oxysterolbildung. BRANDSCH et al. (2002) führten dabei an, dass eine hohe Zufuhr von PUFA über die Diät die Oxysterolbildung stimuliere. Die verstärkte Lipidperoxidation der PUFA in der Leber würde deren Abbau und eine nicht-enzymatische Oxidation des Cholesterins nach sich ziehen. Die verabreichte Diät war jedoch in den eigenen Versuchen nicht reich an PUFA, da diese durch die thermische Behandlung abgebaut wurden. Außerdem kann der Prozess des Erhitzens eine Oxidation des Cholesterins im Fettgemisch bewirkt haben. Daher besteht die Möglichkeit, dass ein gewisser Anteil der COP in der Leber exogenen Ursprungs ist, zumal die Absorption der Oxysterole gleich der des Cholesterins ist (LINSEISEN u. WOLFRAM, 1998b).

Verschiedene Untersuchungen ergaben, dass eine Vitamin E-Supplementierung die nicht-enzymatische Bildung von COP in den Geweben verhindert (MCCLUSKEY et al., 1999; LINSEISEN, 1998; ENGETH et al., 1993; MONAHAN et al., 1990). In der vorliegenden Arbeit war dies nicht der Fall. Aus einer Studie von RINGSEIS u. EDER (2002) ging hervor, dass eine den Bedarf überschreitende Vitamin E-Supplementierung keine Reduktion der COP in der Leber bewirkte. Auch wenn die enzymatische Bildung von 7 β -Hydroxycholesterin und 7-Ketocholesterin in der Literatur sehr umstritten ist, so konnten MENDELSON et al. (1965) die Aktivität einer Cholesterin 7 β -Hydroxylase in der Rattenleber nachweisen. Infolge der Fütterung von thermisch behandeltem Fett beobachteten CHAO et al. (2001) sowie LIU u. CHANG (2000) eine Aktivitätssteigerung von Cytochrom P-450 in der Leber. Durch die Hydroxylierung des Cholesterins unter Verwendung des P-450-Systems entsteht 7 α -Hydroxycholesterin. SONG et al. (1996) berichteten über eine NADP-abhängige enzymatische Umformung von 7 α -Hydroxycholesterin zu 7-Ketocholesterin in Lebermikrosomen bei Hamstern.

Die Aussagen bezüglich einer vorbeugenden Wirkung von Vitamin C bei Lipidperoxidation sind sehr umstritten (SURESH et al., 1999; MAHFOUZ et al., 1997; FREYSCHUSS et al., 1997). Im Rahmen der Gallensäurebiosynthese ist die Ascorbinsäure für die 7 α -Hydroxylierung von Cholesterin erforderlich (GINTER et al., 1977). Jedoch zeigte sich in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss durch Vitamin C.

Zusammenfassend wäre festzuhalten, dass die verwendeten mäßig oxidierten Fette sowohl die Konzentration an TBARS als auch an COP erhöhten und somit oxidativen Stress induzierten. Eine höhere Vitamin E-Supplementierung setzte die Oxidationsempfindlichkeit in den untersuchten Organen herab. Indes übte das Vitamin E keinen Einfluss auf die Oxysterolbildung aus. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass der Effekt der Fettart auf eine gesteigerte Autoxidation bzw. nicht-enzymatische Oxidation des Cholesterins zurückzuführen ist. Vielmehr sollte der Aspekt des exogenen Ursprungs, aber auch die Möglichkeit einer enzymatischen Bildung von COP in Betracht gezogen werden.

Untersuchungen von VÁZQUEZ et al. (1998) ergaben, dass sich Ratte und Meerschweinchen im PUFA- und Gesamtlipidgehalt verschiedener Gewebe stark voneinander unterscheiden. Möglicherweise beruhen darauf auch die Konzentrationsunterschiede an TBARS und COP zwischen Ratten und Meerschweinchen in der vorliegenden Arbeit.

4.7 Hämolyseempfindlichkeit

Bedingt durch ihre Stoffwechselfunktionen sind Erythrozyten einem hohen Aufkommen an ROS ausgesetzt. Weitere Risiken stellen die Autoxidation des Hb und Fe dar sowie der hohe Anteil an membranständigen PUFA. Die Fütterung erhitzter Fettgemische verstärkt die oxidative Belastung der Erythrozyten. Inwieweit die vermehrt aufgenommenen Lipidperoxidationsprodukte die antioxidative Kapazität der Erythrozyten schwächen oder sogar oxidative Schäden verursachen, soll die Untersuchung der Hämolyseempfindlichkeit *in vitro* und *in vivo* klären.

4.7.1 Osmotische Hämolyseresistenz (*in vitro*)

Zur Aufrechterhaltung der normalen Zellform ist ein geringer osmotischer Überdruck (Turgor) im Erythrozyten erforderlich. Die dafür notwendigen Regulationsmechanismen, wie Ionenpumpen, sind in der Membran lokalisiert. Die Lipidperoxidation von PUFA und oxidative Proteinschädigungen an der Erythrozytenmembran beeinträchtigen deren Stabilität und Fluidität. Folge wäre eine Veränderung der Hämolyseempfindlichkeit des Erythrozyten. Die Bestimmung der osmotischen Resistenz von Erythrozyten in hypotonen Lösungen ist eine *in vitro*-Methode und lässt indirekt Rückschlüsse auf Membranveränderungen zu.

Der Anteil hämolysierter Erythrozyten stieg bei den Meerschweinchen, deren Diät erhitztes Fett enthielt, in hypotoner NaCl-Lösung (0,38%–0,41%) um das Doppelte bis 3fache an. Ähnliches berichteten HAY-AM et al. (1993), BEHNIWAL et al. (1991) sowie YOSHIDA u. KAJIMOTO (1989) bei der Verwendung stark oxidiertes Fett im Rattenversuch. In einem *in vitro*-Versuch erbrachte KUBOW (1993) den Beweis, dass Lipidperoxidationsprodukte die Hämolyse von Erythrozyten fördern. Andererseits konnten EDER (1999a) sowie EDER u. KIRCHGESSNER (1999) bei Ratten eine verminderte Hämolyseempfindlichkeit der Erythrozyten durch mäßig oxidiertes Fett belegen.

Im eigenen Meerschweinchenversuch verbesserte eine Vitamin E-Supplementierung die Hämolyseempfindlichkeit der Erythrozyten trotz Zufuhr von erhitztem Fett. Die Untersuchungen von BEHNIWAL et al. (1991) und YOSHIDA u. KAJIMOTO (1989) bestätigen die präventive Wirkung von Vitamin E in Bezug auf die Hämolyseempfindlichkeit unter prooxidativen Bedingungen. Oxidiertes Fett induzieren einen höheren Turnover des Vitamin E und führen somit zu dessen Verarmung im Organismus, wie gleichfalls von SANDERS (1989) beschrieben. Dieses Phänomen war auch in den Erythrozyten zu beobachten. Die verminderte Hämolyseempfindlichkeit bei den Meerschweinchen kann demnach eine Folgeerscheinung einer unzureichenden Vitamin E-Versorgung sein. KRAUS (1996) behauptet sogar, dass das Defizit an Vitamin E eine größere Bedeutung für die Hämolyseempfindlichkeit der Erythrozyten hat als die direkt toxische

Wirkung der Lipidperoxidationsprodukte der thermisch behandelten Fette. Als Membranbestandteil ist α -Tocopherol maßgebend an der Stabilität der Erythrozyten beteiligt und verhindert aktiv die Oxidation der Membranlipide. Somit schützt Vitamin E die Erythrozytenmembran vor oxidativen Strukturveränderungen und begünstigt dadurch die osmotische Hämolyseresistenz.

Interessant war, dass bei den Meerschweinchen eine hohe Vitamin C-Supplementierung die durch erhitztes Fett gesteigerte Hämolyse neigung wesentlich effektiver verminderte als eine hohe Vitamin E-Zulage. Auch in anderen Studien erzielte die Supplementierung von Vitamin C eine Verbesserung der osmotischen Resistenz von Erythrozyten (BEHNIWAL et al., 1991; NIKI et al., 1988; EINSELE et al., 1985). Jedoch gibt es auch gegenläufige Meinungen, die die Hämolyse-senkende Wirkung von Vitamin C bei Meerschweinchen nicht bestätigen (CHEN u. CHANG, 1978). Ein gegenseitiger Spareffekt der Vitamine E und C war nicht zu erkennen.

Die osmotische Resistenz der Erythrozyten ist auch abhängig von der Tierart. So sind die roten Blutzellen vom Meerschweinchen dem des Menschen am ähnlichsten (MARTIN et al., 1975). In einem Vergleich der Hämolyseresistenz unterschiedlicher Tierspezies stellte sich heraus, dass die Erythrozyten der Ratte beständiger gegenüber hämolytischen Einflüssen waren als die des Meerschweinchens (HABERMANN et al., 1981; MATSUZAWA u. IKARASHI, 1979). Dies dürfte auch erklären, warum bei Rattenversuchen teilweise eine verminderte Hämolyse neigung durch mäßig oxidierte Fette zu beobachten war (EDER, 1999a; EDER u. KIRCHGESSNER, 1999).

4.7.2 Hämolysemarker (*in vivo*)

Durch Hämolyse treten eine Vielzahl an unterschiedlichen Zellsubstraten aus den Erythrozyten ins Plasma über. Zu den nicht spezifischen Markern zählen die LDH und saure Phosphatase, weil sie in diversen Geweben vorkommen bzw. von diesen freigesetzt werden. Die LDH ist als Enzym der anaeroben Glykolyse in den Energiestoffwechsel des Erythrozyten integriert. Die saure Phosphatase katalysiert den Abbau von Makromolekülen im Lysosomen. Kalium und freies Hb hingegen sind spezifische Parameter für eine Hämolyse *in vivo*. Da die Kaliumkonzentration im Erythrozyten höher ist als im Plasma, steigt der Gehalt an Kalium bei vermehrter Hämolyse im Plasma an. Eine gewisse Konzentration an freiem Hb im Plasma resultiert aus der begrenzten Hb-Bindungskapazität des Haptoglobins.

Im Allgemeinen steht oxidativer Stress mit einer erhöhten Konzentration an Hämolysemarkern im Plasma miteinander in Verbindung (RAMACHANDRAN et al., 2002). Die Behandlung mit erhitzten Fetten im Rahmen dieser Studie äußerte sich weder bei den Ratten, noch bei den Meerschweinchen in einem

Anstieg der Aktivität bzw. Konzentration von Hämolysemarkern im Plasma. Die Fütterung der oxidierten Fette führte sogar z.T. zu einem Abfall der sauren Phosphataseaktivität und der Konzentration an freiem Hb gegenüber den Kontrollfetten. Wie bei ENGBERG u. BØRSTING (1994) und HARTFIEL u. OBERBACH (1990) war zu beobachten, dass der Effekt der Fettart abhängig von der Peroxidzahl war. Ein Fettgemisch mit hoher Peroxidzahl bewirkte eine geringere Enzymaktivität an saurer Phosphatase sowie geringere Konzentration an freiem Hb als ein Fettgemisch mit niedriger Peroxidzahl. Es kann festgehalten werden, dass die thermisch behandelten Fette in der vorliegenden Arbeit keine verstärkte Hämolyse *in vivo* verursachten und somit auch keine oxidativen Schäden erzeugten, gemessen an den Hämolysemarkern. Jedoch ist zu bedenken, dass die Aktivitätshemmung der sauren Phosphatase eine Störung des enzymatischen Abbaus von Makromolekülen und Organellen im Lysosom bewirken kann. Folge könnte z.B. eine Beeinträchtigung des Abwehrmechanismus gegenüber zellfremden Substanzen sowie auch modifizierten LDL sein.

Die Konzentration an Vitamin E und Vitamin C in der Diät übte wenig Einfluss auf die Parameter der Hämolyse aus, was auch PATERSON et al. (1994) sowie HARTFIEL u. OBERBACH (1990) bei ihren Untersuchungen vermerkten. Lediglich die Aktivität der sauren Phosphatase wurde bei höherer Vitamin E-Versorgung herabgesetzt. In einer Vitamin E-Mangelsituation könnte diese ansteigen (ARKHIPENKO et al., 1987).

4.7.3 Antioxidative Enzyme und Antioxidantien

Die Metabolisierung freier Radikale aus dem Plasma erfolgt zum größten Teil in den Erythrozyten. Die Erythrozytenmembran ist für H_2O_2 permeabel. Superoxidradikale passieren sie mit Hilfe von Anionenkanälen. Um solch eine Offensive adäquat abzuwehren, besitzen die Erythrozyten eine hohe antioxidative Kapazität. Die antioxidativen Enzyme sind aufgrund der fehlenden Zellorganellen wie Kern und Mitochondrien im Zytosol der roten Blutkörperchen lokalisiert. Daher ist im Erythrozyt nur die Cu,Zn-abhängige Form der SOD bestimmbar. Die G6PDH spielt wegen der fehlenden Mitochondrien eine zentrale Rolle im Erythrozytenstoffwechsel. Sie katalysiert im Hexosemonophosphatzyklus die Oxidation von Glukose-6-Phosphat, wobei Lacton und $NADPH+H^+$ entstehen. Diese Reaktion dient der Bereitstellung von Energie und gleichzeitig der Bildung von NADPH für die Regenerierung von GSH sowie Stabilisierung der Katalase. Ein wichtiges Schutzenzym ist auch die Se-haltige GSHPx, die mit Hilfe von GSH H_2O_2 sowie Hydroperoxide entgiftet. Das Redoxsystem des GSH ist in die Reduktion von MetHb zu funktionsfähigem Hb involviert und beugt somit präventiv Oxidationsschäden vor. Auch in der Erythrozytenmembran ist α -Tocopherol das wichtigste Antioxidans zum Schutz vor Lipidperoxidation der PUFA durch ROS.

Die Fütterung des erhitzten Fettgemisches führte weder bei Ratten noch bei Meerschweinchen zu einer signifikanten Aktivitätsänderung der Katalase und SOD. In der Tendenz wurde eine Aktivitätsverminderung der antioxidativen Enzyme beobachtet. Ursache der verminderten GSHPx-Aktivität könnte der Sekundäreffekt eines Se-Mangels sein, den oxidierte Fette induzieren können (NAKANE et al., 1998; WEISS et al., 1996; CHRISTENSEN u. BURGNER, 1992). Vermutlich beeinträchtigte die gesunkene Aktivität der G6PDH die Stabilisierung der Katalase, was zu deren geringfügigem Aktivitätsabfall führen konnte. Im Gegensatz dazu beschrieben HAYAM et al. (1995) eine Aktivitätssteigerung der antioxidativen Enzyme im Erythrozyten um das Doppelte aufgrund des Einsatzes von oxidiertem Fett in der Nahrung. Wobei zu beachten ist, dass bei der Untersuchung von HAYAM et al. (1995) weder die Futtermittelaufnahme noch die Fettsäurezusammensetzung sowie die Vitamin E-Konzentration der Diäten angeglichen wurden.

