

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaften

Direktor: Prof. Dr. Klaus Eder

**Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss oxidierter Fette  
auf ausgewählte Parameter des Lipidstoffwechsels  
am Modelltier Ratte**

Der Landwirtschaftlichen Fakultät

Dekan: Prof. Dr.-Ing. Peter Pickel

Der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg

als

**DISSERTATION**

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

**Vorgelegt von: Dipl. troph. Andrea Sülzle**

Gutachter: Prof. Dr. Klaus Eder  
Prof. Dr. Gabriele Stangel  
PD Dr. Matthias Brandsch

Verteidigung: 19. Januar 2004

**urn:nbn:de:gbv:3-000006142**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006142>]

## INHALT

|  |    |
|--|----|
| <b>1 EINLEITUNG</b> .....  | 1  |
| <b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>   |    |
| <b>2.1 Versuchsaufbau</b>  |    |
| 2.1.1 Herstellung der Diätfette .....  | 5  |
| 2.1.2 Zusammensetzung der Diät .....   | 6  |
| 2.1.3 Versuchstiere .....  | 7  |
| <b>2.2 Charakterisierung der Diätfette</b>   |    |
| 2.2.1 Fettsäurezusammensetzung .....   | 8  |
| 2.2.2 Tocopherolkonzentration .....  | 8  |
| 2.2.3 Peroxidzahl .....  | 9  |
| 2.2.4 Säurezahl .....  | 9  |
| 2.2.5 UV-Spektrum .....  | 9  |
| 2.2.6 Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen .....  | 10 |
| 2.2.7 Gesamt-Carbonyle .....   | 10 |
| 2.2.8 Polare und unpolare Verbindungen .....   | 11 |
| <b>2.3 Aufarbeitung des Probenmaterials</b>  |    |
| 2.3.1 Blutserum und Lipoproteine .....   | 12 |
| 2.3.2 Homogenat, Zytosol und Gesamt-RNA der Leber .....                                      | 12 |
| 2.3.3 Gesamtlipide aus Diät, Leber und Abdominalfett .....                                   | 13 |
| <b>2.4 Analysemethoden</b>   |    |
| 2.4.1 $\alpha$ -Tocopherolkonzentration und<br>scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E ..... | 14 |
| 2.4.2 Triglyceride und Cholesterin .....   | 14 |
| 2.4.3 Gesamtlipide und Phospholipide der Leber   |    |
| 2.4.3.1 Trennung der Lipide .....  | 15 |
| 2.4.3.2 Fettsäurezusammensetzung der Lipide .....  | 16 |
| 2.4.3.3 Quantifizierung der Lipidfraktionen .....  | 16 |
| 2.4.4 Aktivitätsbestimmungen lipogener Enzyme in der Leber                                   |    |
| 2.4.4.1 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase .....   | 18 |
| 2.4.4.2 Fettsäure-Synthase .....   | 19 |
| 2.4.5 Expressionsanalyse relevanter Enzyme in der Leber                                      |    |
| 2.4.5.1 Allgemeine RT-PCR-Bedingungen .....  | 20 |
| 2.4.5.2 Semiquantitative RT-PCR .....  | 22 |
| 2.4.5.2.1 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase .....   | 23 |
| 2.4.5.2.2 Fettsäure-Synthase .....   | 23 |
| 2.4.5.3 Quantitative RTD-PCR .....   | 24 |
| 2.4.5.3.1 Acyl-CoA-Oxidase .....   | 26 |
| 2.4.5.3.2 $\Delta$ 5-, $\Delta$ 6- und $\Delta$ 9-Desaturase .....                           | 27 |
| 2.4.6 Erstellung eines Genexpressionsprofils mittels cDNA-Array .....                        | 28 |
| 2.4.7 Statistische Auswertung .....  | 30 |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| <b>3</b> | <b>ERGEBNISSE</b>   |    |
| 3.1      | Charakterisierung der Diätfette .....   | 31 |
| 3.2      | Entwicklung der Lebendmasse .....   | 33 |
| 3.3      | $\alpha$ -Tocopherolkonzentration und scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E ..... | 34 |
| 3.4      | Triglyceridkonzentrationen und Enzyme des Lipidstoffwechsels                        |    |
| 3.4.1    | Triglyceridkonzentration in Serum, Lipoproteinen und Leber .....                    | 36 |
| 3.4.2    | Glucose-6-Phosphatdehydrogenase und Fettsäure-Synthase .....                        | 38 |
| 3.4.3    | mRNA-Konzentration der Acyl-CoA-Oxidase .....                                       | 38 |
| 3.4.4    | Expressionsänderung von Genen der Fettsäureoxidation .....                          | 40 |
| 3.5      | Cholesterinkonzentration in Serum, Lipoproteinen, Leber und Kot .....               | 42 |
| 3.6      | Leberlipide und Lipidsynthese   |    |
| 3.6.1    | Konzentration der Lipidfraktionen .....   | 44 |
| 3.6.2    | Fettsäurezusammensetzung der Gesamtlipide .....                                     | 44 |
| 3.6.3    | Fettsäurezusammensetzung des Phosphatidylcholins .....                              | 50 |
| 3.6.4    | Fettsäurezusammensetzung des Phosphatidylethanolamins .....                         | 51 |
| 3.6.5    | mRNA-Konzentration der $\Delta 9$ -, $\Delta 6$ - und $\Delta 5$ -Desaturase .....  | 59 |
| 3.7      | Expression hepatischer Gene .....   | 61 |
| <b>4</b> | <b>DISKUSSION</b>   |    |
| 4.1      | Einschätzung der Diätfette .....  | 67 |
| 4.2      | Einfluss oxidierter Diätfette auf die Lebendmasseentwicklung .....                  | 67 |
| 4.3      | Einfluss oxidierter Diätfette auf den Vitamin E-Status .....                        | 68 |
| 4.4      | Einfluss oxidierter Diätfette auf die Triglyceridkonzentration                      |    |
| 4.4.1    | Triglyceridkonzentration in Plasma, VLDL und Leber .....                            | 69 |
| 4.4.2    | Liponeogenese .....   | 69 |
| 4.4.3    | Lipolyse .....  | 70 |
| 4.4.4    | Aktivierung des PPAR $\alpha$ .....   | 71 |
| 4.5      | Einfluss oxidierter Diätfette auf die Cholesterinkonzentration .....                | 73 |
| 4.6      | Einfluss oxidierter Diätfette auf die Leberlipide                                   |    |
| 4.6.1    | Phospholipidkonzentrationen .....   | 74 |
| 4.6.2    | Fettsäurezusammensetzung .....  | 74 |
| 4.6.3    | $\Delta 9$ -, $\Delta 6$ - und $\Delta 5$ -Desaturase .....                         | 78 |
| 4.7      | Einfluss eines oxidierten Diätfettes auf die Expression hepatischer Gene .....      | 80 |
| <b>5</b> | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....  | 83 |
|          | <b>SUMMARY</b> .....  | 87 |
| <b>6</b> | <b>LITERATUR</b> .....  | 91 |

## ABKÜRZUNGEN

|                |   |
|----------------|---|
| ACO            | Acyl-CoA-Oxidase  |
| ANOVA          | Varianzanalyse  |
| cDNA           | komplementäre Desoxyribonukleinsäure                            |
| CoA            | Coenzym A   |
| CYP            | Cytochrom P <sub>450</sub> -Enzym                               |
| EC             | Nummer im Enzymkatalog  |
| EMBL ID        | Europäisches molekularbiologisches Labor, Identifikationsnummer |
| FF             | Versuchsgruppe mit frischem Fett                                |
| FSS            | Fettsäure-Synthtase   |
| G6PDH          | Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase                                |
| GAPDH          | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase                        |
| HDL            | Lipoproteine hoher Dichte                                       |
| HPLC           | Hochauflösende Flüssigchromatographie                           |
| LDL            | Lipoproteine geringer Dichte                                    |
| LPOP           | Lipidperoxidationsprodukte                                      |
| mRNA           | <i>messenger</i> -Ribonukleinsäure                              |
| MUFA           | Einfach ungesättigte Fettsäure                                  |
| NADP+          | Nicotinamidadenindinucleotidphosphat                            |
| NADPH          | Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, reduziert                 |
| OF             | Versuchsgruppe mit oxidiertem Fett                              |
| PCR            | Polymerase-Kettenreaktion                                       |
| PPAR- $\alpha$ | Peroxisomenproliferation-auslösender Rezeptor alpha             |
| PUFA           | Mehrfach ungesättigte Fettsäure                                 |
| RTD-PCR        | <i>Realtime-detection</i> PCR                                   |
| RT-Reaktion    | Reverse Transkriptase-Reaktion                                  |
| SFA            | Gesättigte Fettsäure  |
| SREBP          | <i>sterol regulatory element binding protein</i>                |
| TÄ             | $\alpha$ -Tocopheroläquivalente                                 |
| TBARS          | Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen                           |
| VLDL           | Lipoproteine sehr geringer Dichte                               |

## 1 EINLEITUNG

Nahrungsfette können unter dem Einfluss von Wärme, Licht, Metallionen und dem Sauerstoff der Luft oxidieren. Dabei entstehen eine Vielzahl von primären und sekundären Lipidperoxydationsprodukten (LPOP) (PARDUN 1976, CHARDINGNY et al. 1996). LPOP werden sowohl bei der Bearbeitung als auch bei der Lagerung von fetthaltigen Nahrungs- und Futtermitteln gebildet (SÉBÉDIO und GRANDGIRARD 1989, BATTINO et al. 2002). Sie verändern die sensorischen Eigenschaften und sind vor allem aufgrund ihrer vielfältigen physiologischen Wirkungen relevant (NOLEN et al. 1976, KUBOW 1992). Da oxidierte Fette in der Ernährung von Mensch und Nutztier eine zunehmende Bedeutung erfahren (COHN et al. 2002), ist es notwendig, ihre Wirkungen und die zugrunde liegenden Mechanismen zu verstehen.

Die Wirkungen von oxidierten Diätfetten auf den Organismus wurden bereits in früheren Studien untersucht. In diesen Studien wurden jedoch zumeist Fette eingesetzt, die unter extremen Bedingungen oxidiert wurden und dadurch zu toxischen Symptomen wie Wachstumsdepression, Diarrhöe oder Seborrhöe führten (ALEXANDER et al. 1987, YOSHIDA und KAJIMOTO 1989, BLANC et al. 1992, HAYAM et al. 1995, BØRSTING und ENGBERG 1994). Solche extrem oxidierten Fette spiegeln die tatsächliche Situation in der Ernährungspraxis nicht richtig wider. Außerdem sind einige Studien für die Klärung der physiologischen Wirkungen oxidiertes Fette nur begrenzt geeignet, da die Verfütterung oxidiertes Fette an Versuchstiere mit methodischen Problemen verbunden ist: Diäten mit oxidiertem Fett werden aufgrund des charakteristisch „ranzigen“ Geruchs und der Toxizität weniger gefressen als Diäten mit frischem Fett (GABRIEL et al. 1977, CORCOS-BENEDETTI et al. 1987). Zudem enthält oxidiertes Fett im Vergleich zu frischem Fett geringere Konzentrationen an langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) und an Vitamin E (BILLEK 1980, D'AQUINO et al. 1985, HOCHGRAF et al. 1997, CORCOS-BENEDETTI et al. 1990). Daraus resultiert eine verminderte Nährstoffaufnahme, die den Stoffwechsel bereits an sich beeinflusst (FILLION und HENRY 1998, AMMOUCHE et al. 2002). So ist bekannt, dass Plasmalipide, aber auch die Genexpression und die Aktivität lipogener und lipolytischer Enzyme durch eine unterschiedliche Nährstoffzufuhr beeinflusst werden können (KATSURADA et al. 1986, HERZBERG und ROGERSON 1988, CLARKE und JUMP 1994, NTAMBI 1992, PRIP-BUUS et al. 1995, CHO et al. 1999). Mit diesen Studien können die eigentlichen Wirkungen oxidiertes Fette auf den Stoffwechsel nicht mehr isoliert betrachtet werden. Das gesicherte Wissen über die physiologischen Wirkungen von LPOP ist somit begrenzt.

Aus früheren Untersuchungen mit mäßig oxidierten Diätfetten ist bekannt, dass LPOP neben dem antioxidativen Schutzsystem auch den Lipidstoffwechsel der Tiere beeinflussen (EDER und KIRCHGESSNER 1998a). Die Wirkmechanismen sind jedoch weitgehend unklar. Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, die Wirkmechanismen von mäßig oxidierten Fetten auf den Lipidstoffwechsel zu untersuchen. Da die physiologischen Wirkungen oxidiertes Fett durch die Konzentrationen an LPOP bestimmt werden (KUBOW 1992) und bislang keine Studien zum Einfluss von oxidierten Fetten mit unterschiedlichen Konzentrationen an LPOP auf den Lipidstoffwechsel vorliegen, soll der Einfluss von Diätfetten mit unterschiedlichen Konzentrationen an primären und sekundären LPOP untersucht werden. Ausgehend von bisherigen Erkenntnissen über die physiologischen Wirkungen oxidiertes Fett auf den Lipidstoffwechsel soll folgenden Fragestellungen nachgegangen werden:

Die Verfütterung von oxidierten Fetten führt zu verminderten Triglyceridkonzentrationen im Blutplasma und in der Leber (EDER und KIRCHGESSNER 1998a). Eine mögliche Erklärung ist eine verminderte Lipidsynthese (Liponeogenese) (EDER und KIRCHGESSNER 1998b). Es soll deshalb untersucht werden, ob die Verfütterung oxidiertes Fett neben der Aktivität auch die Genexpression der lipogenen Enzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) und Fettsäure-Synthase (FSS) in der Leber hemmt. Aus den Veränderungen der lipogenen Enzyme G6PDH und FSS kann generell auf Veränderungen der Liponeogenese geschlossen werden, da verschiedene Studien zeigten, dass alle untersuchten lipogenen Enzyme in ähnlicher Weise reguliert wurden (HERZBERG und ROGERSON 1988, IRITANI et al. 1998, EDER und KIRCHGESSNER 1998b).

Die andere mögliche Ursache für verminderte Triglyceridkonzentrationen in den Geweben kann ein gesteigerter Lipidabbau (Lipolyse) sein. Die Lipolyse wird insbesondere durch die mitochondriale  $\beta$ -Oxidation bestimmt, in geringerem Ausmaß aber auch durch die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation und die mikrosomale  $\omega$ - und  $\omega$ -1-Oxidation von Fettsäuren. Um den Einfluss von oxidierten Diätfetten auf die Lipolyse zu untersuchen, wird ein cDNA-Array verwendet, das wesentliche Gene der Fettsäureoxidation enthält.

Erst kürzlich wurde festgestellt, dass die Gene einiger lipolytischer Enzyme durch den Peroxisomenproliferation-aktivierenden Rezeptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) reguliert werden (CHINETTI et al. 2000). PPAR $\alpha$  wird hauptsächlich in der Leber exprimiert (BRAISSANT et al. 1996) und ist der molekulare Vermittler der Proliferation von Peroxisomen (ISSEMAN und GREEN 1990, LEE et al. 1995). Um zu prüfen, ob oxidiertes Fett diesen Rezeptor aktivieren und dadurch lipidsenkend wirken können, wird die Genexpression der Acyl-CoA-Oxidase (ACO) in der Leber bestimmt. Die ACO ist ein geeignetes Markergen für den Nachweis einer PPAR $\alpha$ -Aktivierung, da ihre Expression eine Peroxisomenproliferation voraussetzt (TUGWOOD et al 1992, MARCUS et al. 1993, GREEN 1995, FAN et al. 1996).

In einer Studie von EDER (1999) wurde eine veränderte Fettsäurezusammensetzung der Gesamt- und Phospholipide der Leber festgestellt, die nach JOHNSON et al. (1989) auf eine veränderte Synthese von einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA und PUFA) durch Desaturation und Elongation hinweist. Eine veränderte Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide kann nicht nur die Membraneigenschaften, sondern auch die Synthese von Eicosanoiden beeinflussen, die an vielseitigen physiologischen Funktionen beteiligt sind. Um der These einer veränderten Fettsäuresynthese nachzugehen, wird die Fettsäurezusammensetzung der Gesamt-Lipide und der Phospholipide der Leber analysiert und die Quotienten aus den Konzentrationen der Fettsäuren gebildet, die End- und Ausgangsprodukte der  $\Delta 9$ -,  $\Delta 6$ -,  $\Delta 5$ - und  $\Delta 4$ -Desaturation und Elongation sind. Um zu beurteilen, ob oxidierte Diätfette die Synthese von MUFA und PUFA bereits auf der Transkriptionsebene beeinflussen können, wurde die mRNA-Konzentration der  $\Delta 9$ -,  $\Delta 6$ - und  $\Delta 5$ -Desaturase analysiert. Die Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide lässt neben Rückschlüssen auf die Synthese von MUFA und PUFA auch Rückschlüsse auf die Membranfluidität (SHINITZKI 1984), die Aktivität membranständiger Enzyme (SCHWARTZMANN et al. 1996, NGUYEN 1999) und die Bildung von Eicosanoiden zu (BRENNER 1989, HAYAM et al. 1993, HOCHGRAF et al. 1997).

Die vielfältigen physiologischen Wirkungen von oxidierten Fetten (BIRD et al. 1981, HAGEMANN et al. 1991, QUILES et al. 2002) lassen vermuten, dass nicht nur die Expression von Genen des Lipidstoffwechsels beeinflusst wird. Bislang liegen jedoch keine Studien vor, die die Effekte oxidiertes Diätfette komplexer untersuchen. Da die Leber das zentrale Organ im Stoffwechsel ist, wird ein Expressionsprofil der Leber mittels cDNA-Array erstellt, um die Wirkung oxidiertes Fette auf die Expression hepatischer Gene zu erfassen.

Es wird ein Fütterungsversuch mit wachsenden Ratten als Modelltieren durchgeführt. Die semisynthetische Diät der Tiere enthält entweder frisches oder oxidiertes Fett. Um Sekundäreffekte infolge einer unterschiedlichen Fettsäurezusammensetzung oder einer unterschiedlichen  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration von frischem und oxidiertes Diätfett zu vermeiden, wird die Fettsäurezusammensetzung und die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration der Diätfette angeglichen. Um eine einheitliche Futteraufnahme zu gewährleisten, wird ein restriktives Fütterungssystem angewendet.

Die Diätfette sind ein Gemisch aus Sonnenblumenöl und Schweineschmalz und werden durch Wärmezufuhr mäßig oxidiert, sodass sie keine generell toxischen Wirkungen verursachen und von den Tieren in ausreichenden Mengen gefressen werden.

Um die Wirkung oxidiertes Fette in Abhängigkeit von den gebildeten LPOP zu untersuchen, sollen oxidiertes Fette mit unterschiedlichem Oxidationsgrad erzeugt werden. Aufgrund der Vielzahl der Verbindungen sowie ihrer Instabilität während der Erhitzung und Lagerung ist

eine genaue Erfassung der LPOP problematisch (FRANKEL 1998). LPOP lassen sich jedoch in primäre und sekundäre Oxidationsprodukte einteilen. Primäre und sekundäre LPOP entstehen in Abhängigkeit der Oxidationsbedingungen und unterscheiden sich in ihren physiologischen Wirkungen (POLING et al. 1970, NOLEN et al. 1976, MÖRSEL 1990). Primäre LPOP bilden sich in Nahrungsfetten, die über längere Zeit relativ niedrigen Temperaturen ausgesetzt werden. Bei fortschreitender Erhitzung entstehen daraus sekundäre LPOP. Temperaturen über 160°C führen bereits nach kurzer Zeit zur Bildung von sekundären Produkten (FRANKEL 1998). Unter Berücksichtigung dieser Zusammenhänge erfolgt die Behandlung des Fettgemisches deshalb entweder:

- bei niedriger Temperatur über einen längeren Zeitraum (OF50°C, 38 d),
- bei gemäßigter Temperatur über einen mittleren Zeitraum (OF105°C, 81 h) oder
- bei hoher Temperatur für kurze Zeit (OF190°C, 24 h).

Beurteilt anhand der Peroxidzahl werden damit oxidierte Fette mit jeweils hohen, mittleren und niedrigen Konzentrationen an primären Oxidationsprodukten erzeugt (MÖRSEL und MEUSEL 1990). Die in den Diätfetten entstandenen LPOP werden durch verschiedene Fettkennzahlen erfasst: Für die Bestimmung der primären LPOP werden neben der Peroxidzahl die Konzentrationen an konjugierten Dienen und an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) analysiert, und für die Bestimmung der sekundären LPOP werden die Konzentration an polaren Verbindungen und an Gesamt-Carbonylen ermittelt.

Um festzustellen, ob die Wirkung der oxidierten Fette von LPOP verursacht wurden oder auf eine erhöhte Lipidperoxidation infolge einer oxidativen Belastung zurückzuführen ist, wird die Vitamin E-Konzentration der Diät variiert. Da Vitamin E die Membran vor Lipidperoxidation schützt (BURTON und INGOLD 1989, NAMIKI 1990), können Wirkungen infolge einer erhöhten Lipidperoxidation durch die Höhe der Vitamin E-Versorgung beeinflusst werden kann. Um den Einfluss oxidierter Diätfette auf die Vitamin E-Versorgung zu erfassen, werden die Vitamin E-Konzentrationen in Plasma, Leber, Abdominalfett und die scheinbare Vitamin E-Verdaulichkeit bestimmt. Die Supplementierung der Diäten erfolgt auf entweder 25 mg oder 250 mg  $\alpha$ -Tocopheroläquivalente (TÄ) /kg. Die Supplementierung der Diäten auf 25 mg TÄ/kg Futter entspricht dabei dem Mindestbedarf an Vitamin E, der sich aus den mit dem Diätfett zugeführten ungesättigten Fettsäuren ergibt (MUGGLI 1994). Die Tiere mit der höheren Vitamin E-Supplementierung auf 250 mg TÄ/kg Diät erhielten das 10fache des Bedarfs an Vitamin E (MUGGLI 1994).

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Versuchsaufbau

#### 2.1.1 Herstellung der Diätfette

Für den Fütterungsversuch wurden drei verschieden oxidierte Fette hergestellt. Die Zusammensetzung, Behandlung und die Behandlungskriterien der Diätfette sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Es wurde ein Fettgemisch aus Sonnenblumenöl (BUTTELA, BRÖKELMANN, HAMM) und Schweineschmalz (LARU, LANGENSIEPEN & RUCKEBIER, BOTTROP) im Verhältnis 50/50 (m/m) verwendet. Die Oxidation des Fettgemisches erfolgte durch Erhitzen im Trockenschrank unter Lichtausschluss und Lufteintrag (1,3 l/min) entweder bei 50°C (MEMMERT, SCHWABACH) oder im Glycerinbad, bei 105°C und bei 190°C. Die Dauer der Fettbehandlung orientierte sich an der Peroxidzahl (2.2.3) und dem Linolsäuregehalt (18:2n-6) (2.2.1) der Fette, die fortwährend bestimmt wurden.

Tabelle 1: Versuchsaufbau, Zusammensetzung, Behandlung und Behandlungskriterien der Diätfette

| Diätfett                                | Frisch<br>FF         |    | Oxidiert 1<br>OF50°C |    | Oxidiert 2<br>OF105°C |    | Oxidiert 3<br>OF190°C |    |
|---|----------------------|----|----------------------|----|-----------------------|----|-----------------------|----|
|   | Vitamin E [mg TÄ/kg] | 25 | 250                  | 25 | 250                   | 25 | 250                   | 25 |
| Tiere / Gruppe                          | 10                   | 10 | 10                   | 10 | 10                    | 10 | 10                    | 10 |
| Zusammensetzung<br>SÖ/SS [m/m]          | 31 / 69              |    | 50 / 50              |    | 50 / 50               |    | 50 / 50               |    |
| Behandlung                              |                      |    |                      |    |                       |    |                       |    |
| Temperatur, Zeit                        | unbehandelt          |    | 50°C, 38 d           |    | 105°C, 81 h           |    | 190°C, 24 h           |    |
| Behandlungskriterien                    |                      |    |                      |    |                       |    |                       |    |
| Peroxidzahl<br>[mEq O <sub>2</sub> /kg] | 1,6                  |    | 804                  |    | 150                   |    | 3,5                   |    |
| Linolsäuregehalt<br>[g/100g Fs]         | 26,9                 |    | 26,1                 |    | 26,6                  |    | 27,2                  |    |

SÖ/SS - Sonnenblumenöl/Schweineschmalz; Peroxidzahl; Fs - Fettsäure; TÄ - Tocopheroläquivalente

Die Peroxidzahl wurde zum Abschätzen eines unterschiedlichen Oxidationsgrades der drei Fette herangezogen und sollte dafür hoch, mittel bzw. niedrig sein (Tab. 1). Der Linolsäuregehalt der drei oxidierten Fette sollte dagegen möglichst einheitlich sein, um eine vergleichbare Fettsäurezusammensetzung der drei oxidierten Fette zu erhalten. Die Unterschiede in

der Fettsäurezusammensetzung zwischen den oxidierten Fetten und dem frischen Kontrollfett wurden angeglichen, indem Sonnenblumenöl und Schweineschmalz für das frische Fett so gemischt wurde, dass der Linolsäuregehalt des frischen Fettes dem Linolsäuregehalt des oxidierten Fettes entsprach. Die Kombination aus Sonnenblumenöl und Schweineschmalz ist aufgrund ihrer Fettsäurezusammensetzung gut geeignet, um die Fettsäurezusammensetzung des frischen Fettes der Fettsäurezusammensetzung oxidiertes Fett anzugleichen (EDER und STANGL 2000). Zudem enthält das Fettgemisch auch nach der Oxidation noch ausreichend Linolsäure, um den Bedarf der Tiere an Linolsäure zu decken, der mit 6 g /kg Diät angegeben wird (NUTRITIONAL RESEARCH COUNCIL 1995).

### 2.1.2 Zusammensetzung der Diät

Für den Fütterungsversuch wurde eine halbsynthetische Diät hergestellt. Die Zusammensetzung dieser Diät orientierte sich an den Empfehlungen des AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION für wachsende Nagetiere (REEVES et al. 1993). Alle eingesetzten Komponenten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Die Diät enthielt 10% Fett, das entweder frisch oder bei unterschiedlichen Temperaturen (vgl. Tab. 1/ 2.1.1) oxidiert war. Die Diäten wurden mit 50%igem all-rac- $\alpha$ -Tocopherylacetat auf 25 oder 250  $\alpha$ -Tocopheroläquivalente (TÄ) /kg Diät angereichert. Dabei wurden die in den Diätfetten analysierten Konzentrationen an nativen  $\alpha$ -Tocopherol berücksichtigt (1 mg  $\alpha$ -Tocopherol = 1 mg  $\alpha$ -Tocopheroläquivalente = 1,49 mg all-rac- $\alpha$ -Tocopherylacetat). Das all-rac- $\alpha$ -Tocopherylacetat wurde im frischen bzw. oxidierten Diätfett (vgl. Tab. 1/ 2.1.1) gelöst und der Diät zugesetzt.

Die Vitamine und Mineralstoffe wurden mit Saccharose vorgemischt und dann zur restlichen Futtermischung gegeben. Die Diäten wurden frisch hergestellt, indem 900 g Trockenmischung und 100 g Fett unter Zugabe von Wasser zu einem festen Teig verarbeitet wurden. Die Diäten wurden anschließend als Platten gefriergetrocknet und bis zum Verbrauch bei 4°C gelagert.

Die Trockensubstanz der Diäten wurde mittels Wäge-Trocknungsverfahren nach NAUMANN und BASSLER (1976) ermittelt. Die Einwaagen der Proben wurden dabei 3 Stunden bei 105°C getrocknet. Der Trockensubstanzgehalt der Diäten betrug im Mittel  $93,5 \pm 0,5\%$  (n = 3). Zwischen den Diäten gab es keinen Unterschied im Trockensubstanzgehalt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Diät

| Komponenten                 |                              | [g/kg Diät]                      |         |
|-----------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------|
|                             | Casein                       |                                  | 200     |
|                             | Stärke                       |                                  | 300     |
|                             | Saccharose                   |                                  | 298     |
|                             | Fett <sup>1</sup>            |                                  | 100     |
|                             | Cellulose                    |                                  | 40      |
|                             | Vitaminmischung <sup>2</sup> |                                  | 20      |
|                             | Mineralstoffmischung         |                                  | 40      |
|                             | DL-Methionin                 |                                  | 2       |
| <u>Vitamine pro kg Diät</u> |                              | <u>Mineralstoffe pro kg Diät</u> |         |
| All- <i>trans</i> -Retinol  | 4000 I.E.                    | Calciumcarbonat                  | 8,21 g  |
| Cholecalciferol             | 1000 I.E.                    | Di-Calciumphosphat               | 9,18 g  |
| Menadion-Na-Bisulfid        | 0,76 mg                      | Kaliumchlorid                    | 6,87 g  |
| Thiaminhydrochlorid         | 5 mg                         | Magnesiumoxid                    | 1,01 g  |
| Riboflavin                  | 6 mg                         | Natriumcarbonat                  | 3,77 g  |
| Pyridoxinhydrochlorid       | 6 mg                         |                                  |         |
| Cobalamin                   | 0,025 mg                     | Zinkoxid                         | 38,0 mg |
| Biotin                      | 0,2 mg                       | Manganoxid                       | 16,1 mg |
| Ca-D-Pantothenat            | 15 mg                        | Eisensulfat                      | 116 mg  |
| Nikotinsäure                | 30 mg                        | Kupfersulfat                     | 24,0 mg |
| Folsäure                    | 2 mg                         | Calciumjodat                     | 0,32 mg |
| Cholinchlorid               | 1000 mg                      | Natriumselenit                   | 0,33 mg |

<sup>1</sup> Gemisch aus Sonnenblumenöl und Schweineschmalz, siehe Tab. 1/ 2.1.1; <sup>2</sup> ohne Vitamin E

### 2.1.3 Versuchstiere

Es wurden 80 männliche SPRAGUE-DAWLEY - Ratten (CHARLES RIVER WIGA, SULZFELD) mit einer mittleren Lebendmasse von  $103 \pm 8$  g verwendet. Die Haltung der Ratten erfolgte nach den Richtlinien für den Umgang mit Labortieren (WEIHE 1987).

Für den Versuchsansatz mit den Faktoren Diätfett und Vitamin E-Konzentration der Diät wurden die Tiere in 8 Gruppen mit jeweils 10 Tieren aufgeteilt (vgl. Tab. 1/ 2.1.1). Die Tiere wurden in einem klimatisierten Raum bei einer Temperatur von 24°C, einer relativen Luftfeuchte von 50 - 60% und bei künstlicher Beleuchtung in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus einzeln in Makrolonkäfigen gehalten. Die Käfige waren mit Sägespänen ausgestreut und mit einem Metallgitter abgedeckt. Die Tiere erhielten über einen Zeitraum von 63 Tagen eine Versuchsdiet mit entweder frischem oder oxidiertem Diätfett. Die Fütterung erfolgte täglich zwischen 9 und 10 Uhr. Um eine einheitliche Futteraufnahme zu erreichen, wurden die Tiere restriktiv gefüttert. Die tägliche Futterration orientierte sich dabei an den Tieren mit dem geringsten Verzehr. Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung. Die Lebendmasseentwicklung der Tiere wurde 14-tägig protokolliert.

## 2.2 Charakterisierung der Diätfette

### 2.2.1 Fettsäurezusammensetzung

Die Fettsäurezusammensetzung der Diätfette sowie von den Lipidextrakten aus den Diäten und Geweben (2.3.3) wurde mittels Gaschromatographie bestimmt.

Die Fettsäuren wurden mit 100 µl Trimethylsulfoniumhydroxid methyliert (BUTTE et al. 1989) und gaschromatographisch getrennt (HEWLETT PACKARD 5890, AGILENT TECHNOLOGIES, WALDBRONN). Die Fettsäuremethylester wurden über ihre Retentionszeiten identifiziert und durch den Vergleich mit einem inneren Standard (C15:0) quantifiziert.

#### *Bedingungen:*

|                  |   |
|------------------|---|
| Säule:           | FUSED FATTY ACID PHASE-Silica-Trennsäule,<br>30 m /0,53 mm Innendurchmesser (MACHEREY UND NAGEL, DÜREN) |
| Trägergas:       | Helium, 8,4 ml/min  |
| Auftragsvolumen: | 1 µl  |
| Detektor:        | Flammenionisationsdetektor  |

### 2.2.2 Tocopherolkonzentration

Die Tocopherolkonzentration der Ausgangsfette, der Versuchsfette der Diäten (Lipidextrakte, 2.3.3) und Geweben wurden mittels hochauflösender Flüssigchromatographie (HPLC) in Anlehnung an die Methode von BALZ et al. (1993) und COORS (1991) bestimmt.

Entsprechende Mengen an Probematerial oder 200 µl der Lipidextrakte (2.3.3) wurden mit 1 ml Pyrogallol-Lösung (1% in Ethanol, m/V) und 150 µl gesättigter Natriumhydroxid-Lösung versetzt und bei 70°C für 30 min inkubiert. Die Tocopherole wurden dann mit 2 ml n-Hexan extrahiert. Die Hexanphase wurde zur chromatographischen Auftrennung an der HPLC (1100-er Serie, AGILENT TECHNOLOGIES) verwendet. Die Quantifizierung erfolgte über externe Tocopherolstandards (SIGMA-ALDRICH, DEISENHOFEN).

#### *HPLC-Bedingungen:*

|                   |   |
|-------------------|---|
| Säule:            | LICHROSPHER Si 60, 5 µm, 250 x 4 mm <sup>2</sup> , AGILENT TECHNOLOGIES |
| Säulentemperatur: | 30°C  |
| Auftragsvolumen:  | in Abhängigkeit von der Proben-Konzentration                            |
| Laufmittel:       | n-Hexan:1,4-Dioxan (94/6 V/V)   |
| Fluss:            | 1 ml / min  |
| Detektor:         | Fluoreszenzdetektor (Extinktion 295 nm, Emission 330 nm)                |

### 2.2.3 Peroxidzahl

Die Bestimmung der Peroxidzahl erfolgte nach der Methode von WHEELER (1932). Die Peroxidzahl ist als Milliäquivalente peroxidisch gebundenen Sauerstoffes (mEqO<sub>2</sub>) pro kg Fett definiert:

0,5 - 1,0 g Fett bzw. ein Blindansatz wurden in 30 ml Chloroform/Eisessig-Gemisch (3/2, V/V) gelöst und mit 4 ml gesättigter Kaliumiodidlösung versetzt. Der Ansatz wurde 60 s intensiv gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 30 ml Wasser gestoppt. Die durch die Reaktion mit den Peroxidgruppen freigesetzte Iodmenge wurde durch Titration mit 0,05 N Natriumthiosulfat-Lösung bestimmt.

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

|     |  |
|-----|--|
| POZ | Peroxidzahl  |
| a   | Verbrauch an Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [ml] mit Probe  |
| b   | Verbrauch an Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [ml] mit Wasser |
| N   | Normalität von Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>               |
| E   | Fetteinwaage [g]   |

### 2.2.4 Säurezahl

Die Bestimmung der Säurezahl erfolgte nach der DGF-EINHEITSMETHODE C-V 2 [81] (1994). Die Säurezahl wird über die Menge von Kaliumhydroxid definiert, die notwendig ist, um die im Fett enthaltenen freien Säuren zu neutralisieren:

10 g Fett wurden in 50 ml Ethanol/Toluol-Gemisch (1/1, V/V) unter leichtem Erwärmen gelöst. Mit einer 0,1 N Kalilauge wurden die vorhandenen Säuren gegen eine 1%ige Phenolphthaleinlösung bis zum Farbumschlag titriert.

$$\text{SZ [g KOH/kg Fett]} = \frac{a \cdot N \cdot 56,1}{E}$$

|      |                       |
|------|-----------------------|
| SZ   | Säurezahl             |
| a    | Verbrauch an KOH [ml] |
| N    | Normalität von KOH    |
| 56,1 | Molare Masse von KOH  |
| E    | Fetteinwaage [g]      |

### 2.2.5 UV-Spektrum

Konjungen-Strukturen entstehen aus Isolen-Strukturen durch Spaltung und Umlagerung von Doppelbindungen. Konjungen-Strukturen besitzen eine optische Aktivität, die über das UV-Spektrum qualitativ und quantitativ (konjugierte Diene) erfasst werden kann.

*Qualitative Analyse:* Das UV-Spektrum wurde nach der Methode von HADORN und ZÜRICH (1966) aufgenommen: Anhand der Absorptionsbanden können Konjungenfettsäuren (220 - 240 nm), Trienfettsäuren (258 - 279 nm) und Tetraenfettsäuren (300 - 316 nm) erfasst werden.

0,1 g Fett wurde mit Isooctan auf 25 ml aufgefüllt und der Konzentration der konjugierten Fettsäuren entsprechend verdünnt. Das UV-Spektrum wurde von 200 bis 360 nm in einer

Quarzküvette aufgenommen (ULTRASPEC 2000, PHARMACIA BIOTECH, FREIBURG). Als Blindwert wurde eine 1%ige Stearinsäuremethylester-Lösung in Isooctan verwendet.

*Quantitative Analyse:* Der Diengehalt der Fette wurde nach der Methode von RECKNAGEL und GLENDE (1984) bestimmt:

0,01 g Fett wurde in 10 ml Hexan verdünnt und in einer Quarzküvette gegen Hexan als Blindwert bei 234 nm gemessen (ULTRASPEC 2000).

Berechnung des Diengehaltes:

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

|               |  |
|---------------|--|
| C             | Konzentration an konjugierten Dienen   |
| $\Delta E$    | Extinktionsänderung  |
| $\varepsilon$ | molarer Extinktionskoeffizient der konjugierten Diene $29,50 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ |
| d             | Schichtdicke [cm]  |

### 2.2.6 Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen

Die Konzentration an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) in oxidierten Fetten ist ein Maß für Carbonylverbindungen, die durch Spaltung von Hydroperoxiden entstanden sind. Die Analyse der TBARS erfolgte nach der Methode von SIDWELL et al. (1954). Aldehyde bilden mit Thiobarbitursäure ein farbiges Reaktionsprodukt, welches spektralphotometrisch erfasst wurde:

0,2 g Fett bzw. 0,2 ml Standard wurden mit 4 ml Chloroform und 4 ml Thiobarbitursäure - Reagenz (0,67% [m/V] in destilliertem Wasser, 1:2 mit Eisessig verdünnt) versetzt und 4 min geschüttelt. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und 30 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurde die Extinktion bei 532 nm in Glasküvetten gemessen (ULTRASPEC 2000). Die Menge an TBARS [ $\mu\text{mol}/\text{kg}$  Fett] wurde über die lineare Gleichung einer Kalibrationsgeraden mit 1,1,3,3-Tetraethoxypropan als Standard ermittelt.

### 2.2.7 Gesamt-Carbonyle

Zur Bestimmung der Gesamt-Carbonylverbindungen wurde die Methode von ENDO et al. (2001) verwendet. Aldehyde und Ketone reagieren mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (2,4-DNP) zu 2,4-Dinitrophenylhydrazon (2,4-DNPH), das spektralphotometrisch erfasst werden kann:

0,1 g Fett wurde in 5 ml Aldehyd-freiem 2-Propanol gelöst und durch die Zugabe von Triphenylphosphin stabilisiert. Nach Zugabe von DNP-Lösung (0,05% in 3,5%igem HCl-saurem Isopropanol) wurde der Ansatz 20 min bei 40°C im Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit jeweils 1 ml 2%iger Kalilauge versetzt und für 2 min bei 150 g zentrifugiert. Der Gehalt an Carbonylverbindungen wurde im Überstand bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen (ULTRASPEC 2000).

Die Menge der Gesamt-Carbonyle [mmol/kg Fett] wurde über die lineare Gleichung einer Standard-Eichgeraden mit n-Hexanal ermittelt.

### 2.2.8 Polare und unpolare Verbindungen

Die Bestimmung der polaren und unpolaren Verbindungen in den Fetten erfolgte durch Trennung in einer Kieselgelsäule nach der Methode von DOBARGANES et al. (2000):

1 g Fett wurde mit einem Petroleumbenzin/Diethylether-Gemisch (90/10, V/V) auf 10 ml aufgefüllt und auf eine Kieselgelsäule (0,2 - 0,5 mm Korngröße) gegeben. Die unpolare Fraktion wurde durch Spülen der Säule mit 60 ml des Petroleumbenzin/Diethylether-Gemisches herausgelöst. Für die Elution der polaren Verbindungen wurde 50 ml Diethylether verwendet. Die Qualität der Trennung wurde mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Die gewonnenen Eluate wurden mittels Rotationsverdampfer (JOUAN, UNTERHACHING) getrocknet und zurückgewogen.

Der prozentuale Anteil an polaren und unpolaren Verbindungen wurde aus dem Verhältnis der Rückwaage zur Einwaage ermittelt.

*Dünnschichtchromatographie:* Die im Vakuum getrockneten Proben wurden in 100 µl Chloroform aufgenommen und mittels Kapillare auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Die Platten wurden dann in einer Trogkammer (DESAGA, WEIßLOCH) unter Kammersättigung entwickelt (Chloroform-Methanol-Ammoniak, 26+10+1,6 unter Zusatz von 0,5% Eisessig). Nach dem Trocknen der Platte wurden die lipidhaltigen Bereiche in der Iodkammer angefärbt.

## 2.3 Aufarbeitung des Probenmaterials

Der Versuch wurde am 63. Tag beendet. Die Tiere wurden ungenüchtert getötet, da die Genexpression und Aktivität lipogener und lipolytischer Enzyme durch Nahrungsentzug supprimiert werden können (KRAMER et al. 1984, KATSURADA et al. 1986, NTAMBI 1992, PRIP-BUUS et al. 1995, CHO et al. 1999). Die Futterration des 62. Versuchstages wurde dazu in 2 Portionen verabreicht: 75% der Diät erhielten die Tiere morgens zur gewohnten Fütterungszeit. Die restliche Diät (4 g) wurde den Tieren 4 h vor der Tötung geben. Die Tiere fraßen ihre Diät vollständig, wurden gewogen und anschließend unter Diethyl-Ether-Betäubung dekapitiert und entblutet. Das Blut wurde aufgefangen, die Leber wurde entnommen und gewogen. Der Kot der Tiere wurde über jeweils 7 Tage in der 4. und in der 9. Versuchswoche gesammelt. Die Kotmenge wurde gefriergetrocknet, gewogen und bis zur Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.3.1 Blutserum und Lipoproteine

Zur Gewinnung des Serums wurde das Blut zentrifugiert (1.500 g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 min). Das Serum wurde als Überstand abgenommen, aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Fraktionierung der Lipoproteine erfolgte durch Dichtegradienten-Zentrifugation in Anlehnung an die Vorschrift der Firma SORVALL (1997):

Reagenzien:

Lösung A: 0,195 M Natriumchloridlösung

Lösung B: 0,195 M Natriumchloridlösung und 2,44 M Natriumbromidlösung

Das Serum wurde mit Lösung A im Verhältnis 2+1 versetzt und zentrifugiert (711.000 g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 1,5 h). Die Lipoproteine sehr geringer Dichte (VLDL) wurden als obere Phase abgenommen ( $\delta < 1,006 \text{ g/ml}$ ). Nach der Zugabe von Lösung B und wiederholter Zentrifugation wurden die Lipoproteine geringer Dichte (LDL) als obere Phase entnommen ( $1,006 < \delta > 1,063 \text{ g/ml}$ ). Die verbliebene proteinhaltige Fraktion enthielt die Lipoproteine hoher Dichte (HDL) ( $\delta < 1,063 \text{ g/ml}$ ). Die Lipoproteine wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.3.2 Gewinnung von Homogenat, Zytosol und Gesamt-RNA der Leber

Leberhomogenat und Leberzytosol wurden in Anlehnung an die Methoden von GARG et al. (1988) und CHRISTIANSEN et al. (1991) gewonnen:

*Leberhomogenat:* 1,5 g gefrorene Leber wurde grob zerkleinert und nach Zugabe von 4 ml Homogenisierungspuffer (0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 mit 0,25 M Saccharose) in einem Homogenisator (POTTER-S, BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL, MELSUNGEN) unter

Eiskühlung homogenisiert (500 U/min). Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt (2.000 g, 4°C, 10 min). Das gewonnene Homogenat wurde als obere Phase abgenommen und bei -20°C eingefroren.

*Leberzytosol:* Das Zytosol wurde aus 3 ml Homogenat durch Zentrifugation gewonnen (105.000 g, 4°C, 60 min). Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

*Isolation der Gesamt-RNA:* Unmittelbar nach der Organentnahme wurden etwa 10 mg Leber in ein RNase-freies Reaktionsgefäß überführt (behandelt mit 0,1% Diethylpyrocarbonat-Lösung und autoklaviert) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei -80° C.

Die Gesamt-RNA wurde nach der Guanidinium-Thiocyanat-Methode in Anlehnung an CHIRGWIN et al. (1979) mit RNAZOL B REAGENZ (WAKO CHEMIE MEDICAL, NEUSS) isoliert: Etwa 10 mg tiefgefrorenes Lebergewebe wurden mit 800 µl RNAZOL B REAGENZ versetzt und unter Eiskühlung in einem Hand-Homogenisator homogenisiert. Die Extraktion der RNA erfolgte durch Zugabe von 80 µl Chloroform. Nach der Zentrifugation (12.000 g, 4°C, 15 min) wurde die obere wässrige Phase abgenommen und im Verhältnis 1:2 mit Isopropanol versetzt. Nach einer Inkubationszeit (4°C, 45 min) sedimentierte die gefällte RNA durch Zentrifugation (12.000 g, 4°C, 15 min). Das entstandene RNA-Pellet wurde zweimal mit 800 µl 75%igem Ethanol gewaschen, anschließend zentrifugiert (7.500 g, 8 min) und luftgetrocknet (20 min). Schließlich wurde die Gesamt-RNA in 100 µl RNase-freiem Wasser unter leichtem Schütteln gelöst (THERMOMIXER COMFORT, EPPENDORF, HAMBURG; 60°C, 3 min). Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

### **2.3.3 Gesamtlipide aus Diät, Serum, Leber, Abdominalfett und Kot**

Die Extraktion der Gesamtlipide erfolgte nach einer von EDER und KIRCHGESSNER (1994) modifizierten Methode nach HARA und RADIN (1978):

Das zerkleinerte Probenmaterial (Leber 400 mg, Diät 1,6 g, Kot 500 mg) wurde mit 4 ml Hexan/Isopropanol-Gemisch (3/2, V/V) versetzt und über 18 h bei Raumtemperatur geschüttelt (INCUBATOR SHAKER G 25, NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, Edison, NEW JERSEY, USA). Der Extrakt wurde als Überstand abpipettiert, mit teflonbeschichteten Deckeln verschlossen und bei -20°C gelagert.

## 2.4 Analysemethoden

### 2.4.1 $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen und scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E

Die Bestimmung der Tocopherolkonzentration in Serum, Leber, Abdominalfett und Kot erfolgte mittels HPLC (2.2.2).

Für die Berechnung der scheinbaren Verdaulichkeit ( $V_S$ ) von Vitamin E wurden die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen der Kotextrakte herangezogen (2.2.2, 2.3.3).

$$V_S [\%] = \left( \frac{\text{Aufnahme von Vitamin E} - \text{Ausscheidung von Vitamin E über den Kot}}{\text{Aufnahme von Vitamin E}} \right) \cdot 100$$

### 2.4.2 Cholesterin und Triglyceride

Die Konzentrationsbestimmungen von Cholesterin und Triglyceriden in Serum, VLDL, HDL, Leber und Kot erfolgten mittels enzymatischen Kits (ECOLINE 25, MERCK, DARMSTADT):

Bei den enzymatischen Reaktionen entsteht Wasserstoffperoxid. Dieser reagiert mit 4-Aminoantipyrin und Salicylalkohol zu einem farbigen Chinonimin, das spektralphotometrisch erfasst wurde. Folgende Probenvolumina wurden eingesetzt:

|                      | Cholesterin-Bestimmung | Triglycerid-Bestimmung |
|----------------------|------------------------|------------------------|
| Serum                | 20 $\mu$ l             | 20 $\mu$ l             |
| VLDL                 | 100 $\mu$ l            | 40 $\mu$ l             |
| HDL                  | 50 $\mu$ l             | 100 $\mu$ l            |
| LDL                  | 70 $\mu$ l             | 60 $\mu$ l             |
| Leberextrakt (2.3.3) | 100 $\mu$ l            | 30 $\mu$ l             |
| Kotextrakt (2.3.3)   | 50 $\mu$ l             |                        |

Dabei wurden die Aliquote der Lipidextrakte aus Leber und Kot mittels Zentrifugalverdampfer (JOUAN) getrocknet. Die Proben wurden dann mit 20  $\mu$ l TRITON X-100 / Chloroform-Gemisch (1/2, V/V) emulgiert und das Lösungsmittel erneut eingeeengt.

Die Extinktionen wurden bei einer Wellenlänge von 500 nm gemessen (ULTRASPEC 2000). Die Quantifizierung der Cholesterin- und Triglyceride erfolgte über einen mitgeführten Standard:

$$C [\mu\text{g}] = \frac{E_P \cdot C_{St}}{E_{St}}$$

$C$  Konzentration an Cholesterin bzw. Triglyceriden der Probe  
 $E_P$  Extinktion der Probe  
 $C_{St}$  Konzentration des Standards  
 $E_{St}$  Extinktion des Standards

### 2.4.3 Gesamtlipide und Phospholipide der Leber

#### 2.4.3.1 Trennung der Lipide

Die Trennung der Lipidfraktionen für die Analyse ihrer Fettsäurezusammensetzung sowie für die Gewinnung von Standards zur Quantifizierung der Fraktionen erfolgte durch HPLC in Anlehnung an die Methode von CHRISTIE (1985). Es wurden alle in der Rattenleber enthaltenen Phospholipidfraktionen getrennt (DIAGNE et al. 1983).

*Aufbereitung der Proben:* Die in 1 ml Leberextrakt (2.3.3) enthaltene Lipidmenge wurde durch Rückwaage der eingeeengten Probe (Vakuumentrifugalverdampfer) ermittelt. Die Lipide wurden in 200 µl Chloroform aufgenommen.

Die Probe wurde an der Säule der HPLC (1100-er Serie, AGILENT TECHNOLOGIES) getrennt und über ein Split-Ventil weitergeleitet: 20% der Probe dienten der Erfassung der Retentionszeiten der Fraktionen mittels Lichtstredetektor, 80% der Probe wurde diesen Informationen entsprechend mit einem Fraktionssammler aufgefangen. Es wurden die Gesamtlipide und die Hauptfraktionen der Phospholipide, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin, gesammelt.

*HPLC-Bedingungen:*

Säule: SUPELCO-Si 25 cm x 0,46 cm, LC-Si 5 µm, 13 nm  
(SUPELCO, BELLEFONTE, USA)

Säulentemperatur: 35°C

Auftragsmenge: 3 mg in 50-70 µl Probenvolumen

Laufmittel: Gemisch: Chloroform + Methanol  
A: 47 + 13  
B: 1 + 2  
C: 0 + 1

| Elutionsprogramm: | Zeit [min] | Fluss [ml/min] | A [%] | B [%] | C [%] |
|-------------------|------------|----------------|-------|-------|-------|
|                   | 0,0        | 1,0            | 100   |       |       |
|                   | 8,0        | 1,0            | 100   |       |       |
|                   | 25,0       | 1,0            | 85    | 15    | 100   |
|                   | 26,0       | 1,0            |       |       | 100   |
|                   | 30,0       | 1,0            |       |       | 100   |
|                   | 30,2       | 1,5            |       |       | 100   |
|                   | 35,0       | 1,5            | 100   |       |       |
|                   | 35,5       | 1,5            | 100   |       |       |
|                   | 39,8       | 1,5            | 100   |       |       |

Fraktionssammler: GILSONM203B

Detektor: Lichtstredetektor SEDEX 55  
S.E.D.E.R.E, ALFORTVILLE CEDEX, FRANKREICH  
Verneblungsgas: Druckluft, 1,9 bar  
Verdampfungstemperatur: 50°C

Die Qualität der Trennung wurde mittels Dünnschichtchromatographie (2.2.8) überprüft. Die Proben wurden dazu unter Stickstoffbegasung vollständig getrocknet, mit PARAFILM verschlossen und bis zur Fettsäurenanalyse bei -20 °C gelagert.

### 2.4.3.2 Fettsäurezusammensetzung der Lipide

Die Analyse der Fettsäurezusammensetzung von Gesamtlipiden, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin in der Leber (2.4.3.1) erfolgte durch Gaschromatographie (2.2.1).

### 2.4.3.3 Quantifizierung der Lipidfraktionen

Die Quantifizierung der Lipidfraktionen erfolgte mittels HPLC in Anlehnung an die Methode von BECARDT (1990).

Die Quantifizierung der einzelnen Fraktionen (Triglyceride, Cardiolipin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Spingomyelin) erfolgte über entsprechende Kalibrationsreihen (1100-er Serie, AGILENT TECHNOLOGIES):

*HPLC-Bedingungen:*

Säule: LICHROSPHER Si 60 – 5 µm, 12,5 cm x 4mm,  
(AGILENT TECHNOLOGIES)

Auftragsmenge: 1 µg in 15 – 20 µl Probenvolumen

| Laufmittel:  | A    | B    |
|--------------|------|------|
| Chloroform   | 60,0 | 80,0 |
| Methanol     | 34,0 | 19,5 |
| Ammoniak 30% | 0,5  | 0,5  |
| Wasser       | 5,5  | -    |

Fluss: 1 ml / min

| Elutionsprogramm: | Zeit [min] | A [%] | B [%] |
|-------------------|------------|-------|-------|
|                   | 0          |       | 100   |
|                   | 14         | 45    | 55    |
|                   | 26         | 100   |       |
|                   | 31         | 100   |       |
|                   | 37         |       | 100   |
|                   | 42         |       | 100   |

Detektor: Lichtstredetektor SEDEX 55  
Verneblungsgas: Druckluft, 2,2 bar  
Verdampfungstemperatur: 50°C

*Standards:* Für die Quantifizierung von Gesamtlipiden, Cardiolipin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin und Spingomyelin wurden kommerzielle Standards (SIGMA) verwendet. Für die Hauptfraktionen der Leberphospholipide Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin (DIAGNE et al. 1983) wurden die Standards aus den eigenen Proben gewonnen (2.4.3.1) und über eine Phosphatbestimmung quantifiziert.

Alle Standards wurden als Gemisch zusammengestellt. Die Konzentrationen der einzelnen Phospholipidstandards wurden so angepasst, dass Injektionsvolumen und Signalintensitäten denen einer Durchschnittsprobe entsprachen.

*Phosphatbestimmung:* Zur Charakterisierung der Phospholipidstandards wurde der Phosphatgehalt nach einem Verfahren von AMES (1966) bestimmt.

Reagenzien:

|                    |  |
|--------------------|--|
| Veraschungsgemisch | 5 M HClO <sub>4</sub><br>1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  |
| Farbreagens        | 8,0 g K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub><br>0,126 g 1-Anilinonaphthalensulfonsäure<br>0,250 g Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub><br><br>auf 50 ml mit Wasser aufgefüllt, intensiv gerührt,<br>über Nacht bei 4°C sedimentiert<br>unmittelbar vor der Messung im Verhältnis 2,2:50<br>mit wässriger Ammoniummolybdatlösung (0,26%, m/V)<br>gemischt. |

Konzentrierte Schwefelsäure

In die Veraschungsröhrchen aus Glas wurden als Standard 0 - 4 µg anorganisches Phosphat in 50 µl Wasser gegeben. Entsprechende Mengen an Phospholipiden, in Hexan, Chloroform oder Diethylether gelöst, wurden als Proben eingesetzt. Nach dem Abdampfen des organischen Lösungsmittels wurden jeweils 50 µl Wasser zugesetzt. In jedes Röhrchen wurden dann 50 µl des Veraschungsgemisches pipettiert. Nach dem Mischen wurden die Ansätze in einem Aluminiumblock, der sich in einem elektrisch beheizten Sandbad befand, innerhalb von 30 min auf 250°C erhitzt und für 2 h bei 250 - 290°C belassen. Zum Abkühlen wurden die Proben für eine Stunde im Heizblock belassen. Bei Raumtemperatur wurden die Proben mit je 20 µl konzentrierter Schwefelsäure versetzt und gut gemischt. Der Zusatz von je 1 ml Farbreagens erfolgte nach 5 min Inkubation in 2 Stufen (200 und 800 µl) unter Schütteln am VORTEXER. Die Gläschen wurden mit Aluminiumfolie verschlossen und im Wasserbad 20 min bei 90°C inkubiert. Die Extinktion der abgekühlten Proben wurde bei 820 nm gemessen (ULTRASPEC 2000).

#### 2.4.4 Aktivitätsbestimmung lipogener Enzyme in der Leber

Die Aktivitäten der lipogenen Enzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) und Fettsäure-Synthase (FSS) wurden im Leberzytosol bestimmt. Die Ergebnisse wurden auf den Proteingehalt des Leberzytosols bezogen:

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976), die auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 auf 595 nm bei Bindung der Proteine an den Farbstoff Coomassie-Brillantblau beruht:

50 µl Leberzytosol bzw. Proteinstandard (Rinderserumalbumin) wurden in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte gegeben und mit 200 µl BRADFORD-REAGENZ versetzt. Nach 5 min erfolgte die Messung der Extinktion bei 595 nm (SPECTRO FLUOR PLUS, TECAN, CRAILSHEIM). Die Proteinkonzentration der Proben wurde über die Standardreihe mit Rinderserumalbumin ermittelt.

##### 2.4.4.1 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Die Aktivität der G6PDH (EC 1.1.1.49) wurde nach der Methode von DEUTSCH (1995) bestimmt: G6PDH katalysiert die Reaktion von Glucose-6-Phosphat und  $\text{NADP}^+$  zu 6-phosphogluconolacton und  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ . Die gebildete Menge an NADPH kann spektralphotometrisch erfasst werden und ist proportional zur Aktivität der G6PDH. Die Bildung von NADPH durch die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase wurde durch Zusatz von Maleinimid zur Testlösung gehemmt.

Reagenzien:

Phosphatpuffer: 0,1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{HPO}_4$  (pH 7,4)  
 Testmedium: 50 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan  
 0,4 mM  $\text{NADP}^+$ , 6,3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3,3 mM Glucose-6-Phosphat  
 5 mM Maleinimid

Leberzytosol wurde 1:10 mit Phosphatpuffer verdünnt und bei 25°C inkubiert. Das Testmedium wurde auf 25°C erwärmt und mit der Probe versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 2 min wurde die Extinktionszunahme spektralphotometrisch bei 339 nm über 2 min gemessen (ULTRASPEC 2000). Ein Blindwert ohne Probe wurde bestimmt, um das Ergebnis um eine eventuelle, von der G6PDH unabhängige Bildung von NADPH zu korrigieren.

Berechnung:

$$\text{Aktivität [U/g Protein]} = \frac{V_A \cdot \Delta E / \text{min}}{\varepsilon \cdot V_P \cdot d}$$

|               |   |
|---------------|---|
| $V_A$         | Ansatzvolumen (1050 µl)   |
| $\Delta E$    | Extinktionsänderung   |
| $\varepsilon$ | Molarer Extinktionskoeffizient<br>NADPH ( $6,22 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) |
| $V_P$         | Probenvolumen (50 µl)   |
| $d$           | Schichtdicke [cm]   |

1 U ist die Enzymmenge, die 1 µmol NADPH pro min bei 25°C umsetzt.

### 2.4.4.2 Fettsäure-Synthase

Die Bestimmung der Aktivität der FSS (EC 2.3.1.85) erfolgte nach der Methode von NEPOKROEFF et al. (1975): Durch die Aktivität der FSS wird Acetyl-CoA und Malonyl-CoA unter Oxidation von NADPH in n-Carbonsäuren überführt. Die Aktivität der FSS ist dabei dem Verbrauch an NADPH proportional.

Reagenzien:

Präinkubationsmedium: 500 mM  $K_2HPO_4/KH_2HPO_4$  (pH 7,0), 5,0 mM Dithiotreitol

Medium 1: 700 mM  $K_2HPO_4/KH_2HPO_4$  (pH 7,0), 0,14 mM NADPH;  
1,4 mM Ethylendiamin-N, N, N', N'- Tetraessigsäure; 1,4 mM Dithiotreitol

Medium 2: 0,33 mM Acetyl-CoA

Medium 3: 1,0 mM Malonyl-CoA

Leberzytosol wurde 1:5 mit dem Präinkubationsmedium verdünnt und bei 37°C inkubiert. Die Testmedien wurden auf 25°C erwärmt und in der Küvette gemischt. Nach Zugabe der Probe wurde die Extinktionsabnahme spektralphotometrisch bei 340 nm über 1 min gemessen (ULTRASPEC 2000). Ein Blindwert ohne Malonyl-CoA wurde bestimmt, um das Ergebnis um eine von der FSS unabhängige Oxidation von NADPH zu korrigieren.

Berechnung:

$$\text{Aktivität [U/g Protein]} = \frac{V_A \cdot \Delta E / \text{min}}{\varepsilon \cdot V_P \cdot d}$$

|               |  |
|---------------|--|
| $V_A$         | Ansatzvolumen (1050 $\mu$ l)   |
| $\Delta E$    | Extinktionsänderung  |
| $\varepsilon$ | Molarer Extinktionskoeffizient<br>NADPH ( $6,22 \cdot 10^{-3} \text{ l} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) |
| $V_P$         | Probenvolumen (50 $\mu$ l)   |
| $d$           | Schichtdicke [cm]  |

1 U ist die Enzymmenge, die 1  $\mu$ mol NADPH pro min bei 25°C umsetzt.

## 2.4.5 Expressionsanalyse relevanter Enzyme in der Leber

### 2.4.5.1 Allgemeine RT-PCR-Bedingungen

*Methodik:* Alle Expressionsbestimmungen der vorliegenden Arbeit erfolgten nach dem Prinzip der reversen Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Dafür wurde die isolierte Gesamt-RNA aus der Leber (2.3.2) mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Während der PCR wurde ein zwischen den gewählten Primern liegender DNA-Abschnitt selektiv vermehrt. Das exponentiell angereicherte Produkt konnte so visualisiert und quantifiziert werden.

Die Konzentration an *messenger*-Ribonukleinsäure (mRNA) von G6PDH und FSS wurden dabei semiquantitativ mittels RT-PCR und anschließender Gelelektrophorese erfasst. Die mRNA-Konzentration von  $\Delta 9$ -  $\Delta 6$ - und  $\Delta 5$ -Desaturase sowie der ACO wurde über die Anzahl ihrer Kopien pro Reaktionszyklus durch REALTIME-DETECTION-PCR (RTD-PCR) quantifiziert. Das Ergebnis der PCR wurde mit der jeweils parallel bestimmten Expression des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert, das nach APOSTOLAKOS et al. (1993) und ZHAO et al. (1995) relativ konstant exprimiert wird.

Die Anwendung der beschriebenen Methoden erfolgte in Anlehnung GASSEN und SCHRIMPF (1999) sowie an MÜHLHARDT (2002).

*Qualität und Konzentration der RNA:* Für die Arbeit mit RNA wurden RNase-freie Materialien bzw. Lösungen verwendet, die entweder in geeigneter Form von kommerziellen Herstellern bezogen oder mit 0,1% Diethylpyrocarbonat-Lösung behandelt und autoklaviert. Die benötigten Reagenzien bzw. Puffer wurden ebenfalls mit 0,1% Diethylpyrocarbonat-Lösung-behandeltem Reinstwasser hergestellt.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte durch Messung der optischen Dichte im Spektralphotometer (ULTRASPEC 2000). Die RNA wurde dazu 1:100 verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm in einer Quarzküvette gegen Wasser gemessen. Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \cdot 40 \cdot V$$

|           |  |
|-----------|--|
| $A_{260}$ | Extinktion bei 260 nm                                      |
| 40        | RNA-Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ] bei $A_{260} = 1,0$ |
| V         | Verdünnungsfaktor ( $V = 100$ )                            |

Zur Einschätzung der Reinheit der RNA wurde der Quotient zwischen der Extinktion bei 260 nm und der Extinktion bei 280 nm gebildet. Alle Proben wiesen einen Quotienten von mindestens 1,5 auf.

Die Qualität der RNA wurde mittels Elektrophorese anhand des Verhältnisses der 28S- und 18S-rRNA-Banden in einem 1,2% denaturierenden Agarose-Gel überprüft. Das Banden-Verhältnis der Proben lag zwischen 1,5 und 2,5 : 1.

Für die Gelelektrophorese wurden folgende Reagenzien verwendet:

| Gelpuffer (pH 7,0) | Laufpuffer        | RNA Ladepuffer             |
|--------------------|-------------------|----------------------------|
| 200 mM MOPS        | 100 ml Gelpuffer  | 4 ml 10x Gelpuffer         |
| 50 mM Na-Acetat    | 20 ml Formaldehyd | 20 mg Bromphenolblau       |
| 10 mM EDTA         | 880 ml Wasser     | 80 µl 500 mM EDTA (pH 8,0) |
|                    |                   | 720 µl Formaldehyd (37%)   |
|                    |                   | 2 ml Glycerol              |
|                    |                   | 3 ml Formamid              |

MOPS - 3-[N-Morpholino]-1-Propansulfonsäure; EDTA - Ethylendiamin-N, N, N', N'- Tetraessigsäure

Das Gel wurde aus 0,36 g Agarose, 3 ml Gelpuffer und 26,5 ml Wasser hergestellt und gekocht (5 min). Bei einer Temperatur von 65°C wurde das Gel mit 540 µl Formaldehyd versetzt und anschließend gegossen. Nach dem Abkühlen (20 min) wurde das Gel in Laufpuffer 30 min äquilibriert. 10 µl RNA (4 µg) wurden mit 2 µl Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Im Anschluss an die Elektrophorese (1 h, 5-7 Volt/cm) erfolgte die Färbung der Produkte mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml Laufpuffer). Das Gel wurde in einer Fotoeinrichtung (SYNGENE, GENEENIUS, SYNOPTICS, USA) unter UV-Licht fotografiert und mit der zugehörigen Geräte-Software ausgewertet.