GSHPx und auch G6PDH sind eng mit dem Redoxsystem von GSH verbunden. Die Auswirkungen des oxidierten Fettes auf das Redoxsystem von GSH waren signifikant. Sowohl bei Ratten als auch bei Meerschweinchen wurde nach Fütterung des oxidierten Fettes eine deutlich geringere Konzentration an GSH, GSSG und GSH_{red} gemessen, die auf einen höheren GSH-Verbrauch hindeutet. Die Verarmung an GSH verschiebt das Gleichgewicht von anti- und prooxidativen Prozessen zugunsten der prooxidativen Seite. Dieser Zustand wird als oxidativer Stress bezeichnet (HALLIWELL et al., 1992; SIES, 1994).

Die Vitaminsupplementierung im Meerschweinchenversuch zeigte, außer bei der Katalase, keine Auswirkungen auf die Enzymaktivitäten sowie die Konzentration an GSH und seinen Derivaten. In einer Humanstudie von LACHILI et al. (2001) waren ebenfalls keine signifikanten Veränderungen der antioxidativen Metalloenzyme trotz Supplementierung von Vitamin C in den Erythrozyten zu erkennen. In der vorliegenden Arbeit steigerte eine hohe Vitamin C-Supplementierung die Katalaseaktivität der Meerschweinchen, deren Diät oxidiertes Fett und eine geringe Vitamin E-Zulage enthielt. Anhand von Zellversuchen konnte bewiesen werden, dass mit steigender Ascorbat-Zufuhr die Katalaseaktivität steigt (NEMOTO, 1996a, 1996b), um die vermehrte Bildung von H₂O₂ aus der Autoxidation des Ascorbates abzuwehren. Der Transport des Vitamin C durch die Erythrozytenmembran vollzieht sich in Form von Dehydroascorbat. Intrazellulär erfolgt eine Reduzierung zu Ascorbat über NADH- und GSH-abhängige Dehydroascorbat-Reduktasen (DIPLOCK, 1994; EINSELE et al., 1985).

Die in der Literatur diskutierte Abhängigkeit der GSHPx-Aktivität von der Vitamin E-Versorgung (MARCUS et al., 1993; HUANG u. SHAW, 1994) bestätigte sich in der vorliegenden Arbeit nicht. LI et al. (1998) entdeckten in Erythrozyten eine positive Korrelation zwischen steigendem Vitamin E-Gehalt der Diät und der Konzentration an GSH_{red} sowie eine negative Korrelation zu der Konzentration an GSSG. MEISTER (1994a, 1992) und JAIN et al. (1992) schreiben Vitamin C sogar einen GSH-Spareffekt zu.

Infolge der Zufuhr von thermisch behandeltem Fett fiel die α -Tocopherolkonzentration in den Erythrozyten der Meerschweinchen um 80% ab. Eine höhere Vitamin C-Supplementierung bewirkte bei niedriger sowie hoher Vitamin E-Versorgung eine signifikante Verbesserung des α -Tocopherolstatus. Gleichzeitig belegt die Interaktion zwischen den Vitaminen E und C den Vitamin E-Spareffekt des Vitamin C *in vivo*, der auch schon für Leber und Abdominalfett beschrieben wurde. Eine hohe Vitamin E-Zulage in der Diät kompensierte gleichfalls das durch erhitztes Fett induzierte Vitamin E-Defizit und verbesserte somit den Status an α -Tocopherol in den Erythrozyten. Diese Aussage deckt sich mit den Erkenntnissen von LUBRANO et al. (1989), ELMADFA et al. (1988) und D'AQUINO et al. (1985). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind ein weiterer Beweis für den Synergismus zwischen Vitamin E und Vitamin C *in vivo*.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Hämolyse neigung nach Verzehr von oxidiertem Fett *in vitro* gestiegen war, was vermutlich auf die verminderte α -Tocopherolkonzentration in den Erythrozyten zurückzuführen sein dürfte. Die Supplementierung von Vitamine E oder Vitamin C verbesserte signifikant die Hämolyseresistenz unter prooxidativen Bedingungen und stärkte damit die Membranstabilität der Erythrozyten. Auch wenn Vitamin C in der Literatur bezüglich des Membranschutzes kontrovers diskutiert wird, so fängt es in hydrophilem Milieu (Plasma) bspw. Superoxid-, Hydroxyl- und Peroxylradikale ab und regeneriert α -Tocopherol. Dadurch sinkt die oxidative Belastung auf die Erythrozytenmembran und der Verbrauch an α -Tocopherol geht ebenfalls zurück. Diese Aussage bestätigte der signifikante Spareffekt von Vitamin E durch Vitamin C in den Erythrozyten. Weder bei den Ratten, noch bei den Meerschweinchen wurden wesentliche Veränderungen in den Enzymaktivitäten oder Konzentrationen der Hämolysemarker beobachtet, unabhängig von den Supplementierungen der Vitamine E und C. Demnach induzierten die verschiedenen oxidierten Fette keine Hämolyse *in vivo*. Anhand der analysierten Parameter kann davon ausgegangen werden, dass die Lipidperoxidationsprodukte der thermisch behandelten Fette keinen massiven oxidativen Stress in den Erythrozyten provozierten.

4.8 Lipoproteine

Bei der thermischen Behandlung von Fetten entsteht eine Vielzahl an Peroxidationsprodukten der Fettsäuren, des Cholesterins und der Triglyzeride, die atherogen wirken können (COHN, 2002; PENUMET-CHA et al., 2000). Für die Bewertung bzw. Einschätzung eines atherogenen Risikos werden unter anderem die Cholesterinkonzentrationen im Serum bzw. in den Lipoproteinen herangezogen. Von besonderem Interesse sind dabei die LDL. Die Charakterisierung der LDL anhand der Oxidationsempfindlichkeit, des Antioxidantienstatus, der Apolipoprotein- sowie Fettsäurezusammensetzung und der Scavenger-Rezeptor-vermittelten Aufnahme in Makrophagen läßt Rückschlüsse auf eine oxidative Modifikation der LDL zu.

4.8.1 Cholesterin und Triglyzeride

Der Transport von Cholesterin und Triglyzeriden im Organismus erfolgt mittels Lipoproteine. Jedoch variieren die Lipoproteinprofile der einzelnen Spezies untereinander (CHAPMAN, 1980). Bei Ratten ist HDL die dominante Lipoproteinklasse im Serum (NICHOLS, 1967). Bei Meerschweinchen hingegen liegt der größte Anteil des Cholesterins im LDL vor (CHAPMAN, 1980), ähnlich wie im Humanserum (FERNANDEZ, 2001). Daher sind Meerschweinchen geeignetere Modelltiere, um den Einfluss von Nahrungsfetten auf den Lipoproteinmetabolismus des Menschen zu untersuchen (VÁZQUEZ et al., 1998 u. 1997). Triglyzeride spielen in der vorliegenden Arbeit eine untergeordnete Rolle.

Die Untersuchung zum Einfluss von oxidierten Fetten auf die Cholesterinkonzentration im Plasma ließ bei den Ratten keine einheitlichen Effekte erkennen. Während im 1. Versuchsansatz keine Wirkung nachzuweisen war, wurde im 2. Ansatz eine Senkung um 15% ermittelt. Diese Diskrepanz wird auch in der Literatur kontrovers diskutiert. Während einige Arbeitsgruppen eine Senkung der Cholesterinkonzentration im Plasma von Ratten nach Fütterung oxidierter Fette feststellten (EDER u. STANGL, 2000; EDER, 1999b), konnten andere keine Effekte zeigen (AMMOUCHE et al., 2002; KHAN-MERCHANT et al., 2002; STAPRĀNS et al., 1996). Bei dem eigenen Meerschweinchenversuch wurde im Vergleich zur Literatur keine signifikante Wirkung von oxidiertem Fett auf die Cholesterinkonzentration im Plasma nachgewiesen. LIU u. LEE (1998) beobachteten bei Meerschweinchen einen Anstieg der Cholesterinwerte im Plasma, ebenso wie HOCHGRAF et al. (1997) bei Ratten.

Im 1. Rattenversuch erhöhte sich vor allem nach Zufuhr der Fette Ox2 und Ox3, die einen mittleren bis geringen Anteil an primären Lipidperoxidationsprodukten aufwiesen, die Cholesterinkonzentration in den HDL und LDL. Bei den Ratten war besonders auffällig, dass sich die Cholesterinkonzentration der VLDL im Versuch 1 um 70% und im Versuch 2 sogar um 80% verringerte, infolge der Fütterung oxidierter

Fette. Anders bei den Meerschweinchen, wo die Verwendung von erhitztem Diätfett zu einer signifikanten Absenkung des Cholesterins in den LDL führte.

Um besser abschätzen zu können, ob oxidierte Lipidgemische das atherogene Risiko bezüglich der Cholesterinverteilung in den Lipoproteinen erhöhen, wurde der Quotient aus Gesamtcholesterin und HDL-Cholesterin gebildet. Dabei war zu erkennen, dass oxidierte Fette das Verhältnis von Gesamtcholesterin zu HDL-Cholesterin bei Ratten verändern, aufgrund des höheren Anteil an HDL im Serum bzw. Plasma. Das gleiche zeichnete sich auch bei den Meerschweinchen ab.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Vitamin E einen Einfluss auf die Cholesterinbiosynthese ausübt, unabhängig von seiner antioxidativen Eigenschaft. Die α -Tocopherolkonzentration reguliert unter anderem die Expression des α -Tocopherol-Transfer-Proteins und α -Tocopherol-assoziierten Proteins, wodurch es zur Beeinflussung der Cholesterinhomöostase kommt (PORTER, 2003; ARITA, 1997). Dies ist ein möglicher Ansatz, um den signifikanten Effekt der Vitamin E-Supplementierung auf den Cholesteringehalt des Plasmas sowie einzelner Lipoproteinfraktionen der verwendeten Versuchstiere zu erklären. Aufgrund der Vitamin E-Zulage in der Meerschweinchendiät verkleinerte sich der Quotient zwischen Gesamtcholesterin im Plasma und der Cholesterinkonzentration in den HDL.

Bei den Meerschweinchen unterstützt die Interaktion zwischen Vitamin E und Vitamin C in Bezug auf die erhöhte HDL-Cholesterinkonzentration die Hypothese einer präventiven Wirkung beider Vitamine gegenüber koronaren Herzerkrankungen. Humanstudien ergaben, dass eine positive Korrelation zwischen dem Ascorbinsäurestatus und der HDL-Cholesterinkonzentration im Plasma besteht (LANGLOIS et al., 2001; SIMON u. HUDES, 1998). LANGLOIS et al. (2001) entdeckten, dass der Ascorbinsäurelevel im Serum einzig und allein mit dem HDL-Cholesterin korreliert und mit keinem anderen Lipoprotein. Dieser positive Effekt spiegelt sich auch im Verhältnis von Gesamt- zu HDL-Cholesterin wieder. Mit vermehrter Zufuhr von Vitamin E und Vitamin C wird der Quotient kleiner.

Unter Berücksichtigung des Quotienten Gesamtcholesterin/HDL-Cholesterin erhöhten oxidierte Fette das atherogene Risiko nicht, wie auch andere Arbeitsgruppen zeigten (KHAN-MERCHANT et al., 2002; JETHMALANI et al., 1989). Jedoch ist davon Abstand zu halten, die Effekte als präventiv zu bezeichnen. Der eindeutige Eingriff in die Cholesterinhomöostase infolge der Fütterung thermisch behandelte Lipide ist unabhängig von der spezifischen Lipoproteinverteilung der beiden Spezies.

Im Ergebnis der vorliegenden Arbeit wurde für oxidierte Fette eine Triglyzerid-senkende Wirkung in den Lipoproteinen von Ratten nachgewiesen (AMMOUCHE et al., 2002; EDER, 1999b). Jedoch ist dieser Punkt nach wie vor sehr strittig, da sich in anderen Versuchen keine oder sogar eine Triglyzerid-steigernde Wirkung von erhitzten Fetten zeigte (KHAN-MERCHANT et al., 2002; HAYAM et al., 1995). Bei den Meerschweinchen beeinflusste das oxidierte Fett die Triglyzeridkonzentration nicht, was vermutlich auf den Speziesunterschied im Lipidstoffwechsel zurückzuführen ist. Da erhitzte Fette insgesamt in der vorliegenden Arbeit die Triglyzeridkonzentration im Serum bzw. Plasma sowie in den Lipoproteinen nicht verändern oder sogar senken, fördern sie keine Hyperlipidämie, die ein Risikofaktor für koronare Herzerkrankungen darstellt.

Jedoch ist zu bedenken, dass es infolge der oxidierten Lipide im Futter zu einer drastischen Senkung der Cholesterin- und Triglyzeridwerte in der Leber kam, was ein Anzeichen für eine verminderte Cholesterinbiosynthese sein könnte. Da in der Leber eine vermehrte Oxysterolbildung nach Verzehr von oxidierten Fetten auftrat, könnten diese möglicherweise die Cholesterinbiosynthese hemmen. Eine *in vivo*-Studie von SAUCIER et al. (1989) zeigte, dass Oxysterole über Oxysterol-bindende Proteine die HMG CoA Reduktase runter regulieren. Die Folgen solch einer Hemmung würden sich wahrscheinlich auf den Plasmacholesterinspiegel niederschlagen. Auch die erst kürzlich erschienenen Arbeiten von EDER et al. (2003) und ŠKUFCÁ (2002) belegten eine Triglyzerid-senkende Wirkung von thermisch behandelten Lipidgemischen, was ebenfalls auf einen veränderten Lipidstoffwechsel hindeutet.

4.8.2 Charakterisierung der LDL

Bei der *in vivo*-Oxidation von LDL wird in erster Linie die Rolle der Sauerstoffradikale diskutiert, da sie als Entzündungsmediatoren eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Arteriosklerose spielen (COHN, 2002; PENUMETCHA et al., 2000; NAVAB et al., 1996). Peroxylradikale, Superoxidradikale, Hydroxylradikale, Hydroperoxylradikale und H_2O_2 greifen fast alle Makromoleküle an, wie Proteine, Amino- und Fettsäuren, infolgedessen auch Biomembranen. Den Mechanismus der LDL-Oxidation durch ROS beschrieben NAVAB et al. (2000a, 2000b) in einem 3-stufigem Modell. Die wesentlichen Schritte sind 1. Anregung der LDL durch ROS, 2. deren Akkumulation im subendothelialen Raum, was 3. die nicht-enzymatische Oxidation der LDL in den Zellen der Arterienwand induziert. Dies führt zu Kettenreaktionen, die in der Fragmentierung von Apoproteinen und Bildung von Oxysterolen sowie konjugierten Dienen aus PUFA enden. Zahlreiche Tier- sowie Humanstudien belegen eine enge Korrelation zwischen oxidierten LDL und Arteriosklerose (LIZARD et al., 1999; ZIEDÉN, et al., 1999; JIALAL u. DEVARAJ; 1996). Um das atherogene Risiko thermisch veränderter Fette einschätzen zu können, erfolgte eine Charakterisierung der LDL anhand verschiedener Parameter. Aufschluss über eine mögliche Modi-

fikation der LDL geben die Oxidationsstabilität *in vitro*, der α -Tocopherolstatus, das Fettsäurenmuster, die Zusammensetzung der Apoproteine sowie die Rezeptor-vermittelte Aufnahme in Makrophagen (ESTERBAUER et al., 1990).