*Primer:* Die zur PCR benötigten Primer für GAPDH, G6PDH, FSS und ACO wurden mit der Software PRIMER SELECT 4.0 (DNASTAR, USA) ausgewählt. Die Wahl der Primer für die Desaturasen erfolgte mittels ABI-PRISM PRIMERPAIRS (APPLIED BIOSYSTEMS, WEITERSTADT). Die Auswahl orientierte sich nach folgenden Parametern: Länge von Primer und Produkt, Guanidin-Cytosin-Gehalt des Produkts sowie dessen Schmelztemperatur. Die Konzentration der Primer wurde spektralphotometrisch überprüft.

*Vorversuche:* In Abhängigkeit von der verwendeten PCR-Methode wurden folgende Einflussgrößen nach Vorversuchen optimiert: die Konzentration an cDNA, Primern, Nukleotiden, Polymerase, MgCl<sub>2</sub>, SYBR GREEN I sowie Temperatur und Dauer der Einzelschritte und die Anzahl der Reaktionszyklen.

### 2.4.5.2 Semiquantitative RT-PCR

Die semiquantitative RT-PCR wurde für die Expressionsanalyse von G6PDH und FSS unter folgenden Bedingungen angewendet:

*RT-Reaktion:* Die RT-Reaktion der RNA in cDNA erfolgte mit READY TO GO RT-PCR BEADS (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, FREIBURG). Dazugegeben wurde:

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| Wasser                                | 34,0 µl |
| Oligo-pd (T) <sub>12-18</sub> (SIGMA) | 1,0 µl  |
| RNA [0,4 µg/µl]                       | 5,0 µl  |

Die cDNA-Synthese erfolgte in 25 min bei 42°C (MASTERCYCLER PERSONAL, KÖLN). Abschließend wurde bei 95°C für 4,5 min denaturiert.

*PCR:* Die Expressionsbestimmung von GAPDH, G6PDH und FSS erfolgte parallel. Dazu wurde die cDNA eines READY TO GO RT-PCR-Ansatzes zu gleichen Teilen (11 µl) aufgeteilt und die entsprechenden Primerpaare (5µl) zugesetzt. Die PCR erfolgte im MASTERCYCLER (EPPENDORF). Für den Test der Produktspezifität und um genomische DNA ausschließen zu können, wurde stets ein Ansatz mit inaktivierter cDNA mitgeführt.

*PCR-Bedingungen:*

| Reaktionszyklus             | Temperatur | Dauer |
|-----------------------------|------------|-------|
| Denaturierung               | 95°C       | 30 s  |
| Anlagerung                  | 55°C       | 30 s  |
| Kettenverlängerung          | 72°C       | 45 s  |
| Anzahl der Reaktionszyklen: | 35         |       |

*Gelelektrophorese:* Die Trennung der entstandenen PCR-Produkte erfolgte elektrophoretisch (1 h, 6 Volt/cm). Dafür wurde ein 2%iges Gel aus 0,6 g Agarose und 30 ml Laufpuffer hergestellt. Die Herstellung und weitere Behandlung des Gels erfolgten wie bereits unter 2.4.5.1 beschrieben, jedoch ohne den Zusatz von Formaldehyd:

| Gelpuffer          | Laufpuffer          | Ladepuffer           |
|--------------------|---------------------|----------------------|
| 54,0 g Tris Base   | 100 ml 5x Gelpuffer | 300 µl Glycerol      |
| 27,5 g Borsäure    | 900 ml Wasser       | 20 mg Bromphenolblau |
| 1000 ml 0,1 M EDTA |                     | 700 µl Wasser        |

Tris - Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan ; EDTA - Ethylendiamin-N, N, N', N'- Tetraessigsäure

*Auswertung:* Als Ergebnis wurde das Verhältnis der Fläche des Signals vom Ziel-Gen zur entsprechenden Fläche des Signals vom GAPDH berechnet.

### 2.4.5.2.1 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Für die Expressionsanalyse der G6PDH wurden folgende Primer verwendet:

|              |               |  |
|--------------|---------------|--|
| G6PDH        |               | EC 1.1.1.49                                      |
| mRNA         |               | EMBL ID: RNGD                                    |
| Primer       | Sequenz       | <i>up</i> 5' CCA GCC TCC ACA AGC ACC TCA AC 3'   |
|              | Sequenz       | <i>low</i> 5' AAT TAG CCC CCA CGA CCC TCA GTA 3' |
|              | Konzentration | 2,0 pmol/µl Primergemisch                        |
| Produkt      |               | 406 Basenpaare                                   |
| <u>GAPDH</u> |               | EC 1.2.1.12                                      |
| mRNA         |               | EMBL ID: RNGADPHR                                |
| Primer       | Sequenz       | <i>up</i> 5' GCA TGG CCT TCC GTG TTC C 3'        |
|              | Sequenz       | <i>low</i> 5' GGG TGG TCC AGG GTT TCT TAC TC 3'  |
|              | Konzentration | 0,5 pmol/µl Primergemisch                        |
| Produkt      |               | 337 Basenpaare                                   |

### 2.4.5.2.2 Fettsäure-Synthase

Für die Expressionsanalyse der FSS wurden folgende Primer verwendet:

|              |               |   |
|--------------|---------------|---|
| FSS          |               | EC 2.3.1.85                                     |
| mRNA         |               | EMBL ID: RNFASA                                 |
| Primer       | Sequenz       | <i>up</i> 5' GGG CCT GGA GTC TAT CAT CAA CAT 3' |
|              | Sequenz       | <i>low</i> 5' GCG GGT ACA GGG CTA AGA CAA AA 3' |
|              | Konzentration | 2,0 pmol/µl Primergemisch                       |
| Produkt      |               | 518 Basenpaare                                  |
| <u>GAPDH</u> |               | EC 1.2.1.12                                     |
| mRNA         |               | EMBL ID: RNGADPHR                               |
| Primer       | Sequenz       | <i>up</i> 5' GCA TGG CCT TCC GTG TTC C 3'       |
|              | Sequenz       | <i>low</i> 5' GGG TGG TCC AGG GTT TCT TAC TC 3' |
|              | Konzentration | 0,4 pmol/µl Primergemisch                       |
| Produkt      |               | 337 Basenpaare                                  |

### 2.4.5.3 Quantitative RTD-PCR

Die quantitative RTD-PCR wurde für die Expressionsanalyse von  $\Delta 9$ -,  $\Delta 6$ - und  $\Delta 5$ -Desaturase sowie von ACO unter folgenden Bedingungen angewendet:

*RT-Reaktion* (OMNISCRIPRT REVERSE TRANSKRIPTASE, QIAGEN, HILDEN):

|                                       |              |
|---------------------------------------|--------------|
| Wasser                                | 10,5 $\mu$ l |
| 10x Puffer                            | 2,0 $\mu$ l  |
| Desoxynucleosidtriphosphat (dNTP)     | 2,0 $\mu$ l  |
| Oligo-pd (T) <sub>12-18</sub> (SIGMA) | 2,0 $\mu$ l  |
| Reverse Transkriptase                 | 1,0 $\mu$ l  |
| RNA (0,4 $\mu$ g/ $\mu$ l)            | 5,8 $\mu$ l  |

Der Ansatz wurde gemischt und die cDNA im MASTERCYCLER (EPPENDORF) synthetisiert (37°C, 55 min). Anschließend wurde bei 93°C für 5 min denaturiert.

*RTD-PCR* (TAQ PCR CORE KIT, QIAGEN): Als Farbstoff wurde SYBR GREEN I (SIGMA) eingesetzt. SYBR GREEN I wird in die doppelsträngige DNA des PCR-Produktes eingebaut, wodurch sich die Fluoreszenz messbar erhöht.

In einem PCR-Ansatz wurde die Amplifikation von Ziel- und Haushaltsgen einer Probe sowie die Amplifikation der entsprechenden Standardreihen mittels ROTORGENE 2000 (CORBETT RESEARCH, MORTLAKE, AUSTRALIEN) bestimmt.

*PCR-Ansatz:*

|  |              |
|--|--------------|
| Wasser (QIAGEN)                            | 6,09 $\mu$ l |
| 10 x Puffer                                | 1,50 $\mu$ l |
| MgCl <sub>2</sub> [25 mM]                  | 2,10 $\mu$ l |
| Desoxynucleosidtriphosphat (dNTP) [2,5 mM] | 0,75 $\mu$ l |
| Taq-Polymerase [5 U]                       | 0,19 $\mu$ l |
| 5x SYBR GREEN I                            | 0,38 $\mu$ l |
| cDNA von Probe bzw. Standard               | 2,00 $\mu$ l |
| Primergemisch: Ziel-Gen oder GAPDH         | 2,00 $\mu$ l |

Aus den Reagenzien wurde eine Vormischung (MASTERMIX) hergestellt. Für die Probenanalyse wurde die cDNA vorgelegt, mit Vormischung versetzt und anschließend die jeweiligen Primerpaare zugegeben. Für die Standardreihen wurde die Vormischung zuerst mit den Primerpaaren versetzt und dann auf die vorgelegte cDNA verteilt. Jeder Ansatz wurde zweifach bestimmt. Ein Ansatz ohne cDNA diente dem Test auf Primerdimere und unspezifische Produkte.

Im Anschluss an die PCR wurde das Produkt einem Schmelzprozess unterzogen. Bei kontinuierlicher Steigerung der Temperatur wurden die Doppelstränge des gebildeten

Produkts getrennt und dabei der eingebaute Farbstoff freigesetzt. Das Produkt konnte somit über seinen Schmelzpunkt verifiziert und eine Artefaktbildung ausgeschlossen werden.

**Quantifizierung:** Die Quantifizierung erfolgte über die mitgeführten Standardreihen des Ziel- und des Haushaltsgens: Für die Gewinnung der Standards wurde eine PCR ohne SYBR GREEN I durchgeführt. Das Reaktionsprodukt wurde in einem 2%igen Agarose-Gel elektrophoretisch getrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (vgl. 2.4.5, jedoch ohne den Zusatz von Formaldehyd). Die Banden wurden unter kurzer UV-Licht-Exposition ausschnitten. Die DNA-Extraktion aus dem Gel erfolgte mittels MINELUTE PCR PURIFICATION KIT (QIAGEN). Die DNA-Konzentration des gewonnenen Eluats wurde mit einem Kit (PICOGREEN, MOLECULAR PROBES, LEIDEN, NIEDERLANDE) fluorimetrisch bestimmt (SPECTRO FLUOR PLUS). Aus der DNA-Konzentration des Eluats wurde über das Molekulargewicht des Produkts die darin enthaltene Stoffmenge ermittelt. Die Kopien pro ml Eluat ( $1 \text{ Mol} = 6,03 \cdot 10^{23}$  Kopien) wurden zu einer entsprechenden Standardreihe verdünnt und als cDNA in der PCR eingesetzt.

**Auswertung:** Die Auswertung erfolgte mit der Geräte-Software über den *cycle threshold* ( $C_T$ -Wert) (ROTORGENE 2000, Version 4.2). Der  $C_T$ -Wert ist der Reaktionszyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal den Hintergrund überschreitet (Abb.1). Die Amplifikation befindet sich dann in der exponentiellen Phase. Trägt man den ermittelten  $C_T$ -Wert gegen die anfangs eingesetzten DNA-Mengen [Kopien] auf, erhält man eine Standardkurve, die es erlaubt, aus den ermittelten  $C_T$ -Werten der Versuchsansätze die jeweils ursprünglich vorhandene DNA-Menge zu errechnen. Die Kopienzahl des Ziel-Gens wurde mit der Kopienzahl von GAPDH normalisiert.

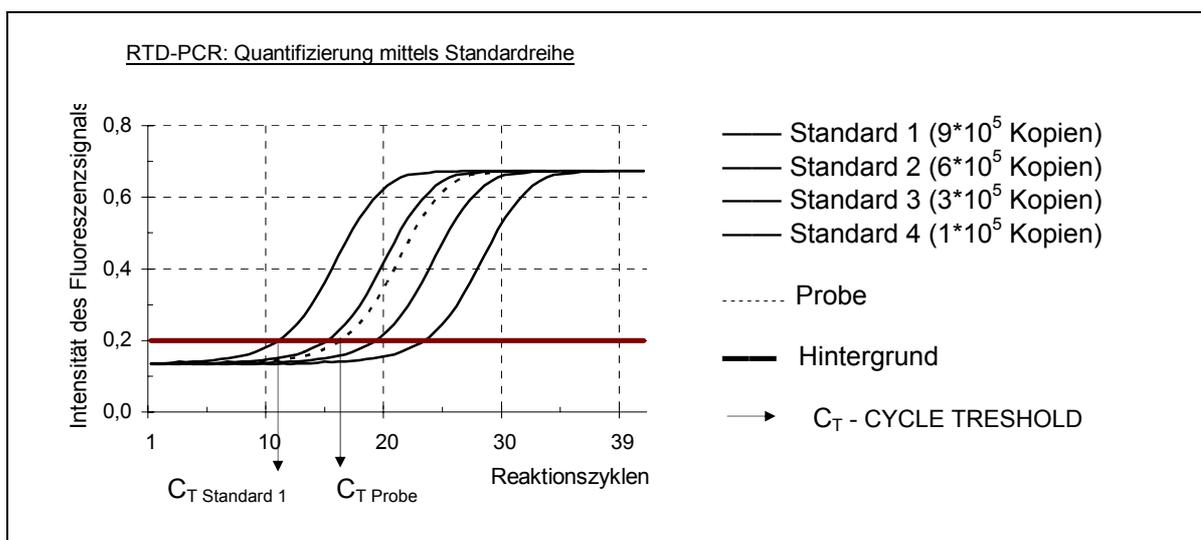


Abbildung 1: Quantifizierung der mRNA-Konzentration mittels REALTIME-DETECTION-PCR

### 2.4.5.3.1 Acyl-CoA-Oxidase

Für die Expressionsanalyse der ACO wurden folgende Primer verwendet:

| ACO     |               | EC 1.3.3.6                                       |
|---------|---------------|--|
| mRNA    |               | EMBL ID: RNACO1                                  |
| Primer  | Sequenz       | <i>up</i> 5' CGG CGG GCA CGG CTA TTC T 3'        |
|         | Sequenz       | <i>low</i> 5' GCT GTG GCT GGA TCC GCT GAC TC 3'  |
|         | Konzentration | 2,5 pmol/µl Primergemisch                        |
| Produkt |               | 212 Basenpaare                                   |
|         | Schmelzpunkt  | 79°C   |
|         | Standardreihe | 9,6*10 <sup>5</sup> – 9,6*10 <sup>6</sup> Kopien |

| GAPDH   |               | EC 1.2.1.12                                      |
|---------|---------------|--|
| mRNA    |               | EMBL ID: RNGADPHR                                |
| Primer  | Sequenz       | <i>up</i> 5' GCA TGG CCT TCC GTG TTC C 3'        |
|         | Sequenz       | <i>low</i> 5' GGG TGG TCC AGG GTT TCT TAC TC 3'  |
|         | Konzentration | 1,5 pmol/µl Primergemisch                        |
| Produkt |               | 337 Basenpaare                                   |
|         | Schmelzpunkt  | 79,8°C   |
|         | Standardreihe | 2,5*10 <sup>7</sup> – 2,6*10 <sup>8</sup> Kopien |

| RTD-PCR-Bedingungen: | Temperatur | Dauer  |
|----------------------|------------|--------|
| Denaturierung        | 95°C       | 120 s  |
| PCR                  |            |        |
| Denaturierung        | 95°C       | 20 s   |
| Anlagerung           | 58°C       | 20 s   |
| Kettenverlängerung   | 72°C       | 20 s   |
| Fluoreszenzmessung   | 85°C       | 15 s   |
| Inkubation           | 50°C       | 60 s   |
| Schmelzkurve         | 50 - 99°C  | 5 s/°C |

### 2.4.5.3.2 $\Delta 9$ -, $\Delta 6$ - und $\Delta 5$ -Desaturase

Für die Expressionsanalysen der  $\Delta 9$ -,  $\Delta 6$ - und  $\Delta 5$ -Desaturase wurden folgende Primer verwendet:

|   |               |   |
|---|---------------|---|
| <b><math>\Delta 9</math>-Desaturase</b> |               | EC 1.14.99.5  |
| mRNA                                    |               | EMBL ID: RNSCD  |
| Primer                                  | Sequenz       | <i>up</i> 5' CCG TGG CTT TTT CTT CTC TCA 3'                                 |
|   | Sequenz       | <i>low</i> 5' CTT TCC GCC CTT CTC TTT GA 3'                                 |
|   | Konzentration | <i>up</i> : 3,5 pmol/ $\mu$ l; <i>low</i> : 7,5 pmol/ $\mu$ l Primergemisch |
| Produkt                                 |               | 76 Basenpaare   |
|   | Schmelzpunkt  | 83°C  |
|   | Standardreihe | $1,2 \cdot 10^6$ - $1,2 \cdot 10^7$ Kopien                                  |
| <b><math>\Delta 6</math>-Desaturase</b> |               | EC 1.14.99  |
| mRNA                                    |               | EMBL ID: AB621980   |
| Primer                                  | Sequenz       | <i>up</i> 5' CTT TCT CCT CCT GTC CCA CAT 3'                                 |
|   | Sequenz       | <i>low</i> 5' CAT TGC CGA AGT ACG AGA GGA 3'                                |
|   | Konzentration | 7,5 pmol/ $\mu$ l Primergemisch   |
| Produkt                                 |               | 71 Basenpaare   |
|   | Schmelzpunkt  | 81°C  |
|   | Standardreihe | $6,3 \cdot 10^4$ – $6,3 \cdot 10^5$ Kopien                                  |
| <b><math>\Delta 5</math>-Desaturase</b> |               | EC 1.14.99  |
| mRNA                                    |               | EMBL ID: AF320509   |
| Primer                                  | Sequenz       | <i>up</i> 5' CCC CAT GCA CAT TGA TCA TG 3'                                  |
|   | Sequenz       | <i>low</i> 5' AAC GTT GCA GGT TGC CTG TAG 3'                                |
|   | Konzentration | 7,5 pmol/ $\mu$ l Primergemisch   |
| Produkt                                 |               | 70 Basenpaare   |
|   | Schmelzpunkt  | 82°C  |
|   | Standardreihe | $1,6 \cdot 10^5$ – $1,6 \cdot 10^6$ Kopien                                  |
| <b>GAPDH</b>                            |               | EC 1.2.1.12   |
| mRNA                                    |               | EMBL ID: RNGADPHR   |
| Primer                                  | Sequenz       | <i>up</i> 5' GCA TGG CCT TCC GTG TTC C 3'                                   |
|   | Sequenz       | <i>low</i> 5' GGG TGG TCC AGG GTT TCT TAC TC 3'                             |
|   | Konzentration | 1,5 pmol/ $\mu$ l Primergemisch   |
| Produkt                                 |               | 337 Basenpaare  |
|   | Schmelzpunkt  | 79,8°C  |
|   | Standardreihe | $1,3 \cdot 10^7$ – $1,3 \cdot 10^8$ Kopien                                  |

| RTD-PCR-Bedingungen: | Temperatur | Dauer   |
|----------------------|------------|---------|
| Denaturierung        | 95°C       | 120 s   |
| PCR                  |            |         |
| Denaturierung        | 95°C       | 20 s    |
| Anlagerung           | 60°C       | 30 s    |
| Kettenverlängerung   | 72°C       | 40 s    |
| Fluoreszenzmessung   | 72°C       | 15 s    |
| Inkubation           | 50°C       | 30 s    |
| Schmelzkurve         | 50 - 99°C  | 10 s/°C |

### 2.4.6 Erstellung eines Genexpressionsprofils mittels cDNA-Array

Für die Expressionsanalyse wurde das cDNA-Macroarray HYBOND ATLAS RAT 1.2 ARRAY (CLONTECH, HEIDELBERG) verwendet. Diese Nylon-Membran enthält mit 1.176 cDNA Gene des Lipidstoffwechsels, des Stoffwechsels von Kohlenhydraten, Aminosäuren, Xenobiotika, Vitaminen sowie Gene verschiedener Rezeptoren, Hormone, Proteine und Faktoren (Translation, Transkription, Wachstum).

**Versuchsaufbau.** Für das cDNA-Array wurde Gesamt-RNA der Leber verwendet. Proben-gewinnung, Isolation, Qualitäts- und Konzentrationsbestimmung der RNA sind in den Kapiteln 2.3.2 und 2.4.5 beschrieben. Für die Expressionsanalyse wurden die folgenden vier Gruppen des Versuchs verwendet (vgl. Tab.1/ 2.2.1):

#### *Kontrollgruppe*

- Frisches Fett, 25 mg TÄ / kg Diät

#### *Behandlungsgruppen*

- Frisches Fett, 250 mg TÄ / kg Diät
- Oxidiertes Fett, bei 50°C erhitzt, 25 mg TÄ / kg Diät
- Oxidiertes Fett, bei 50°C erhitzt, 250 mg TÄ / kg Diät

Pro Versuchsgruppe wurde die RNA von 9 Tieren verwendet, die zu drei Pools zusammen-gestellt wurde. Mit jedem dieser drei RNA-Pools wurde ein Array angefertigt. Die insgesamt zwölf Pools bzw. Arrays wurden in drei Durchgängen bearbeitet.

**Durchführung des Experiments.** 40 µg Gesamt-RNA je Pool wurde mit ATLAS PURE TOTAL RNA LABELING SYSTEM (CLONTECH) der Anleitung entsprechend aufbereitet.

Die wesentlichen Arbeitsschritte werden nachfolgend beschrieben:

*Anreicherung der mRNA:* Die Gesamt-RNA wurde mit biotinylierten Oligo (desoxy-Thymin, [dT]) versetzt, die sich an den Poly-A<sup>+</sup>-Schwanz der mRNA anlagerten. Die Zugabe von magnetisiertem Streptavidin führte zur Bindungsreaktion zwischen Biotin und Avidin. Die so magnetisierte mRNA wurde mit einem magnetischen Partikel-Separator (PROMEGA, MANNHEIM) aufkonzentriert.

*cDNA-Synthese und radioaktive Markierung:* Die RT-Reaktion erfolgte mittels RAT 1.2 ARRAY-spezifischen Oligonukleotiden, die sich direkt an der Poly-A<sup>+</sup>-RNA anlagern. Nicht gebundene Fragmente wurden mittels Säulenchromatographie abgetrennt. Die cDNA wurde mit [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P] Desoxyadenosintriphosphat (dATP) (PERKIN ELMER, BOSTON, USA) radioaktiv markiert.

*Hybridisierung:* Die Membranen wurden in Hybridisierungsflaschen platziert und der Anleitung folgend vorbehandelt. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit Lachs-DNA

blockiert. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Probe wurde 18 h bei 68°C und 5 U/min hybridisiert.

*Exposition:* Die Membranen wurden dem Protokoll entsprechend gewaschen, anschließend mit einem Puffer-getränkten Filterkarton stabilisiert und in CELLOPHAN gewickelt auf einem Phosphor-Speicher-Schirm (RAYTEST, STRAUBENHARDT) angeordnet. Der Schirm wurde für die Dauer der Exposition in einer speziellen Kassette aufbewahrt, wo er die Energie in Abhängigkeit der angelagerten radioaktiv markierten cDNA absorbierte. Die Expositionsdauer (16 bis 32 h) orientierte sich am oberen dynamischen Messbereich des Systems und an der Signalstärke der Haushaltsgene, um eine gute Vergleichbarkeit der Arrays zu erzielen.

Die Informationen des Schirmes wurden unter laserinduzierter Stimulation mittels PHOSPHORIMAGER als digitales Bild (16 Bit) gespeichert (BAS-1500, TINA 2.0, RAYTEST).

*Reinigung der Membran:* Die Membranen wurden mehrfach verwendet. Dazu wurden sie im Anschluss an das Experiment der Anleitung folgend gereinigt. Die Wiederverwendbarkeit der Membran wurde durch eine 20-stündige Exposition auf dem Phosphor-Speicher-Schirm sichergestellt.

**Auswertung der Daten.** Die Quantifizierung der Expressionssignale erfolgte durch die Software ATLASIMAGE 2.01 (CLONTECH). Die Zuordnung der Signale zu den Genen des RAT 1.2 ARRAYS erfolgte durch das Anpassen der entsprechenden Maske an das jeweilige Array.

*Hintergrund und Signal-Schwellenwert.* Als Hintergrund wurde der Mittelwert der Signalintensitäten der freien Flächen eines Arrays definiert. Der Signal-Schwellenwert wurde anhand des Hintergrundes festgesetzt: Als Signal zählte jede Intensität, die höher als der Hintergrund war.

*Normalisierung und Vergleich der Arrays:* Das Niveau der Signalintensitäten der einzelnen Arrays variierte infolge der Qualität und Quantität der eingesetzten RNA, der spezifischen Aktivität der Probe sowie der Expositionszeit. Um die Arrays vergleichen zu können, musste der Einfluss dieser Faktoren ausgeglichen werden. Dazu wurden die Daten normalisiert:

Für den Vergleich der zwölf Arrays wurden die drei Arrays der Kontrollgruppe zu einem Kontroll-Array zusammengefasst. Dafür wurden die drei Arrays der Kontrollgruppe einzeln normalisiert, indem ihre relativen Signalintensitäten mit einem Koeffizienten multipliziert wurden:

$$\left( \text{Normalisierungs-} \right)_{\text{koeffizient}} = \frac{1}{3} \left[ \frac{\sum_{k1=1}^n (S_i - H_g)_{k1} + \sum_{k2=1}^n (S_i - H_g)_{k2} + \sum_{k3=1}^n (S_i - H_g)_{k3}}{\sum_{k1=1}^n (S_i - H_g)_{k1}} \right]$$

$S_i$  Signalintensität  
 $H_g$  Hintergrund  
 $k$  Arrays der Kontrollgruppe  
 $n$  Anzahl der Gene des Arrays

Auf den so gebildeten Kontroll-Array wurde dann jeder der neun Behandlungs-Arrays bezogen. Dazu mussten die Signalintensitäten des Behandlungs-Arrays dem Niveau des Kontroll-Arrays angeglichen werden. Auch hierfür wurde ein Normalisierungskoeffizient gebildet:

$$\text{Normalisierungskoeffizient} = \frac{\sum_{k=1}^n (\text{Intensität} - \text{Hintergrund})_k}{\sum_{b=1}^n (\text{Intensität} - \text{Hintergrund})_b}$$

k    Kontroll-Array  
b    Behandlungs-Array  
n    Anzahl der Gene des Arrays

*Auswertung:* Für die Auswertung der Daten wurde eine Datenbank mit EXCEL 2000 (MICROSOFT, USA) erstellt. Die Genexpression wurde als Verhältnis der Signalintensitäten von Behandlungs- zu Kontroll-Array erfasst. Ein Gen wurde als verändert exprimiert gewertet, wenn der Faktor  $\geq 1,4$  betrug:

$$\text{Faktor} = \frac{\text{Relative Signalintensität Array}_{\text{Behandlung}}}{\text{Relative Signalintensität Array}_{\text{Kontrolle}}}$$

Da einem großen Faktor auch sehr schwache Signale zugrunde liegen können, wurde auch die Differenz der Signale als Kriterium für die qualitative Beurteilung des Faktors ermittelt. Schwache Signale sind durch eine geringe Differenz gekennzeichnet:

$$\text{Differenz} = (\text{Relative Signalintensität Array}_{\text{Behandlung}}) - (\text{Relative Signalintensität Array}_{\text{Kontrolle}})$$

Beispiel:

|    | <u>Signalintensität</u> |                  | <u>Faktor</u> | <u>Differenz</u> |
|----|-------------------------|------------------|---------------|------------------|
|    | <i>Behandlung</i>       | <i>Kontrolle</i> |               |                  |
| 1. | 20                      | 10               | <b>2</b>      | 10               |
| 2. | 2                       | 1                | <b>2</b>      | 1                |

### 2.4.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (MINITAB, Version 13, MINITAB, USA). Die Faktoren waren das Diätfett und die Vitamin E-Konzentration der Diät sowie die Interaktion zwischen den beiden Faktoren. Bei signifikanten F-Werten in der Varianzanalyse wurden die Gruppenmittelwerte mittels FISHER-TEST verglichen. Als Signifikanzgrenze wurde dabei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zugrunde gelegt ( $P < 0,05$ ).

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Charakterisierung der Diätfette

Die Parameter zur Charakterisierung der verwendeten Diätfette sind in Tabelle 3 aufgeführt.

*$\alpha$ -Tocopherol:* Die Oxidation von OF190°C reduzierte die Konzentration an nativem  $\alpha$ -Tocopherol um 90%, während es im OF50°C und OF105°C vollständig abgebaut wurde. Andere native Tocopherolisomere waren selbst im frischen Fett nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden (< 1 mg TÄ/kg Fett, Daten nicht gezeigt).

*Fettsäuren:* Die Fettsäurezusammensetzung der drei oxidierten Fette war nahezu identisch. Die Fettsäurezusammensetzung der oxidierten Fette war der Fettsäurezusammensetzung des frischen Fettes sehr ähnlich (Tab. 3).

*Lipidperoxidationsprodukte:* Alle drei oxidierten Fette wiesen deutlich höhere Konzentrationen an LPOP auf als frisches Fett.

Die Peroxidzahlen der Diätfette OF50°C, OF105°C und OF190°C waren um die Faktoren 500, 100 und 2 höher als die von frischem Fett. Nach dem Einbringen der Fette in die Diäten stiegen ihre Peroxidzahlen nochmals an und unterschieden sich dann um die Faktoren 200, 50 und 10 vom frischen Fett.

Die Konzentrationen der TBARS waren in OF50°C, OF105°C und OF190°C um 1000, 200 und 30mal höher und nach dem Einbringen der Fette in die Diäten 2200, 220 und 20mal höher als in der Diät mit frischem Fett.

Die Konzentration der Gesamt-Carbonylverbindungen war in allen drei oxidierten Fetten etwa um den Faktor 15 höher als im frischen Fett. Auch die Säurezahl und die Anteile an polaren Verbindungen waren in den oxidierten Fetten deutlich höher als im frischen Fett: Die Säurezahl der oxidierten Fette lag 2,5 bis 3,5mal höher und der Anteil an polaren Verbindungen war 17 bis 22mal höher als im frischem Fett.

Die Konzentration an konjugierten Dienen war sowohl vor als auch nach dem Eintrag der Fette in die Diäten im OF50°C, OF105°C und OF190°C um die Faktoren 22, 13 und 8 höher als im frischen Fett.

In den Abbildungen 2 bis 5 sind die UV-Spektren der Diätfette dargestellt. Anhand der Absorptionsbanden können Konjungenfettsäuren (220 - 240 nm), Trienfettsäuren (258 - 279 nm) und Tetraenfettsäuren (300 - 316 nm) erfasst werden (HADORN und ZÜRICHER 1966). Im Vergleich zum frischen Fett ist im Bereich von 220 nm bis 240 nm bei allen drei oxidierten Fetten ein deutlicher Extinktionsanstieg zu verzeichnen

Tabelle 3: Parameter zur Charakterisierung der Diätfette

|                                      |  | Frisches Fett            | Oxidiertes Fett 1 | Oxidiertes Fett 2 | Oxidiertes Fett 3 |
|--------------------------------------|--|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Zusammensetzung:                     | SÖ / SS (m/m)  | 31 / 69                  | 50 / 50           | 50 / 50           | 50 / 50           |
| Temperatur und Dauer der Behandlung: |  | unbehandelt              | 50°C, 38 d        | 105°C, 81 h       | 190°C, 24 h       |
| Tocopherole                          |  | [mg/kg Fett]             |                   |                   |                   |
|                                      | $\alpha$ -Tocopherol (analysiert)                    | 202                      | <1                | <1                | 28                |
|                                      | All-rac- $\alpha$ -Tocopherylacetat (supplementiert) | 72 / 3453 <sup>1</sup>   | 372 / 3725        | 372 / 3725        | 331 / 3683        |
|                                      | $\alpha$ -Tocopherol Äquivalent (kalkuliert)         | 250 / 2500 <sup>1</sup>  | 250 / 2500        | 250 / 2500        | 250 / 2500        |
| Fettsäuren                           |  | [g/100 g Fettsäuren]     |                   |                   |                   |
|                                      | 14:0   | 1,1                      | 0,9               | 0,9               | 0,9               |
|                                      | 16:0   | 19,2                     | 17,4              | 17,8              | 17,5              |
|                                      | 18:0   | 11,5                     | 9,8               | 10,4              | 10,2              |
|                                      | 18:1   | 35,6                     | 36,9              | 35,6              | 34,7              |
|                                      | 18:2n-6  | 26,1                     | 26,9              | 26,6              | 27,2              |
|                                      | 18:3n-3  | 0,6                      | 0,3               | 0,3               | 0,3               |
| Lipidperoxidationsprodukte           |  |                          |                   |                   |                   |
| Vor Eintrag in die Diät              |  |                          |                   |                   |                   |
|                                      | Peroxidzahl [mEq O <sub>2</sub> /kg]                 | 1,6                      | 804               | 150               | 3,5               |
|                                      | Konjugierte Diene [mmol/kg]                          | 13                       | 295               | 178               | 103               |
|                                      | TBARS [mmol/kg]                                      | 0,01                     | 10                | 2,2               | 0,3               |
|                                      | Gesamt Carbonyle [mmol/kg]                           | < 3                      | 54                | 53                | 46                |
|                                      | Säurezahl [g KOH/kg]                                 | 0,8                      | 2,9               | 2,2               | 2,0               |
|                                      | Polare Verbindungen [%]                              | 2,2                      | 41                | 46                | 38                |
| Nach Eintrag in die Diät             |  |                          |                   |                   |                   |
|                                      | Peroxidzahl [mEq O <sub>2</sub> /kg]                 | 4,7 / 4,4 <sup>1</sup>   | 920 / 915         | 239 / 224         | 39 / 37           |
|                                      | Konjugierte Diene [mmol/kg]                          | 13,9 / 13,6 <sup>1</sup> | 259 / 295         | 195 / 163         | 107 / 99          |
|                                      | TBARS [mmol/kg]                                      | 0,01 / 0,01 <sup>1</sup> | 23 / 21           | 2,2 / 2,3         | 0,2 / 0,2         |

SÖ/SS - Sonnenblumenöl/Schweineschmalz; LPOP - Lipidperoxidationsprodukte; TBARS - Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen

<sup>1</sup> Werte entsprechen den Diätfetten mit entweder 25 mg oder 250 mg  $\alpha$ -Tocopheroläquivalenten/kg Diät

Die Extinktion war bei OF50°C, OF105°C und OF190°C etwa um die Faktoren 5, 4 und 3 höher als beim frischen Fett. Im Bereich von 258 nm bis 279 nm ist bei den oxidierten Fetten im Vergleich zum frischen Fett ein leichter Extinktionsanstieg um den Faktor 1,4 festzustellen. Im Absorptionsbereich von 300 nm bis 316 nm wurde kein Unterschied zwischen frischem und oxidiertem Fett erfasst.

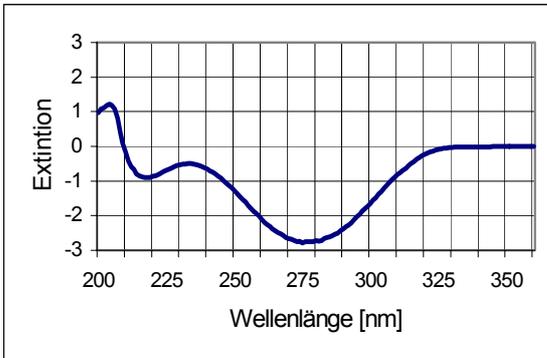


Abbildung 2: UV-Spektrum vom frischen Fett

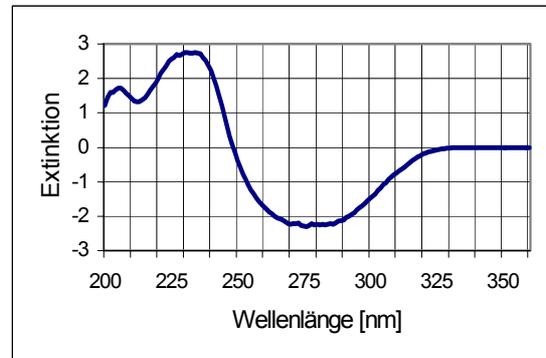


Abbildung 3: UV-Spektrum vom OF50°C

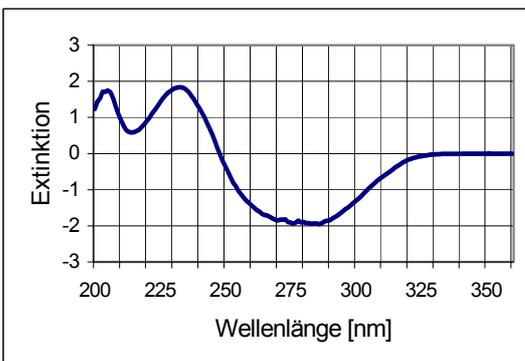


Abbildung 4: UV-Spektrum vom OF105°C

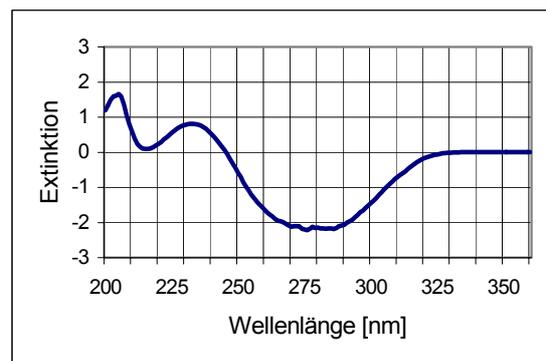


Abbildung 5: UV-Spektrum vom OF190°C

### 3.2 Entwicklung der Lebendmasse

Die Lebendmasseentwicklung der Versuchstiere und das relative Lebergewicht sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Am Versuchsbeginn betrug die mittlere Lebendmasse der Ratten  $103 \pm 8$  g. Während der Versuchsdauer wurde die tägliche Futtermenge von 4 g auf 18 g gesteigert, womit jedes Tier durchschnittlich 14,3 g/Tag und insgesamt 915 g der Diät aufnahm.

Die Lebendmassezunahme der Tiere wurde signifikant durch das Diätfett und die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst: Bei niedriger Vitamin E-Aufnahme war die Lebendmassezunahme der Versuchstiere, die oxidierte Fette erhielten, etwas geringer (-7%) als bei den Versuchstieren mit frischem Diätfett. Bei den Tieren mit hoher Vitamin E-Aufnahme wurden dagegen keine signifikanten Unterschiede in der Lebendmassezunahme festgestellt.

Die relativen Lebergewichte der Ratten (g/100g Lebendmasse) wurden nicht beeinflusst.

### 3.3 $\alpha$ -Tocopherolkonzentration und scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E

Die Konzentration an  $\alpha$ -Tocopherol in Serum, Leber und Abdominalfett sowie die scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E ist in Tabelle 4 aufgeführt. Die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration war in allen Geweben von Tieren mit 250 mg TÄ/kg Diät signifikant höher als in Geweben von Tieren mit 25 mg TÄ/kg Diät.

Die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in Serum und Abdominalfett wurde signifikant durch das Diätfett und die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst: Im Serum hatten Tiere mit hoher Vitamin E-Aufnahme im Mittel eine 4mal so hohe  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration wie Tiere mit niedriger Vitamin E-Aufnahme. Im Serum führte die Verfütterung der oxidierten Fette zu keinen signifikanten Unterschieden in der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration zwischen den Gruppen.

Im Abdominalfett hatten Tiere mit oxidierten Diätfetten und niedriger Vitamin E-Aufnahme unabhängig vom Oxidationsgrad eine um 30% geringere  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration als Tiere mit frischem Fett. Dagegen hatten Tiere mit oxidierten Diätfetten und hoher Vitamin E-Aufnahme eine im Mittel um 6% niedrigere Konzentration als bei frischem Fett. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in der Leber wurde signifikant durch das Diätfett in Interaktion mit der Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst: Bei Tieren mit niedriger Vitamin E-Aufnahme führte die Verfütterung der oxidierten Fette OF50°C, OF105°C und OF190°C zu einer um 23%, 30% und 38% niedrigeren  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in der Leber im Vergleich zu frischem Fett. Bei hoher Vitamin E-Aufnahme und oxidiertem Diätfett war die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in der Leber im Vergleich zu frischem Fett um 43% geringer.

Die scheinbare Verdaulichkeit von  $\alpha$ -Tocopherol wurde in der 4. Versuchswoche signifikant durch das Diätfett in Interaktion mit der Vitamin E-Konzentration beeinflusst und war bei Ratten mit niedriger Vitamin E-Aufnahme und OF50°C, OF105°C und OF190°C um 5%, 10% und 10% niedriger als bei frischem Fett. Dagegen war die scheinbare Verdaulichkeit von  $\alpha$ -Tocopherol bei hoher Vitamin E-Aufnahme und oxidiertem Diätfett um 13%, 17% und 15% niedriger als bei frischem Fett.

In der 9. Versuchswoche wurde die scheinbare Verdaulichkeit des  $\alpha$ -Tocopherols ausschließlich durch das Diätfett beeinflusst und war bei Fütterung mit OF50°C um 18% und bei Fütterung mit OF105°C sowie mit OF190°C jeweils um 26% geringer als bei Fütterung mit frischem Fett.

Tabelle 4: Lebendmassezunahme, relatives Lebergewicht und die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration sowie die scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E

| Fettbehandlung                                 |                   | Frisches Fett               |                              | Oxidiertes Fett 1           |                             | Oxidiertes Fett 2           |                             | Oxidiertes Fett 3           |                             | ANOVA<br>Signifikanter<br>Einfluss von<br><br>( $P < 0.05$ ) |
|--|-------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
|  |                   | unbehandelt                 |                              | 50°C, 38 d                  |                             | 105°C, 81 h                 |                             | 190°C, 24 h                 |                             |  |
| Vitamin E                                      | [mg TÄ/kg]        | 25                          | 250                          | 25                          | 250                         | 25                          | 250                         | 25                          | 250                         |  |
| Lebendmassezunahme<br>Gesamt [g]               |                   | 285 <sup>a</sup><br>± 15    | 276 <sup>a</sup><br>± 23     | 261 <sup>b</sup><br>± 14    | 271 <sup>ab</sup><br>± 16   | 275 <sup>ab</sup><br>± 15   | 283 <sup>a</sup><br>± 12    | 261 <sup>b</sup><br>± 15    | 273 <sup>a</sup><br>± 12    | Fett, Vit.E  |
| Relatives Lebergewicht<br>[g/100 g LM]         |                   | 3,19<br>± 0,13              | 3,34<br>± 0,23               | 3,33<br>± 0,12              | 3,31<br>± 0,17              | 3,43<br>± 0,23              | 3,36<br>± 0,18              | 3,32<br>± 0,21              | 3,29<br>± 0,26              | -  |
| $\alpha$ -Tocopherolkonzentration <sup>1</sup> |                   |                             |                              |                             |                             |                             |                             |                             |                             |  |
| Serum <sup>2</sup>                             | [ $\mu$ mol/mmol] | 0,67 <sup>c</sup><br>± 0,23 | 2,61 <sup>ab</sup><br>± 0,76 | 0,66 <sup>c</sup><br>± 0,19 | 2,14 <sup>b</sup><br>± 0,78 | 0,59 <sup>c</sup><br>± 0,18 | 3,03 <sup>a</sup><br>± 0,96 | 0,76 <sup>c</sup><br>± 0,25 | 2,82 <sup>a</sup><br>± 1,17 | Fett, Vit.E  |
| Leber  | [nmol/g]          | 26,1 <sup>c</sup><br>± 4,5  | 160 <sup>a</sup><br>± 22     | 20,1 <sup>d</sup><br>± 5,0  | 90,0 <sup>b</sup><br>± 23,6 | 18,6 <sup>de</sup><br>± 4,3 | 88,9 <sup>b</sup><br>± 11,0 | 16,1 <sup>e</sup><br>± 2,2  | 94,2 <sup>b</sup><br>± 11,4 | Fett, Vit.E<br>Fett x Vit.E                                  |
| Abdominalfett                                  | [nmol/g]          | 38,5 <sup>b</sup><br>± 9,8  | 127 <sup>a</sup><br>± 27     | 28,2 <sup>c</sup><br>± 8,6  | 106 <sup>a</sup><br>± 19    | 26,8 <sup>c</sup><br>± 5,9  | 121 <sup>a</sup><br>± 36    | 26,0 <sup>c</sup><br>± 5,7  | 135 <sup>a</sup><br>± 42    | Fett, Vit.E  |
| Scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E        |                   |                             |                              |                             |                             |                             |                             |                             |                             |  |
| Woche 4  | [%]               | 98,4 <sup>a</sup><br>± 0,7  | 98,3 <sup>a</sup><br>± 1,0   | 92,9 <sup>b</sup><br>± 2,0  | 85,2 <sup>d</sup><br>± 1,0  | 88,3 <sup>c</sup><br>± 1,7  | 82,6 <sup>e</sup><br>± 2,4  | 89,2 <sup>c</sup><br>± 2,4  | 84,3 <sup>de</sup><br>± 1,5 | Fett, Vit.E,<br>Fett x Vit.E                                 |
| Woche 9  | [%]               | 98,5 <sup>a</sup><br>± 1,0  | 96,5 <sup>a</sup><br>± 0,7   | 81,3 <sup>b</sup><br>± 3,1  | 78,1 <sup>b</sup><br>± 3,6  | 71,8 <sup>c</sup><br>± 1,4  | 71,4 <sup>c</sup><br>± 3,8  | 71,7 <sup>c</sup><br>± 6,7  | 74,3 <sup>c</sup><br>± 4,4  | Fett   |

Werte - Mittelwert  $\pm$  SD, n = 10; <sup>a,b,c</sup> - Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Reihe unterscheiden sich signifikant ( $P < 0,05$ )

TÄ -  $\alpha$ -Tocopheroläquivalente; LM – Lebendmasse; <sup>1</sup> - multipler Mittelwertvergleich und Varianzanalyse erfolgten mit logarithmisch transformierten Werten;

<sup>2</sup> - bezogen auf die Gesamtkonzentration an Triglyceriden und Cholesterin

### **3.4 Triglyceridkonzentrationen und Enzyme des Lipidstoffwechsels**

#### **3.4.1 Triglyceridkonzentration in Serum, Lipoproteinen und Leber**

Die Triglyceridkonzentrationen in Serum, Lipoproteinen und Leber sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Die Triglyceridkonzentration im Serum, in den VLDL und in der Leber wurde signifikant durch das Diätfett, nicht aber durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst: Die Triglyceridkonzentration in Serum und VLDL war bei Tieren mit oxidierten Diätfetten unabhängig vom Oxidationsgrad des Fettes durchschnittlich um 60% geringer und in der Leber um 30% geringer als bei Tieren mit frischem Fett.

Die Triglyceridkonzentration in den HDL wurde signifikant durch die Vitamin E-Konzentration, nicht aber durch das Diätfett beeinflusst: Tiere mit hoher Vitamin E-Aufnahme wiesen im Mittel eine um 24% geringere Triglyceridkonzentration in den HDL auf als Tiere mit niedriger Vitamin E-Aufnahme.

Die Triglyceridkonzentration in den LDL wurde signifikant durch das Diätfett in Interaktion mit der Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst: Im Vergleich zu frischem Fett führten oxidierte Fette unabhängig vom Oxidationsgrad bei Tieren mit niedriger Vitamin E-Aufnahme zu einer um 70% niedrigeren Triglyceridkonzentration in den LDL, während bei Tieren mit hoher Vitamin E-Aufnahme keine Konzentrationsunterschiede gefunden wurden.

Tabelle 5: Konzentration an Triglyceriden in Serum, Lipoproteinen und Leber

| Fettbehandlung       |          | Frisches Fett                 |                               | Oxidiertes Fett 1             |                               | Oxidiertes Fett 2             |                               | Oxidiertes Fett 3              |                               | ANOVA<br>Signifikanter<br>Einfluss von<br>(P < 0,05) |
|----------------------|----------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--|
|                      |          | unbehandelt                   |                               | 50°C, 38 d                    |                               | 105°C, 81 h                   |                               | 190°C, 24 h                    |                               |  |
| Vitamin E [mg TÄ/kg] |          | 25                            | 250                           | 25                            | 250                           | 25                            | 250                           | 25                             | 250                           |  |
| Serum                | [mmol/l] | 2,23 <sup>a</sup><br>± 1,08   | 1,67 <sup>b</sup><br>± 0,56   | 0,83 <sup>c</sup><br>± 0,14   | 0,64 <sup>c</sup><br>± 0,14   | 0,96 <sup>c</sup><br>± 0,29   | 0,81 <sup>c</sup><br>± 0,14   | 0,63 <sup>c</sup><br>± 0,03    | 0,91 <sup>c</sup><br>± 0,37   | Fett   |
| VLDL                 | [mmol/l] | 1,82 <sup>a</sup><br>± 0,93   | 1,44 <sup>a</sup><br>± 0,42   | 0,68 <sup>b</sup><br>± 0,11   | 0,50 <sup>b</sup><br>± 0,11   | 0,80 <sup>b</sup><br>± 0,23   | 0,67 <sup>b</sup><br>± 0,16   | 0,48 <sup>b</sup><br>± 0,05    | 0,74 <sup>b</sup><br>± 0,29   | Fett   |
| HDL                  | [mmol/l] | 0,087 <sup>a</sup><br>± 0,026 | 0,055 <sup>c</sup><br>± 0,009 | 0,071 <sup>b</sup><br>± 0,017 | 0,057 <sup>c</sup><br>± 0,005 | 0,071 <sup>b</sup><br>± 0,016 | 0,055 <sup>c</sup><br>± 0,014 | 0,062 <sup>bc</sup><br>± 0,012 | 0,053 <sup>c</sup><br>± 0,007 | Vit.E  |
| LDL <sup>1</sup>     | [mmol/l] | 0,32 <sup>a</sup><br>± 0,19   | 0,11 <sup>b</sup><br>± 0,02   | 0,090 <sup>b</sup><br>± 0,048 | 0,066 <sup>b</sup><br>± 0,019 | 0,092 <sup>b</sup><br>± 0,059 | 0,11 <sup>b</sup><br>± 0,04   | 0,091 <sup>b</sup><br>± 0,032  | 0,14 <sup>b</sup><br>± 0,12   | Fett,<br>Fett x Vit.E                                |
| Leber                | [µmol/g] | 10,1 <sup>a</sup><br>± 3,1    | 9,31 <sup>b</sup><br>± 3,28   | 5,98 <sup>c</sup><br>± 1,16   | 6,76 <sup>c</sup><br>± 1,94   | 7,68 <sup>bc</sup><br>± 1,41  | 6,45 <sup>c</sup><br>± 1,09   | 6,88 <sup>c</sup><br>± 1,87    | 6,69 <sup>c</sup><br>± 1,28   | Fett   |

Werte - Mittelwert ± SD, n = 10; <sup>a,b,c</sup> - Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Reihe unterscheiden sich signifikant (P < 0,05)

TÄ - α-Tocopheroläquivalente; VLDL - Lipoproteine sehr geringer Dichte; HDL - Lipoproteine hoher Dichte; LDL - Lipoproteine geringer Dichte

<sup>1</sup> - Errechnete Werte (LDL = Serum - VLDL - HDL)

### 3.4.2 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Fettsäure-Synthase

Die relativen mRNA-Konzentrationen und Aktivitäten der G6PDH und FSS sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Sowohl die relative mRNA-Konzentration als auch die Aktivität der Enzyme wurden durch das Diätfett unabhängig von der Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst.

Die Unterschiede in den relativen mRNA-Konzentrationen und den Aktivitäten von G6PDH waren zwischen Tieren mit frischem Diätfett und Tieren mit oxidiertem Diätfett nur teilweise signifikant. Werden die Werte beider Vitamin E-Gruppen eines Diätfettes zusammengefasst, so ergeben sich mRNA-Konzentrationen an [% von GAPDH]: FF  $121^a \pm 24$ ; OF50°C  $92^b \pm 24$ ; OF105°C  $104^{ab} \pm 26$ ; OF190°C  $93^b \pm 32$  und Aktivitäten von [U / g Protein]: FF  $66^a \pm 12$ ; OF50°C  $45^b \pm 12$ ; OF105°C  $51^b \pm 12$ ; OF190°C  $68^a \pm 17$  (Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant). Die zusammengefassten Werte beider Vitamin E-Gruppen eines Diätfettes zeigten, dass die relativen mRNA-Konzentrationen bei Tieren mit OF50°C und OF190°C jeweils um 23% geringer waren als bei Tieren mit frischem Fett. Die mRNA-Konzentrationen bei Tieren mit OF105°C waren im Vergleich zu Tieren mit frischem Diätfett ebenfalls geringer (-14%), der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die Aktivität von G6PDH war bei zusammengefassten Werten beider Vitamin E-Gruppen eines Diätfettes bei Tieren mit OF50°C und OF105°C in der Diät um jeweils 28% geringer als bei Tieren mit frischem Fett, während sich die Tiere mit OF190°C nicht signifikant von Tieren mit frischem Diätfett unterschieden.

Die relative mRNA-Konzentration der FSS war bei allen Tieren mit oxidierten Diätfetten im Mittel um 40% niedriger als bei Tieren mit frischem Fett. Die Aktivität der FSS war im Vergleich zum frischen Fett bei Tieren mit OF50°C um 40% geringer und bei Tieren mit OF105°C und OF190°C um jeweils 24% geringer.

### 3.4.3 mRNA-Konzentration der Acyl-CoA-Oxidase

Die mRNA-Konzentration der ACO ist in Tabelle 6 (siehe oben) aufgeführt. Die mRNA-Konzentration der ACO wurde ausschließlich vom Diätfett beeinflusst: Tiere, die mit oxidierten Fetten gefüttert wurden, hatten unabhängig vom Oxidationsgrad eine um 68% höhere mRNA-Konzentration an ACO als Tiere, die frisches Fett erhielten.

Tabelle 6: Relative mRNA-Konzentration und Enzymaktivität von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Fettsäure-Synthase sowie die relative mRNA-Konzentration an Acyl-CoA-Oxidase

| Fettbehandlung                             | Frisches Fett               |                             | Oxidiertes Fett 1            |                             | Oxidiertes Fett 2            |                             | Oxidiertes Fett 3            |                              | ANOVA<br>Signifikanter<br>Einfluss von<br>( $P < 0.05$ ) |
|--|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|--|
|  | unbehandelt                 |                             | 50°C, 38 d                   |                             | 105°C, 81 h                  |                             | 190°C, 24 h                  |                              |  |
| Vitamin E [mg TÄ/kg]                       | 25                          | 250                         | 25                           | 250                         | 25                           | 250                         | 25                           | 250                          |  |
| <b>G6PDH</b>                               |                             |                             |                              |                             |                              |                             |                              |                              |  |
| mRNA-Konzentration<br>[% von GAPDH]        | 118 <sup>ab</sup><br>± 16,6 | 128 <sup>a</sup><br>± 12,0  | 102 <sup>ab</sup><br>± 11,4  | 79,7 <sup>b</sup><br>± 14,0 | 97,1 <sup>b</sup><br>± 29,8  | 110 <sup>ab</sup><br>± 22,1 | 86,8 <sup>b</sup><br>± 37,4  | 98,5 <sup>b</sup><br>± 28,8  | <i>Fett</i>  |
| Enzymaktivität<br>[U / g Protein]          | 76,9 <sup>a</sup><br>± 5,3  | 60,5 <sup>b</sup><br>± 10,4 | 52,6 <sup>bc</sup><br>± 11,6 | 42,1 <sup>c</sup><br>± 8,9  | 53,9 <sup>bc</sup><br>± 10,3 | 48,3 <sup>c</sup><br>± 13,5 | 67,3 <sup>ab</sup><br>± 18,9 | 69,6 <sup>ab</sup><br>± 15,4 | <i>Fett</i>  |
| <b>FSS</b>                                 |                             |                             |                              |                             |                              |                             |                              |                              |  |
| mRNA-Konzentration<br>[% von GAPDH]        | 162 <sup>a</sup><br>± 24    | 157 <sup>a</sup><br>± 17    | 97 <sup>b</sup><br>± 40      | 107 <sup>b</sup><br>± 38    | 94 <sup>b</sup><br>± 31      | 94 <sup>b</sup><br>± 37     | 98 <sup>b</sup><br>± 29      | 92 <sup>b</sup><br>± 18      | <i>Fett</i>  |
| Enzymaktivität<br>[U / g Protein]          | 6,65 <sup>a</sup><br>± 0,81 | 6,23 <sup>a</sup><br>± 0,65 | 4,38 <sup>bc</sup><br>± 1,39 | 3,63 <sup>c</sup><br>± 0,88 | 4,86 <sup>b</sup><br>± 1,76  | 4,91 <sup>b</sup><br>± 1,04 | 5,06 <sup>b</sup><br>± 1,48  | 4,71 <sup>b</sup><br>± 1,35  | <i>Fett</i>  |
| <b>ACO<sup>1</sup></b>                     |                             |                             |                              |                             |                              |                             |                              |                              |  |
| mRNA-Konzentration<br>Kopien [% von GAPDH] | 2,25 <sup>b</sup><br>± 0,84 | 2,79 <sup>b</sup><br>± 0,98 | 4,55 <sup>a</sup><br>± 1,99  | 4,17 <sup>a</sup><br>± 1,80 | 4,16 <sup>a</sup><br>± 1,56  | 4,22 <sup>a</sup><br>± 1,35 | 4,16 <sup>a</sup><br>± 0,96  | 3,01 <sup>ab</sup><br>± 1,45 | <i>Fett</i>  |

Werte - Mittelwert ± SD, n = 10; <sup>a,b,c</sup> - Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Reihe unterscheiden sich signifikant ( $P < 0,05$ )

TÄ -  $\alpha$ -Tocopheroläquivalente; G6PDH - Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase; FSS - Fettsäure-Synthase, ACO - Acyl-CoA-Oxidase; <sup>1</sup> - Ergebnisbeschreibung siehe Kap. 3.4.3

#### 3.4.4 Expressionsänderung von Genen der Fettsäureoxidation

Die Auswertung der mittels cDNA-Array gewonnenen Daten erfolgte unter Berücksichtigung der im Kapitel 4.7 diskutierten Aspekte.

Die Gene der mitochondrialen, peroxisomalen und mikrosomalen Fettsäureoxidation sind mit dem Faktor und der Differenz der Änderung ihres Expressionssignals der drei Behandlungsgruppen (vgl. 2.4.6) in Tabelle 7 aufgeführt. Die Genexpression aller aufgeführten Enzyme war bei Tieren, die mit OF50°C [25 mg TÄ/kg Diät] gefüttert wurden, mindestens um den Faktor 1,4 höher als bei Tieren der Kontrollgruppe FF [25 mg TÄ/kg Diät].

Zusätzlich zur Auswertung der Daten anhand des Faktors der Expressionsänderung von Behandlungs- und Kontrollgruppe wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt, um den Einfluss der Behandlungsfaktoren statistisch abzusichern (siehe 4.7):

Die Genexpression der mitochondrialen mittelkettigen und langkettigen Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD, LCAD), der peroxisomalen ACO und des mikrosomalen CYP4A1 wurde signifikant durch das Diätfett und nicht durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst und war nach Verfütterung von oxidiertem Fett höher als nach Verfütterung von frischem Fett.

Die Genexpression der peroxisomalen 3-Ketoacyl-CoA Thiolase (Thiolase) und des mikrosomalen CYP4F14 wurde signifikant durch das Diätfett in Interaktion mit der Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst und war im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe FF [25 mg TÄ/kg Diät] bei Tieren mit oxidiertem Diätfett und niedriger Vitamin E-Aufnahme im Mittel um den Faktor 5,2 bzw. 3,9 höher, während sie bei Tieren mit oxidiertem Diätfett und hoher Vitamin E-Aufnahme im Mittel um den Faktor 3,2 bzw. 2,2 höher war.

5 der in Tabelle 7 aufgeführten Gene der Fettsäureoxidation zählen zu den Zielgenen des PPAR $\alpha$  (siehe 4.4.4): Die Expression von MCAD, ACO und CYP4A1 wurde signifikant durch das Diätfett beeinflusst (vgl. oben) und die Expression der Thiolase wurde durch das Diätfett in Interaktion mit der Vitamin E-Konzentration beeinflusst (vgl. oben). Die Expression des PPAR $\alpha$ -Zielgens CYP4A3 war nach Verfütterung von OF50°C [25 mg TÄ/kg Diät] um den Faktor 1,4 höher als nach Verfütterung von frischem Fett [25 mg TÄ/kg Diät], ein signifikanter Einfluss vom Diätfett oder der Vitamin E-Konzentration der Diät wurde aber nicht festgestellt.

Tabelle 7: Änderungen der Expression lipolytischer Gene im Verhältnis zur Kontrollgruppe FF [25 mg TÄ/kg]

| Enzym  | EMBL ID          | Frisches Fett <sup>I</sup>          |                                 | Oxidiertes Fett (OF50°C) <sup>I</sup> |                             | ANOVA <sup>II</sup><br>Signifikanter Einfluss von<br>(P < 0,05) |
|--|------------------|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|---|
|  |                  | 250 mg TÄ/kg                        | 25 mg TÄ/kg                     | 250 mg TÄ/kg                          | 25 mg TÄ/kg                 |   |
| <i>Mitochondriale <math>\beta</math>-Oxidation von Fettsäuren</i>                          |                  |                                     |                                 |                                       |                             |   |
| Mittelkettige Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) *  | J02791           | F + <b>1,0</b> ± 0,3<br>D 1,0 ± 0,0 | + <b>1,6</b> ± 0,3<br>3,0 ± 1,4 | + <b>2,0</b> ± 0,3<br>5,0 ± 1,4       | Fett                        |   |
| Langkettige Acyl-CoA Dehydrogenase (LCAD)  | J05029           | F + <b>1,2</b> ± 0,2<br>D 0,5 ± 0,7 | + <b>2,3</b> ± 0,9<br>4,0 ± 2,8 | + <b>1,8</b> ± 0,2<br>2,5 ± 0,7       | Fett                        |   |
| <i>Peroxisomale <math>\beta</math>-Oxidation von Fettsäuren</i>                            |                  |                                     |                                 |                                       |                             |   |
| Acyl-CoA-Oxidase (ACO) *   | J02752           | F + <b>2,3</b> ± 1,1<br>D 2,5 ± 2,1 | + <b>3,5</b> ± 0,0<br>5,0 ± 0,0 | + <b>3,0</b> ± 0,7<br>4,0 ± 1,4       | Fett                        |   |
| 3-Ketoacyl-CoA Thiolase (Thiolase) *   | M32801<br>J02749 | F + <b>1,9</b> ± 0,6<br>D 9,0 ± 5,7 | + <b>5,1</b> ± 0,6<br>41 ± 5,7  | + <b>3,2</b> ± 0,8<br>22 ± 8,5        | Fett,<br>Fett *Vit.E        |   |
| <i>Mikrosomale <math>\omega</math>- und <math>\omega</math>-1-Oxidation von Fettsäuren</i> |                  |                                     |                                 |                                       |                             |   |
| Cytochrom P-450 4A1 (CYP4A1) *   | X07259           | F + <b>6,5</b> ± 2,1<br>D 5,5 ± 2,1 | + <b>14</b> ± 0,7<br>13 ± 0,7   | + <b>15</b> ± 4,9<br>14 ± 4,9         | Fett                        |   |
| Cytochrom P450 4A3 (CYP4A3) *  | M33936           | F - <b>1,4</b> ± 0,3<br>D 29 ± 34   | + <b>1,4</b> ± 0,5<br>44 ± 50   | + <b>1,1</b> ± 0,4<br>30 ± 15         | -                           |   |
| Cytochrom P-450 4F5 (CYP4F5)   | U39207           | F + <b>2,0</b> ± 0,5<br>D 3,0 ± 1,4 | + <b>1,7</b> ± 0,5<br>2,0 ± 1,4 | + <b>1,5</b> ± 0,2<br>1,5 ± 0,7       | -                           |   |
| Cytochrom P-450 4F6 (CYP4F6)   | U39208           | F + <b>2,3</b> ± 0,4<br>D 2,5 ± 0,7 | + <b>1,4</b> ± 0,4<br>0,5 ± 0,7 | + <b>1,8</b> ± 0,4<br>1,5 ± 0,7       | -                           |   |
| Cytochrom P-450 4F14 (CYP4F14)   | U17697<br>D87997 | F + <b>1,1</b> ± 0,1<br>D 0,1 ± 0,1 | + <b>3,9</b> ± 0,8<br>2,6 ± 0,7 | + <b>2,2</b> ± 0,0<br>1,1 ± 0,0       | Fett, Vit.E,<br>Fett *Vit.E |   |

<sup>I</sup> - Werte - Mittelwert der Expressionssignale der Arrays Behandlungsgruppe (n = 3) im Verhältnis zum Kontroll-Array (frisches Fett, 25 mg TÄ/ kg Diät) ± SD; Bedingungen: F ≥ 1,4 und D ≥ 2 bei mindestens 2 von 3 Arrays pro Gruppe und mindestens bei einer der drei Behandlungsgruppen pro Gen; <sup>II</sup> - Expressionssignal der Kontrollgruppe = 1; F- Faktor der Expressionsänderung zum Kontroll-Array: Gen war um den Faktor „+“ - höher bzw. „-“ - geringer exprimiert; D - Differenz der Expressionssignale; TÄ -  $\alpha$ -Tocopheroläquivalent, EMBL ID- Identifikationsnummer des Europäischen molekularbiologischen Labors; \* PPAR $\alpha$ -Zielgene, siehe Kap. 4.4.4

### **3.5 Cholesterinkonzentration in Serum, Lipoproteinen, Leber und Kot**

Die Cholesterinkonzentrationen in Serum, Lipoproteinen, Leber und Kot sowie das Verhältnis Serum zu HDL sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Die Cholesterinkonzentration im Serum wurde durch die Vitamin E-Konzentration, nicht aber durch das Diätfett beeinflusst: Bei hoher Vitamin E-Aufnahme war die Cholesterinkonzentration im Serum höher als bei niedriger Vitamin E-Aufnahme, wobei die Unterschiede zwischen den Gruppen jedoch nicht signifikant waren.