In beiden Versuchen verkürzte die Fütterung moderat oxidierter Fette die Lag-Time der LDL, während eine Supplementierung von Vitamin E und/oder Vitamin C sie verlängerte. Gleiches beobachteten EDER u. KIRCHGESSNER (1999). Beim Vergleich des oxidativen Verhaltens der LDL von Ratte und Meerschweinchen erkannte VÁZQUEZ et al. (1998, 1997), dass eine größere Ähnlichkeit in der LDL-Zusammensetzung zwischen Meerschweinchen und Mensch besteht als zwischen Meerschweinchen und Ratte. Deshalb war für Rückschlüsse auf die Oxidationsstabilität der humanen LDL das Meerschweinchen als Modelltier besser geeignet. Die in beiden Versuchen durch höhere Supplementierung von Vitamin E und/oder Vitamin C unter oxidativen Bedingungen bedingte Verlängerung der Lag-Time deutete auf eine Verbesserung der Oxidationsstabilität von LDL hin. Zurückzuführen ist dies zum einen auf eine Erhöhung des α -Tocopherolstatus durch die Supplementierung von Vitamin E bei den Ratten, wie auch von EDER u. KIRCHGESSNER (1997) sowie ESTERBAUER et al. (1991) berichtet. Zum anderen verlängerte eine hohe Zufuhr von Vitamin E und Vitamin C bei den Meerschweinchen die Lag-Time der LDL um den Faktor 2. Durch die Abwehr von ROS im hydrophilen Plasma intensiviert Vitamin C möglicherweise die antioxidative Wirkung von Vitamin E in den LDL. Einen bestehenden Synergismus zwischen Vitamin E und C beschrieben auch LIU u. LEE (1998) in ihrer Arbeit.

Im Rattenversuch reduzierte die Fütterung von thermisch behandelten Lipidgemischen den Anteil an C18:2 in den LDL gegenüber der Kontrollgruppe. Durch die niedrigere Konzentration an C18:2 in den LDL der Tiere, deren Diät oxidiertes Fett enthielt, wurde eine verminderte Dienbildung bei der Cu-induzierten *in vitro*-Oxidation gemessen. Im weiteren Fortgang führte dies bei niedriger Vitamin E-Versorgung zu einer geringeren Produktionsrate und maximalen Konzentration an konjugierten Dienen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Da bei den Meerschweinchen das oxidierte Fett keinen Einfluss auf den Anteil an C18:2 in den LDL ausübte, war die Ausgangskonzentration an konjugierten Dienen bei allen Tieren gleich. Es ist festzuhalten, dass die Konzentration an Dienen sowie deren Bildung in den LDL abhängig vom Anteil an PUFA und insbesondere an C18:2 war. Die Untersuchung von STAPRÄNS et al. (1994) bestätigte diese Aussage.

Vitamin E bewirkte in beiden Versuchen eine Senkung der Produktionsrate sowie der maximalen Konzentration an Dienen, was wahrscheinlich auf der höheren α -Tocopherolkonzentration in den LDL infolge einer Vitamin E-Supplementierung beruht.

Aus der Betrachtung des Fettsäurenmusters der LDL ging hervor, dass das Fettgemisch Ox1, dessen Oxidation bei 50°C verlief, die bereits erwähnte Verminderung der Linolsäurekonzentration am stärks-

ten induzierte. Die Konzentration von C18:2 sank um 20%, was auf einen vermehrten oxidativen Abbau durch primäre Lipidperoxidationsprodukte hinweisen könnte. Auch lässt sich dadurch erklären, warum allein bei Fütterung von Ox1 der Anteil an PUFA in den LDL signifikant geringer war als bei den Kontrolltieren. Während einer Humanstudie von STAPRÄNS et al. (1994) stieg nach Verzehr von erhitzten Fetten, die bei geringer, mittlerer und hoher Temperatur oxidiert wurden, ebenfalls die Oxidationsempfindlichkeit der Chylomikronen *in vitro* aller Probanden gegenüber der Kontrolle an. Jedoch sank hierbei signifikant die C18:2-Konzentration der Chylomikronen infolge des Verzehrs von hoch erhitztem Fett. STAPRÄNS et al. (1994) wertet dies als Beleg für die Absorption und Inkorporation von oxidierten Fetten in die Chylomikronen sowie den gesamten Organismus.

Auch die Fettsäurezusammensetzung der LDL spiegelte den Speziesunterschied zwischen Ratte und Meerschweinchen wieder. Bei VÁZQUEZ et al. (1998) war nachzulesen, dass Meerschweinchen einen doppelt so großen Anteil an C18:2 und einen um den Faktor 4 kleineren Anteil an C20:4 in den LDL aufweisen als Ratten. Diese Aussage deckte sich mit den eigenen Ergebnissen.

Die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von LDL in Makrophagen diene der Erfassung von modifizierten LDL. Die Zelllinie J-774A.1 bildet LDL- sowie Scavenger-Rezeptoren aus und ist folglich zur Aufnahme von nativen und oxidierten LDL befähigt (HALVORSEN et al., 1998; RUMSEY et al., 1995). Die Summe der totalen Aufnahme der LDL durch die Makrophagen war vergleichbar mit der von anderen ermittelten (HALVORSEN et al., 1998). Die Polyinosinsäure, als Inhibitor der Scavenger-Rezeptor vermittelten Aufnahme, gewährleistete die Erfassung beider Modifikationsformen von LDL, der acetylierten sowie oxidierten (SPARROW et al., 1989). Da die Inkubation von J-774A.1 mit markierten LDL in Gegenwart von Polyinosinsäure nicht die Summe der von den Zellen aufgenommenen markierten LDL reduzierte, waren keine messbaren modifizierten LDL in den präparierten LDL präsent gewesen. XING et al. (1998) beschrieben eine mehr als 30%ige Scavenger-Rezeptor vermittelte Aufnahme von LDL durch Makrophagen, jedoch nur wenn die LDL zuvor mit Cu-Ionen oxidiert oder die Monozyten stimuliert wurden. Bei beiden Gruppen der eigenen Studie wurde die Aufnahme der markierten LDL in Gegenwart von Heparin massiv gehemmt. Die LDL wurden nur noch zu 50% durch die spezifische vom LDL-Rezeptor vermittelte Endozytose aufgenommen. Es kann davon ausgegangen werden, dass im Rahmen der angewandten Methoden keine messbare Konzentration an modifizierten LDL vorhanden war.

Einige Lipidperoxidationsprodukte, wie Aldehyde, reagieren bevorzugt mit den Lipoproteinen der LDL. Zum einen kommt es direkt zur oxidativen Spaltung der Peptidbindungen und zum anderen reagieren Lipidperoxidationsprodukte mit freien Aminogruppen von Apo B, wobei sie Atombindungen eingehen (XING et al., 1998). Die Fragmentierung des Apoproteins B-100 verändert die spezifische Bindungsstel-

le der LDL, wodurch die Bindung an den LDL-Rezeptor gehemmt ist (ESTERBAUER et al., 1991). Eine fortschreitende Oxidation des Apoproteins führt zum Verlust von spezifischen Aminosäuren und steigert die Elektronegativität der LDL (CHANG et al., 1997). Folge ist eine veränderte Lipoproteinzusammensetzung der LDL.

Die eigene Untersuchung der Apolipoproteinzusammensetzung erbrachte, dass durch die Fütterung eines erhitzten Fettes keine mittels SDS-PAGE erfassbare oxidative Modifikation des Apo B der LDL *in vivo* statt fand. In anderen Studien, wo die Ratten erhöhtem oxidativem Stress ausgesetzt waren, wurde eine abnormale Lipoproteinzusammensetzung detektiert. BRUNET et al. (1999) beschrieben eine Reduktion der Apo B-Proteinkonzentration in den LDL bei Fe-belasteten Ratten. Bei besonders massivem Mangel an Vitamin E oder Vitamin C bzw. beider Vitamine beobachteten KAMIYAM et al. (2002) einen Konzentrationsanstieg an Apolipoprotein B in den LDL von Ratten.

Unter Berücksichtigung aller bestimmten Parameter konnte durch Fütterung oxidiertes Lipidgemische kein erhöhtes atherogenes Risiko festgestellt werden. Jedoch ist zu bedenken, dass bereits der Verzehr von oxidierten Fetten über einen kurzen Zeitraum die Oxidationsresistenz *in vitro* sowie den α -Tocopherolstatus der LDL signifikant herabsetzte.

Eine Supplementierung von Vitamin E und/oder Vitamin C bewirkte eine wesentliche Verbesserung der Oxidationsstabilität der LDL unter oxidativen Bedingungen und reduzierte somit das atherogene Risiko von Lipidperoxidationsprodukten.

5 Zusammenfassung

Viele unserer täglich verzehrten Lebensmittel werden im industriellen Produktionsprozess einer thermischen Behandlung unterzogen. Dabei kann es zur Autoxidation der Lipide kommen, wodurch eine Vielzahl an reaktiven Lipidperoxidationsprodukten entsteht. Frühere Untersuchungen zeigten, dass Lipidperoxidationsprodukte die nutritiven Eigenschaften von Fetten negativ beeinflussen. Aus Humanstudien ist bekannt, dass nach Verzehr thermisch behandelter Fette die Konzentration von Lipidperoxidationsprodukten im Plasma ansteigt, was zur Induzierung von oxidativem Stress führen kann. Zum Schutz vor physiologischen Schäden durch oxidativen Stress besitzt der Organismus mehrere Abwehrmechanismen, zu denen auch Antioxidantien (Vitamin E, Vitamin C, Glutathion) und antioxidative Enzyme (Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase) gehören. Die Aufgabe des antioxidativen Schutzsystems besteht darin, radikalische Kettenreaktionen abubrechen. Bislang ist noch nicht eindeutig geklärt, welche Produkte der Lipidperoxidation, primäre oder eher sekundäre, eine stärkere Beeinträchtigung des antioxidativen Schutzmechanismus hervorrufen.

Jedoch bergen Versuche mit thermisch behandelten Fetten methodische Probleme in sich. Die veränderten sensorischen Eigenschaften von erhitzten Fetten führen oftmals zu unterschiedlichen Futteraufnahmen bei den Versuchstieren. Durch den Abbau von ungesättigten Fettsäuren und nativen Antioxidantien während der thermischen Behandlung von Fetten treten Veränderungen in Fettsäuremuster und Vitamin E-Konzentration auf. Folgen sind eine geringere Energie- und Nährstoffzufuhr. Demnach wären die beobachteten Effekte nicht allein auf den Verzehr von oxidierten Fetten zurückzuführen.

Das Ziel der Arbeit bestand darin, die Wirkungen verschiedener moderat oxidierten Fette auf das antioxidative Schutzsystem am Modelltier Ratte und Meerschweinchen zu untersuchen. Zum einen sollte geprüft werden, inwieweit die Konzentration an primären und sekundären Oxidationsprodukten Einfluss ausübt, zum anderen, ob eine erhöhte Konzentration an den Vitaminen E und C in der Diät die Abwehr von Lipidperoxidationsprodukten unterstützt. Um methodische Probleme auszuschließen, wurden in der vorliegenden Arbeit das Fettsäuremuster und die Vitamin E-Konzentration aller Diätfette angeglichen und die Tiere restriktiv gefüttert. Somit können alle beobachteten Effekte direkt auf die Einflussfaktoren bezogen werden.

Es wurden zwei Versuche mit wachsenden männlichen Sprague Dawley Ratten und ein Versuch mit wachsenden männlichen Dunkin Hartley Meerschweinchen durchgeführt. Im 1. Rattenversuch mit 80 Tieren wurden drei erhitzte Fettgemische als Teil einer semisynthetischen Diät gefüttert, die sich deutlich in den Konzentrationen an primären Lipidperoxidationsprodukten voneinander unterschieden (Peroxidzahl: 1.Diät: 920 mEq O₂/kg; 2.Diät: 230 mEq O₂/kg; 3.Diät: 38 mEq O₂/kg). Das erste Gemisch aus

Sonnenblumenöl und Schweineschmalz (50:50; w/w) wurde bei 50°C über 38 d, das zweite bei 105°C über 81 h und das dritte bei 190°C über 24 h erhitzt. Gleichzeitig sollte die Wirkung von zwei verschiedenen Vitamin E-Versorgungsstufen untersucht werden (25 α -TÄ/kg Diät vs. 250 α -TÄ/kg Diät). Um die Effekte primärer Oxidationsprodukte genauer erfassen zu können, wurde für den 2. Rattenversuch (n=20 Tiere) und den Meerschweinchenversuch (n=50 Tiere) ein 4. Fettgemisch bei 55°C über 49 d oxidiert (Peroxidzahl: 1.400 mEq O₂/kg). Im 2. Rattenversuch sollte geklärt werden, ob oxidierte Fette eine Modifikation der LDL *in vivo* provozieren, wodurch bei Makrophagen ein Anstieg in der Scavenger-Rezeptor vermittelten Aufnahme von LDL zu erwarten wäre. Der Meerschweinchenversuch diente vor allem der Analyse des Synergismus zwischen Vitamin E und Vitamin C unter oxidativer Belastung (35 bzw. 175 α -TÄ/kg Diät mit 300 bzw. 1.000 mg Ascorbinsäure/kg Diät).

Um die Wirkungen oxidiertes Fette auf das antioxidative Schutzsystem zu untersuchen, wurde erstens der Status an Antioxidantien (α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Harnsäure, Glutathion) und zweitens die Aktivität der antioxidativen Enzyme in verschiedenen Geweben ermittelt. Die Konzentrationsbestimmung an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) und Cholesterinoxidationsprodukte (COP) gab Auskunft über eine mögliche Anreicherung von Lipidperoxidationsprodukten im Körper sowie eine Induzierung von oxidativem Stress. Die Bestimmung der Hämolyseempfindlichkeit und die Charakterisierung der Lipoproteine sollten zeigen, ob eine oxidative Belastung weitreichendere physiologische Veränderungen nach sich zieht.