Die Cholesterinkonzentration in der Leber, im Kot und in den HDL wurde durch das Diätfett, nicht aber durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst. Die Cholesterinkonzentration in der Leber und im Kot war bei Tieren mit oxidierten Diätfetten unabhängig vom Oxidationsgrad um etwa 25% geringer als bei Tieren mit frischem Fett.

In den HDL hatten Tiere mit oxidiertem Fett eine um 21% höhere Cholesterinkonzentration als Tiere mit frischem Diätfett.

Die Cholesterinkonzentration in den VLDL wurde signifikant durch das Diätfett in Interaktion mit der Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst. Der Einfluss war unabhängig vom Oxidationsgrad des oxidierten Fetts: Mit oxidiertem Fett gefütterte Tiere hatten um 80% weniger Cholesterin in den VLDL als Tiere mit frischem Fett. Bei frischem Diätfett hatten die Tiere hoher Vitamin E-Aufnahme signifikant weniger Cholesterin in den VLDL als Tiere mit niedriger Vitamin E-Aufnahme, während die Cholesterinkonzentration bei oxidiertem Diätfett unabhängig von der Vitamin E-Aufnahme war.

Die Cholesterinkonzentration in den LDL wurde sowohl durch das Diätfett als auch durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst: Bei Tieren mit hoher Vitamin E-Aufnahme führte die Fütterung mit OF105°C und OF190°C zu einer um jeweils 21% höheren Cholesterinkonzentration in den LDL als bei der Verfütterung von frischem Fett. Weitere signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen ließen sich nicht feststellen.

Tabelle 8: Konzentration an Cholesterin in Serum, Lipoproteinen, Leber und Kot

| Fettbehandlung       |          | Frisches Fett               |                              | Oxidiertes Fett 1           |                             | Oxidiertes Fett 2            |                              | Oxidiertes Fett 3           |                              | ANOVA<br>Signifikanter<br>Einfluss von<br><br>( <i>P</i> < 0.05) |
|----------------------|----------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--|
|                      |          | unbehandelt                 |                              | 50°C, 38 d                  |                             | 105°C, 81 h                  |                              | 190°C, 24 h                 |                              |  |
| Vitamin E [mg TÄ/kg] |          | 25                          | 250                          | 25                          | 250                         | 25                           | 250                          | 25                          | 250                          |  |
| Serum                | [mmol/l] | 1,72 <sup>b</sup><br>± 0,29 | 1,86 <sup>ab</sup><br>± 0,39 | 1,56 <sup>b</sup><br>± 0,25 | 1,66 <sup>b</sup><br>± 0,09 | 1,74 <sup>ab</sup><br>± 0,14 | 1,98 <sup>a</sup><br>± 0,27  | 1,71 <sup>b</sup><br>± 0,36 | 1,84 <sup>ab</sup><br>± 0,13 | Vit.E  |
| VLDL                 | [mmol/l] | 0,35 <sup>a</sup><br>± 0,22 | 0,20 <sup>b</sup><br>± 0,10  | 0,08 <sup>c</sup><br>± 0,01 | 0,06 <sup>c</sup><br>± 0,01 | 0,08 <sup>bc</sup><br>± 0,02 | 0,08 <sup>bc</sup><br>± 0,02 | 0,05 <sup>c</sup><br>± 0,02 | 0,08 <sup>bc</sup><br>± 0,04 | Fett, Vit.E,<br>Fett x Vit.E                                     |
| HDL                  | [mmol/l] | 0,74 <sup>b</sup><br>± 0,07 | 0,73 <sup>b</sup><br>± 0,08  | 0,85 <sup>a</sup><br>± 0,11 | 0,90 <sup>a</sup><br>± 0,10 | 0,89 <sup>a</sup><br>± 0,10  | 0,91 <sup>a</sup><br>± 0,09  | 0,90 <sup>a</sup><br>± 0,14 | 0,89 <sup>a</sup><br>± 0,03  | Fett   |
| LDL <sup>1</sup>     | [mmol/l] | 0,63 <sup>b</sup><br>± 0,14 | 0,70 <sup>b</sup><br>± 0,15  | 0,64 <sup>b</sup><br>± 0,17 | 0,72 <sup>b</sup><br>± 0,10 | 0,93 <sup>ab</sup><br>± 0,12 | 0,76 <sup>a</sup><br>± 0,21  | 0,71 <sup>b</sup><br>± 0,19 | 0,86 <sup>a</sup><br>± 0,10  | Fett, Vit.E  |
| Leber                | [µmol/g] | 6,47 <sup>a</sup><br>± 1,19 | 7,13 <sup>a</sup><br>± 1,01  | 4,62 <sup>c</sup><br>± 0,69 | 5,19 <sup>b</sup><br>± 0,57 | 5,40 <sup>b</sup><br>± 0,72  | 5,14 <sup>bc</sup><br>± 0,49 | 5,20 <sup>b</sup><br>± 0,87 | 5,49 <sup>b</sup><br>± 0,67  | Fett   |
| Kot, Woche 4         | [µmol/g] | 6,01 <sup>b</sup><br>± 1,22 | 6,13 <sup>b</sup><br>± 0,72  | 7,96 <sup>a</sup><br>± 1,33 | 7,47 <sup>a</sup><br>± 0,50 | 8,07 <sup>a</sup><br>± 0,57  | 7,61 <sup>a</sup><br>± 0,31  | 7,57 <sup>a</sup><br>± 1,14 | 8,08 <sup>a</sup><br>± 0,88  | Fett   |
| Kot, Woche 9         | [µmol/g] | 7,69 <sup>b</sup><br>± 0,81 | 7,49 <sup>b</sup><br>± 1,60  | 11,1 <sup>a</sup><br>± 2,1  | 9,67 <sup>a</sup><br>± 1,28 | 10,1 <sup>a</sup><br>± 0,7   | 7,25 <sup>b</sup><br>± 0,52  | 10,1 <sup>a</sup><br>± 2,5  | 9,25 <sup>ab</sup><br>± 0,62 | Fett   |

Werte - Mittelwert ± SD, n = 10; <sup>a,b,c</sup> - Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Reihe unterscheiden sich signifikant (*P* < 0,05)

TÄ - α-Tocopheroläquivalente; <sup>1</sup> - Errechnete Werte (LDL = Serum - VLDL - HDL)

### **3.6 Leberlipide und Lipidsynthese**

#### **3.6.1 Konzentration der Lipidfraktionen**

Die Konzentrationen der Gesamtlipid- und Phospholipidfraktionen in der Leber sowie das Verhältnis zwischen Gesamt-Phospholipiden und Cholesterin in der Leber sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Die Konzentrationen an Gesamtlipiden, Phosphatidylethanolamin und Cardiolipin wurden signifikant durch das Diätfett, nicht aber durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst. Die Verfütterung von oxidierten Fetten hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentrationen an Gesamt-Phospholipiden, Phosphatidylcholin, Phosphatidylinositol, Spingomyelin und Phosphatidylserin.

Tiere, denen oxidierte Fette verfüttert wurden, hatten unabhängig vom Oxidationsgrad des Fettes eine um 40% geringere Konzentration an Gesamtlipiden als Tiere, die frisches Fett erhielten. Tiere mit oxidierten Diätfetten hatten unabhängig vom Oxidationsgrad des Fettes um 15% höhere Konzentrationen an Phosphatidylethanolamin und an Cardiolipin als Tiere mit frischem Fett. Der Quotient aus der Konzentration an Gesamt-Phospholipiden und der Cholesterinkonzentration der Leber (3.5) wurde signifikant durch das Diätfett, nicht aber durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst und war bei Tieren mit oxidierten Diätfetten unabhängig vom Oxidationsgrad des Fettes 1,4mal höher als bei Tieren mit frischem Diätfett.

Die Anteile der einzelnen Phospholipidfraktionen an den Gesamt-Leberphospholipiden wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen auf (Daten nicht gezeigt).

#### **3.6.2 Fettsäurezusammensetzung der Gesamtlipide**

Die Fettsäurezusammensetzung der Gesamtlipide der Leber ist in Tabelle 10 aufgeführt. Die Konzentration an Gesamt-SFA wurde durch das Diätfett, nicht aber durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst und war bei Tieren mit oxidierten Diätfetten unabhängig vom Oxidationsgrad um 4% höher als bei Tieren mit frischem Diätfett. Unter den einzelnen SFA wurde die Konzentration an Myristinsäure (14:0) durch das Diätfett in Interaktion mit der Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren jedoch nur teilweise signifikant. Die Konzentrationen an Palmitinsäure (16:0) und Stearinsäure (18:0) wurden weder durch das Diätfett noch durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst.

Die Konzentration an Gesamt-MUFA und das Verhältnis zwischen Gesamt-MUFA und Gesamt-SFA wurde weder durch das Diätfett noch durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst. Unter den einzelnen MUFA wurden die Konzentrationen an Palmitoleinsäure (16:1n-7), Ölsäure (18:1n-9) und Gadoleinsäure (20:1n-9) durch das Diätfett beeinflusst, zeigten aber mit Ausnahme der Vaccensäure (18:1n-7) nur vereinzelt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Konzentration der Vaccensäure war bei Tieren mit oxidiertem Diätfett unabhängig vom Oxidationsgrad des Fettes um 36% geringer als bei Tieren mit frischem Diätfett.

Die Konzentration an Gesamt-PUFA, der Quotient aus Gesamt-PUFA und Gesamt-SFA, die Summen an Gesamt-n-6-PUFA und Gesamt-n-3-PUFA sowie der Quotient aus den Summen an Gesamt-n-6-PUFA und Gesamt-n-3-PUFA wurden durch das Diätfett, nicht aber durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst.

Die Konzentration an Gesamt-PUFA war bei Tieren mit oxidiertem Diätfett unabhängig vom Oxidationsgrad des Fettes um 13% geringer als bei Tieren mit frischem Diätfett. Der Quotient aus Gesamt-PUFA und Gesamt-SFA war bei den Tieren mit oxidiertem Fett um 14% kleiner als bei Tieren mit frischem Fett. Bei Tieren mit oxidiertem Diätfett war die Summe der Konzentrationen an n-3-PUFA um 33% geringer und die Summe der Konzentrationen an n-6-PUFA um 10% geringer im Vergleich zu Tieren mit frischem Diätfett. Der Quotient aus den Summen an n-6-PUFA und n-3-PUFA war bei Tieren mit oxidiertem Diätfett unabhängig vom Oxidationsgrad des Fettes 1,35mal größer als bei Tieren mit frischem Diätfett.

Unter den einzelnen PUFA wurden die Konzentrationen an Linolsäure (18:2n-6), Docosahexaensäure (22:6n-3) Docosatetraensäure (22:4n-6) signifikant durch das Diätfett beeinflusst und waren bei Tieren mit oxidierten Diätfetten um -18%, -50%, bzw. +77% verändert im Vergleich zu Tieren mit frischem Diätfett. Die Konzentrationen an Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure (20:3n-6) sowie Arachidonsäure (20:4n-6) wurden durch das Diätfett beeinflusst und die Konzentration an Eicosadiensäure (20:2n-6) wurde durch das Diätfett in Interaktion mit der Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren jedoch nur vereinzelt signifikant.

Die Konzentration an Docosapentaensäure (22:5n-3) wurde weder durch das Diätfett noch durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst.

Tabelle 9: Konzentration an Gesamtlipiden, Gesamt-Phospholipiden, einzelnen Phospholipidfraktionen und das Verhältnis der Konzentration an Gesamtphospholipiden zum Cholesterin der Leber

| Fettbehandlung  | Frisches Fett               |                             | Oxidiertes Fett 1           |                             | Oxidiertes Fett 2            |                              | Oxidiertes Fett 3            |                              | ANOVA<br>Signifikanter<br>Einfluss von<br><br>( <i>P</i> < 0.05) |     |
|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--|-----|
|   | unbehandelt                 |                             | 50°C, 38 d                  |                             | 105°C, 81 h                  |                              | 190°C, 24 h                  |                              |  |     |
| Vitamin E   | [mg TÄ/kg]                  |                             | 25                          | 250                         | 25                           | 250                          | 25                           | 250                          | 25   | 250 |
| Gesamtlipide  | 10,9 <sup>a</sup><br>± 4,8  | 10,2 <sup>a</sup><br>± 5,4  | 6,85 <sup>b</sup><br>± 3,23 | 6,96 <sup>b</sup><br>± 2,74 | 8,55 <sup>ab</sup><br>± 3,64 | 5,23 <sup>b</sup><br>± 1,38  | 5,25 <sup>b</sup><br>± 1,02  | 4,56 <sup>b</sup><br>± 1,48  | Fett   |     |
| Gesamt-Phospholipide                                    | 61,7<br>± 8,5               | 59,9<br>± 11,9              | 68,2<br>± 6,7               | 65,4<br>± 9,2               | 65,9<br>± 7,9                | 63,7<br>± 9,0                | 65,2<br>± 6,4                | 67,8<br>± 9,2                | -  |     |
| Phosphatidylcholin                                      | 29,5<br>± 5,2               | 28,6<br>± 7,9               | 32,5<br>± 3,3               | 30,1<br>± 5,0               | 31,4<br>± 4,7                | 29,1<br>± 6,0                | 30,6<br>± 4,0                | 32,1<br>± 5,9                | -  |     |
| Phosphatidyl<br>ethanolamin                             | 15,1 <sup>b</sup><br>± 1,7  | 14,9 <sup>b</sup><br>± 2,3  | 17,2 <sup>a</sup><br>± 2,2  | 17,5 <sup>a</sup><br>± 2,2  | 16,4 <sup>ab</sup><br>± 1,7  | 16,9 <sup>a</sup><br>± 1,4   | 16,9 <sup>a</sup><br>± 1,7   | 17,5 <sup>a</sup><br>± 1,8   | Fett   |     |
| Phosphatidylinositol                                    | 6,50<br>± 1,04              | 6,22<br>± 1,52              | 7,26<br>± 1,23              | 6,97<br>± 1,60              | 7,07<br>± 1,39               | 6,92<br>± 1,26               | 6,91<br>± 1,06               | 7,34<br>± 1,81               | -  |     |
| Phosphatidylserin                                       | 5,54<br>± 0,25              | 5,58<br>± 0,37              | 5,68<br>± 0,31              | 5,54<br>± 0,15              | 5,50<br>± 0,18               | 5,52<br>± 0,25               | 5,58<br>± 0,31               | 5,56<br>± 0,28               | -  |     |
| Cardiolipin   | 2,93 <sup>b</sup><br>± 0,51 | 2,76 <sup>a</sup><br>± 0,37 | 3,42 <sup>a</sup><br>± 0,28 | 3,34 <sup>a</sup><br>± 0,54 | 3,42 <sup>a</sup><br>± 0,88  | 3,18 <sup>ab</sup><br>± 0,51 | 3,14 <sup>ab</sup><br>± 0,31 | 3,23 <sup>ab</sup><br>± 0,44 | Fett   |     |
| Spingomyelin  | 2,21<br>± 0,25              | 1,98<br>± 0,63              | 2,01<br>± 0,25              | 2,06<br>± 0,33              | 2,33<br>± 0,86               | 2,08<br>± 0,34               | 2,13<br>± 0,26               | 3,31<br>± 0,60               | -  |     |
| <u>Phospholipide gesamt</u><br>Cholesterin <sup>1</sup> | 8,6 <sup>b</sup><br>± 1,8   | 9,7 <sup>b</sup><br>± 3,1   | 13,4 <sup>a</sup><br>± 2,1  | 10,9 <sup>ab</sup><br>± 1,2 | 12,1 <sup>a</sup><br>± 2,4   | 12,5 <sup>a</sup><br>± 2,6   | 12,2 <sup>a</sup><br>± 2,3   | 12,8 <sup>a</sup><br>± 2,8   | Fett   |     |

Werte - Mittelwert ± SD, n = 10; <sup>a,b,c</sup> - Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben in einer Reihe unterscheiden sich signifikant (*P* < 0,05);  
TÄ - α-Tocopheroläquivalente; <sup>1</sup> - Cholesterinkonzentration in der Leber siehe Tab. 8/ 3.5

Tabelle 10: Fettsäurezusammensetzung<sup>1</sup> der Gesamtlipide der Leber

| Fettbehandlung              | Frisches Fett               |                              | Oxidiertes Fett 1           |                              | Oxidiertes Fett 2            |                              | Oxidiertes Fett 3            |                              | ANOVA<br>Signifikanter<br>Einfluss von<br>( <i>P</i> < 0.05) |
|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--|
|                             | unbehandelt                 |                              | 50°C, 38 d                  |                              | 105°C, 81 h                  |                              | 190°C, 24 h                  |                              |  |
| Vitamin E [mg TÄ/kg]        | 25                          | 250                          | 25                          | 250                          | 25                           | 250                          | 25                           | 250                          |  |
|                             | [mol/100 mol Fettsäuren]    |                              |                             |                              |                              |                              |                              |                              |  |
| Gesamt-SFA                  | 30,9 <sup>c</sup><br>± 1,3  | 31,7 <sup>bc</sup><br>± 1,2  | 32,7 <sup>ab</sup><br>± 1,3 | 32,1 <sup>b</sup><br>± 1,4   | 32,3 <sup>b</sup><br>± 0,8   | 33,1 <sup>a</sup><br>± 1,1   | 33,2 <sup>a</sup><br>± 0,8   | 33,1 <sup>a</sup><br>± 0,4   | <i>Fett</i>  |
| 14:0<br>Myristinsäure       | 0,78 <sup>a</sup><br>± 0,10 | 0,58 <sup>bc</sup><br>± 0,08 | 0,62 <sup>b</sup><br>± 0,10 | 0,59 <sup>bc</sup><br>± 0,09 | 0,56 <sup>bc</sup><br>± 0,12 | 0,54 <sup>bc</sup><br>± 0,05 | 0,52 <sup>c</sup><br>± 0,09  | 0,47 <sup>c</sup><br>± 0,05  | <i>Fett, Vit.E,<br/>Fett x Vit.E</i>                         |
| 16:0<br>Palmitinsäure       | 25,2<br>± 1,8               | 26,7<br>± 0,8                | 26,1<br>± 1,9               | 26,2<br>± 1,3                | 26,0<br>± 1,8                | 26,5<br>± 1,8                | 25,9<br>± 1,9                | 26,6<br>± 1,6                | -  |
| 18:0<br>Stearinsäure        | 4,84<br>± 1,02              | 4,53<br>± 0,82               | 5,05<br>± 0,42              | 4,75<br>± 0,52               | 5,14<br>± 0,91               | 5,14<br>± 0,57               | 5,5<br>± 0,96                | 5,19<br>± 0,83               | -  |
| Gesamt-MUFA                 | 42,6<br>± 2,6               | 41,1<br>± 2,7                | 42,6<br>± 3,8               | 44,3<br>± 2,5                | 43,5<br>± 1,4                | 43,0<br>± 1,9                | 42,2<br>± 2,9                | 43,1<br>± 2,0                | -  |
| 16:1n-7<br>Palmitoleinsäure | 2,96 <sup>a</sup><br>± 0,67 | 2,27 <sup>b</sup><br>± 0,39  | 2,23 <sup>b</sup><br>± 0,56 | 1,94 <sup>b</sup><br>± 0,55  | 2,56 <sup>ab</sup><br>± 0,58 | 2,59 <sup>ab</sup><br>± 0,50 | 2,13 <sup>b</sup><br>± 0,37  | 2,43 <sup>ab</sup><br>± 0,37 | <i>Fett</i>  |
| 18:1n-9<br>Ölsäure          | 38,2 <sup>b</sup><br>± 3,4  | 36,9 <sup>b</sup><br>± 1,3   | 39,1 <sup>b</sup><br>± 3,9  | 43,7 <sup>a</sup><br>± 2,5   | 40,4 <sup>ab</sup><br>± 2,2  | 39,9 <sup>ab</sup><br>± 1,8  | 38,2 <sup>b</sup><br>± 2,3   | 39,3 <sup>ab</sup><br>± 2,6  | <i>Fett</i>  |
| 18:1n-7<br>Vaccensäure      | 0,23 <sup>a</sup><br>± 0,05 | 0,22 <sup>a</sup><br>± 0,02  | 0,16 <sup>b</sup><br>± 0,03 | 0,12 <sup>c</sup><br>± 0,01  | 0,17 <sup>b</sup><br>± 0,04  | 0,14 <sup>b</sup><br>± 0,03  | 0,15 <sup>bc</sup><br>± 0,03 | 0,14 <sup>bc</sup><br>± 0,04 | <i>Fett</i>  |
| 20:1n-9<br>Gadoleinsäure    | 0,45 <sup>a</sup><br>± 0,14 | 0,44 <sup>a</sup><br>± 0,28  | 0,43 <sup>a</sup><br>± 0,08 | 0,42 <sup>ab</sup><br>± 0,07 | 0,38 <sup>ab</sup><br>± 0,06 | 0,34 <sup>b</sup><br>± 0,04  | 0,38 <sup>ab</sup><br>± 0,08 | 0,33 <sup>b</sup><br>± 0,07  | <i>Fett</i>  |

Tabelle wird fortgesetzt

Fortsetzung Tabelle 10: Fettsäurezusammensetzung<sup>1</sup> der Gesamtlipide der Leber

| Fettbehandlung                   | Frisches Fett               |                             | Oxidiertes Fett 1            |                              | Oxidiertes Fett 2           |                              | Oxidiertes Fett 3           |                              | ANOVA<br>Signifikanter<br>Einfluss von<br><br>( <i>P</i> < 0.05) |
|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--|
|                                  | unbehandelt                 |                             | 50°C, 38 d                   |                              | 105°C, 81 h                 |                              | 190°C, 24 h                 |                              |  |
| Vitamin E [mg TÄ/kg]             | 25                          | 250                         | 25                           | 250                          | 25                          | 250                          | 25                          | 250                          |  |
|                                  | [mol/100 mol Fettsäuren]    |                             |                              |                              |                             |                              |                             |                              |  |
| Gesamt-PUFA                      | 27,6 <sup>a</sup><br>± 1,4  | 28,0 <sup>a</sup><br>± 1,4  | 24,2 <sup>b</sup><br>± 4,1   | 23,9 <sup>b</sup><br>± 3,3   | 24,4 <sup>b</sup><br>± 3,0  | 23,4 <sup>b</sup><br>± 1,5   | 25,2 <sup>ab</sup><br>± 3,0 | 23,6 <sup>b</sup><br>± 1,8   | Fett   |
| 18:2n-6<br>Linolsäure            | 18,4 <sup>a</sup><br>± 1,4  | 19,6 <sup>a</sup><br>± 2,3  | 14,3 <sup>c</sup><br>± 2,2   | 15,6 <sup>bc</sup><br>± 1,8  | 16,0 <sup>b</sup><br>± 1,6  | 14,7 <sup>c</sup><br>± 0,6   | 17,0 <sup>ab</sup><br>± 1,6 | 15,7 <sup>bc</sup><br>± 0,9  | Fett   |
| 20:2n-6<br>Eicosadiensäure       | 1,77 <sup>b</sup><br>± 1,40 | 0,61 <sup>c</sup><br>± 0,36 | 2,37 <sup>ab</sup><br>± 0,82 | 1,41 <sup>bc</sup><br>± 0,34 | 0,86 <sup>c</sup><br>± 0,17 | 1,09 <sup>c</sup><br>± 0,53  | 0,93 <sup>c</sup><br>± 0,47 | 1,01 <sup>c</sup><br>± 0,25  | Fett,<br>Fett x Vit.E  |
| 20:3n-6<br>Dihomo-γ-Linolensäure | 0,40 <sup>b</sup><br>± 0,05 | 0,45 <sup>b</sup><br>± 0,07 | 0,65 <sup>a</sup><br>± 0,14  | 0,58 <sup>a</sup><br>± 0,15  | 0,47 <sup>b</sup><br>± 0,09 | 0,47 <sup>b</sup><br>± 0,06  | 0,47 <sup>b</sup><br>± 0,12 | 0,46 <sup>b</sup><br>± 0,15  | Fett   |
| 20:4n-6<br>Arachidonsäure        | 4,99 <sup>b</sup><br>± 1,05 | 5,55 <sup>b</sup><br>± 1,78 | 5,08 <sup>b</sup><br>± 1,25  | 4,70 <sup>b</sup><br>± 0,94  | 4,68 <sup>b</sup><br>± 1,01 | 5,93 <sup>ab</sup><br>± 0,87 | 6,39 <sup>a</sup><br>± 1,60 | 5,98 <sup>ab</sup><br>± 1,33 | Fett   |
| 22:4n-6<br>Docosatetraensäure    | 0,27 <sup>b</sup><br>± 0,06 | 0,37 <sup>b</sup><br>± 0,12 | 0,61 <sup>a</sup><br>± 0,12  | 0,58 <sup>a</sup><br>± 0,14  | 0,59 <sup>a</sup><br>± 0,25 | 0,61 <sup>a</sup><br>± 0,13  | 0,57 <sup>a</sup><br>± 0,16 | 0,41 <sup>b</sup><br>± 0,11  | Fett   |
| 22:5n-3<br>Docosapentaensäure    | 0,17<br>± 0,10              | 0,13<br>± 0,03              | 0,20<br>± 0,08               | 0,17<br>± 0,03               | 0,15<br>± 0,08              | 0,18<br>± 0,07               | 0,21<br>± 0,03              | 0,21<br>± 0,07               | -  |
| 22:6n-3<br>Docosahexaensäure     | 0,58 <sup>a</sup><br>± 0,16 | 0,63 <sup>a</sup><br>± 0,16 | 0,33 <sup>b</sup><br>± 0,07  | 0,26 <sup>b</sup><br>± 0,06  | 0,30 <sup>b</sup><br>± 0,12 | 0,34 <sup>b</sup><br>± 0,09  | 0,34 <sup>b</sup><br>± 0,11 | 0,31 <sup>b</sup><br>± 0,08  | Fett   |

Tabelle wird fortgesetzt

Fortsetzung Tabelle 10: Fettsäurezusammensetzung<sup>1</sup> der Gesamtlipide der Leber

| Fettbehandlung       | Frisches Fett               |                             | Oxidiertes Fett 1           |                             | Oxidiertes Fett 2           |                             | Oxidiertes Fett 3           |                             | ANOVA<br>Signifikanter<br>Einfluss von<br><br>( <i>P</i> < 0,05) |
|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
|                      | unbehandelt                 |                             | 50°C, 38 d                  |                             | 105°C, 81 h                 |                             | 190°C, 24 h                 |                             |  |
| Vitamin E [mg TÄ/kg] | 25                          | 250                         | 25                          | 250                         | 25                          | 250                         | 25                          | 250                         |  |
|                      | [mol/100 mol Fettsäuren]    |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                             |  |
| Gesamt-n-6-PUFA      | 26,1 <sup>ab</sup><br>± 1,7 | 27,2 <sup>a</sup><br>± 1,4  | 24,2 <sup>b</sup><br>± 2,5  | 23,4 <sup>b</sup><br>± 3,2  | 23,8 <sup>b</sup><br>± 2,9  | 23,5 <sup>b</sup><br>± 2,2  | 25,2 <sup>ab</sup><br>± 2,2 | 24,3 <sup>b</sup><br>± 2,1  | Fett   |
| Gesamt-n-3-PUFA      | 0,76 <sup>a</sup><br>± 0,13 | 0,77 <sup>a</sup><br>± 0,16 | 0,52 <sup>b</sup><br>± 0,11 | 0,50 <sup>b</sup><br>± 0,15 | 0,44 <sup>b</sup><br>± 0,13 | 0,54 <sup>b</sup><br>± 0,13 | 0,59 <sup>b</sup><br>± 0,12 | 0,47 <sup>b</sup><br>± 0,08 | Fett   |
|                      | [mol/mol]                   |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                             |  |
| n-6-PUFA / n-3-PUFA  | 34,2 <sup>c</sup><br>± 5,2  | 33,9 <sup>c</sup><br>± 5,4  | 42,1 <sup>b</sup><br>± 8,1  | 46,4 <sup>ab</sup><br>± 5,6 | 52,7 <sup>a</sup><br>± 9,4  | 45,0 <sup>b</sup><br>± 4,6  | 45,0 <sup>b</sup><br>± 7,2  | 45,8 <sup>ab</sup><br>± 9,6 | Fett   |
| MUFA / SFA           | 1,38<br>± 0,13              | 1,31<br>± 0,15              | 1,31<br>± 0,11              | 1,34<br>± 0,17              | 1,34<br>± 0,07              | 1,28<br>± 0,10              | 1,28<br>± 0,17              | 1,30<br>± 0,09              | -  |
| PUFA / SFA           | 0,89 <sup>a</sup><br>± 0,05 | 0,90 <sup>a</sup><br>± 0,08 | 0,76 <sup>b</sup><br>± 0,15 | 0,78 <sup>b</sup><br>± 0,14 | 0,76 <sup>b</sup><br>± 0,11 | 0,78 <sup>b</sup><br>± 0,14 | 0,78 <sup>b</sup><br>± 0,11 | 0,76 <sup>b</sup><br>± 0,11 | Fett   |

Werte - Mittelwert ± SD, n = 10; <sup>a,b,c</sup> - Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Reihe unterscheiden sich signifikant (*P* < 0,05)

<sup>1</sup> Fettsäuren < 0,001 g / 100 g; TÄ - α-Tocopheroläquivalente; SFA - Gesättigte Fettsäuren; MUFA - Einfach ungesättigte Fettsäuren; PUFA - Mehrfach ungesättigte Fettsäuren

### 3.6.3 Fettsäurezusammensetzung des Phosphatidylcholins

Die Fettsäurezusammensetzung des Phosphatidylcholins der Leber ist in Tabelle 11 aufgeführt.

Die Konzentrationen der Fettsäuren von Phosphatidylcholin wurden durch das Diätfett und nicht durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst. Der Einfluss von OF50°C war dabei zumeist stärker als der Einfluss von OF105°C und OF190°C. Eine Ausnahme bildete die Konzentration an Palmitoleinsäure (16:1n-7), die weder durch das Diätfett noch durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst wurde.

Die Verfütterung oxidierter Fette führte zu signifikanten Unterschieden bei den Konzentrationen einzelner SFA, während die Konzentration an Gesamt-SFA keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen aufwies. Nach Fütterung mit OF50°C, nicht aber nach Fütterung mit OF105°C und 190°C war Konzentration an Myristinsäure (14:0) und Palmitinsäure (16:0) signifikant höher, während die Konzentration an Stearinsäure (18:0) signifikant geringer war als nach Fütterung mit frischem Fett (+10%; +30% bzw. -8%).

Die Verfütterung oxidierter Fette führte zu signifikanten Unterschieden bei den Konzentrationen einzelner MUFA, während die Summe der Konzentrationen an Gesamt-MUFA und der Quotient aus Gesamt-MUFA und Gesamt-SFA keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen aufwies.

Nach Fütterung mit OF50°C, OF105°C und 190°C war Konzentration an Ölsäure (18:1n-9) höher (+43%; +24%; +24%), während die Konzentration an Vaccensäure (18:1n-7) (-17%) und Gadoleinsäure (20:1n-9) (-44%) bei allen drei oxidierten Diätfetten signifikant geringer war im Vergleich zur Fütterung mit frischem Fett.

Die Konzentrationen an Gesamt-PUFA waren bei den Tieren mit OF50°C, OF105°C und OF190°C geringerer (-7%; -4%, -3%) als bei Tieren mit frischem Diätfett. Der Quotient aus den Konzentrationen an Gesamt-PUFA und Gesamt-SFA war bei Verfütterung von OF50°C, OF105°C und OF190°C signifikant kleiner (-42%; -4%; -4%) als bei Verfütterung von frischem Fett. Tiere mit oxidierten Diätfetten hatten im Vergleich zu Tieren mit frischen Diätfetten signifikant geringere Konzentrationen an allen n-3-PUFA, während die Konzentrationen an einzelnen n-6-PUFA mit Ausnahme der Arachidonsäure (20:4n-6) höher waren. Der Quotient aus den Konzentrationen von Gesamt-n-6-PUFA zu Gesamt-n-3-PUFA war bei Tieren mit oxidierten Diätfetten mehr als doppelt so hoch wie bei Tieren mit frischem Fett.