Die restriktive Fütterung oxidiertes Fettgemische führte bei bedarfsdeckender Vitamin E-Versorgung zu keinen wesentlichen Gruppenunterschieden in der Lebendmasseentwicklung von Ratten und Meerschweinchen. An den Tieren wurden keine toxischen Symptome beobachtet. Jedoch kam es zur Zunahme der relativen Lebermasse bei Ratten und Meerschweinchen, die das Diätfett mit dem größten Anteil an primären Lipidperoxidationsprodukten (4. Diät 1.400 mEq O₂/kg) verzehrten.

Die thermisch behandelten Fette verminderten die Konzentration der Antioxidantien (α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Harnsäure) in allen untersuchten Geweben und bewirkten Veränderungen im Redoxsystem von Glutathion bei Ratten und Meerschweinchen. Eine höhere Supplementierung von Vitamin E verbesserte den α -Tocopherol- und Ascorbinsäurestatus in den analysierten Organen. Gleiches konnte im Meerschweinchenversuch bei einer gesteigerten Vitamin C-Zufuhr beobachtet werden.

Die Vitamin E-Verdaulichkeit der Ratten und Meerschweinchen verschlechterte sich in Abhängigkeit des Oxidationsgrades der Diätfette. Je höher der Anteil an primären Lipidperoxidationsprodukten im Diätfett

war, um so höher war auch die Verdaulichkeit von Vitamin E. Die Supplementierung mit Vitamin E und Vitamin C übten keinen Einfluss auf die Vitamin E-Verdaulichkeit aus.

Die Aktivitäten der antioxidativen Enzyme wurden in den Versuchen nur geringfügig durch erhitzte Fette modifiziert. Eine Ausnahme bildete dabei die Katalase, deren Aktivität nach Fütterung erhitzter Fette signifikant erhöht war.

Der Verzehr oxidierter Fettgemische führte zum Konzentrationsanstieg der Lipidperoxidationsprodukte (TBARS, COP) in Leber und Plasma beider Tierspezies. Eine höhere Vitamin E-Versorgung verminderte die Konzentration an TBARS, aber nicht die an COP.

Zwar bewirkte die Fütterung thermisch behandelter Fettgemische bei den Meerschweinchen eine verstärkte Hämolyse neigung der Erythrozyten *in vitro* aber nicht *in vivo*: Die Hämolysemarker im Plasma waren weder bei Ratten noch bei Meerschweinchen wesentlich verändert. Mit hoher Vitamin E- und/oder Vitamin C-Zulage in der Diät verbesserte sich die *in vitro* Hämolyseresistenz der Erythrozyten von Meerschweinchen.

Infolge der Fütterung erhitzter Fette stieg die Cholesterinkonzentration in den HDL signifikant bei beiden Spezies an. Zudem war ein Abfall der Cholesterinkonzentration in den VLDL der Ratten und in den LDL der Meerschweinchen zu beobachten. Auch die Triglyzeride waren nach Verzehr von oxidierten Fettgemischen vermindert. Eine erhöhte Supplementierung von Vitamin E bewirkte einen Konzentrationsanstieg von Cholesterin in den LDL sowie VLDL der Ratten und in den HDL der Meerschweinchen. Die Fütterung von oxidierten Fetten senkte die Cholesterin- und Triglyzeridkonzentration in der Leber unabhängig von der Versorgung mit den Vitaminen E und C.

Die Oxidationsempfindlichkeit der LDL *in vitro* war nach Verzehr oxidierter Fette bei Ratten und Meerschweinchen erhöht. Eine erhöhte Zulage an Vitamin E und/oder Vitamin C verbesserte die Oxidationsstabilität der LDL. Es konnten *in vivo* keine wesentlichen Veränderungen im Fettsäuremuster oder in der Zusammensetzung der Apolipoproteine der LDL nach Fütterung thermisch behandelter Fettgemische festgestellt werden. Auch bei der Rezeptor-vermittelten Aufnahme von fluoreszenz-markierten LDL in Makrophagen traten keine Unterschiede zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe auf.

Gestützt auf die eigenen Resultate und deren Vergleich mit den Erkenntnissen aus jüngsten Studien kann zusammenfassend gesagt werden, dass die Abwehr der vermehrt zugeführten Lipidperoxidationsprodukte vorrangig über die Antioxidantien erfolgte. Eine Stimulation der Aktivität antioxidativ wirksamer Enzyme durch oxidierte Fette trat kaum auf. Gleichzeitig induzierten erhitzte Fette oxidativen Stress durch die vermehrte Genese von Lipidperoxidationsprodukten (TBARS, COP) im Organismus, die zum Teil für den Verbrauch von Antioxidantien (α -Tocopherol, Ascorbinsäure, GSH, Harnsäure) mitverantwortlich waren.

Es wurde keine weitere oxidative Schädigung bezüglich einer verstärkten Hämolyse *in vivo* festgestellt. Eine Modifikation der LDL *in vivo* durch oxidierte Fette konnte nicht nachgewiesen werden. Auch erhöhten die thermisch behandelten Fette das atherogene Risiko bezüglich der Cholesterinverteilung in den Plasma-Lipoproteinen nicht, zumal sie sogar die Cholesterinkonzentration der HDL steigerten. Allein die verminderte α -Tocopherolkonzentration in den Geweben nach Verzehr oxidierter Fette setzte die Hämolyseresistenz der Erythrozyten und die Oxidationsstabilität der LDL *in vitro* herab.

Die höhere Supplementierung von Vitamin E und Vitamin C verminderte die oxidative Belastung von thermisch behandelten Fetten. Ein wechselseitiger Spareffekt zwischen den Vitaminen E und C bestätigte deren Synergismus *in vivo*.

Die Effekte der verschiedenen moderat oxidierten Fette waren zum größten Teil unabhängig von der Konzentration an primären und sekundären Lipidperoxidationsprodukten. Somit war der Einfluss von Fetten, die bei niedriger Temperatur erhitzt wurden, gleich dem der Fette, die bei hohen Temperaturen erhitzt wurden.

Summary

Owing to the popularity of fried foods and wide fast food industry, the typical western diet contains large quantities of oxidised fat. Primary and secondary autoxidation products of polyunsaturated fatty acids as a component of fried foods affect the antioxidant status and promote lipid peroxidation in tissues. Accumulating evidence suggests that oxidised fats and lipid oxidation products in the diet can also contribute to the pathogenesis of atherosclerosis. In view of the potential adverse effects of lipid peroxidation products, a number of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathionperoxidase) and antioxidants (vitamin E, vitamin C, glutathion) present in the cell are able to protect from oxidative damages.

The main objective of this study, was to investigate the effect of moderate thermoxidised fats on the cellular antioxidant defence system. Moreover, the effect of heated fat in interaction with antioxidants (vitamin E, vitamin C) was of interest, because they protect against lipidperoxidation. Until now, however, there is no knowledge which kind of lipid peroxidation products (primary or secondary) exert the most influence on the cellular antioxidant defence system.

Three experiments were carried out with rats (experiments 1 and 2) and guinea pigs (experiment 3) to study the effect of different moderate oxidised fats, in interaction with dietary concentrations of vitamins E and C, on the antioxidant status and antioxidant enzymes activity in tissues, the concentration of lipid peroxidation products, the susceptibility to haemolysis as well as the lipoprotein composition and the atherogenicity of LDL.

In experiment 1, three fats were treated at different temperatures over different periods to gain different concentration of primary oxidation products, characterised by the peroxide value (POV). The fat 1 was prepared by heating at 50°C over a period of 38 days (POV 920 mEq O₂/kg), the fat 2 at 105°C over 81 hours (POV 230 mEq O₂/kg) and the fat 3 at 190°C over 24 hours (POV 38 mEq O₂/kg). In experiments 2 and 3, the fat 4 was heated at 55°C over 49 days (POV 1400 mEq O₂/kg).

In experiment 1, diets with fresh or thermoxidised fats, containing either 25 or 250 mg α -TE/kg were used; experiment 2 included diets with fresh or thermoxidised fats, containing 25 mg α -TE/kg; in experiment 3, besides a control diet with a fresh fat, diets containing thermoxidised fats with two different concentrations of vitamin E (35 vs. 175 mg α -TE/kg) and vitamin C (300 vs. 1000 mg/kg) were used.

Feeding of oxidised fats to rats and guinea pigs induced a decrease of the apparent digestibility of vitamin E, reduced concentrations of antioxidants (vitamin E, vitamin C, uric acid) in analysed tissues and changes in the redox-system of glutathion. A high dietary vitamin E and/or vitamin C improved the antioxidant status.

Feeding of oxidised fats to rats and guinea pigs had only minority effects on the activity of antioxidative enzymes (superoxide dismutase, glutathionperoxidase, glucose-6-phosphat-dehydrogenase) in analysed tissues (plasma, erythrocytes, liver) with the exception of catalase. After feeding of thermoxidised fats, the activity of catalase was significantly increased in the liver. The supplementation of vitamin E and vitamin C had no significant influence on the activity of the antioxidative enzymes.

The concentration of lipid peroxidation products (TBARS, cholesterol oxidation products) in liver and plasma was higher in the groups fed thermoxidised fat, than in the groups fed fresh fat. The supplementation of vitamin E induced a decrease concentrations of TBARS but not of cholesterol oxidation products. The dietary vitamin C had no influence on the lipid peroxidation products.

Erythrocytes of guinea pigs fed oxidised fats showed an increased susceptibility to haemolysis *in vitro*; this effect could be improved by increasing the dietary concentrations of both, vitamin E and vitamin C. Parameters of *in vivo* haemolysis (activities of lactate dehydrogenase and acidic phosphatase, concentrations of free haemoglobin and potassium in plasma) were not adversely affected in rats and guinea pigs fed the oxidised fats as compared with animals fed the fresh fats.

Feeding of oxidised fats to rats and guinea pigs induced increased concentrations of cholesterol in HDL as well as decreased concentrations of cholesterol in VLDL of rats and in LDL of guinea pigs. The high dietary vitamin E level used resulted in increased concentrations of cholesterol in LDL and VLDL of rats and in HDL of guinea pigs. All animals fed the oxidised fat diets, irrespective of dietary concentration of vitamin E and/or C, had significantly lower concentrations of total cholesterol and triglycerides in the liver than animals fed the fresh fat diet.

According to the lag-time before onset of lipidperoxidation, LDL of rats and guinea pigs fed the thermoxidised fats with low dietary vitamin E and /or vitamin C level were significantly more susceptible to copper induced lipid peroxidation than those of animals fed the fresh fat. A high dietary vitamin E and/or vitamin C reduced the susceptibility of LDL to oxidation *in vitro*.

The fatty acid composition of LDL total lipids was only slightly different between the groups of animals. The uptake of labelled LDL by macrophages and the proportions of LDL apolipoproteins (experiment 2) were not influenced by the dietary fat.

In conclusion, the protection against lipid peroxidation products was realised rather by the antioxidants than by increased activities of antioxidant enzymes. According to the parameters determined, feeding of moderate thermoxidised fats induced oxidative stress, but there was no evidence of oxidative damage *in vivo* or proatherogenic effects. The effects of thermoxidised fats were independent of the concentration of primary lipid peroxidation products. The high dietary vitamin E and vitamin C level reduced partial effects of thermoxidised fats. According to the parameters determined, there was a evidence of a sparing effect of vitamin E and vitamin C through the dietary supplementation of both vitamins.

6 Literatur

Aebi, H. E. (1986): Catalase, In: Methods of enzymatic analysis, Bergmeyer, H. U. (Ed.), Band III, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 273-286

Adachi, J.; Kudo, R.; Ueno, Y.; Hunter, R.; Rajendram, R.; Want, E.; Preedy, V. (2001): Heart 7-Hydroperoxycholesterol and Oxysterols are elevated in chronically ethanol-fed rats, *J Nutr*, Vol. 131, 2916-2920

Alexander, J. C. (1981): Chemical and biological properties related to toxicity of heated fats, *J Toxicol Environ Health*, Vol. 7, 125-138

Alexander, J. C.; Valli, V. E.; Chanin, B. E. (1987): Biological observation from feeding heated corn oil and heated peanut oil to rats, *J Toxicol Environ Health*, Vol. 21, 295-309

Ammouche, A.; Rouaki, F.; Bitam, A.; Bellal, M. M. (2002): Effect of ingestion of thermally oxidized sunflower oil on the fatty acid composition and antioxidant enzymes of rat liver and brain in development, *Ann Nutr Metab*, Vol. 46, 268-275

Arevalo, J. C.; Perez-Gonzalez, M.N.; Sanchez-Berani, C.; Llanillo, M. (1998): Phospholipid fatty acid and lipid peroxidation in liver microsomes from guinea pigs fed oil related to the toxic oil syndrome, *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, Vol. 120, 111-119

Arita, M.; Nomura, K.; Arai, H.; Inoue, K. (1997): alpha-tocopherol transfer protein stimulates the secretion of alpha-tocopherol from a cultured liver cell line through a brefeldin A-insensitive pathway, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 94, 12437-12441

Ariyoshi, K.; Adachi, J.; Asano, M.; Ueno, Y.; Rajendram, R.; Preedy, V. R. (2002): Effect of chronic ethanol feeding on oxysterols in rat liver, *Free Radic Res*, Vol. 36, 661-666

Arkhipenko, I. V.; Dzhaparidze, L. M.; Gutkin, D. V.; Rozhitskaia, I. I.; Spirichev, V. B. (1987): Comparative evaluation of effect of vitamin E deficiency on lipid peroxidation and Ca²⁺ transport in heart and skeletal muscles, *Vopr Med Khim*, Vol. 33, 122-127

Aviram, M. (1992): Low density lipoprotein modification by cholesterol oxidase induces enhanced uptake and cholesterol accumulation in cell, *J Biol Chem*, Vol. 267, 218-225

Balz, M. K.; Schulte, E.; Thier, H.-P. (1993): Simultaneous determination of α -tocopheryl acetate, tocopherols and tocotrienols by HPLC with fluorescence detection in foods, *Fat Sci Technol*, Vol. 95, 215-220

Barja, G.; Lopez-Torres, M.; Perez-Campo, R.; Cadenas, S.; Prat, J.; Pamplona, R. (1994): Dietary vitamin C decreases endogenous protein oxidative damage, malondialdehyde and lipid peroxidation and maintains fatty acid unsaturation in the guinea pig liver, *Free Radic Biol Med*, Vol. 17, 105-115

Battino, M.; Quiles, J. L.; Huertas, J. R.; Ramirez-Tortosa, M. C.; Cassinello, M.; Manas, M.; Lopez-Frias, M.; Mataix, J. (2002): Feeding fried oil changes antioxidant and fatty acid pattern of rat and affects rat liver mitochondrial respiratory chain components, *J Bioenerg Biomembr*, Vol. 34, 127-134