Die Quotienten der Konzentration von Ausgangsprodukt und Endprodukt der  $\Delta 6$ -,  $\Delta 5$ - bzw.  $\Delta 4$ -Desaturierung/Elongierung wurden durch das Diätfett und nicht durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst. Der Quotient aus der Konzentration an Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure (20:3n-6) und Linolensäure (18:2n-6) war bei Tieren mit OF50°C und OF105°C 1,4mal und 1,2mal und bei OF190°C tendenziell höher als bei Tieren mit frischem Diätfett.

Der Quotient aus der Konzentration an Docosatetraensäure (22:4n-5) und Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure (20:3n-6) war bei oxidierten Fetten in Abhängigkeit vom Oxidationsgrad des Fettes 1,6 bis 2,2mal so hoch wie bei Tieren mit frischem Diätfett. Der Quotient aus den Konzentrationen an Docosahexaensäure (22:6n-3) und Docosapentaensäure (22:5n-3) war bei Tieren mit oxidierten Diätfetten um 30% kleiner als bei Tieren mit frischem Fett.

Der Doppelbindungsindex der Fettsäuren von Phosphatidylcholin wurde durch das Diätfett beeinflusst: Bei Tieren mit oxidierten Diätfetten hatte eine durchschnittliche Fettsäure signifikant niedrigere Doppelbindungsindizes (OF50°C < OF105°C = OF190°C) als bei Tieren mit frischen Diätfetten.

#### **3.6.4 Fettsäurezusammensetzung des Phosphatidylethanolamins**

Die Fettsäurezusammensetzung des Phosphatidylethanolamins der Leber ist in Tabelle 12 aufgeführt.

Die Konzentrationen der Fettsäuren im Phosphatidylethanolamin wurden durch das Diätfett und nicht durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst. Ausnahmen bildeten die Konzentrationen an Stearinsäure (18:0) und Palmitoleinsäure (16:1n-7), die weder durch das Diätfett noch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst wurden und die Konzentrationen an Docosahexaensäure (22:6n-3), bei der eine Interaktion der Einflussfaktoren Diätfett und Vitamin E-Konzentration der Diät vorlag. Die Konzentration an Docosahexaensäure (22:6n-3) war im Vergleich zu frischem Diätfett bei Tieren mit oxidiertem Fett und geringer Vitamin E-Aufnahme um 57% geringer, während sie bei Tieren mit oxidiertem Fett und hoher Vitamin E-Aufnahme um 50% geringer war.

Die Konzentration an Gesamt-SFA wurde durch das Diätfett und nicht durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst. Mit Ausnahme der Palmitinsäure (16:0) wiesen die Konzentrationen an Gesamt-SFA und einzelnen SFA keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Die Fütterung mit OF50°C, nicht aber mit OF105°C und 190°C verminderte die Konzentration an Palmitinsäure (16:0) um 9% im Vergleich zur Fütterung mit frischem Fett.

Die Konzentration an Gesamt-MUFA wurde durch das Diätfett und nicht durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst. Die Verfütterung oxidierter Fette führte zu signifikanten Unterschieden bei den Konzentrationen der MUFA Ölsäure (18:1n-9) und Gadoleinsäure (20:1n-9), während die Summe der Konzentrationen an Gesamt-MUFA und der Quotient aus Gesamt-MUFA und Gesamt-SFA keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen aufwies. Im Vergleich frischem Diätfett war die Konzentration an Ölsäure (18:1n-9) nach Verfütterung oxidierter Fette unabhängig vom Oxidationsgrad des Fettes erhöht (+16%), während die Konzentration an Gadoleinsäure (20:1n-9) vermindert war (-33%).

Die Konzentration an Gesamt-PUFA wurde weder durch das Diätfett noch durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst, während der Quotient aus den Konzentrationen an Gesamt-PUFA und Gesamt-SFA durch das Diätfett beeinflusst wurde und bei Tieren mit OF190°C um 7% größer als bei Tieren mit frischem Diätfett. Tiere mit OF50°C und OF105°C unterschieden sich dabei nicht von Tieren mit frischem Fett.

Die Konzentration an Gesamt-n-6-PUFA wurde durch das Diätfett und nicht durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst und war bei Tieren mit oxidiertem Diätfett unabhängig vom Oxidationsgrad des Fettes um 8% höher als bei Tieren mit frischem Diätfett. Die Konzentration an Gesamt-n-3-PUFA wurde durch das Diätfett in Interaktion mit der Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst und war bei Tieren mit oxidiertem Fett und geringer Vitamin E-Aufnahme um 44% niedriger und bei Tieren mit oxidiertem Fett und hoher Vitamin E-Aufnahme um 51% niedriger im Vergleich zu Tieren mit frischem Diätfett. Der Quotient aus den Konzentrationen an Gesamt-n-6-PUFA und Gesamt-n-3-PUFA wurde durch das Diätfett und nicht durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst und war bei Tieren mit oxidiertem Fett unabhängig vom Oxidationsgrad des Fettes mehr als doppelt so groß wie bei Tieren mit frischem Diätfett. Die Konzentrationen aller einzelnen n-3-PUFA waren bei Tieren mit oxidierten Fetten im Vergleich zu Tieren mit frischem Diätfett niedriger, während die Konzentrationen der einzelnen n-6-PUFA mit Ausnahme der Arachidonsäure (20:4n-6) höher waren. Die Unterschiede waren bei der Verfütterung von OF50°C im Vergleich zu OF105°C und OF190°C am deutlichsten, jedoch nur teilweise signifikant.

Die Quotienten der Konzentration von Endprodukt und Ausgangsprodukt der  $\Delta 6$ -,  $\Delta 5$ - bzw.  $\Delta 4$ -Desaturierung/Elongierung wurden durch das Diätfett und nicht durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst. Der Quotient aus der Konzentration an Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure (20:3n-6) und Linolensäure (18:2n-6) war bei Tieren mit OF50°C und OF105°C um 1,5mal und 1,4mal und bei Tieren mit OF190°C tendenziell höher als bei Tieren mit frischem Diätfett. Auch der Quotient aus der Konzentration an Docosatetraensäure (22:4n-5) und Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure (20:3n-6) war bei Tieren mit oxidierten Diätfetten in Abhängigkeit des Oxidationsgrades 1,4 bis 2,1mal so hoch wie bei Tieren mit frischem Diätfett. Der Quotient aus der Konzentration an Docosahexaensäure (22:6n-3) und Docosapentaensäure (22:5n-3) war bei allen Tieren mit oxidierten Diätfetten tendenziell ( $P = 0,06$ ) kleiner (-20%) als bei Tieren mit frischem Fett.

Der Doppelbindungsindex der Fettsäuren von Phosphatidylethanolamin wurde durch das Diätfett beeinflusst und war bei Tieren mit oxidierten Fetten unabhängig vom Oxidationsgrad signifikant niedriger als bei Tieren mit frischen Diätfetten.

Tabelle 11: Fettsäurezusammensetzung<sup>1</sup> des Phosphatidylcholins der Leber

| Fettbehandlung              | Frisches Fett                |                             | Oxidiertes Fett 1           |                              | Oxidiertes Fett 2            |                              | Oxidiertes Fett 3            |                              | ANOVA<br>Signifikanter<br>Einfluss von<br>( <i>P</i> < 0.05) |
|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--|
|                             | unbehandelt                  |                             | 50°C, 38 d                  |                              | 105°C, 81 h                  |                              | 190°C, 24 h                  |                              |  |
| Vitamin E [mg TÄ/kg]        | 25                           | 250                         | 25                          | 250                          | 25                           | 250                          | 25                           | 250                          |  |
|                             | [mol/100 mol Fettsäuren]     |                             |                             |                              |                              |                              |                              |                              |  |
| Gesamt-SFA                  | 46,8 <sup>ab</sup><br>± 1,0  | 45,9 <sup>b</sup><br>± 0,7  | 47,4 <sup>a</sup><br>± 0,6  | 47,3 <sup>ab</sup><br>± 0,9  | 46,8 <sup>ab</sup><br>± 0,8  | 46,9 <sup>ab</sup><br>± 0,7  | 46,3 <sup>b</sup><br>± 0,9   | 46,6 <sup>b</sup><br>± 0,4   | <i>Fett</i>  |
| 14:0<br>Myristinsäure       | 0,20 <sup>ab</sup><br>± 0,06 | 0,18 <sup>b</sup><br>± 0,02 | 0,25 <sup>a</sup><br>± 0,08 | 0,24 <sup>a</sup><br>± 0,04  | 0,20 <sup>ab</sup><br>± 0,05 | 0,22 <sup>ab</sup><br>± 0,04 | 0,19 <sup>b</sup><br>± 0,03  | 0,19 <sup>b</sup><br>± 0,04  | <i>Fett</i>  |
| 16:0<br>Palmitinsäure       | 22,7 <sup>c</sup><br>± 1,2   | 23,9 <sup>b</sup><br>± 1,2  | 26,1 <sup>a</sup><br>± 1,3  | 25,4 <sup>ab</sup><br>± 2,4  | 24,5 <sup>b</sup><br>± 1,0   | 24,9 <sup>ab</sup><br>± 1,2  | 24,1 <sup>b</sup><br>± 1,2   | 24,7 <sup>b</sup><br>± 1,0   | <i>Fett</i>  |
| 18:0<br>Stearinsäure        | 23,3 <sup>a</sup><br>± 1,8   | 22,0 <sup>ab</sup><br>± 1,8 | 20,7 <sup>b</sup><br>± 2,0  | 20,9 <sup>b</sup><br>± 3,2   | 23,0 <sup>ab</sup><br>± 2,2  | 21,8 <sup>ab</sup><br>± 1,0  | 22,0 <sup>ab</sup><br>± 1,5  | 21,7 <sup>ab</sup><br>± 1,0  | <i>Fett</i>  |
| Gesamt-MUFA                 | 9,9 <sup>c</sup><br>± 1,3    | 10,2 <sup>bc</sup><br>± 1,4 | 12,2 <sup>a</sup><br>± 1,1  | 11,1 <sup>b</sup><br>± 1,3   | 10,9 <sup>bc</sup><br>± 1,3  | 10,5 <sup>bc</sup><br>± 0,8  | 10,3 <sup>bc</sup><br>± 0,8  | 10,7 <sup>bc</sup><br>± 0,5  | <i>Fett</i>  |
| 16:1n-7<br>Palmitoleinsäure | 0,70<br>± 0,27               | 0,72<br>± 0,30              | 0,66<br>± 0,03              | 0,64<br>± 0,16               | 0,66<br>± 0,22               | 0,73<br>± 0,08               | 0,63<br>± 0,04               | 0,89<br>± 0,16               | -  |
| 18:1n-9<br>Ölsäure          | 5,99 <sup>d</sup><br>± 0,44  | 6,40 <sup>d</sup><br>± 0,68 | 9,31 <sup>a</sup><br>± 0,95 | 8,96 <sup>ab</sup><br>± 0,84 | 8,17 <sup>b</sup><br>± 0,49  | 7,58 <sup>bc</sup><br>± 0,34 | 7,34 <sup>c</sup><br>± 0,78  | 7,59 <sup>bc</sup><br>± 0,66 | <i>Fett</i>  |
| 18:1n-7<br>Vaccensäure      | 2,48 <sup>a</sup><br>± 0,50  | 2,41 <sup>a</sup><br>± 0,31 | 2,05 <sup>b</sup><br>± 0,38 | 1,95 <sup>b</sup><br>± 0,26  | 2,03 <sup>b</sup><br>± 0,40  | 2,08 <sup>b</sup><br>± 0,28  | 2,17 <sup>ab</sup><br>± 0,27 | 2,23 <sup>ab</sup><br>± 0,18 | <i>Fett</i>  |
| 20:1n-9<br>Gadoleinsäure    | 0,19 <sup>a</sup><br>± 0,09  | 0,19 <sup>a</sup><br>± 0,07 | 0,11 <sup>b</sup><br>± 0,04 | 0,11 <sup>b</sup><br>± 0,05  | 0,08 <sup>b</sup><br>± 0,05  | 0,10 <sup>b</sup><br>± 0,05  | 0,11 <sup>b</sup><br>± 0,05  | 0,11 <sup>b</sup><br>± 0,04  | <i>Fett</i>  |

Tabelle wird fortgesetzt

Fortsetzung Tabelle 11: Fettsäurezusammensetzung<sup>1</sup> des Phosphatidylcholins der Leber

| Fettbehandlung                   | Frisches Fett               |                              | Oxidiertes Fett 1           |                              | Oxidiertes Fett 2            |                              | Oxidiertes Fett 3            |                             | ANOVA<br>Signifikanter<br>Einfluss von<br>( <i>P</i> < 0.05) |
|----------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--|
|                                  | Unbehandelt                 |                              | 50°C, 38 d                  |                              | 105°C, 81 h                  |                              | 190°C, 24 h                  |                             |  |
|                                  | 25                          | 250                          | 25                          | 250                          | 25                           | 250                          | 25                           | 250                         |  |
| Vitamin E [mg TÄ/kg]             | 25                          | 250                          | 25                          | 250                          | 25                           | 250                          | 25                           | 250                         |  |
|                                  | [mol/100 mol Fettsäuren]    |                              |                             |                              |                              |                              |                              |                             |  |
| Gesamt-PUFA                      | 44,0 <sup>a</sup><br>± 1,0  | 44,4 <sup>a</sup><br>± 0,9   | 40,5 <sup>c</sup><br>± 1,1  | 41,3 <sup>c</sup><br>± 0,9   | 42,5 <sup>b</sup><br>± 1,2   | 42,6 <sup>b</sup><br>± 0,7   | 43,2 <sup>ab</sup><br>± 0,8  | 42,5 <sup>b</sup><br>± 0,9  | <i>Fett</i>  |
| Gesamt-n-6-PUFA                  | 41,4 <sup>a</sup><br>± 0,6  | 41,6 <sup>a</sup><br>± 1,0   | 39,3 <sup>c</sup><br>± 1,0  | 40,4 <sup>b</sup><br>± 1,0   | 41,3 <sup>a</sup><br>± 1,1   | 41,4 <sup>a</sup><br>± 0,4   | 41,9 <sup>a</sup><br>± 0,6   | 41,2 <sup>ab</sup><br>± 0,8 | <i>Fett</i>  |
| Gesamt-n-3-PUFA                  | 2,90 <sup>a</sup><br>± 0,34 | 2,82 <sup>a</sup><br>± 0,38  | 1,07 <sup>c</sup><br>± 0,31 | 1,24 <sup>bc</sup><br>± 0,21 | 1,23 <sup>bc</sup><br>± 0,13 | 1,38 <sup>b</sup><br>± 0,13  | 1,30 <sup>b</sup><br>± 0,13  | 1,32 <sup>b</sup><br>± 0,06 | <i>Fett</i>  |
| 18:2n-6<br>Linolsäure            | 11,7 <sup>a</sup><br>± 1,7  | 12,3 <sup>a</sup><br>± 2,7   | 11,3 <sup>ab</sup><br>± 2,4 | 11,2 <sup>ab</sup><br>± 1,6  | 10,4 <sup>b</sup><br>± 0,9   | 10,3 <sup>b</sup><br>± 1,2   | 10,3 <sup>b</sup><br>± 1,2   | 10,2 <sup>b</sup><br>± 1,1  | <i>Fett</i>  |
| 20:2n-6<br>Eicosadiensäure       | 0,55 <sup>d</sup><br>± 0,29 | 0,55 <sup>d</sup><br>± 0,26  | 1,32 <sup>a</sup><br>± 0,25 | 1,09 <sup>b</sup><br>± 0,24  | 0,72 <sup>cd</sup><br>± 0,13 | 0,76 <sup>c</sup><br>± 0,16  | 0,57 <sup>d</sup><br>± 0,11  | 0,64 <sup>c</sup><br>± 0,11 | <i>Fett</i>  |
| 20:3n-6<br>Dihomo-γ-Linolensäure | 0,88 <sup>c</sup><br>± 0,15 | 1,00 <sup>bc</sup><br>± 0,27 | 1,38 <sup>a</sup><br>± 0,18 | 1,40 <sup>a</sup><br>± 0,35  | 1,30 <sup>ab</sup><br>± 0,17 | 1,09 <sup>b</sup><br>± 0,26  | 1,01 <sup>bc</sup><br>± 0,17 | 1,15 <sup>b</sup><br>± 0,20 | <i>Fett</i>  |
| 20:4n-6<br>Arachidonsäure        | 28,2 <sup>a</sup><br>± 1,3  | 27,2 <sup>a</sup><br>± 2,0   | 23,9 <sup>b</sup><br>± 1,2  | 25,2 <sup>a</sup><br>± 1,7   | 27,7 <sup>a</sup><br>± 1,5   | 27,3 <sup>a</sup><br>± 1,6   | 28,6 <sup>a</sup><br>± 1,2   | 27,8 <sup>a</sup><br>± 1,5  | <i>Fett</i>  |
| 22:4n-6<br>Docosatetraensäure    | 0,79 <sup>c</sup><br>± 0,17 | 0,60 <sup>c</sup><br>± 0,24  | 1,39 <sup>b</sup><br>± 0,70 | 1,46 <sup>b</sup><br>± 0,28  | 1,93 <sup>a</sup><br>± 0,50  | 1,80 <sup>ab</sup><br>± 0,59 | 1,45 <sup>b</sup><br>± 0,27  | 1,42 <sup>b</sup><br>± 0,18 | <i>Fett</i>  |
| 22:5n-3<br>Docosapentaensäure    | 0,16 <sup>a</sup><br>± 0,04 | 0,16 <sup>a</sup><br>± 0,02  | 0,07 <sup>b</sup><br>± 0,03 | 0,09 <sup>b</sup><br>± 0,03  | 0,08 <sup>b</sup><br>± 0,03  | 0,08 <sup>b</sup><br>± 0,01  | 0,09 <sup>b</sup><br>± 0,02  | 0,09 <sup>b</sup><br>± 0,02 | <i>Fett</i>  |
| 22:6n-3<br>Docosahexaensäure     | 2,66 <sup>a</sup><br>± 0,42 | 2,67 <sup>a</sup><br>± 0,35  | 1,06 <sup>b</sup><br>± 0,21 | 1,07 <sup>b</sup><br>± 0,30  | 1,19 <sup>b</sup><br>± 0,17  | 1,28 <sup>b</sup><br>± 0,12  | 1,21 <sup>b</sup><br>± 0,13  | 1,21 <sup>b</sup><br>± 0,09 | <i>Fett</i>  |

Tabelle wird fortgesetzt

Fortsetzung Tabelle 11: Fettsäurezusammensetzung<sup>1</sup> des Phosphatidylcholins der Leber

| Fettbehandlung  | Frisches Fett                      |                              | Oxidiertes Fett 1            |                               | Oxidiertes Fett 2            |                              | Oxidiertes Fett 3            |                              | ANOVA<br>Signifikanter<br>Einfluss von<br><br>( <i>P</i> < 0,05) |
|---|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--|
|   | unbehandelt                        |                              | 50°C, 38 d                   |                               | 105°C, 81 h                  |                              | 190°C, 24 h                  |                              |  |
| Vitamin E [mg TÄ/kg]  | 25                                 | 250                          | 25                           | 250                           | 25                           | 250                          | 25                           | 250                          |  |
|   | [mol/mol]                          |                              |                              |                               |                              |                              |                              |                              |  |
| n-6-PUFA / n-3-PUFA   | 13,4 <sup>c</sup><br>± 0,7         | 14,3 <sup>c</sup><br>± 1,4   | 35,6 <sup>a</sup><br>± 6,7   | 33,2 <sup>ab</sup><br>± 5,4   | 31,7 <sup>b</sup><br>± 5,4   | 30,3 <sup>b</sup><br>± 2,8   | 32,1 <sup>ab</sup><br>± 2,5  | 31,5 <sup>b</sup><br>± 1,4   | <i>Fett</i>  |
| MUFA / SFA  | 0,21 <sup>b</sup><br>± 0,027       | 0,22 <sup>b</sup><br>± 0,030 | 0,27 <sup>a</sup><br>± 0,042 | 0,25 <sup>ab</sup><br>± 0,041 | 0,23 <sup>b</sup><br>± 0,030 | 0,22 <sup>b</sup><br>± 0,010 | 0,22 <sup>b</sup><br>± 0,010 | 0,23 <sup>b</sup><br>± 0,010 | <i>Fett</i>  |
| PUFA / SFA  | 0,94 <sup>ab</sup><br>± 0,03       | 0,96 <sup>a</sup><br>± 0,03  | 0,85 <sup>d</sup><br>± 0,03  | 0,873 <sup>d</sup><br>± 0,02  | 0,90 <sup>cd</sup><br>± 0,02 | 0,91 <sup>c</sup><br>± 0,01  | 0,92 <sup>bc</sup><br>± 0,03 | 0,91 <sup>c</sup><br>± 0,02  | <i>Fett</i>  |
| 20:3n-6 / 18:2n-6 <sup>3</sup><br>(Δ6-Desaturierung/Elongierung) <sup>2</sup> | 0,07 <sup>c</sup><br>± 0,01        | 0,08 <sup>c</sup><br>± 0,01  | 0,11 <sup>a</sup><br>± 0,01  | 0,11 <sup>a</sup><br>± 0,02   | 0,97 <sup>ab</sup><br>± 0,01 | 0,90 <sup>b</sup><br>± 0,02  | 0,76 <sup>bc</sup><br>± 0,01 | 0,88 <sup>bc</sup><br>± 0,02 | <i>Fett</i>  |
| 22:4n-6 / 20:3n-6<br>(Δ5-Desaturierung/Elongierung) <sup>2</sup>              | 2,09 <sup>c</sup><br>± 0,16        | 1,81 <sup>c</sup><br>± 0,38  | 4,39 <sup>a</sup><br>± 0,65  | 3,48 <sup>b</sup><br>± 0,39   | 4,03 <sup>ab</sup><br>± 0,30 | 3,85 <sup>ab</sup><br>± 0,67 | 3,22 <sup>b</sup><br>± 0,52  | 3,19 <sup>b</sup><br>± 0,61  | <i>Fett</i>  |
| 22:6n-3 / 22:5n-3<br>(Δ4-Desaturierung/Elongierung) <sup>2</sup>              | 8,9 <sup>a</sup><br>± 0,44         | 8,2 <sup>a</sup><br>± 0,45   | 11,4 <sup>b</sup><br>± 0,40  | 11,8 <sup>b</sup><br>± 0,24   | 15,5 <sup>b</sup><br>± 0,44  | 14,7 <sup>b</sup><br>± 0,33  | 13,5 <sup>b</sup><br>± 0,34  | 12,4 <sup>b</sup><br>± 0,50  | <i>Fett</i>  |
|   | [Doppelbindungen / mol Fettsäuren] |                              |                              |                               |                              |                              |                              |                              |  |
| Doppelbindungsindex   | 1,68 <sup>a</sup><br>± 0,05        | 1,66 <sup>a</sup><br>± 0,04  | 1,50 <sup>c</sup><br>± 0,05  | 1,54 <sup>c</sup><br>± 0,05   | 1,60 <sup>b</sup><br>± 0,05  | 1,61 <sup>b</sup><br>± 0,03  | 1,62 <sup>b</sup><br>± 0,05  | 1,61 <sup>b</sup><br>± 0,04  | <i>Fett</i>  |

Werte - Mittelwert ± SD, n = 10; <sup>a,b,c</sup> - Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Reihe unterscheiden sich signifikant (*P* < 0,05)

<sup>1</sup> Fettsäuren < 0,001 g / 100 g; <sup>2</sup> Endprodukt und Ausgangsprodukt, vgl. Abb. 9 4.8.2; <sup>3</sup> Quotient multipliziert mit Faktor 10; TÄ - α-Tocopheroläquivalente; SFA - Gesättigte Fettsäuren; MUFA - Einfach ungesättigte Fettsäuren; PUFA - Mehrfach ungesättigte Fettsäuren

Tabelle 12: Fettsäurezusammensetzung<sup>1</sup> des Phosphatidylethanolamins der Leber

| Fettbehandlung              | Frisches Fett                |                              | Oxidiertes Fett 1           |                              | Oxidiertes Fett 2            |                              | Oxidiertes Fett 3           |                              | ANOVA<br>Signifikanter<br>Einfluss von<br>( <i>P</i> < 0.05) |
|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--|
|                             | unbehandelt                  |                              | 50°C, 38 d                  |                              | 105°C, 81 h                  |                              | 190°C, 24 h                 |                              |  |
| Vitamin E [mg TÄ/kg]        | 25                           | 250                          | 25                          | 250                          | 25                           | 250                          | 25                          | 250                          |  |
|                             | [mol/100 mol Fettsäuren]     |                              |                             |                              |                              |                              |                             |                              |  |
| Gesamt-SFA                  | 44,9 <sup>ab</sup><br>± 1,6  | 45,1 <sup>ab</sup><br>± 1,4  | 45,7 <sup>a</sup><br>± 1,4  | 45,5 <sup>a</sup><br>± 1,2   | 45,9 <sup>a</sup><br>± 0,9   | 45,0 <sup>ab</sup><br>± 0,4  | 43,6 <sup>b</sup><br>± 0,8  | 44,4 <sup>b</sup><br>± 1,0   | <i>Fett</i>  |
| 14:0<br>Myristinsäure       | 0,19 <sup>ab</sup><br>± 0,05 | 0,16 <sup>b</sup><br>± 0,05  | 0,25 <sup>a</sup><br>± 0,07 | 0,22 <sup>ab</sup><br>± 0,06 | 0,22 <sup>ab</sup><br>± 0,07 | 0,20 <sup>ab</sup><br>± 0,06 | 0,14 <sup>b</sup><br>± 0,06 | 0,16 <sup>b</sup><br>± 0,06  | <i>Fett</i>  |
| 16:0<br>Palmitinsäure       | 17,1 <sup>c</sup><br>± 1,0   | 17,0 <sup>c</sup><br>± 0,8   | 19,2 <sup>a</sup><br>± 0,5  | 18,1 <sup>b</sup><br>± 1,3   | 17,5 <sup>bc</sup><br>± 0,9  | 18,0 <sup>bc</sup><br>± 0,9  | 17,3 <sup>bc</sup><br>± 1,3 | 17,3 <sup>bc</sup><br>± 1,1  | <i>Fett</i>  |
| 18:0<br>Stearinsäure        | 27,9<br>± 0,9                | 27,6<br>± 1,2                | 26,7<br>± 1,0               | 27,1<br>± 1,6                | 27,3<br>± 1,9                | 26,6<br>± 0,6                | 26,6<br>± 1,0               | 27,6<br>± 1,2                | -  |
| Gesamt-MUFA                 | 8,53<br>± 0,67               | 8,62<br>± 0,81               | 8,70<br>± 0,93              | 8,43<br>± 0,57               | 9,05<br>± 0,65               | 8,76<br>± 0,71               | 9,37<br>± 0,9               | 9,19<br>± 1,05               | <i>Fett</i>  |
| 16:1n-7<br>Palmitoleinsäure | 1,02<br>± 0,25               | 0,10<br>± 0,23               | 0,91<br>± 0,25              | 0,83<br>± 0,16               | 0,96<br>± 0,22               | 0,95<br>± 0,18               | 0,86<br>± 0,18              | 1,08<br>± 0,24               | -  |
| 18:1n-9<br>Ölsäure          | 4,74 <sup>b</sup><br>± 0,48  | 4,74 <sup>b</sup><br>± 0,34  | 5,48 <sup>a</sup><br>± 0,69 | 5,36 <sup>a</sup><br>± 0,40  | 5,76 <sup>a</sup><br>± 0,92  | 5,38 <sup>a</sup><br>± 0,58  | 5,70 <sup>a</sup><br>± 0,57 | 5,29 <sup>ab</sup><br>± 0,45 | <i>Fett</i>  |
| 18:1n-7<br>Vaccensäure      | 2,71 <sup>ab</sup><br>± 0,44 | 2,52 <sup>ab</sup><br>± 0,43 | 2,39 <sup>b</sup><br>± 0,24 | 2,15 <sup>b</sup><br>± 0,13  | 2,21 <sup>b</sup><br>± 0,41  | 2,34 <sup>b</sup><br>± 0,14  | 2,36 <sup>b</sup><br>± 0,41 | 2,33 <sup>b</sup><br>± 0,24  | <i>Fett</i>  |
| 20:1n-9<br>Gadoleinsäure    | 0,25 <sup>a</sup><br>± 0,04  | 0,21 <sup>b</sup><br>± 0,04  | 0,17 <sup>c</sup><br>± 0,02 | 0,14 <sup>c</sup><br>± 0,02  | 0,16 <sup>c</sup><br>± 0,06  | 0,15 <sup>c</sup><br>± 0,03  | 0,15 <sup>c</sup><br>± 0,02 | 0,15 <sup>c</sup><br>± 0,03  | <i>Fett</i>  |

Tabelle wird fortgesetzt

Fortsetzung Tabelle 12: Fettsäurezusammensetzung<sup>1</sup> des Phosphatidylethanolamins der Leber

| Fettbehandlung                   | Frisches Fett                |                              | Oxidiertes Fett 1           |                              | Oxidiertes Fett 2            |                              | Oxidiertes Fett 3           |                             | ANOVA<br>Signifikanter<br>Einfluss von<br><br>( <i>P</i> < 0.05) |
|----------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
|                                  | unbehandelt                  |                              | 50°C, 38 d                  |                              | 105°C, 81 h                  |                              | 190°C, 24 h                 |                             |  |
| Vitamin E [mg TÄ/kg]             | 25                           | 250                          | 25                          | 250                          | 25                           | 250                          | 25                          | 250                         |  |
|                                  | [mol/100 mol Fettsäuren]     |                              |                             |                              |                              |                              |                             |                             |  |
| Gesamt-PUFA                      | 46,1<br>± 1,6                | 46,5<br>± 1,8                | 45,9<br>± 1,2               | 46,1<br>± 0,9                | 46,3<br>± 0,9                | 46,4<br>± 0,9                | 46,9<br>± 0,7               | 46,8<br>± 0,1               | -  |
| Gesamt-n-6-PUFA                  | 39,9 <sup>b</sup><br>± 1,7   | 40,2 <sup>b</sup><br>± 2,6   | 43,1 <sup>a</sup><br>± 1,4  | 43,1 <sup>a</sup><br>± 1,1   | 43,4 <sup>a</sup><br>± 1,1   | 43,3 <sup>a</sup><br>± 0,9   | 43,7 <sup>a</sup><br>± 1,1  | 43,5 <sup>a</sup><br>± 1,1  | Fett   |
| Gesamt-n-3-PUFA                  | 6,51 <sup>a</sup><br>± 0,69  | 5,91 <sup>b</sup><br>± 0,72  | 2,82 <sup>c</sup><br>± 0,37 | 2,94 <sup>c</sup><br>± 0,32  | 3,01 <sup>c</sup><br>± 0,25  | 3,05 <sup>c</sup><br>± 0,22  | 2,85 <sup>c</sup><br>± 0,43 | 2,98 <sup>c</sup><br>0,38   | Fett,<br>Fett x Vit.E  |
| 18:2n-6<br>Linolsäure            | 7,23<br>± 0,84               | 7,84<br>± 1,56               | 7,26<br>± 0,97              | 7,85<br>± 0,95               | 7,84<br>± 0,84               | 7,66<br>± 1,00               | 8,53<br>± 0,87              | 8,09<br>± 1,41              | -  |
| 20:2n-6<br>Eicosadiensäure       | 0,21 <sup>c</sup><br>± 0,06  | 0,23 <sup>c</sup><br>± 0,01  | 0,77 <sup>a</sup><br>± 0,21 | 0,73 <sup>a</sup><br>± 0,09  | 0,47 <sup>b</sup><br>± 0,07  | 0,47 <sup>b</sup><br>± 0,08  | 0,40 <sup>b</sup><br>± 0,08 | 0,43 <sup>b</sup><br>± 0,06 | Fett   |
| 20:3n-6<br>Dihomo-γ-Linolensäure | 0,56 <sup>c</sup><br>± 0,08  | 0,62 <sup>bc</sup><br>± 0,19 | 0,81 <sup>a</sup><br>± 0,14 | 0,80 <sup>ab</sup><br>± 0,19 | 0,75 <sup>ab</sup><br>± 0,05 | 0,68 <sup>b</sup><br>± 0,13  | 0,65 <sup>b</sup><br>± 0,10 | 0,69 <sup>b</sup><br>± 0,10 | Fett   |
| 20:4n-6<br>Arachidonsäure        | 29,5 <sup>b</sup><br>± 1,6   | 29,2 <sup>b</sup><br>± 2,2   | 29,8 <sup>b</sup><br>± 1,8  | 30,4 <sup>b</sup><br>± 0,8   | 31,1 <sup>ab</sup><br>± 0,7  | 31,5 <sup>ab</sup><br>± 0,5  | 31,5 <sup>ab</sup><br>± 0,6 | 32,4 <sup>a</sup><br>± 1,6  | Fett   |
| 22:4n-6<br>Docosatetraensäure    | 1,55 <sup>c</sup><br>± 0,48  | 1,12 <sup>c</sup><br>± 0,44  | 3,53 <sup>a</sup><br>± 0,63 | 3,02 <sup>ab</sup><br>± 0,69 | 3,36 <sup>a</sup><br>± 1,41  | 3,15 <sup>ab</sup><br>± 0,66 | 2,55 <sup>b</sup><br>± 0,57 | 2,50 <sup>b</sup><br>± 0,64 | Fett   |
| 22:5n-3<br>Docosapentaensäure    | 0,47 <sup>ab</sup><br>± 0,25 | 0,51 <sup>a</sup><br>± 0,23  | 0,31 <sup>b</sup><br>0,12   | 0,35 <sup>b</sup><br>± 0,18  | 0,35 <sup>b</sup><br>± 0,16  | 0,29 <sup>b</sup><br>± 0,06  | 0,29 <sup>b</sup><br>± 0,09 | 0,33 <sup>b</sup><br>± 0,09 | Fett   |
| 22:6n-3<br>Docosahexaensäure     | 5,88 <sup>a</sup><br>± 0,66  | 5,34 <sup>b</sup><br>± 0,69  | 2,41 <sup>c</sup><br>± 0,23 | 2,59 <sup>c</sup><br>± 0,29  | 2,50 <sup>c</sup><br>± 0,12  | 2,75 <sup>c</sup><br>± 0,24  | 2,65 <sup>c</sup><br>± 0,29 | 2,65 <sup>c</sup><br>± 0,39 | Fett,<br>Fett x Vit.E  |

Tabelle wird fortgesetzt

Fortsetzung Tabelle 12: Fettsäurezusammensetzung<sup>1</sup> des Phosphatidylethanolamins der Leber

| Fettbehandlung  | Frisches Fett                          |                             | Oxidiertes Fett 1           |                              | Oxidiertes Fett 2            |                              | Oxidiertes Fett 3           |                              | ANOVA<br>Signifikanter<br>Einfluss von<br><br>( <i>P</i> < 0,05) |
|---|--|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--|
|   | unbehandelt                            |                             | 50°C, 38 d                  |                              | 105°C, 81 h                  |                              | 190°C, 24 h                 |                              |  |
| Vitamin E [mg TÄ/kg]  | 25                                     | 250                         | 25                          | 250                          | 25                           | 250                          | 25                          | 250                          |  |
|   | [mol/mol]                              |                             |                             |                              |                              |                              |                             |                              |  |
| n6-PUFA / n3-PUFA   | 6,2 <sup>b</sup><br>± 0,7              | 6,4 <sup>b</sup><br>± 0,4   | 15,4 <sup>a</sup><br>± 0,3  | 14,8 <sup>a</sup><br>± 1,9   | 14,4 <sup>a</sup><br>± 1,5   | 14,3 <sup>a</sup><br>± 1,0   | 15,0 <sup>a</sup><br>± 1,7  | 14,8 <sup>a</sup><br>± 1,7   | <i>Fett</i>  |
| MUFA / SFA  | 0,19<br>± 0,02                         | 0,19<br>± 0,01              | 0,19<br>± 0,01              | 0,19<br>± 0,02               | 0,19<br>± 0,03               | 0,19<br>± 0,02               | 0,20<br>± 0,02              | 0,20<br>± 0,02               | -  |
| PUFA / SFA  | 1,00 <sup>b</sup><br>± 0,04            | 1,01 <sup>b</sup><br>± 0,10 | 0,99 <sup>b</sup><br>± 0,06 | 1,01 <sup>b</sup><br>± 0,05  | 1,03 <sup>ab</sup><br>± 0,07 | 1,03 <sup>ab</sup><br>± 0,02 | 1,08 <sup>a</sup><br>± 0,03 | 1,07 <sup>a</sup><br>± 0,04  | <i>Fett</i>  |
| 20:3n-6 / 18:2n-6 <sup>3</sup><br>(Δ6-Desaturierung/Elongierung) <sup>2</sup> | 0,08 <sup>c</sup><br>± 0,04            | 0,10 <sup>c</sup><br>± 0,01 | 0,15 <sup>a</sup><br>± 0,02 | 0,13 <sup>ab</sup><br>± 0,03 | 0,12 <sup>b</sup><br>± 0,01  | 0,13 <sup>ab</sup><br>± 0,02 | 0,99 <sup>c</sup><br>± 0,01 | 0,11 <sup>bc</sup><br>± 0,02 | <i>Fett</i>  |
| 22:4n-6 / 20:3n-6<br>(Δ5-Desaturierung/Elongierung) <sup>2</sup>              | 1,66 <sup>d</sup><br>± 0,24            | 1,77 <sup>d</sup><br>± 0,44 | 3,65 <sup>a</sup><br>± 0,61 | 2,94 <sup>bc</sup><br>± 0,62 | 3,03 <sup>b</sup><br>± 0,56  | 3,00 <sup>b</sup><br>± 0,67  | 2,48 <sup>c</sup><br>± 0,20 | 2,44 <sup>c</sup><br>± 0,26  | <i>Fett</i>  |
| 22:6n-3 / 22:5n-3<br>(Δ4-Desaturierung/Elongierung) <sup>2</sup>              | 11,1<br>± 0,4                          | 10,2<br>± 0,3               | 8,09<br>± 0,37              | 9,23<br>± 0,45               | 7,27<br>± 0,30               | 9,98<br>± 0,27               | 7,72<br>± 0,12              | 8,70<br>± 0,28               | <i>Fett</i>  |
|   | [Doppelbindungen / 100 mol Fettsäuren] |                             |                             |                              |                              |                              |                             |                              |  |
| Doppelbindungsindex   | 1,89 <sup>a</sup><br>± 0,06            | 1,90 <sup>a</sup><br>± 0,04 | 1,79 <sup>b</sup><br>± 0,05 | 1,81 <sup>b</sup><br>± 0,05  | 1,82 <sup>b</sup><br>± 0,04  | 1,83 <sup>b</sup><br>± 0,04  | 1,83 <sup>b</sup><br>± 0,04 | 1,83 <sup>b</sup><br>± 0,07  | <i>Fett</i>  |

Werte - Mittelwert ± SD, n = 10; <sup>a,b,c</sup> - Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Reihe unterscheiden sich signifikant (*P* < 0,05)

<sup>1</sup> Fettsäuren < 0,001 g / 100 g; <sup>2</sup> Endprodukt und Ausgangsprodukt, vgl. Abb. 9 4.8.2; <sup>3</sup> Quotient multipliziert mit Faktor 10; TÄ - α-Tocopheroläquivalente; SFA - Gesättigte Fettsäuren; MUFA - Einfach ungesättigte Fettsäuren; PUFA - Mehrfach ungesättigte Fettsäuren

### 3.6.5 mRNA-Konzentration der $\Delta 9$ -, $\Delta 6$ - und $\Delta 5$ -Desaturase

Die mRNA-Konzentrationen der  $\Delta 9$ -,  $\Delta 6$ - und  $\Delta 5$ -Desaturase sind in Tabelle 13 aufgeführt. Die mRNA-Konzentration der  $\Delta 9$ -Desaturase wurde weder durch das Diätfett noch durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst, während die mRNA-Konzentration der  $\Delta 5$ - und der  $\Delta 6$ -Desaturase signifikant durch das Diätfett und nicht durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst wurde.

Der Unterschied in der mRNA-Konzentration der  $\Delta 6$ -Desaturase war zwischen Tieren mit frischem Diätfett und Tieren mit oxidiertem Diätfett nur teilweise signifikant. Werden die Werte beider Vitamin E-Gruppen eines Diätfettes zusammengefasst, so ergeben sich mRNA-Konzentrationen an [% von GAPDH]: FF  $7,7^c \pm 1,9$ ; OF50°C  $10,0^b \pm 2,1$ ; OF105°C  $10,2^b \pm 2,5$ ; OF190°C  $12,0^a \pm 3,1$  (Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant). Die mRNA-Konzentration der  $\Delta 6$ -Desaturase war bei zusammengefassten Vitamin E-Gruppen eines Diätfettes bei Tieren mit OF50°C und OF105°C in der Diät um jeweils 31% höher und bei Tieren mit OF190°C um 54% höher als bei Tieren mit frischem Fett.

Die mRNA-Konzentration der  $\Delta 5$ -Desaturase war bei den Tieren mit oxidierten Diätfetten unabhängig vom Oxidationsgrad des Fettes um 63% höher als bei den Tieren mit frischem Diätfett.

Tabelle 13: mRNA-Konzentration an  $\Delta 9$ -,  $\Delta 6$ -, und  $\Delta 5$ -Desaturase in der Leber

| Fettbehandlung                                 | Frisches Fett                   |                                  | Oxidiertes Fett 1                |                                 | Oxidiertes Fett 2                |                                 | Oxidiertes Fett 3               |                                   | ANOVA<br>Signifikanter<br>Einfluss von<br>( $P < 0.05$ ) |
|--|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|--|
|  | unbehandelt                     |                                  | 50°C, 38 d                       |                                 | 105°C, 81 h                      |                                 | 190°C, 24 h                     |                                   |  |
| Vitamin E [mg TÄ/kg]                           | 25                              | 250                              | 25                               | 250                             | 25                               | 250                             | 25                              | 250                               |  |
| $\Delta 9$ -Desaturase<br>Kopien [% von GAPDH] | 3,54<br>$\pm 1,19$              | 4,26<br>$\pm 1,73$               | 3,52<br>$\pm 1,92$               | 4,28<br>$\pm 2,88$              | 5,03<br>$\pm 2,36$               | 5,63<br>$\pm 3,04$              | 5,37<br>$\pm 2,82$              | 5,25<br>$\pm 2,57$                | -  |
| $\Delta 6$ -Desaturase<br>Kopien [% von GAPDH] | 7,27 <sup>b</sup><br>$\pm 2,33$ | 8,02 <sup>ab</sup><br>$\pm 1,51$ | 9,56 <sup>ab</sup><br>$\pm 1,68$ | 10,23 <sup>a</sup><br>$\pm 2,5$ | 9,16 <sup>ab</sup><br>$\pm 3,06$ | 11,3 <sup>a</sup><br>$\pm 1,1$  | 11,9 <sup>a</sup><br>$\pm 3,3$  | 12,24 <sup>ab</sup><br>$\pm 3,14$ | Fett   |
| $\Delta 5$ -Desaturase<br>Kopien [% von GAPDH] | 4,41 <sup>b</sup><br>$\pm 2,51$ | 4,10 <sup>b</sup><br>$\pm 2,30$  | 6,48 <sup>a</sup><br>$\pm 2,28$  | 6,95 <sup>a</sup><br>$\pm 1,79$ | 7,05 <sup>a</sup><br>$\pm 1,43$  | 7,38 <sup>a</sup><br>$\pm 2,97$ | 8,25 <sup>a</sup><br>$\pm 2,53$ | 5,47 <sup>ab</sup><br>$\pm 3,55$  | Fett   |

Werte - Mittelwert  $\pm$  SD, n = 10; <sup>a,b,c</sup> - Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Reihe unterscheiden sich signifikant ( $P < 0,05$ )  
TÄ -  $\alpha$ -Tocopheroläquivalente

### 3.7 Expression hepatischer Gene

Die Signalintensitäten von ca. 400 der 1176 Gene des cDNA-Array lagen über dem festgelegten Signalschwellenwert (2.4.6) und sind entsprechend den drei Behandlungsgruppen in den Abbildungen 6, 7 und 8 dargestellt. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Berücksichtigung der im Kapitel 4.7 diskutierten Aspekte.

Es wurde festgestellt, dass die Signalintensitäten von 27 Genen nach Fütterung mit FF [250 mg TÄ/kg Diät], von 47 Genen nach Fütterung mit OF50°C [25 mg TÄ/kg Diät] und von 35 Genen nach Fütterung mit OF50°C [250 mg TÄ/kg Diät] im Vergleich zur Kontrollgruppe (Fütterung mit FF [25 mg TÄ/kg Diät]) mindestens um den Faktor 1,4 verändert waren (Abb. 6, 7 bzw. 8). Diese Gene sind mit dem Faktor und der Differenz der Änderung ihres Expressionssignals im Vergleich zur Kontrollgruppe in Tabelle 14 aufgelistet. Die Gene wurden dabei entsprechend ihrer Funktion im Stoffwechsel geordnet: Stoffwechsel von Lipiden (16 Gene, Tab. 14 + Tab. 7/ 3.4.2), Proteinen (7 Gene) und Xenobiotika (15 Gene) sowie intrazelluläre Effektoren/Modulatoren (5 Gene), Transkriptionsfaktoren (4 Gene) und Translationsfaktoren (4 Gene). Weitere 5 Gene wurden keiner der Gruppen zugeordnet.

Zusätzlich zur Auswertung der Daten anhand des Faktors der Expressionsänderung im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt, um den Einfluss des Diätfettes und der Vitamin E-Konzentration der Diät auf die Genexpression statistisch abzusichern (siehe 4.7).

*Lipidstoffwechsel:* Neben Genen der Fettsäureoxidation (Tab. 7/ 3.4.2) wurde die Expression des Fettsäure-bindenden Proteins, der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase und des Apolipoproteins AIV signifikant durch das Diätfett und nicht durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst und war nach Verfütterung von oxidiertem Fett im Mittel um den Faktor 1,4 und 1,2 höher bzw. um den Faktor 2,6 geringer als nach Fütterung von frischem Fett. Die Expression der Carnitin-O-Palmitoyltransferase II wurde sowohl durch das Diätfett als auch durch die Vitamin E-Konzentration der Diät signifikant beeinflusst und war sowohl nach der Verfütterung einer Diät mit oxidiertem Fett als auch durch Verfütterung einer Diät mit hoher Vitamin E-Konzentration höher als nach der Verfütterung von FF [25 mg TÄ/kg Diät].

*Xenobiotikastoffwechsel:* Die Genexpression der CYP3A1, CYP2E1 und der Cytochrom-c-Oxidase wurde signifikant durch das Diätfett und nicht durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst. Diese Gene waren nach der Verfütterung von oxidiertem Fett höher exprimiert als nach der Verfütterung von frischem Fett. Die Genexpression der Arylsulfatase und der Glutathion-S-Transferase (GST5-5) wurde signifikant durch das Diätfett in Interaktion mit der Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst und war im Vergleich zu FF [25 mg TÄ/kg Diät] nach Verfütterung von OF50°C und niedriger Vitamin E-Konzentration der Diät höher als nach Verfütterung von OF50°C und hoher Vitamin E-Konzentration der Diät.

*Proteinstoffwechsel:* Die Genexpression der Cathepsine B und H wurde signifikant durch das Diätfett und nicht durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst und war nach der Verfütterung von oxidiertem Fett höher als nach der Verfütterung von frischem Fett. Die Expression der Proteasome-Aktivatoren rPA28, RC10 und PSMB4 und die Expression des Gewebe-Inhibitor der Metalloproteinase 2 (TIMP2) wurden im Vergleich zu FF [25 mg TÄ/kg Diät] sowohl nach Verfütterung von oxidiertem Fett als auch durch eine hohe Vitamin E-Aufnahme der Diät höher exprimiert. Ein statistisch signifikanter Einfluss von dem Diätfett und der Vitamin E-Konzentration der Diät wurde aber nur auf die Expression von Proteasome-Aktivator RC10 und TIMP2 festgestellt.

*Intrazelluläre Effektoren und Modulatoren:* Die Genexpression der Guanin-Nucleotid-bindenden Proteine (G- $\alpha$  12 und G-rab 1A) wurde signifikant durch das Diätfett und nicht durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst und war nach der Verfütterung von oxidiertem Fett höher als nach der Verfütterung von frischem Fett. Die Expression von Calmodulin wurde signifikant durch das Diätfett in Interaktion mit der Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst und war im Vergleich zu FF [25 mg TÄ/kg Diät] nach Verfütterung von oxidiertem Fett und geringer Vitamin E-Konzentration der Diät höher als nach Verfütterung von oxidiertem Fett und hoher Vitamin E-Konzentration der Diät.

*Transkription:* Die Genexpression der Inhibitoren DNA-bindender Proteine (Id-2 und Id-3) und die Genexpression des Amphotericins wurde signifikant durch das Diätfett und nicht durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst und war nach der Verfütterung von oxidiertem Fett niedriger als nach der Verfütterung von frischem Fett. Die Genexpression der Nucleosid-Diphosphat-Kinase B wurde signifikant durch die Vitamin E-Konzentration der Diät und nicht durch das Diätfett beeinflusst und war nach Verfütterung einer Diät mit hoher Vitamin E-Konzentration geringer als nach Verfütterung einer Diät mit niedriger Vitamin E-Konzentration.

*Translation:* Die Genexpression von 3 der 4 ribosomalen Proteine wurde signifikant durch das Diätfett und nicht durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst und war nach der Verfütterung von oxidiertem Fett niedriger als nach der Verfütterung von frischem Fett.

*Weitere Gene:* Die Genexpression Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase wurde signifikant durch das Diätfett und nicht durch die Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst und war nach der Verfütterung von oxidiertem Fett höher als nach der Verfütterung von frischem Fett. Die Genexpression des Mikroglobulins wurde signifikant durch das Diätfett in Interaktion mit der Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst und war im Vergleich zu FF [25 mg TÄ/kg Diät] nach der Verfütterung einer Diät mit oxidiertem Fett und hoher Vitamin E-Konzentration stärker vermindert als nach Verfütterung einer Diät mit oxidiertem Fett und niedriger Vitamin E-Konzentration. Die Genexpression des Cofilins und des *dC-Strech-Binding-Protein* wurde signifikant durch die Vitamin E-Konzentration der Diät und nicht durch das Diätfett beeinflusst und war nach der Verfütterung einer Diät mit hoher Vitamin E-Konzentration höher als nach Verfütterung einer Diät mit niedriger Vitamin E-Konzentration.

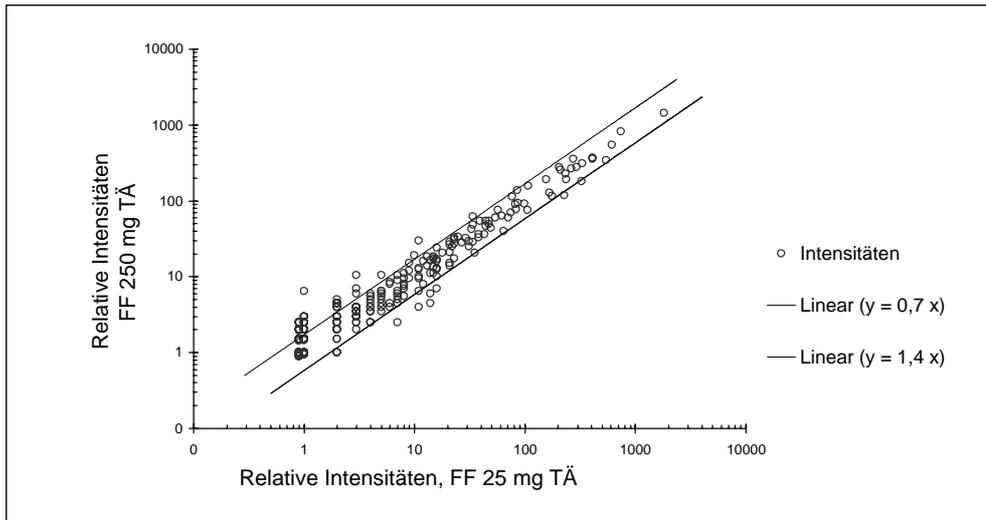


Abbildung 6: Relative Signalintensitäten der erfassten Gene:  
Frisches Fett, 250 mg TÄ/kg Diät versus Frisches Fett, 25 mg TÄ/kg Diät

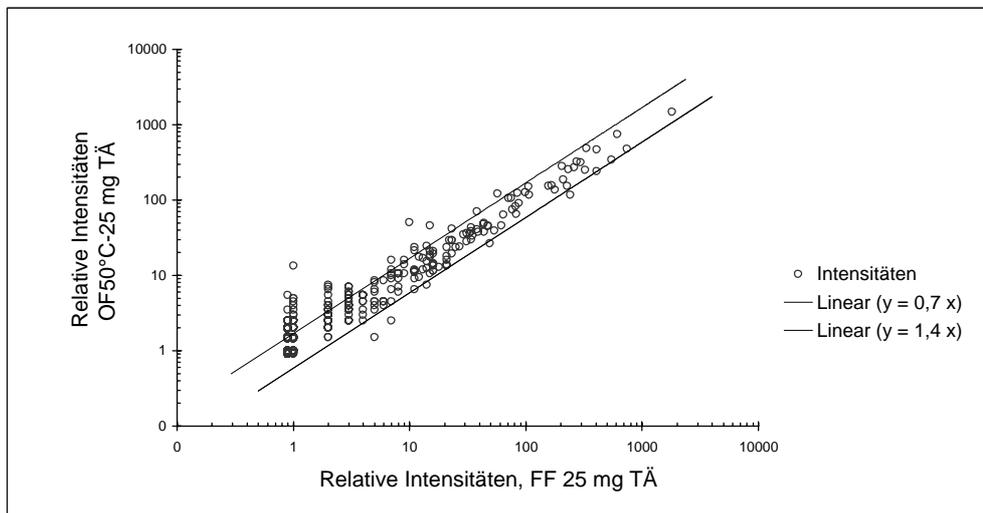


Abbildung 7: Relative Signalintensitäten der erfassten Gene  
Oxidiertes Fett (50°C), 25 mg TÄ/kg Diät versus Frisches Fett, 25 mg TÄ/kg Diät

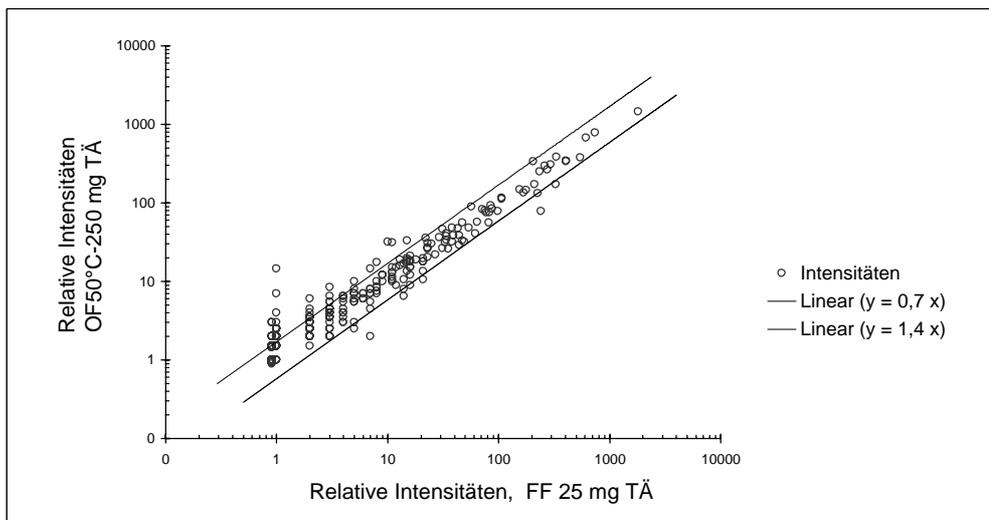


Abbildung 8: Relative Signalintensitäten der erfassten Gene:  
Oxidiertes Fett (50°C), 250 mg TÄ/kg Diät versus Frisches Fett, 25 mg TÄ/kg Diät

Tabelle 14: Änderungen der Expression hepatischer Gene im Verhältnis zur Kontrollgruppe FF [25 mg TÄ/kg]

| Enzym   | EMBL ID | Frisches Fett <sup>I</sup> |             | Oxidiertes Fett (OF50°C) <sup>I</sup> |             | ANOVA <sup>II</sup><br>Signifikanter Einfluss von (P < 0,05) |
|---|---------|----------------------------|-------------|---------------------------------------|-------------|--|
|   |         | 250 mg TÄ/kg               | 25 mg TÄ/kg | 250 mg TÄ/kg                          | 25 mg TÄ/kg |  |
| <b>Weitere Gene des Lipidstoffwechsels<sup>1</sup></b>        |         |                            |             |                                       |             |  |
| Carboxylesterase 10<br>Präkursor (ES-HVEL) <sup>2</sup>       | L46791  | F                          | + 2,7 ± 1,5 | + 2,1 ± 0,3                           | + 2,9 ± 0,1 | -  |
|   |         | D                          | 19 ± 17     | 12 ± 3,5                              | 20 ± 0,7    |  |
| Fettsäure-bindendes<br>Protein (FABP) <sup>3*</sup>           | M35991  | F                          | - 1,1 ± 0,1 | + 1,5 ± 0,1                           | + 1,2 ± 0,2 | Fett   |
|   |         | D                          | 25 ± 24     | 157 ± 47                              | 54 ± 73     |  |
| Carnitin-O-Palmitoyltrans-<br>ferase I (CPT I) <sup>3*</sup>  | L07736  | F                          | + 2,8 ± 0,8 | + 6,1 ± 3,9                           | + 3,3 ± 1,6 | -  |
|   |         | D                          | 1,6 ± 0,7   | 4,6 ± 3,5                             | 2,1 ± 1,4   |  |
| Carnitin-O-Palmitoyl-<br>transferase II (CPT II) <sup>3</sup> | J05470  | F                          | + 1,4 ± 0,2 | + 1,3 ± 0,1                           | + 2,2 ± 0,6 | Fett, Vit.E  |
|   |         | D                          | 3,0 ± 1,4   | 2,5 ± 0,7                             | 9,5 ± 4,9   |  |
| Sterol-26-Hydroxylase<br>Präkursor (CYP27) <sup>4</sup>       | M38566  | F                          | - 1,1 ± 0,1 | + 1,7 ± 0,4                           | + 1,0 ± 0,4 | -  |
|   |         | D                          | 0,5 ± 0,7   | 5,0 ± 2,8                             | 2,0 ± 0,0   |  |
| Apolipoprotein A-IV<br>Präkursor (APO-AIV) <sup>4</sup>       | M00002  | F                          | - 1,3 ± 0,5 | - 2,1 ± 0,0                           | - 3,1 ± 0,1 | Fett   |
|   |         | D                          | 90 ± 66     | 124 ± 3,5                             | 162 ± 20    |  |
| Lecithin-Cholesterin-<br>Acytransferase (LCAT) <sup>4</sup>   | U62803  | F                          | - 1,1 ± 0,0 | - 1,3 ± 0,0                           | - 1,1 ± 0,1 | Fett   |
|   |         | D                          | 6,5 ± 3,5   | 19 ± 2,1                              | 7,5 ± 7,8   |  |
| <b>Proteinstoffwechsel</b>                                    |         |                            |             |                                       |             |  |
| Cathepsin B   | X82396  | F                          | + 1,3 ± 0,4 | + 2,8 ± 1,1                           | + 1,8 ± 0,0 | Fett   |
|   |         | D                          | 0,5 ± 0,7   | 3,5 ± 2,1                             | 2,5 ± 0,7   |  |
| Cathepsin H   | M36320  | F                          | + 1,3 ± 0,5 | + 2,0 ± 0,0                           | + 1,8 ± 0,7 | Fett   |
|   |         | D                          | 1,0 ± 1,4   | 3,0 ± 0,0                             | 2,5 ± 2,1   |  |
| Proteasome-Aktivator<br>(rPA28)                               | D45249  | F                          | + 1,5 ± 0,5 | + 1,5 ± 0,5                           | + 2,1 ± 0,7 | -  |
|   |         | D                          | 3,5 ± 3,5   | 3,5 ± 3,5                             | 7,5 ± 4,9   |  |
| Proteasome-Aktivator<br>(RC10)                                | D21800  | F                          | + 2,0 ± 0,0 | + 1,8 ± 0,4                           | + 2,3 ± 0,4 | Fett, Vit.E  |
|   |         | D                          | 2,0 ± 0,0   | 1,5 ± 0,7                             | 2,5 ± 0,7   |  |
| Proteasome-Aktivator<br>(PSMB4)                               | L17127  | F                          | + 2,5 ± 0,7 | + 2,0 ± 1,4                           | + 4,0 ± 1,4 | -  |
|   |         | D                          | 1,5 ± 0,7   | 1,0 ± 1,4                             | 3,0 ± 1,4   |  |
| Proteasomale ATPase,<br>(TBP1)                                | U77918  | F                          | + 2,1 ± 0,1 | + 1,7 ± 0,1                           | + 1,4 ± 0,3 | Vit.E,<br>Fett *Vit.E  |
|   |         | D                          | 5,5 ± 0,7   | 3,5 ± 0,7                             | 2,0 ± 1,4   |  |
| Gewebe-Inhibitor der<br>Metalloproteinase 2<br>(TIMP2)        | L31884  | F                          | + 3,5 ± 0,7 | + 1,5 ± 1,0                           | + 2,8 ± 0,2 | Fett, Vit.E  |
|   |         | D                          | 7,5 ± 2,1   | 2,5 ± 2,0                             | 5,5 ± 0,7   |  |

Tabelle wird fortgesetzt

<sup>I</sup> - Werte - Mittelwert der Expressionssignale der Arrays Behandlungsgruppe (n = 3) im Verhältnis zum Kontroll-Array (frisches Fett, 25 mg TÄ/ kg Diät) ± SD; Bedingungen: F ≥ 1,4 und D ≥ 2 bei mindestens 2 von 3 Arrays pro Gruppe und mindestens bei einer der drei Behandlungsgruppen pro Gen; <sup>II</sup> - Expressionssignal der Kontrollgruppe = 1; F- Faktor der Expressionsänderung zum Kontroll-Array: Gen war um den Faktor „+“ - höher bzw. „-“ - geringer exprimiert; D - Differenz der Expressionssignale; TÄ - α-Tocopheroläquivalent, EMBL ID- Identifikationsnummer des Europäischen molekularbiologischen Labors;

<sup>1</sup> - Gene der mitochondrialen, peroxisomalen und mikrosomalen Fettsäureoxidation siehe Tab. 7/ 3.4.2; <sup>2</sup> - Lipolyse

<sup>3</sup> - Fettsäuretransport; <sup>4</sup> - Cholesterinstoffwechsel; \* PPARα-Zielgene, siehe Kap. 4.4.4

Fortsetzung Tabelle 14: Änderungen der Expression hepatischer Gene im Verhältnis zur Kontrollgruppe (FF, 25 mg TÄ/kg)

| Enzym  | EMBL ID          | Frisches Fett <sup>I</sup> |             | Oxidiertes Fett (OF50°C) <sup>I</sup> |             | ANOVA <sup>II</sup><br>Signifikanter Einfluss von (P < 0,05) |
|--|------------------|----------------------------|-------------|---------------------------------------|-------------|--|
|  |                  | 250 mg TÄ/kg               | 25 mg TÄ/kg | 250 mg TÄ/kg                          | 25 mg TÄ/kg |  |
| <b>Xenobiotkastoffwechsel und Stress-Antwort</b> |                  |                            |             |                                       |             |  |
| 2-Arylpropionyl-CoA Epimerase                    | Y08172           | F                          | + 1,3 ± 0,5 | + 2,3 ± 0,9                           | + 1,3 ± 0,5 | -  |
|  |                  | D                          | 1,0 ± 1,4   | 4,0 ± 2,8                             | 1,0 ± 1,4   |  |
| Arylsulfatase C Präkursor (ASC)                  | U37138           | F                          | + 1,5 ± 0,0 | + 2,3 ± 0,4                           | + 1,3 ± 0,4 | Fett, Fett *Vit.E  |
|  |                  | D                          | 1,0 ± 0,0   | 2,5 ± 0,7                             | 0,5 ± 0,7   |  |
| Alkohol Dehydrogenase (ADH1)                     | M15327           | F                          | + 1,4 ± 0,8 | + 1,8 ± 0,2                           | + 1,2 ± 0,1 | -  |
|  |                  | D                          | 13 ± 14     | 19 ± 4,9                              | 4,0 ± 2,8   |  |
| Glutathion-S-Transferase (GST YA)                | K01931           | F                          | - 1,4 ± 0,0 | + 1,2 ± 0,4                           | + 1,2 ± 0,2 | -  |
|  |                  | D                          | 4,0 ± 0,0   | 4,5 ± 3,5                             | 3,5 ± 3,5   |  |
| Glutathion-S-Transferase (GST5-5)                | X67654           | F                          | + 2,5 ± 0,7 | + 3,5 ± 0,7                           | + 2,0 ± 0,0 | Fett, Fett *Vit.E  |
|  |                  | D                          | 1,5 ± 0,7   | 2,5 ± 0,7                             | 1,0 ± 0,0   |  |
| Glutathione-S-Transferase (GSTM2)                | J02592           | F                          | + 1,3 ± 0,6 | + 1,4 ± 0,2                           | + 1,6 ± 0,1 | -  |
|  |                  | D                          | 86 ± 101    | 79 ± 45                               | 130 ± 22    |  |
| Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion- Peroxidase | X82679           | F                          | + 1,2 ± 0,5 | + 1,8 ± 0,2                           | + 1,2 ± 0,7 | -  |
|  |                  | D                          | 4,5 ± 3,5   | 10 ± 2,1                              | 7,0 ± 4,2   |  |
| Hypoxanthin-Guanine-Phosphoribosyltransferase    | M63983           | F                          | - 1,1 ± 0,7 | + 1,9 ± 0,3                           | + 1,3 ± 0,4 | -  |
|  |                  | D                          | 18 ± 2,8    | 33 ± 11                               | 12 ± 14     |  |
| Cytochrom P450 3A1 (CYP3A1)                      | M10161           | F                          | + 1,3 ± 0,5 | + 2,1 ± 0,4                           | + 1,6 ± 0,2 | Fett   |
|  |                  | D                          | 21 ± 26     | 64 ± 21                               | 32 ± 11     |  |
| Cytochrom P450 2C7 (CYP2C7)                      | M18335<br>J03509 | F                          | - 1,9 ± 0,3 | - 1,5 ± 0,0                           | - 1,7 ± 0,3 | -  |
|  |                  | D                          | 108 ± 65    | 73 ± 4,2                              | 93 ± 57     |  |
| Cytochrom P450 2E1 (CYP2E1)                      | J02627           | F                          | + 1,1 ± 0,0 | + 3,0 ± 0,3                           | + 2,2 ± 0,8 | Fett   |
|  |                  | D                          | 2,0 ± 0,0   | 31 ± 4,9                              | 18 ± 13     |  |
| Scavenger Rezeptor (Klasse B 1)                  | U76205           | F                          | - 1,3 ± 0,5 | + 1,8 ± 0,0                           | + 1,3 ± 0,1 | -  |
|  |                  | D                          | 1,0 ± 1,0   | 2,5 ± 0,7                             | 1,0 ± 1,4   |  |
| Organischer-Kation-Transporter 1A (OCT1A)        | U76379<br>X78855 | F                          | + 3,0 ± 0,0 | + 3,0 ± 1,4                           | + 3,0 ± 1,4 | -  |
|  |                  | D                          | 2,0 ± 0,0   | 2,0 ± 1,4                             | 2,0 ± 1,4   |  |
| NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase                   | M12516           | F                          | + 1,2 ± 0,2 | + 2,0 0,0                             | + 1,2 ± 0,7 | -  |
|  |                  | D                          | 0,5 ± 0,7   | 3,0 0,0                               | 1,5 ± 0,7   |  |
| Cytochrom-c-Oxidase, Präkursor                   | X15030           | F                          | - 2,3 ± 0,0 | + 1,2 ± 0,2                           | + 1,3 ± 0,3 | Fett   |
|  |                  | D                          | 9,0 ± 0,0   | 3,5 ± 3,5                             | 5,0 ± 4,2   |  |