- Behniwal, P.; Gulati, J.; Soni, G. L.; Singh, R. (1991): Toxicity of peroxidized oil and role of vitamins: Effect on osmotic fragility of erythrocyte membranes and membrane bound enzymes, *J Food Sci Technol*, Vol. 28, 161-163
- Biesalski, H. K.; Frank, J. (1995): Antioxidation in der Ernährung und ihre Bedeutung für die anti-/prooxidative Balance im Immunsystem, *Imm Infekt*, Vol. 23, 166-173
- Biesalski, H. K.; Schrezenmeir, J.; Weber, P.; Weiß, H. E. (1997): Vitamine – Physiologie, Pathophysiologie, Therapie, Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York
- Billek, G. (1979): Heated oil – Chemistry and nutritional aspects, *Nutr Metab*, Vol. 24, 200-210
- Bird, R. P.; Draper, H. H. (1984): Comparative studies on methods of malonaldehyde determination, In: *Methods in Enzymology*, Packer, L. (Ed.), Vol. 105, 299-305
- Blanc, P.; Revol, A.; Pacheco, H. (1992): Chronical ingestion of oxidized oil in the rat: Effect on lipid composition and on cytidyl transferase activity in various tissues, *Nutr Res*, Vol. 12, 833-844
- Børsting, C. F.; Engberg, M.; Jakobsen, K.; Jensen, S. K.; Andersen, J. O. (1994): Inclusion of oxidized fish oil in mink diets – 1. The influence on nutrient digestibility and fatty-acid accumulation in tissues, *J Anim Physiol a Anim Nutr*, Vol. 72, 132-145
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, Vol. 72, 248-254
- Brandsch, C.; Ringseis, R.; Eder, K. (2002): High dietary iron concentrations enhance the formation of cholesterol oxidation products in the liver of adult rats fed salmon oil with minimal effects on antioxidant status, *J Nutr*, Vol. 132, 2263-2269
- Bray, T. M.; Taylor, C. G. (1993): Tissue glutathione, nutrition and oxidative stress, *Can J Physiol Pharmacol*, Vol. 71, 746-751
- Breuer, O.; Björkhem, I. (1995): Use of an $^{18}\text{O}_2$ inhalation technique and mass isotopomer distribution analysis to study the oxygenation of cholesterol in rat, *J Biol Chem*, Vol. 270, 20278-20284
- Brunet, S.; Thibault, L.; Delvin, E.; Yotov, W.; Bendayan, M.; Levy, E. (1999): Dietary iron overload and induced lipid peroxidation are associated with impaired plasma lipid transport and hepatic sterol metabolism in rats, *Hepatology*, Vol. 29, 1809-1817
- Bulitta, C.; Ganea, C.; Fahimi, H. D.; Völkl, A. (1996): Cytoplasmic and peroxisomal catalases of the guinea pig liver: Evidence for two distinct proteins, *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1293, 55-62
- Butte, W.; Kirsch, M.; Denker, J. (1983): The determination of pentachlorophenol and tetrachlorophenols in wadden sediment and clams (*Maya arenaria*) using triethylsulfonium hydroxide for extraction and pyrolytic ethylation, *Int J Environ Anal Chem*, Vol. 13, 141-153
- Cadenas, S.; Lertsiri, S.; Otsuka, M.; Baraja, G.; Miyazawa, T. (1996a): Phospholipid hydroperoxides and lipid peroxidation in liver and plasma of ODS rats supplemented with alpha-tocopherol and ascorbic acid, *Free Radic Res*, Vol. 24, 485-493

- Cadenas, S.; Rojas, C.; Mendez, J.; Herrero, A.; Barja, G. (1996b): Vitamin E decreases urine lipid peroxidation products in young healthy human volunteers under normal conditions, *Pharmacol Toxicol*, Vol. 79, 247-253
- Cadenas, S.; Rojas, C.; Pérez-Campo, R.; López-Torres, M.; Barja, G. (1995): Vitamin E protects guinea pig liver from lipid peroxidation without depressing levels of antioxidants, *Int J Biochem Cell Biol*, Vol. 27, 1175-1181
- Cadenas, S.; Rojas, C.; Pérez-Campo, R.; López-Torres, M.; Barja, G. (1994): Effect of dietary vitamin C and catalase inhibition of antioxidants and molecular markers of oxidative damage in guinea pigs, *Free Radic Res*, Vol. 21, 109-118
- Cartwright, G. E. (1963): *Diagnostic Laboratory Hematology*, Grune and Stratton, New York, 214
- Cattley, R. C. (2003): Regulation of cell proliferation and cell death by peroxisome proliferators, *Microsc Res Tech*, Vol. 61, 179-184
- Chan, A. C. (1993): Partners in defense, vitamin E and vitamin C, *Can J Physiol Pharm*, Vol. 71, 725-731
- Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol Rev*, Vol. 59, 527-605
- Chang, Y. H.; Abdalla, D. S. P.; Sevanian, A. (1997): Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein, *Free Radic Bio Med*, Vol. 23, 202-214
- Chao, P. M.; Chao, C. Y.; Lin, F. J.; Huang, C. (2001): Oxidized frying oil up-regulates hepatic acyl-CoA oxidase and cytochrome P450 A1 genes in rats and activates PPARalpha, *J Nutr*, Vol. 131, 3166-3174
- Chapman, M. J. (1980): Animal lipoproteins: Chemistry, structure and comparative aspects, *J Lipid Res*, Vol. 21, 789-853
- Chen, K. H.; Chang, M. L. (1978): Effects of dietary vitamin E and vitamin C on respiration and swelling of guinea pig liver, *J Nutr*, Vol. 108, 1616
- Chen, K.; Suh, J.; Carr, A. C.; Morrow, J. D.; Zeind, J.; Frej, B. (2000): Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, Vol. 279, 1406-1412
- Chisolm, G. M.; Steinberg, D. (2000): The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview, *Free Radic Biol Med*, Vol. 28, 1815-1826
- Cho, E. S.; Sahyoun, N.; Stegink, L. D. (1981): Tissue glutathione as a cyst(e)ine reservoir during fasting and refeeding of rats, *J Nutr*, Vol. 111, 914-922
- Chow, C. K. (1988): Interrelationships of cellular antioxidant defense system, In: *Cellular Antioxidant Defense Mechanisms*, Chow, C. K. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 217-238
- Christova, T. Y.; Duridanova, D. B.; Setchenska, M. S. (2002): Enhanced heme oxygenase activity increases the antioxidant defense capacity of guinea pig liver upon acute cobalt chloride loading: Comparison with rat liver, *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, Vol. 131, 177-184

- Christensen, M. J.; Burgener, K. W. (1992): Dietary selenium stabilizes glutathione peroxidase mRNA in rat liver, *J Nutr*, Vol. 122, 1620-1626
- Cohn, J. S. (2002): Oxidized fat in the diet, postprandial lipaemia and cardiovascular disease, *Curr Opin Lipidol*, Vol. 13, 19-24
- Cohn, W. (1993): Tocopherol transport and absorption, In: *Vitamine und weitere Zusatzstoffe bei Mensch und Tier*, Flachowsky, G.; Schubert, R. (Ed.), Wissenschaftlicher Fachverlag, Dr. Neck, 71-82
- Conti, M.; Morand, P. C.; Levillain, P.; Lemonnier, A. (1991): Improved fluorimetric determination of malondialdehyde, *Clin Chem*, Vol. 37, 1273-1275
- Coors, U. (1991): Anwendung des Tocopherolmusters zur Erkennung von Fett- und Ölvermischungen, *Fat Sci Technol*, Vol. 93, 519-526
- Corcos Benedetti, P.; Di Felice, M.; Gentili, V.; Tagliamonte, B.; Tomassi, G. (1990): Influence of dietary thermally oxidized soybean oil on the oxidative status of rats of different ages, *Ann Nutr Metab*, Vol. 34, 221-231
- Corcos Benedetti, P.; D'Aquino, M.; Di Felice, M.; Gentili, V.; Tagliamonte, B.; Tomassi, G. (1987): Effects of a fraction thermally oxidized soy bean oil on growing rats, *Nutr Rep Int*, Vol. 36, 387-401
- Dänicke, S.; Jeroch, H.; Simon, O.; Bedford, M. R. (1999): Interaction between dietary fat type and exogenous enzyme supplementation of broiler diets based on maize, wheat, triticale or barley, *J Anim Feed Sci*, Vol. 8, 467-483
- D'Aquino, M.; Di Felice, M.; Tomassi, G. (1985): Vitamin E status and effects of thermoxidized fats on structural alpha-tocopherol and fatty acid of different rat tissues, *Nutr Rep Int*, Vol. 32, 1179-1185
- Deutsch, J. (1985): Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, In: *Methods of Enzymatic analysis*, Bergmeyer, H. U. (Ed.), VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, 190-197
- DGF (1994): Deutsche Einheitsmethoden zur Bestimmung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, WVG, C-VI 6a (84)
- DGF (1994): Deutsche Einheitsmethoden zur Bestimmung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, WVG, C-V 2 (81)
- Diplock, A. T. (1994): Antioxidants and free radical scavengers, In: *Free radical damage and its Control*, Rice-Evans, C. A., Burdon, R. H. (Ed.), Elsevier Science B. V., 113-130
- Dobarganes, M. C.; Velasco, J.; Dieffenbacher, A. (2000): Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols, and diacylglycerols in oils and fats, *Pure Appl Chem*, Vol. 72, 1563-1575
- Draper, H. H.; Dhanakotti, S. N.; Hadley, M.; Piche, L. A. (1988): Malondialdehyde in biological systems, In: *Cellular antioxidant defence mechanism*, Chow, C. K. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 97-110
- Drexler, H. G.; Dirks, W.; MacLeod, R. A. F.; Qentmeier; Steube, K. G.; Uphoff (1999): *DSMZ Catalogue of human and animal cell lines*, 80

- Eder, K. (1999a): The effects of a dietary oxidized oil on lipid metabolism in rats, *Lipids*, Vol. 34, 717-725
- Eder, K. (1999b): The effect of an oxidized dietary oil on plasma cholesterol and thyroid hormone concentrations in miniature pigs fed on a hyperlipidaemic diet, *J Anim Physiol a Anim Nutr*, Vol. 82, 271-281
- Eder, K.; Kirchgessner, M. (1999): The effect of moderately thermoxidized dietary fat on the vitamin E status, the fatty acid composition of tissue lipids and the susceptibility of low-density lipoproteins to lipids peroxidation, *Fett/Lipid*, Vol. 101, 178-184
- Eder, K.; Kirchgessner, M. (1998a): The effect of dietary vitamin E supply and a moderately oxidized oil on activities of hepatic lipogenic enzymes in rats, *Lipids*, Vol. 33, 277-283
- Eder, K.; Kirchgessner, M. (1998b): Vitamin E status and tissue fatty acid composition in rats fed a moderately oxidized soybean oil at low high vitamin E supply, *J Anim Physiol Anim Nutr*, Vol. 79, 80-91
- Eder, K.; Kirchgessner, M. (1997): The effect of a moderately oxidized soybean oil on lipid peroxidation in rat low-density lipoproteins at low and high dietary vitamin E levels, *J Anim Nutr*, Vol. 78, 230-243
- Eder, K.; Kirchgessner, M. (1994): Dietary fat influences the effect of zinc deficiency on liver lipids and fatty acids in rat force-fed equal quantities of diet, *J Nutr*, Vol. 124, 1917-1926
- Eder, K.; Stangl, G. I. (2000): Plasma thyroxine and cholesterol concentrations of miniature pigs are influenced thermally oxidized dietary lipids, *J Nutr*, Vol. 130, 116-121
- Eder, K.; Sülzle, A.; Škufca, P.; Brandsch, C.; Hirche, F. (2003): Effects of dietary thermoxidized fats on expression and activities of hepatic lipogenic enzymes in rats, *Lipids*, Vol. 38, 31-38
- Einsele, H.; Clemens, M.; Remmer, H. (1985): Effect of ascorbate on red blood cell lipid peroxidation, *Free Radical Res Communications*, Vol. 1, 63-67
- Endo, Y.; Li, C. M. , Tariri-Endo, M., Fujimoto, K. (2001): A modified method for the estimation of total carbonyl compounds in heated and frying oils using 2-propanol as a solvent, *J Am Oil Chem Soc*, Vol. 78, 1021-1024
- Engberg, M.; Børsting, C. F. (1994): Inclusion of oxidized fish oil in mink diets – 2. The influence on performance and health considering histopathological, clinical-chemical and haematological indices, *J Anim Physiol a Anim Nutr*, Vol. 72, 146-157
- Engberg, M.; Lauridsen, C.; Jensen, S. K.; Jakobsen, K. (1996): Inclusion of oxidized vegetable oil in broiler diets – Its influence on nutrient balance and on the antioxidative status of broilers, *Poultry Sci*, Vol. 75, 1003-1011
- Engeseth, N. J.; Gray, J. I.; Booren, A. M.; Ashgar, A. (1993): Improved oxidative stability of veallipids and cholesterol through dietary vitamin E supplementation, *Meat Sci*, Vol. 35, 1-15
- Elmadfa, I.; Schwalbe, P.; Franke, D.; Weidler, B.; Schlotzer, E. (1988): Auswirkung einer intravenösen Applikation von DL- α -Tocopherylacetat auf Tocopherolstatus, Lipidperoxidation und Thromboxansynthese bei Probanden, *Ern-Ums*, Vol. 35, 173

- Esterbauer, H.; Dieber-Rothender, M.; Striegel, G.; Waeg, G. (1991): Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein, *Am J Clin Nutr*, Vol. 53, 314S-321S
- Esterbauer, H.; Dieber-Rotheneder, M.; Wäg, G.; Striegl, G.; Jürgens, G. (1990): Biochemical, structural, and functional properties of oxidized Low-Density Lipoprotein, *Chem Res Toxicol*, Vol. 3, 77-92
- Esterbauer, H.; Stiegl, G.; Puhl, H.; Rotheneder, M. (1989): Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein, *Free Radic Res Commun*, Vol. 6, 67-75
- Esterbauer, H.; Wäg, G.; Puhl, H. (1993): Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis, *Br Med Bulletin*, Vol. 49, 566-576
- Fernandez, M. L. (2001): Guinea pig as models for cholesterol and lipoprotein metabolism, *J Nutr*, Vol. 131, 10-20
- Fields, M.; Ferretti, R.; Smith, J. C.; Reiser, S. (1984): Interaction between dietary carbohydrate and copper nutriure on lipid in peroxidation in rat tissues, *Biol Trace Elem Res*, Vol. 6, 379
- Findlay, G. M.; Draper, H. H.; Bergan, J. G. (1970): Metabolism of 1-¹⁴C-methyl linoleate hydroperoxide in the rabbit, *Lipids*, Vol. 5, 970-975
- Freyschuss, A.; Xiu, R. J.; Zhang, J.; Ying, X.; Diczfalusy, U.; Jogestrang, T.; Henriksson, P.; Bjorkhem, I. (1997): Vitamin C reduces cholesterol-induced microcirculatory changes in rabbits, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol. 17, 1178-1184
- Gabriballa, S. E.; Hutchin, T. P.; Sincliar, A. J. (2002): Antioxidant capacity after acute ischaemic stroke, *Stroke*, Vol. 33, 691-703
- Gabriel, H. G.; Alexander, J. C.; Valli, V. E. (1977): Biochemical and histological effects of feeding thermally oxidized rapeseed oil and lard to rats, *Can J Comp Med*, Vol. 41, 98-106
- Gaßmann, B.; Schultz, M.; Brigelius-Flohe, R. (1995): Vitamin E-Stoffwechsel und –Bedarf, *Ern Ums*, Vol. 42, 80-87
- Ginter, E.; Ozdin, L.; Nemeč, R. (1977): Localization of the interference of ascorbic acid deficiency with bile acid biogenesis, *Physiol, Bohemoslov*, Vol. 26, 353-359
- Goldstein, J. L.; Basu, S. K.; Brunschede, G. Y.; Brown, M. S. (1976): Release of low density lipoprotein from its cell surface receptor by sulfated glycosaminoglycans, *Cell*, Vol. 7, 85-95
- Guardiola, F.; Codony, R.; Addis, P. B.; Rafecas, M.; Botatella, J. (1996): Biological effects of oxysterols: current status, *Fd Chem Toxic*, Vol. 34, 193-211
- Guo, X.; Ohno, Y.; Takanaka, A. (1993): Inhibition of hepatocyte gap junctional communication by 25-hydroxycholesterol may be mediated through free radicals, *Eur J Pharmacol*, Vol. 248, 337-340
- Habermann, E.; Ahnert-Hilger, G.; Chatwal, G. S.; Beress, L. (1981): Delayed haemolytic action of palytoxin. General characteristics, *Biochim Biophys Acta*, Vol. 649, 481-486

Hadorn, H.; Zürcher, K. (1966): Beurteilung von Speiseölen aufgrund des UV-Spektrums, Mitt Gebiete Lebensm, Vol. 57

Hageman, G.; Verhagen, H.; Schutte, B.; Kleinjans, J. (1991): Biological effects of short-term feeding to rats of repeatedly used deep-frying fats in relation to fat mutagen content, Food Chem Toxicol, Vol. 29, 689-698

Hallberg, L.; Brune, M.; Rossander-Hulthön, L. (1987): Is there a physiological role of vitamin C in iron absorption?, In: Third conference on vitamin C, Bruns, J. J.; Rivers, J. M.; Machlin L. J. (Ed.), Ann N Y Acad Sci, Vol. 498, 324-332

Halliwell, B. (1994): Free radicals and antioxidants: A personal view, Nutr Rev, Vol. 52, 253-265

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (1988): The antioxidant proteins and extracellular fluids, In: Cellular antioxidant defense mechanism, Chow (Ed.), CRC Press, Boca Raton

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; Cross, C. E. (1992): Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now?, J Lab Clin Med, Vol. 119, 598-620

Halvorsen, B.; Aas, U. K.; Kulseth, M. A.; Drevon, C. A.; Christiansen, E. N.; Kolset, S. O. (1998): Proteoglycins in macrophages: Characterization and possible role in the cellular uptake of lipoproteins, Biochem J, Vol. 331, 743-752

Hara, A.; Radin, N. S. (1978): Lipid extraction of tissues with a low toxicity solvent, Anal Biochem, Vol. 90, 420-426

Hartfiel, W.; Oberbach, H. (1990): Auswirkungen oxidierter Fettsäuren auf landwirtschaftliche Nutztiere bei Unterversorgung mit Vitamin E und Selen, Fat Sci Technol, Vol. 92, 80-85

Hayam, I.; Cogan, U.; Mokady, S. (1995): Dietary oxidized oil and the activity of antioxidant enzymes and lipoprotein peroxidation in rats, Nutr Res, Vol. 15, 1037-1044

Hayam, I.; Cogan, U.; Mokady, S. (1993): Dietary oxidized oil enhances the activity of (Na⁺K⁺) ATPase and acetylcholinesterase and lowers the fluidity of rat erythrocyte membrane, J Nutr Biochem, Vol. 4, 563-568

Himeno, S.; Takekawa, A.; Imura, N. (1993): Species difference in hydroperoxide-scavenging enzymes with special reference to glutathione peroxidase in guinea pigs, Comp Biochem Physiol B, Vol. 104, 27-31

Hiroaki, O.; Yamashita, K.; Sasaki, S.; Horio, F.; Yoshioda, A. (1987): Long term effects of dietary polychlorinated biphenyl and high level of vitamin E on ascorbic acid and lipid metabolism in rat, Int J Nutr, Vol. 117, 1217-1223

Hochgraf, E.; Mokady, S.; Cogan, U. (1997): Dietary oxidized linolenic acid modifies lipid composition of rat liver microsomes and increases their fluidity, J Nutr, Vol. 127, 681-686

Hodis, H. N.; Chauhan, A.; Hashimoto, S.; Crawford, D. W.; Sevanian, A. (1992): Probucol reduces plasma and aortic wall oxysterol level in cholesterol fed rabbits independently of its plasma cholesterol-lowering effects, Atherosclerosis, Vol. 96, 125-134

- Hruba, F.; Novakova, V.; Ginter, E. (1982): The effect of chronic marginal vitamin C deficiency on the α -tocopherol content of the organs and plasma of guinea pigs, *Experientia*, Vol. 38, 1454
- Hsieh, H. S.; Navia, J. M. (1980): Zinc deficiency and bone formation in guinea pig alveolar implants, *J Nutr*, Vol. 110, 1581-1588
- Huang, C.-J.; Cheung, N.-S.; Lu, V.-R. (1988): Effects of deteriorated frying oil and dietary protein levels on liver microsomal enzymes in rats, *JAOCS*, Vol. 65, 1796-1803
- Huang, C.-J.; Shaw, H.-M. (1994): Tissue vitamin E status in compromised by dietary protein insufficiency in young growing rats, *J Nutr*, Vol. 124, 571-579
- Hunt, J. V.; Bottoms, M. A.; Mitchinson, M. J. (1992): Ascorbic acid oxidation: A potential cause of the elevated severity of atherosclerosis in diabetes mellitus?, *FEBS Lett*, Vol. 311, 161-164
- Iritani, N.; Fukuda, E.; Kitamura, Y. (1980): Effect of oxidized oil on lipogenic enzymes, *Lipids*, Vol. 15, 371-374
- Ishikawa, T.; Sies, H. (1989): Glutathione as an antioxidant toxicological aspects, In: *Coenzymes and Cofactors: Glutathione – Chemical, Biochemical and Medical Aspects, Part B.*, Dolphin, D., Poulson, R., Avramovi O. (Ed.), John Wiley & Sons, New York, 85-109
- Izaki, Y.; Yoshikawa, S.; Uchiyama, M. (1984): Effect of ingestion of thermally oxidized frying oil on peroxidative criteria in rats, *Lipids*, Vol. 19, 324-331
- Jain, A.; Mårtensson, J.; Mehta, T.; Krauss, A. N.; Auld, P. A. M.; Meister, A. (1992): Ascorbic acid prevents oxidative stress in glutathione-deficient mice: Effects on lung type 2 cell lamellar bodies, lung surfactant and skeletal muscle, *Proceedings Nat Acad Sci USA*, Vol. 89, 5093-5097
- Jensen, G. E.; Clausen, J. (1981): Glutathione peroxidase activity in vitamin E and essential fatty acid-deficient rats, *Ann Nutr Metab*, Vol. 25, 27-37
- Jethmalani, S. M.; Viswanathan, G.; Bandyopadhyay, C.; Noronha, J. M. (1989): Effects of ingestion of thermally oxidized edible oils on plasma lipids, lipoproteins and postheparin lipolytic activity of rats, *India J Exp Biol*, Vol. 27, 1052-1055
- Jialal, I.; Devaraj, S. (1996): The role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis, *J Nutr*, Vol. 126, Suppl. 4, 1053S-1057S
- Kamiyam, S.; Howlader, Z. H.; Ito, M.; Komai, M.; Furukawa, Y. (2002): Effect of deficiency of vitamins C and/or E on lipoprotein metabolism in osteogenic disorder Shionogi rat, a strain unable to synthesize ascorbic acid, *J Nutr Sci Vitaminol*, Vol. 48, 95-101
- Kanazawa, K.; Kanazawa, E.; Natake, M. (1985): Uptake of secondary autoxidation products of linoleic acid by the rat, *Lipids*, Vol. 20, 412-419
- Kappus, H.; Diplock, A. T. (1992): Tolerance and safety of vitamin E: Toxicological position report, *Free Radic Biol Med*, Vol. 13, 55-74
- Kaur, H.; Halliwell, B. (1990): Action of biologically-relevant oxidizing species upon uric acid. Identification of uric acid oxidation products, *Chem Biol Interac*, Vol. 73, 235-247

- Khan-Merchant, N.; Penumetcha, M.; Meilhac, O.; Parthasarathy, S. (2002): Oxidized fatty acids promote atherosclerosis only in the presence of dietary cholesterol in low-density lipoprotein receptor knockout mice, *J Nutr*, Vol. 132, 3256-3262
- Kinalski, M.; Sledziewski, A.; Telejko, B.; Zarzycki, W.; Kinalski, I. (1999): Antioxidant therapy and streptozotocin-induced diabetes in pregnant rats, *Acta Diabetol*, Vol. 36, 113-117
- Kirchgessner, M. (1986): Tierernährung, Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis, DLG Verlag, Frankfurt, 30-39
- Kleinveld, H. A.; Hak-Lemmers, H. L. M.; Stalenhoef, A. F. H.; Demacker, P. N. M. (1992): Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: Application of a short procedure for isolating low-density-lipoprotein, *Clin Chem*, Vol. 38, 2066-2072
- Kok, T. S.; Harris, P. G.; Alexander, J. C. (1988): Heated canola oil and oxidative stress in rats, *Nutr Res*, Vol. 8, 673-683
- Koolman, J.; Röhm, K.-H. (1998): Taschenbuch der Biochemie, Thieme Verlag Stuttgart, 270
- Kraft, H. (1989): Klinische Labormethoden der Veterinärmedizin bei Haussäugetieren, Stuttgart
- Kraus, A. (1996): Einfluss der Antioxidantien Vitamin C, Vitamin E und β -Carotin auf die Membranstabilität und antioxidative Parameter von Erythrozyten der Ratte bei alimentärem Zinkmangel, Dissertation an der Technischen Universität München
- Kravchenko, L. V.; Morozov, S. V.; Deriagina, V. P.; Avren'eva, L. I.; Guseva, G. V. (2002): Effect of soybean isoflavones on antioxidant status in rats fed diet with oxidized linseed oil, *Vopr Pitan*, Vol. 71, 3-6
- Kubow, S. (1993): Lipid oxidation products in food and atherogenesis, *Nutr Rev*, Vol. 51, 33-40
- Lachili, B.; Hininger, I.; Faure, H.; Arnaud, J.; Richard, M. J.; Favier, A.; Roussel, A. M. (2001): Increased lipid peroxidation in pregnant women after iron and vitamin C supplementation, *Biol Trace Elem Res*, Vol. 83, 103-110
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, Vol. 227, 680-685
- Langlois, M.; Duprez, D.; Delanghe, J.; De Buyzere, M.; Clement, D. L. (2001): Serum vitamin C concentration is low in peripheral arterial disease and is associated with inflammation and severity of atherosclerosis, *Circulation*, Vol. 103, 1863-1868
- Lee, S. H.; Oe, T.; Blair, I. A. (2001): Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins, *Science*, Vol. 292, 2083-2086
- Leung, H. W.; Vang, M. J.; Mavis, R. D. (1981): The cooperative interaction between vitamin E and vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids, *Biochim Biophys Acta*, Vol. 664, 266
- Levander, O. A.; DeLoach, D. P.; Morris, V. C.; Moser, P. B. (1983): Platelet glutathione peroxidase activity as an index of selenium status in rats, *J Nut*, Vol. 113, 1983

- Lii, C. K.; Ko, Y. J.; Chiang, M. T.; Sung, W. C.; Chen, H. W. (1998): Effect of dietary vitamin E on antioxidant status and antioxidant enzyme activities in Sprague-Dawley rats, *Nutr Cancer*, Vol. 32, 95-100
- Linseisen, J. (1998): Cholesteroxidationsprodukte und Antioxidantien – Untersuchungen zur Zufuhr, Absorption und Wechselwirkungen beim Menschen, Habilitation an der Technischen Universität München, Freisingen-Weihenstephan
- Linseisen, J.; Hoffmann, J.; Riedl, J.; Wolfram, G. (1998): Effect of single oral dose of antioxidant mixture (vitamin E, carotenoids) on the formation of cholesterol oxidation products after ex vivo LDL oxidation in humans, *Eur J Med Res*, Vol. 3, 5-11
- Linseisen, J.; Wolfram, G. (1998a): Cholesterin-Oxidationsprodukte und Arteriosklerose, *Fett/Lipid*, Vol. 199, 369
- Linseisen, J.; Wolfram, G. (1998b): Absorption of cholesterol oxidation products from ordinary foodstuff in humans, *Ann Nutr Metab*, Vol. 42, 224-230
- Linseisen, J.; Wolfram, G. (1998c): Origin, metabolism and adverse health effects of cholesterol oxidation products, *Fett/Lipid*, Vol. 100, 211-218
- Liu, J.-F.; Chang, F.-C. (2000): Forms of cytochrome P450 in the liver microsome of oxidized frying oil-fed guinea pigs, *J Nutr Sci Vitaminol*, Vol. 46, 240-245
- Liu, J.-F.; Huang, C.-J. (1996): Dietary oxidized frying oil enhances tissue α -tocopherol depletion and radioisotope tracer excretion in vitamin E-deficient rats, *J Nutr*, Vol. 126, 2227-2235
- Liu, J.-F.; Huang, C.-J. (1995): Tissue α -tocopherol retention in male rats is compromised by feeding diets containing oxidized frying oil, *J Nutr*, Vol. 125, 3071-3080
- Liu, L.-Y.; Huang, C.-J. (1989): Responses of rat liver microsomal enzyme activities to feeding frying oils deteriorated to different degrees, *J Chinese Agric Chem Soc*, Vol. 27, 64-74
- Liu, J.-F.; Lee, Y.-W.; Chang, F.-C. (2000): Effect of oxidized frying oil and vitamin C levels on the hepatic xenobiotic-metabolizing enzyme system of guinea pigs, *J Nutr Sci Vitaminol*, Vol 46, 137-140
- Liu, J.-F.; Lee, Y.-W. (1998): Vitamin C supplementation restores the impaired vitamin E status of guinea pigs fed oxidized frying oil, *J Nutr*, Vol. 128, 116-122
- Lizard, G.; Monier, S.; Cordelet, C.; Gesquière, L.; Deckert, V.; Gueldry, S.; Lagrost, L.; Gambert, P. (1999): Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7 β -Hydroxycholesterol and 7-Ketocholesterol in the cells of the vascular wall, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol. 19, 1190-1200
- Lopez-Torres, M.; Perez-Campo, R.; Cadenas, S.; Rojas, C.; Barja, G. (1993): A comparative study of free radical in vertebrates – II. Non-enzymatic antioxidants and oxidative stress, *Comp Biochem Physiol B*, Vol. 105, 757-763
- Lopez-Varela, S.; Sanchez-Muniz, F. J.; Cuesta, C. (1995): Decreased food efficiency ratio, growth retardation and changes in liver fatty acid composition in rats consuming thermally oxidized and polymerized sunflower oil used for frying, *Food Chem Toxicol*, Vol. 33, 181-189

- Lubrano, R.; Frediani, T.; Citti, G.; Cardi, E.; Mannarino, O.; Elli, M.; Cozzi, F.; Giardini, O. (1989): Erythrocyte membrane lipid peroxidation before and after vitamin E supplementation in children with cholestasis, *J Pediatrics*, Vol. 115, 380-384
- Maeda, Y.; Nagatomo, H.; Uchiyama, F.; Nagatomo, J.; Yamada, M.; Shiotsuki, H.; Ohta, Y.; Sato, S.; Kai, M. H.; Higashi, S.; Setoguchi T. (2002): A comparative study of the conversion of 7-hydroxycholesterol in rabbit, guinea pig, rat, hamster and chicken, *Steroids*, Vol. 67, 703-708
- Mahfouz, M. M.; Kawano, H.; Kummerow, F. A. (1997): Effect of cholesterol-rich diets with and without added vitamin E and C on the severity of atherosclerosis in rabbits, *Am J Clin Nutr*, Vol. 66, 1240-1249
- Mannering, G. J. (1949): Vitamin requirements of guinea pig, *Vitam Horm*, Vol. 7, 201-221
- Marcus, S. R.; Chandrakala, M. V.; Nadiger, H. A. (1993): Interaction between vitamin E and glutathione in rat brain – effect of acute alcohol administration, *J Nutr Biochem*, Vol. 4, 336-340
- Marcuse, R.; Johansson, L. (1973): Studies on the TBA test for rancidity grading. II. TBA reactivity of different aldehyde classes, *J Am Oil Chem Soc*, Vol. 50, 387-391
- Markant, A.; Rimbach, G.; Krämer, K.; Mayer, H.; Pallauf, J. (1995): Reaktive Sauerstoffradikale: Entstehung, Wirkung, Eliminierung, *PZ*, 2313-2327
- Marklund, S.; Marklund, G. (1974): Involvement of the superoxid anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur J Biochem*, Vol. 47, 469-474
- Martin, J.-C.; Joffre, F.; Siess, M.-H.; Vernevaut, M.-F.; Collenot, P.; Genty, M.; Sébédio, J.-L. (2000): Cyclic fatty acid monomers from heated oil modify the activities of lipid synthesizing and oxidizing enzymes in rat liver, *J Nutr*, Vol. 130, 1524-1530
- Martin, J. K.; Luthra, M. G.; Wells, M. A.; Watts, R. P.; Hanahan, D. J. (1975): Phospholipase A₂ as a probe of phospholipid distribution in erythrocyte membranes. Factor influencing the apparent specificity of the reaction, *Biochemistry*, Vol. 14, 5400-5408
- Matsuzawa, T.; Ikarashi, Y. (1979): Haemolysis of various mammalian erythrocytes in sodium chloride, glucose and phosphate-buffer solutions, *Lab Anim*, Vol. 13, 329-331
- Mc Cluskey, S.; Hall, M.; Stantont, C.; Devery, R. (1999): Alpha-tocopherol inhibits oxidative stress induced by cholestanetriol and 25-hydroxycholesterol in porcine ovarian granulosa cells, *Mol Cell Biochem*, Vol. 194, 217-225
- Meister, A. (1994a): Glutathione, ascorbate and cellular protection, *Canc Res*, Vol. 54, 1969-1975
- Meister, A. (1994b): Glutathion-ascorbic acid antioxidant system in animals, *J Biol Chem*, Vol. 269, 9397-9400
- Meister, A. (1992): On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione, *Biochem Pharmacol*, Vol. 44, 1905-1915
- Mendelsohn, D.; Medelsohn, L.; Staple, E. (1965): The catabolism in vitro of cholesterol: formation of the 7-epimeric hydroxycholesterols from cholesterol in rat liver, *Biochim Biophys Acta*, Vol. 97, 379-381

- Mikami, T.; Yoshino, Y.; Ito, A. (2000): Does a relationship exist between the urate pool in the body and lipid peroxidation during exercise?, *Free Radic Res*, Vol. 32, 31-39
- Mörssel, J.-Th. (1990): Fortschrittsbericht Lipidperoxidation - 1. Mitt. Primärreaktionen, *Die Nahrung*, Vol. 34, 3-12
- Mörssel, J.-Th., Meusel, D. (1990): Fortschrittsbericht Lipidperoxidation - 2. Mitt. Sekundärreaktionen, *Die Nahrung*, Vol. 34, 13-27
- Monahan, F. J.; Buckley, D. J.; Gray, J. I.; Morrissey, P. A.; Asghar, A.; Hanrahan, T. J.; Lynch, P. B. (1990): Effect of dietary vitamin E on the stability of raw and cooked pork, *Meat Sci*, Vol. 27, 99-108
- Mori, T. A.; Croft, K. D.; Puddey, I. B.; Beilin, L. J. (1996): Analysis of native and oxidized LDL oxysterols using GC-MS with selective ion monitoring, *Redox Rep*, Vol. 2, 25-34
- Morrissey, P. A.; Quinn, P. B.; Sheehy, P. J. A. (1994): Newer aspects micronutrients in chronic disease: Vitamin E, *Proceed Nutr Soc*, Vol. 53, 571-582
- Muggli, R. (1994): Vitamin E-Bedarf bei Zufuhr von Polyenfettsäuren, *Fat Sci Technol*, Vol. 96, 17-19
- Nakane, T.; Asayama, K.; Koreda, K.; Hayashibe, U.; Uchida, N.; Nakazawa, S. (1998): Effect of selenium deficiency on cellular and extracellular glutathione peroxidases: Immunochemical detection and mRNA analysis in rat kidney and serum, *Free Radic Biol Med*, Vol. 25, 504-511
- Namiki, M. (1990): Antioxidants / antimutagens, *Crit Rev in Food Sci and Nutr*, Vol. 29, 273-300
- Narasimhamurthy, K.; Raina, P. L. (1999): Long term feeding effects of heated and fried oils on lipids and lipoproteins in rats, *Mol Cell Biochem*, Vol. 195, 143-153
- Naumann, C.; Bassler, R. (1976): *Methodenbuch Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln*, mit 1. Ergänzungslieferung (1983), 2. Ergänzungslieferung (1988), 3. Ergänzungslieferung (1993) und 4. Ergänzungslieferung (1997), VDLUFA-Verlag Darmstadt
- Navab, M.; Hama, S. Y.; Cook, C. J.; Anatharamaiah, G. M.; Chaddha, M.; Jin, L.; Subbanagounder, G.; Faull, K. F.; Reddy, S. T.; Miller, N. E.; Fogelman, A. M. (2000a): Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: Step 1, *J Lipid Res*, Vol. 41, 1481-1494
- National Research Council (1995): *Nutrient requirements of laboratory animals*, National Academy Press
- Navab, M.; Hama, S. Y.; Cook, C. J.; Anatharamaiah, G. M.; Hassan, K.; Hough, G. P.; Watson, A. D.; Reddy, S. T.; Sevanian, A.; Fonarow, G. C.; Fogelman, A. M. (2000b): Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: Step 2 and 3, *J Lipid Res*, Vol. 41, 1495-1508
- Navab, M.; Berliner, J. A.; Watson, A. D.; Hama, S. Y.; Territo, M. C.; Lusis, A. J.; Shih, D. M.; Van Lenten, B. J.; Frank, J. S.; Demer, L. L.; Edwards, P. A.; Fogelman, A. M. (1996): The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol. 16, 831-342

- Nemoto, S.; Otsuka, M.; Arakawa, N. (1996a): Inhibitory effect of ascorbate on cell growth: Relation to catalase activity, *J Nutr Sci Vitaminol*, Vol. 42, 77-85
- Nemoto, S.; Otsuka, M.; Arakawa, N. (1996b): A positiv correlation between catalase activity and ascorbate uptake in the tissues of guinea pigs and cultured cells of mammals, *J Nutr Sci Vitaminol*, Vol. 42, 387-395
- Nesterenko, M. V.; Tilley, M.; Upton, S. J. (1994): A simple modification of Blum`s silver stain method allows for 30 minutes detection of proteins in polyacrylamide gels, *J Biochem Biophys Methods*, Vol. 28, 239-242
- Nichols, A. V. (1967): Human serum lipoproteins and their interrelationships, *Adv Biol Med Phys*, Vol. 11, 109-159
- Niki, E. (1988): Synergistic inhibition of oxidation by vitamin E and vitamin C, In: *Cellular Antioxidant Defense Mechanisms*, Chow, C. K. (Ed.), CRC Press Inc., Boca Raton, 111-122
- Niki, E.; Komuro, E.; Takahashi, M.; Urano, S.; Ito, E.; Terao, K. (1988): Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers, *J Biol Chem*, Vol 263, 19809-19814
- Nolen, G. A.; Alexander, J. C.; Artman, N. R. (1967): Long-term rat feeding study with use frying fats, *J Nutr*, Vol. 93, 337-348
- Nwanguma, B. C.; Achebe, A. C.; Ezeanyika, L. U.; Eze, L. C. (1999): Toxicity of oxidized fats II: Tissue levels of lipid peroxides in rats fed a thermally oxidized corn oil diet, Vol. 37, 413-416
- O`Dell, B. L.; Browning, J. D.; Reeves, P. G. (1987): Zinc deficiency increases the osmotic fragility of rat erythrocytes, *J Nutr*, Vol. 117, 1883-1889
- Orada, M.; Mijazawa, Z.; and Kaneda, T. (1986): Distribution of ¹⁴C after oral administration of (U-¹⁴C) labeled methyl linoleate hydroperoxides and their secondary oxidation products in rats, *Lipids*, Vol. 21, 150-154
- Osada, K.; Kodama, T.; Cui, L.; Yamada, K.; Sugano, M. (1993): Levels and formation of oxidized cholesterols in processed marine foods, *J Agric Food Chem*, Vol. 41, 1893-1898
- Osada, K.; Sasaki, E.; Sugano, M. (1994): Lymphatic absorption of oxidized cholesterol in rats, *Lipids*, Vol. 29, 555-559
- Paglia, D. E.; Valentine, W. N. (1967): Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *J Lab Clin Med*, Vol. 70, 158-169
- Palut, D. (1997): Proliferation of peroxisomes and the hepatocarcinogenic process, *Rocs Panstw Zak Hig*, Vol. 48, 1-11
- Paniangvait, P.; King, A. J.; Jones, A. D.; German, B. G. (1995): Cholesterol oxides in foods of animal origin, *J Food Sci*, Vol. 60, 1159-1174
- Pardun, H. (1976): *Analyse der Nahrungsfette*, Kiermeier, F. (Ed.), Verlag Paul Parey in Berlin und Hamburg

- Park, S. W.; Addis, P. B. (1985): HPLC determination of C-7 oxidized cholesterol derivatives in foods, *J Food Sci*, Vol. 50, 1437-1441
- Paterson, P. G.; Gorecki, D. K. J.; Card, R. T. (1994): Vitamin E deficiency and erythrocyte deformability in rat, *Nutr Biochem*, Vol. 5, 298-302
- Penumetcha, M.; Khan, N.; Parthasarathy, S. (2000): Dietary oxidized fatty acids: An atherogenic risk?, *J Lipid Res*, Vol. 41, 1473-1480
- Perciballi, M.; Pintauro, S. J. (1985): The effects of fractionated thermally oxidized corn oil on drug-metabolizing enzyme systems in the rat, *Food Chem Toxicol*, Vol. 23, 737-740
- Perez-Campo, R.; Lopez-Torres, M.; Rojas, C.; Cadenas, S.; Barja, G. (1993): A comparative study of free radicals in vertebrates – I. Antioxidant enzymes, *Comp Biochem Physiol B*, Vol. 105, 749-755
- Plug, C. M.; Dekker, D.; Bult, A. (1984): Complex stability of ferrous ascorbate in aqueous solution and its significance for iron absorption, *Pharm Weekbl [Sci]*, Vol. 6, 245-248
- Polidori, M. C.; Mecocci, P. (2002): Plasma susceptibility to free radical-induced antioxidant consumption and lipid peroxidation is increased in very old subjects with Alzheimer disease, *J Alzheimers Dis*, Vol. 4, 513-518
- Poling, C. E.; Eagle, E.; Rice, E. E.; Durand, A. M. A.; Fisher, M. (1970): Long-term responses of rat to heat-treated dietary fats: IV – Weight gains, food and energy efficiencies, longevity and histopathology, *Lipids*, Vol. 5, 128-136
- Pongracz, G.; Weiser, H.; Matzinger, D. (1995): Tocopherole – Antioxidantien der Natur, *Fat Sic Technol*, Vol. 97, 90-104
- Porter, T. D. (2003): Supernatant protein factor and tocopherol-associated protein: An unexpected link between cholesterol synthesis and vitamin E, *J Nutr Biochem*, Vol. 14, 3-6
- Ramachandran, H. D.; Narasimhamurthy, K.; Raina, P. L. (2002): Effect of oxidative stress on serum and antioxidant enzymes in liver and kidney of rats and their modulation through dietary factors, *Indian J Exp Biol*, Vol. 40, 1010-1015
- Recknagel, R. O.; Glende, E. A., Jr. (1984): Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes, In: *Methods in Enzymology*, Packer, L. (Ed.), Academic Press, New York, 331-337
- Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C. (1993): AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, *American Inst Nutr*, 1939-1952
- Reiter, R.; Wendel, A. (1984): Selenium and drug metabolism. II. Independence of glutathione peroxidase and reversibility of hepatic enzyme modulations in deficient mice, *Biochem Pharmacol*, Vol. 33, 1923
- Reiter, R.; Wendel, A. (1983): Selenium and drug metabolism. I. Multiple modulations of mouse liver enzymes, *Biochem Pharmacol*, Vol. 32, 3063
- Ringseis, R.; Eder, K. (2002): Insufficient dietary vitamin E increases the concentration of 7 β -Hydroxycholesterol in Tissues of rats fed salmon oil, *J Nutr*, Vol. 132, 3732-3735

- Rojas, C.; Cadenas, S.; López-Torres, M.; Pérez-Campo, R.; Baraja, G. (1996): Increase in heart glutathion redox ration and total antioxidant capacity and decrease in lipid peroxidation after vitamin E dietary supplementation in guinea pigs, *Free Radic Biol Med*, Vol. 21, 907-915
- Rojas, C.; Cadenas, S.; Pérez-Campo, R.; López-Torres, M.; Baraja, G. (1994): Effect of vitamin C on antioxidants, lipid peroxidation and GSH system in the normal guinea pig heart, *J Nutr Sci Vitaminol*, Vol. 40, 411-420
- Ross, M. A. (1994): Determination of ascorbic acid and uric acid in plasma by high-performance liquid chromatography, *J Chrom B*, Vol. 657, 197-200
- Rumsey, S. C.; Galeano, N. F.; Lipschitz, B.; Deckelbaum, R. J. (1995): Oleate and other long chain fatty acids stimulate low density lipoprotein receptor activity by regulatory cholesterol pools in cultured cells, *J Bio Chem*, Vol. 270, 10008-10016
- Saka, S.; Aouacheri, W.; Abdennour, C. (2002): The capacity of glutathione reductase in cell protection from the toxic effect of heated oils, *Biochimie*, Vol. 84, 661-665
- Sanchez-Martin, M. M.; Sanchez-Barnal, C.; Sanchez-Llorente, A.; Cabezas, J. A.; Perez-Gonzalez, N. (1993): Lysosomal enzyme activities in liver and sera from guinea pigs fed oil related to the toxic oil syndrom, *Biol Chem Hoppe Seyler*, Vol. 374, 665-670
- Sanders, T. A. B. (1989): Nutritional aspects of rancidity, In: *Rancidity in Foods*, Allen, J. C.; Hamilton, R. J. (Ed.), Elsevier Applied Science, London, 125-139
- Saucier, S. E.; Kandutsch, A. A.; Gayen, A. K.; Swahn, D. K.; Spencer, T. A. (1989): Oxysterol regulators of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in liver, *J Biol Chem*, Vol. 264, 6863-6869
- Selmer, D. (1994): Bindung von Low Density Lipoprotein an Makrophagen unter dem Einfluss von Magnesium-Pyridoxalphosphat-glutamat und anderen Antioxidantien, Dissertation an der Technischen Universität München
- Sevanian, A.; Hodis, H. N.; Hwang, J.; McLeod, L. L.; Peterson, H. (1995): Characterization of endothelial cell injury by cholesterol oxidation products found in oxidized LDL, *J Lipid Res*, Vol. 36, 1971-1986
- Sheehy, P. J.; Morrissey, P. A.; Flynn, A. (1994): Consumption of thermally oxidized sunflower oil by chicks reduces alpha-tocopherol status and increases susceptibility of tissues to lipid oxidation, *Br J Nutr*, Vol. 71, 53-65
- Sidwell, C. G.; Salwin, H.; Benca, M.; Mitchell, J. H., Jr. (1954): The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation, *J Am Oil Chem Soc*, Vol. 31, 603-606
- Sies, H. (1994): Oxidative stress: from basic research to clinical medicine, In: *Trace Elements and Free Radicals in Oxidative Diseases*, Favier, A. E.; Nève, J.; Faure, P. (Ed.), AOCS Press, Champaign, Illinois, 1-7
- Sies, H. (1989): Relationship between free radicals and vitamins, In: *Elevated dosages of vitamins*, Walter, P.; Stähelin, H.; Brubaker, G. (Ed.), Hans Huber Publishers, Toronto, 215-223

- Simon, J. A.; Hudes, E. S. (1998): Relation of serum ascorbic acid to serum lipids and lipoproteins in US adults, *J Am Coll Nutr*, Vol. 17, 250-255
- Škufca, P. (2002): Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss oxidierter Fette auf ausgewählte Parameter des Schilddrüsenhormon- und Lipidstoffwechsels beim Modelltier Ratte, Dissertation an der Universität Halle-Wittenberg
- Slade, R.; Crissman, K.; Norwood, J.; Hatch, G. (1993): Comparison of antioxidant substances in bronchoalveolar lavage cells and fluid from humans, guinea pigs and rats, *Exp Lung Res*, Vol. 19, 469-484
- Smith, M. A.; Rottkamp, C. A.; Nunomura, A.; Raina, A. K.; Perry, G. (2000): Oxidative stress in Alzheimer's disease, *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1502, 139-144
- Song, W.; Pierce, W. M.; Saeki, Y.; Redinger, R. N.; Prough, R. A. (1996): Endogenous 7-oxocholesterol is an enzymatic product: Characterization of 7 α -hydroxycholesterol dehydrogenase activity of hamster liver microsomes, *Arch Biochem Biophys*, Vol. 328, 272-282
- Sparrow, C. P.; Parthasarathy, S.; Steinberg, D. (1989): A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein, *J Bio Chem*, Vol. 264, 2599-2604
- Srinivasan, K. N.; Pugalendi, K. V. (2000): Effect of excessive intake of thermally oxidized sesam oil on lipid, lipid peroxidation and antioxidants' status in rats, *Indian J Exp Biol*, Vol. 38, 777-780
- Staprāns, I.; Hardman, D. A.; Pan, X.-M.; Feingold, K. R. (1999): Effect of oxidized lipids in the diet on oxidized lipid levels in postprandial serum chylomicrons of diabetic patients, *Diabetes Care*, Vol. 22, 300-306
- Staprāns, I.; Rapp, J. R.; Pan, X.-M.; Hardman, D. A.; Feingold, K. R. (1996): Oxidized lipids in the diet accelerate the development of fatty streaks in cholesterol-fed rabbits, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol. 16, 533-538
- Staprāns, I.; Rapp, J. R.; Pan, X.-M.; Kim, K. Y.; Feingold, K. R. (1994): Oxidized lipids in the diet are a source of oxidized lipid in chylomicrons of human serum, *Arterioscler Thromb*, Vol. 14, 1900-1905
- Suresh, M. V.; Sreeranjit Kumar, C. V.; Lal, J. J.; Indira, M. (1999): Impact of massive ascorbic acid supplementation on alcohol-induced oxidative stress in guinea pigs, *Tox Letters*, Vol. 104, 221-229
- Tabet, N.; Mantle, D.; Orrell, M. (2000): Free radicals as mediators of toxicity in Alzheimer's disease: A review and hypothesis, *Adverse Drug React Toxicol Rev*, Vol. 19, 127-152
- Thomas, J. P.; Maiorino, M.; Ursisni, F.; Girotti, A. W. (1990): Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation, *J Biol Chem*, Vol. 265, 454-461
- Tiedink, C.; Katan, H. (1989): Variability in lipoprotein concentrations in serum after prolonged storage at 20 degrees C, *Clin Chim Acta*, Vol. 180, 147-155

- Tietze, F. (1969): Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues, *Anal Biochem*, Vol. 27
- Toyoda, H.; Himeno, S.; Imura, N. (1990): Regulation of glutathione peroxidase mRNA level by dietary selenium manipulation, *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1049, 213-215
- Ursini, F.; Zamburlini, A.; Cazzolato, G.; Maiorino, M.; Bon, G. B.; Sevanian, A. (1998): Postprandial plasma lipid hydroperoxides: A possible link between diet and atherosclerosis, *Free Radic Biol Med*, Vol. 25, 250-252
- Ursini, F. (1988): The phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: a peroxidation inhibition enzyme, In: *Cellular Antioxidant Defense Mechanisms*, Chow, C. K. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 69-76
- Valenzuela, A. (1991): The biological significance of malondialdehyde determination in assessment of tissue oxidative stress, *Life Sciences*, Vol. 48, 301-309
- Vázquez, M.; Merlos, M.; Adzet, T.; Laguna, J. C. (1998): Influence of lipid profile and fatty acid composition on the oxidation behavior of rat and guinea pig low density lipoprotein, *Comp Biochem Physiol*, Vol. 119, 311-316
- Vázquez, M.; Zambo, D.; Hernandez, Y.; Adzet, T.; Merlos, M.; Laguna, J. C. (1997): Lipoprotein composition and oxidative modification during therapy with gemfibrozil and lovastatin in patients with combined hyperlipidemia, *Br J Clin Pharmacol*, Vol. 45, 236-269
- Wang, S. Y.; Bottje, W.; Maynard, P.; Dibner, J.; Shermer, W. (1997): Effect of Santoquin and oxidized fat on liver and intestinal glutathione in broilers, *Poult Sci*, Vol. 76, 961-967
- Wang, Q.; Quinn, P. J. (1999): Vitamin E and its function in membranes, *Progr Lipid Res*, Vol. 38, 309-336
- Wartanowicz, M.; Panczenko-Kresowska, B.; Ziemiański-Kowalska, M.; Okolska, G. (1984): The effect of α -tocopherol and ascorbic acid on the serum lipid peroxide level in elderly people, *Ann Nutr Metab*, Vol. 28, 186-191
- Weiss, S. L.; Evenson, J. K.; Thompson, K. M.; Sunde, R. A. (1996): The selenium requirement for glutathione peroxidase mRNA level is half of the selenium requirement for glutathione peroxidase activity in female rats, *J Nutr*, Vol. 126, 2260-2267
- Weiss, J. F.; Kumar, K. S. (1988): Antioxidant mechanisms in radiation injury and radioprotection, In: *Cellular Antioxidant Defense Mechanisms*, Chow, C. K. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 163-189
- Westermeier, R. (1990): *Elektrophorese-Praktikum*, VCH-Verlagsgemeinschaft mbH
- Wittenstein, B.; Klein, M.; Finck, B.; Ulrich, K.; Kohlschutter, A. (2002): Plasma antioxidants in pediatric patients with glycogen storage disease, diabetes mellitus and hypercholesterolemia, *Free Radic Biol Med*, Vol. 33, 103-110
- Xing, Y.; Baffic, J.; Sparrow, C. P. (1998): LDL oxidation by activated monocytes: characterization of the oxidized LDL and requirement for transition metal ions, *J Lipid Res.*, Vol. 39, 2201-2208

Yamamoto, K.; Volkl, A.; Hashimoto, T.; Fahimi, H. D. (1988): Catalase in guinea pig hepatocytes is localized in cytoplasm, nuclear matrix and peroxisomes, *Eur J Cell Biol*, Vol. 46, 129-135

Yoshida, H.; Kajimoto, G. (1989): Effect of dietary vitamin E on the toxicity of autoxidized oil to rats, *Ann Nutr Metab*, Vol. 33, 153-161

Yuan, X. M.; Brunk, U. T. (1998): Iron and LDL-oxidation in atherogenesis, *APMIS*, Vol. 106, 825-842

Ziedén, B.; Kaminskas, A.; Kristenson, M.; Kucinskienė, Z.; Vessby, B.; Olsson, A. G.; Diczfalusy, U. (1999): Increased plasma 7 β -Hydroxycholesterol concentrations in a population with a high risk for cardiovascular disease, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol. 19, 967-971

Zouhair, F. S.; Yurachek, E. C. (1993): Rapid fluorometric assay of LDL receptor activity by Dil-labeled LDL, *J Lipid Res*, Vol. 34, 325-330

Lebenslauf

Name: Uta Keller
Geburtsdatum: 02.03.1976
Geburtsort: Halle/Saale
Familienstand: ledig

Theorie:

09/1982 – 07/1989 Schullaufbahn an polytechnischer Oberschule in Halle-Neustadt
09/1989 – 07/1990 Karl-Liebknecht-Oberschule in Halle (Leistungsklasse)
09/1990 – 07/1994 Gymnasium am Bildungszentrum in Halle
Abschluss: Abitur

10/1994 – 09/1999 Studium der Ernährungswissenschaften
an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Diplomarbeit: Ethanolamin/Selenat-Einfluss auf Selen- und Schwermetall-
status, antioxidative Aktivität, Carotinoid- sowie Phenolgehalt
in Tomaten (*Lycopersicon esculentum*)
Abschluss: Diplom Trophologin

01/2003 – 10/2003 Promotionsstudium
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Praxis:

03/1996 Halloren Schokoladenfabrik GmbH Halle
Praktikum: Qualitätskontrolle und Produktentwicklung

09/1996 Klinik Bavaria Freyung
Praktikum: Ernährungsberatung

03/1997 Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt des Landkreises Saalkreis
Praktikum: Außendienst

09/1997 Coca-Cola Erfrischungsgetränke AG, Area Sachsen-Anhalt
Praktikum: Qualitätssicherung

11/1997 – 01/1998 Forschungsprojekt der GAU Göttingen
Mitarbeit am Ernährungsbericht 2000

04/1999 – 10/1999 Institut für Ernährung an der FSU Jena
Studentische Hilfskraft

11/1999 – 02/2000 BSMG Worldwide GmbH Hamburg
Assistentin im Food & Beverage Team

04/2000 – 12/2002 Institut für Ernährungswissenschaften an der MLU Halle
Wissenschaftliche Mitarbeiterin

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „Wirkung oxidierter Fette auf das antioxidative Schutzsystem an Ratten und Meerschweinchen bei variierender Konzentration von Vitamin E und Vitamin C in der Diät“ selbständig angefertigt und diese nicht bereits für eine Promotion oder ähnliche Zwecke an einer anderen Universität eingereicht habe. Alle hierzu benutzten wissenschaftlichen Arbeiten und Hilfsmittel sind genau und vollständig angegeben worden.

Halle/Saale, den 13.09.2003

.....
Uta Keller

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. habil. K. Eder für die Übertragung des Themas, die Gewährung der Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Ernährungswissenschaften und die tatkräftige Unterstützung bei der Publikation der Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. C. Brandsch für die tierexperimentelle Betreuung und die Hilfestellung bei der Anfertigung der Dissertation. Bei Herrn Dr. F. Hirche bedanke ich mich für die bereitwillige Hilfe bei der Bearbeitung analytischer Fragestellungen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dipl. troph. A. Sülzle und Frau Dr. D. Flader-Ringseis für die außerordentlich gute Zusammenarbeit. Des Weiteren danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Ernährungswissenschaften, insbesondere den technischen Kräften und Doktoranden, für ihre Hilfsbereitschaft und Mitarbeit.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung des Forschungsprojektes.