Tabelle wird fortgesetzt

<sup>I</sup> - Werte - Mittelwert der Expressionssignale der Arrays Behandlungsgruppe (n = 3) im Verhältnis zum Kontroll-Array (frisches Fett, 25 mg TÄ/ kg Diät) ± SD; Bedingungen: F ≥ 1,4 und D ≥ 2 bei mindestens 2 von 3 Arrays pro Gruppe und mindestens bei einer der drei Behandlungsgruppen pro Gen; <sup>II</sup> - Expressionssignal der Kontrollgruppe = 1; F- Faktor der Expressionsänderung zum Kontroll-Array: Gen war um den Faktor „+“ - höher bzw. „-“ - geringer exprimiert; D - Differenz der Expressionssignale; TÄ - α-Tocopheroläquivalent, EMBL ID- Identifikationsnummer des Europäischen molekularbiologischen Labors

Fortsetzung Tabelle 14: Änderungen der Expression hepatischer Gene im Verhältnis zur Kontrollgruppe (FF, 25 mg TÄ/kg)

| Enzym  | EMBL ID          | Frisches Fett <sup>I</sup> |             | Oxidiertes Fett (OF50°C) <sup>I</sup> |              | ANOVA <sup>II</sup><br>Signifikanter Einfluss von<br>(P < 0,05) |
|--|------------------|----------------------------|-------------|---------------------------------------|--------------|---|
|  |                  | 250 mg TÄ/kg               |             | 25 mg TÄ/kg                           | 250 mg TÄ/kg |   |
| <b>Intrazelluläre Effektoren und Modulatoren</b>   |                  |                            |             |                                       |              |   |
| G-Protein (G-α-8)                                  | M17525           | F                          | + 1,1 ± 1,0 | + 2,0 ± 0,1                           | + 1,2 ± 0,9  | -   |
|  |                  | D                          | 7,5 ± 2,1   | 11 ± 0,7                              | 7,0 ± 2,8    |   |
| G-Protein (G-α 12)                                 | M61177           | F                          | + 1,2 ± 0,6 | + 2,3 ± 0,6                           | + 1,1 ± 0,2  | Fett  |
|  |                  | D                          | 3,0 ± 2,8   | 9,0 ± 4,2                             | 1,0 ± 1,4    |   |
| G-Protein (G- rab1A)                               | J02998           | F                          | + 1,0 ± 0,0 | + 2,0 ± 0,0                           | + 1,8 ± 0,4  | Fett  |
|  |                  | D                          | 0,0 ± 0,0   | 2,0 ± 0,0                             | 1,5 ± 0,7    |   |
| 14-3-3 Protein epsilon;<br>PKC-Inhibitor-Protein-1 | M84416           | F                          | + 1,4 ± 0,2 | + 1,4 ± 0,5                           | + 1,5 ± 0,0  | -   |
|  |                  | D                          | 1,5 ± 0,7   | 1,5 ± 2,1                             | 2,0 ± 0,0    |   |
| Calmodulin (CALM)                                  | X13817           | F                          | + 2,0 ± 0,0 | + 2,0 ± 0,7                           | + 1,3 ± 0,4  | Fett *Vit.E   |
|  |                  | D                          | 2,0 ± 0,0   | 2,0 ± 1,4                             | 0,5 ± 0,7    |   |
| <b>Transkription: Aktivatoren und Repressoren</b>  |                  |                            |             |                                       |              |   |
| Id-2; Inhibitor des DNA-<br>bindenden Proteins     | D10863           | F                          | + 1,2 ± 0,6 | - 2,8 ± 0,1                           | - 3,5 ± 0,0  | Fett  |
|  |                  | D                          | 3,0 ± 1,4   | 4,5 ± 0,7                             | 5,0 ± 0,0    |   |
| Id-3; Inhibitor des DNA-<br>bindenden Proteins     | D10864           | F                          | + 1,2 ± 0,3 | - 1,1 ± 0,7                           | - 2,0 ± 0,1  | Fett  |
|  |                  | D                          | 1,0 ± 1,4   | 2,5 ± 0,7                             | 2,5 ± 0,7    |   |
| Nucleosid-Diphosphat-<br>Kinase B (NDK B)          | M91597           | F                          | - 1,4 ± 0,2 | - 1,3 ± 0,0                           | - 1,6 ± 0,1  | Vit.E   |
|  |                  | D                          | 6,0 ± 4,2   | 5,0 ± 0,0                             | 7,5 ± 2,1    |   |
| Amphoterin   | M64986           | F                          | - 1,3 ± 0,3 | - 3,3 ± 0,1                           | - 1,7 ± 0,0  | Fett  |
|  |                  | D                          | 1,0 ± 1,4   | 3,5 ± 0,7                             | 2,0 ± 0,0    |   |
| <b>Translation: Aktivatoren und Repressoren</b>    |                  |                            |             |                                       |              |   |
| 40S Ribosomales Protein                            | X59051           | F                          | - 1,1 ± 0,3 | - 1,7 ± 0,2                           | - 1,2 ± 0,3  | -   |
|  |                  | D                          | 96 ± 75     | 167 ± 99                              | 86 ± 86      |   |
| 60S Ribosomales Protein                            | M19635           | F                          | + 1,3 ± 0,4 | - 1,5 ± 0,1                           | - 1,2 ± 0,3  | Fett  |
|  |                  | D                          | 5,5 ± 7,8   | 7,0 ± 1,4                             | 4,0 ± 4,2    |   |
| 40S Ribosomales Protein                            | M18547           | F                          | - 1,1 ± 0,1 | - 1,8 ± 0,1                           | - 1,5 ± 0,1  | Fett  |
|  |                  | D                          | 5,0 ± 5,7   | 22 ± 3,5                              | 17 ± 2,8     |   |
| 60S Ribosomales Protein                            | M27905           | F                          | + 1,0 ± 0,0 | - 1,3 ± 0,2                           | - 1,5 ± 0,1  | Fett  |
|  |                  | D                          | 1,0 ± 0,0   | 16 ± 14                               | 22 ± 7,8     |   |
| <b>Weitere Gene</b>                                |                  |                            |             |                                       |              |   |
| Cofilin  | X62908           | F                          | + 1,2 ± 0,2 | - 1,4 0,0                             | + 1,3 ± 0,1  | Vit.E   |
|  |                  | D                          | 3,5 ± 3,5   | 4,5 0,7                               | 4,5 ± 2,1    |   |
| Mikroglobulin                                      | X16956<br>U26663 | F                          | - 1,8 ± 0,0 | - 1,3 0,0                             | - 1,9 ± 0,1  | Fett, Vit.E,<br>Fett *Vit.E                                     |
|  |                  | D                          | 146 ± 11    | 78 9,9                                | 153 ± 21     |   |
| ATP-Synthase                                       | D13124           | F                          | - 1,5 ± 0,3 | - 1,6 ± 0,2                           | - 2,0 ± 0,2  | -   |
|  |                  | D                          | 7,0 ± 5,7   | 7,5 ± 3,5                             | 11 ± 4,9     |   |
| Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> - ATPase           | M28647           | F                          | + 1,0 ± 0,6 | + 1,6 0,0                             | + 1,3 ± 0,2  | Fett  |
|  |                  | D                          | 4,0 ± 4,2   | 5,0 0,0                               | 3,0 ± 1,4    |   |
| <i>dC-stretch binding- Protein</i><br>(CSBP)       | D17711           | F                          | + 2,3 ± 0,4 | + 1,5 0,7                             | + 2,0 ± 0,7  | Vit.E   |
|  |                  | D                          | 2,5 ± 0,7   | 1,0 1,4                               | 2,0 ± 1,4    |   |

<sup>I</sup> - Werte - Mittelwert (n = 3) der Expressionssignale der Arrays Behandlungsgruppe im Verhältnis zum Kontroll-Array (frisches Fett, 25 mg TÄ/ kg Diät) ± SD; Bedingungen: F ≥ 1,4 und D ≥ 2 bei mindestens 2 von 3 Arrays pro Gruppe und mindestens bei einer der drei Behandlungsgruppen pro Gen; <sup>II</sup> - Expressionssignal der Kontrollgruppe = 1; F- Faktor der Expressionsänderung zum Kontroll-Array: Gen war um den Faktor „+“ - höher bzw. „-“ - geringer exprimiert; D - Differenz der Expressionssignale; TÄ - α-Tocopheroläquivalent, EMBL ID- Identifikationsnummer des Europäischen molekularbiologischen Labors; G-Protein - Guanin-Nucleotid-bindendes Protein

## **4 DISKUSSION**

### **4.1 Einschätzung der Diätfette**

Die Bestimmung der in den Diätfetten entstandenen LPOP erfolgte durch verschiedene Fettkennzahlen. Mit der Peroxidzahl, den Konzentrationen an TBARS und konjugierten Dienen werden primäre Oxidationsprodukte erfasst (MÖRSEL und MEUSEL 1990). Da OF50°C hohe Konzentrationen an diesen Produkten aufwies (Tab. 3/ 3.1), ist davon auszugehen, dass bei der Behandlung des Fettes vorwiegend primäre LPOP entstanden sind. Im Vergleich zum OF50°C wurden im OF105°C geringere Konzentrationen an primären LPOP festgestellt. Das kurzzeitig bei hoher Temperatur erhitzte Fett OF190°C wies die geringsten Konzentrationen an primären Oxidationsprodukten im Vergleich zu OF50°C und OF105° auf.

Bei hohen Temperaturen, wie bei der Behandlung von OF190°C werden primäre LPOP bereits nach kurzer Zeit zu sekundären LPOP wie polaren Verbindungen und Gesamt-Carbonylen abgebaut (FRANKEL 1998). Diese sind jedoch zum Teil bei hohen Temperaturen instabil und flüchtig (MÖRSEL und MEUSEL 1990). Wahrscheinlich wurden deshalb im OF190°C niedrige Konzentrationen an primären LPOP, jedoch keine höheren Konzentrationen an den sekundären LPOP gefunden als im OF50°C. Zu den im OF190°C verbliebenen weniger flüchtigen Sekundärprodukten zählen Epoxide, Ketone, Alkohole, Monomere, Dimere, Polymere und zyklische Verbindungen (PAUL und MITTAL 1997).

### **4.2 Einfluss oxidierter Diätfette auf die Lebendmasseentwicklung**

Die Lebendmasse aller Versuchstiere entwickelte sich im physiologischen Bereich (WEIHE 1987). Bei den Tieren wurden keine generell toxischen Symptome wie Wachstumsdepression beobachtet, wie sie aus anderen Fütterungsversuchen mit oxidierten Fetten bekannt ist (GABRIEL et al. 1977, ALEXANDER et al. 1987). Auch die Lebergewichte der Tiere (Tab. 4/ 3.2) wurden im Vergleich zu anderen Studien mit oxidierten Fetten (CORCOS-BENEDETTI et al. 1987, CHAO et al. 2001, AMMOUCHE et al. 2002) nicht beeinflusst. Es kann daher angenommen werden, dass die verfütterten Fette moderat oxidiert waren.

Die Lebendmassezunahme (Tab. 4/ 3.2) war bei den Tieren mit oxidierten Diätfetten und geringer Vitamin E-Konzentration der Diät unabhängig vom Oxidationsgrad der Fette etwas niedriger als bei Tieren mit frischem Diätfett. Dieser Effekt kann die Folge einer erhöhten oxidativen Belastung sein, da das Gewichtsdefizit bei der höheren Vitamin E-Konzentration der Diät ausgeglichen wurde (YOSHIDA und KAJIMOTO 1989, LIU und HUANG 1995).

### 4.3 Einfluss oxidierter Diätfette auf den Vitamin E-Status

Der Vitamin E-Status ist durch die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen in Plasma, Leber und Abdominalfett gekennzeichnet (D'AQUINO et al. 1985, LIU und HUANG 1995). Um den Einfluss oxidierter Diätfette auf den Vitamin E-Status beurteilen zu können, wurde die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in Plasma, Leber und Abdominalfett analysiert.  $\alpha$ -Tocopherol wird zusammen mit Triglyceriden und Cholesterin über Lipoproteine und Chylomikronen transportiert (COHN et al. 1992). Um den Einfluss oxidierter Diätfette auf die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Plasma unabhängig von Veränderungen der Lipidkonzentration zu beurteilen, wurde die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Plasma auf die Konzentration an Gesamtlipiden im Plasma bezogen.

In Übereinstimmung mit früheren Studien (z.B. CORCOS-BENEDETTI et al. 1987, EDER und KIRCHGESSNER 1999) lassen die Ergebnisse (Tab. 4/ 3.3) auf eine Beeinträchtigung des Vitamin E-Status durch die Verfütterung der oxidierten Fette schließen.

Ein verminderter Vitamin E-Status kann durch einen erhöhten Vitamin E-Umsatz bei oxidativer Belastung verursacht werden (D'AQUINO et al. 1985, LIU und HUANG 1995). In der vorliegenden Arbeit lassen die verminderten  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen in den Geweben von Tieren mit oxidierten Diätfetten auf einen erhöhten Vitamin E-Umsatz schließen. Da die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in der Leber von Tieren mit niedriger Vitamin E-Aufnahme nach Fütterung von OF190°C niedriger war als nach Fütterung von OF50°C, sind vermutlich nicht nur primäre LPOP, die in OF50°C höher konzentriert waren als in OF190°C, sondern auch sekundäre LPOP für die Erhöhung des Vitamin E-Umsatzes verantwortlich.

Neben dem erhöhten Vitamin E-Umsatz kann auch die geringe Verdaulichkeit von Vitamin E, die bei Tieren mit oxidierten Diätfetten festgestellt wurde (Tab. 4/ 3.3), zu dem verminderten Vitamin E-Status beigetragen haben. Auch hier sind nicht ausschließlich die primären LPOP für die verminderte Verdaulichkeit von Vitamin E ursächlich, da nach Verfütterung von OF50°C, das hohe Konzentrationen an primären LPOP enthielt, die Verdaulichkeit des  $\alpha$ -Tocopherols nicht so stark vermindert war wie nach Verfütterung von OF190°C mit niedrigen Konzentrationen an primären LPOP.

Die höhere Vitamin E-Supplementierung der Diäten verbesserte den Vitamin E-Status der Tiere mit oxidierten Diätfetten. Es ist zu schlussfolgern, dass die Verfütterung der drei oxidierten Fette den Vitamin E-Status beeinträchtigte und zu einer Erhöhung des Vitamin E-Bedarfs führte. Dabei verursachte das Diätfett, das über eine längere Zeit bei niedrigen Temperaturen erhitzt wurde und hohe Konzentrationen an primären LPOP enthielt, geringere Effekte auf den Vitamin E-Status und die Vitamin E-Verdaulichkeit als das Fett, das kurze Zeit bei hohen Temperaturen erhitzt wurde. Möglicherweise sind an den Effekten sekundäre LPOP beteiligt, die in hoch erhitzten Fetten entstehen (FRANKEL 1998), besser verdaut werden und daher eine hohe physiologische Relevanz haben (ORADA et al. 1986).

## **4.4 Einfluss oxidierter Diätfette auf die Triglyceridkonzentration**

### **4.4.1 Triglyceridkonzentration in Plasma, VLDL und Leber**

Die Verfütterung von oxidierten Fetten führte in früheren Untersuchungen zu verminderten Triglyceridkonzentrationen im Plasma und in der Leber (z.B. HUANG et al. 1988, LIU und HUANG 1995, EDER und KIRCHGESSNER 1998a, AMMOUCHE et al. 2002). Die Ursachen dafür waren bislang unklar.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden verminderte Triglyceridkonzentrationen im Plasma, in den VLDL und der Leber infolge der Fütterung mit oxidierten Fetten an Ratten festgestellt (Tab. 5/ 3.4.1). Es zeigte sich dabei, dass der Effekt unabhängig von dem Oxidationsgrad des Fettes sowie von der Vitamin E-Aufnahme der Tiere war.

Als möglichen Ursachen für die verminderten Triglyceridkonzentration wurde in der vorliegenden Arbeit der Hypothese einer verminderten Liponeogenese (4.4.2) und einer gesteigerten Lipolyse nachgegangen (4.4.3). Es wurde außerdem geprüft, ob oxidierte Diätfette den PPAR $\alpha$  aktivieren, der an der Regulation lipolytischer Gene beteiligt ist (4.4.4).

### **4.4.2 Liponeogenese**

In Übereinstimmung mit EDER und KIRCHGESSNER (1998b) sowie ŠKUFCÁ (2002) verminderte die Verfütterung von oxidierten Fetten die Aktivitäten der lipogenen Enzyme FSS und G6PDH in der Leber (Tab. 6/ 3.4.2). Die Ursachen sind bislang nicht klar.

Neben den verminderten Aktivitäten wurden in der vorliegenden Studie auch verminderte mRNA-Konzentrationen der lipogenen Enzyme FSS und G6PDH festgestellt (Tab. 6/ 3.4.2). Dies zeigt, dass die Verfütterung der oxidierten Fette die Liponeogenese bereits auf der Ebene der Genexpression hemmt und dass die verminderte Aktivität der lipogenen Enzyme zumindest teilweise auf eine verminderte Genexpression zurückzuführen ist.

Da die Aktivität, nicht aber die Genexpression der lipogenen Enzyme in der Gruppe mit OF190°C am geringfügigsten reduziert war und OF190°C geringere Konzentrationen an primären LPOP hatte als OF50°C und OF105°C, könnten insbesondere primäre LPOP nicht nur über die Genexpression, sondern auch direkt die Enzymaktivität der lipogenen vermindert haben.

Wie auch in der Studie von EDER und KIRCHGESSNER (1998b) waren die Wirkungen der oxidierten Diätfette auf die lipogenen Enzyme unabhängig von der Vitamin E-Aufnahme der Tiere, weshalb die Ursache vermutlich nicht oxidativer Stress ist. Wahrscheinlicher ist, dass bestimmte LPOP, wie zum Beispiel zyklische Fettsäuren (MARTIN et al. 2000), zu einer Verminderung der lipogenen Enzyme führten.

Der Regulationsmechanismus, dem die lipogenen Enzyme unterliegen, ist jedoch nicht klar. SCHOOJANS et al. (1996), PETERS et al. (1997) FORMAN et al. (1997) und DALLONGEVILLE et al. (2001) stellten einen Zusammenhang zwischen einer Verminderung von lipogenen Enzymen und einer PPAR $\alpha$ -Aktivierung fest. Daneben wurde kürzlich festgestellt, dass auch das *sterol regulatory element binding protein-1c* (SREBP-1) die lipogenen Enzyme beeinflusst (HORTON 2002). XU et al. (1999) zeigten, dass eine PPAR $\alpha$ -Aktivierung die Expression des SREBP-1 vermindert. Da die Verfütterung der oxidierten Fette die lipogenen Enzyme G6PDH und FSS verminderte und zu einer PPAR $\alpha$ -Aktivierung führte (4.4.4), ist zu vermuten, dass ein vermindertes SREBP-1 in die Verminderung der lipogenen Enzyme involviert war. SREBP-1 wird nicht nur durch PPAR $\alpha$ , sondern auch durch den *liver X-activated receptor alpha* reguliert. LXRA hat eine Schlüsselrolle in der Regulation der Lipidhomöostase (EDWARDS et al. 2002) (siehe auch 4.7).

#### 4.4.3 Lipolyse

Wie auch in früheren Untersuchungen (z.B. EDER und KIRCHGESSNER 1998a) führte die Fütterung mit oxidierten Fetten zu verminderten Triglyceridkonzentrationen im Plasma und in der Leber (Tab. 5/ 3.4.1). Neben der verminderten Liponeogenese (vgl. 4.4.2) könnte auch eine gesteigerte Lipolyse ursächlich sein.

Die Lipolyse wird insbesondere durch die mitochondriale  $\beta$ -Oxidation bestimmt, in geringerem Ausmaß aber auch durch die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation und die mikrosomale  $\omega$ - und  $\omega$ -1-Oxidation von Fettsäuren. Die Auswertung der Array-Daten zeigte, dass nach Verfütterung des oxidierten Fettes OF50°C Gene des mitochondrialen Fettsäureabbaus, vor allem aber auch Gene des peroxisomalen und des mikrosomalen Fettsäureabbauweges signifikant vermehrt exprimiert wurden (vgl. Tab. 7/ 3.4.3).

Neben den Genen der Fettsäureoxidation führte die Verfütterung von OF50°C auch zu einer erhöhten Expression von Genen, die am intrazellulären Fettsäuretransport oder am Transport von Fettsäuren zum Ort ihrer  $\beta$ -Oxidation in das Mitochondrium beteiligt sind und zu einer erhöhten Lipolyse beitragen können (Fettsäure-bindendes-Protein, Carnitin-O-Palmitoyltransferasen I und II, Carboxylesterase, HUI und HOWLES 2002) (vgl. Tab. 14/ 3.7). Da die Genexpression lipolytischer Enzyme zumeist unabhängig von der Vitamin E-Konzentration der Diät erhöht wurde, ist eine oxidative Belastung als Ursache für die Wirkungen vermutlich nur von geringer Bedeutung.

Die erhöhte Expression von Genen, deren Proteine an wesentlichen Funktionen der Lipolyse beteiligt sind, zeigt, dass die verminderten Triglyceridkonzentrationen in Leber, VLDL und Plasma, die nach der Verfütterung oxidierten Fette festgestellt wurden, nicht nur auf eine Hemmung der Liponeogenese, sondern auch auf eine gesteigerte Lipolyse zurückgeführt werden können.

#### 4.4.4 Aktivierung des PPAR $\alpha$

Einige Gene, die in der Lipolyse involviert sind, können durch den PPAR $\alpha$  reguliert werden (z.B. SCHOOJANS et al. 1996, MARTIN et al. 2000, CHAO und HUANG 2001). Wird PPAR $\alpha$  durch einen Liganden aktiviert, agiert er als Transkriptionsfaktor, indem er die Expression seiner Zielgene durch die Bindung an bestimmte DNA-Sequenzen reguliert (TUGWOOD et al 1992, LEMBERGER et al. 1996, CHINETTI et al. 2000).

7 Gene des Lipidstoffwechsels, die nach Verfütterung des oxidierten Fettes OF50°C [25 mg TÄ/kg Diät] mindestens um den Faktor 1,4 höher exprimiert wurden als nach Verfütterung von frischem Fett [25 mg TÄ/kg Diät] (Tab. 7/ 3.4.3 und Tab. 14/ 3.7) sind direkte Zielgene des PPAR $\alpha$  (GREEN 1995, GONZALEZ 1992, ISSEMANN et al. 1992, DREYER et al. 1993, GULICK et al. 1994, DEMOZ et al. 1994, SIMPSON 1997). Um zu verifizieren, dass neben OF50°C auch OF105°C und 190°C den PPAR $\alpha$  aktiviert, wurde die Expression der ACO (Tab. 7/ 3.4.3) zusätzlich durch RTD-PCR bestimmt (Tab. 6/ 3.4.4). Das Ergebnis bestätigte das Array-Resultat und zeigte, dass die Verfütterung der drei oxidierten Fette zu einer Aktivierung des PPAR $\alpha$  führte.

Die Wirkung der oxidierten Fette auf die Genexpression der ACO war unabhängig von der Vitamin E-Aufnahme der Tiere, sodass die Ursache der PPAR $\alpha$ -Aktivierung vermutlich nicht oxidativer Stress ist. Da der Oxidationsgrad der Fette keinen entscheidenden Einfluss auf die Genexpression der ACO hatte, könnten sekundäre Oxidationsprodukte wie Carbonyle oder polare Verbindungen, die in allen drei oxidierten Fetten etwa gleich stark konzentriert waren (vgl. 4.2), an der PPAR $\alpha$ -Aktivierung beteiligt sein.

Die PPAR $\alpha$ -Aktivierung erfolgt durch Bindung eines Liganden an den Rezeptor. Diese Liganden können direkt zugeführte Substanzen sein (direkte Aktivierung) oder aber Stoffwechselprodukte von zugeführten Substanzen (indirekte Aktivierung) (FORMAN et al. 1997, MINNICH 2001). Die Aktivierung des Rezeptors scheint generell eher indirekt zu erfolgen, da selbst Fibrate, die, gemessen an der Expression der ACO, eine starke PPAR $\alpha$ -Aktivierung verursachen, nur geringe Bindungsaffinitäten aufweisen (FORMAN et al. 1997, DESVERGNE und WAHLI 1999). Eine indirekte Aktivierung des Rezeptors kann zum Beispiel durch oxidierte Phospholipide, eine angestiegene Arachidonsäurekonzentration oder durch Eicosanoide erfolgen (DEVCHAND et al. 1996, KLIEWER et al. 1997, FORMAN et al. 1997, DEVCHAND und WAHLI 1998, DELERIVE et al. 2000). Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist eine indirekte Aktivierung des Rezeptors durch oxidierte Phospholipide oder eine angestiegene Arachidonsäurekonzentration unwahrscheinlich (vgl. 4.6 ff.). Zudem wurde im Zusammenhang mit einer solchen Aktivierung des PPAR $\alpha$  eine Erhöhung der Phospholipasen A2 beobachtet (DELERIVE et al. 2000), deren Genexpressionen (n = 5, Daten nicht gezeigt) in der vorliegenden Arbeit nicht erhöht waren.

Wahrscheinlicher ist dagegen eine indirekte Aktivierung des PPAR $\alpha$  durch Eicosanoide. Eicosanoide wie Leukotriene der Serie B<sub>4</sub> und Hydroxyeicosatetraensäure (HETEs) werden über Cytochrome der CYP4A- und CYP4F-Familie aus der Arachidonsäure gebildet (DEVCHAND et al. 1996, HELVIG et al 1998, NGUYEN et al. 1999, KIKUTA et al. 2002). Die Verfütterung der oxidierten Fette erhöhte die Genexpression der CYP4A und CYP4F-Familie deutlich (n = 5, Tab. 7/ 3.4.3), was auf eine gesteigerte Synthese von Eicosanoiden schließen lässt, welche wiederum für eine indirekte PPAR $\alpha$ -Aktivierung ursächlich ist.

Die Verfütterung der oxidierten Fette führte zu einer Aktivierung des PPAR $\alpha$ . Durch die Aktivierung des Rezeptors wurden erhöhten Expressionen einer Reihe von Genen festgestellt, die an der Lipolyse beteiligt sind (Tab. 7/ 3.4.3 und Tab. 14/ 3.7) und die vermutlich nicht nur entscheidend für die verminderten Triglyceridkonzentrationen in Plasma, VLDL und Leber verantwortlich sind, sondern auch für die verminderten Konzentrationen an n-3-Fettsäuren in den Leberlipiden (4.6.2). Da auch die Genexpression der lipogenen Enzyme (G6PDH, FSS (4.4.2), Desaturasen (4.6.3)) sowie die Phospholipidkonzentrationen (4.6.1) im Zusammenhang mit der PPAR $\alpha$ -Aktivierung stehen, dürfte PPAR $\alpha$  ein bedeutender Vermittler der Wirkungen oxidierter Fette auf den Lipidstoffwechsel sein.

#### 4.5 Einfluss oxidierter Diätfette auf das Cholesterin

EDER (1999) und HOCHGRAF et al. (1997) stellten eine verminderte Cholesterinkonzentration in der Leber fest. In dieser Arbeit wurden nach Verfütterung von oxidierten Fetten ebenfalls verminderte Cholesterinkonzentrationen in der Leber und auch in den VLDL (Tab. 8/ 3.5) festgestellt, die mit den weiteren Ergebnissen der Arbeit in folgendem Zusammenhang stehen können:

Die Aufnahme der oxidierten Fette führte zu einer erhöhten Cholesterinausscheidung (Tab. 8/ 3.5) und wahrscheinlich auch zu einem erhöhten Abbau von Cholesterin, da die Genexpression der Sterol-26-Hydroxylase und anderer Cytochrom P<sub>450</sub>-Enzyme (Tab. 7/ 3.4.3 und Tab. 14/ 3.7), die am Abbau von Cholesterin für die Gallensäurebiosynthese beteiligt sind (OKUDA 1994, SCHROEPFER 2000), erhöht waren. Bei dem Abbau von Cholesterin über Cytochrom P<sub>450</sub>-Enzyme entstehen Oxysterole (ARIYOSHI et al. 2002), die die Cholesterinkonzentrationen in VLDL und Leber zusätzlich die verminderten können:

Oxysterole binden an den *liver X-activated receptor alpha* (LXR $\alpha$ ), der die Cholesterinsynthese, die Cholesterinaufnahme und die VLDL-Sekretion vermindert und den Cholesterintransport über die HDL stimuliert (JANOWSKI et al. 1996, EDWARDS et al. 2002, TONTONUZ und MANGELSDORF 2003). Da in der vorliegenden Arbeit eine verminderte Cholesterinkonzentration in den VLDL und eine erhöhte Cholesterinkonzentration in den HDL festgestellt wurde, kann eine Aktivierung des LXR $\alpha$  vermutet werden. Einen weiteren Hinweis auf die Beeinflussung des Cholesterintransportes durch die Verfütterung oxidierter Fette stellen die signifikant verminderten Genexpressionen von Apolipoprotein A-IV (APO A-IV) und Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) dar (Tab. 14/ 3.7). APO A-IV aktiviert die LCAT, die wiederum Cholesterin mit Fettsäuren für den Transport verestert.

Es ist also anzunehmen, dass die verminderten Cholesterinkonzentrationen in der Leber und in den VLDL nach Verfütterung der oxidierten Fette die Folge einer erhöhten Cholesterinausscheidung, eines veränderten Cholesterintransportes und eines gesteigerten Cholesterinabbaus durch P<sub>450</sub>-Enzyme sowie vermutlich auch die Folge einer eingeschränkten Cholesterinbiosynthese sind und dass diese Effekte im Zusammenhang mit einer Aktivierung des LXR $\alpha$  stehen. Eine Aktivierung des LXR $\alpha$  durch die Verfütterung oxidierter Fette wurde auch im Zusammenhang mit der verminderten Liponeogenese diskutiert (4.4.2).

Da der Oxidationsgrad der Fette keinen entscheidenden Einfluss auf die analysierten Cholesterinkonzentrationen hatte, könnten sekundäre LPOP wie Carbonyle und polare Verbindungen, die in allen drei Fetten etwa gleich stark konzentriert waren (vgl. 4.1), an den Wirkungen beteiligt sein.

## **4.6 Einfluss oxidierter Diätfette auf die Leberlipide**

### **4.6.1 Phospholipidkonzentration**

Phospholipide sind Hauptbestandteil der Zellmembranen. D'AQUINO et al. (1985) und EDER (1999) fanden im Zusammenhang mit der Verfütterung von oxidierten Fetten deutlich erhöhte Phospholipidkonzentrationen in der Leber. Auch in der vorliegenden Arbeit war die Konzentration des Phosphatidylethanolamins und des Cardiolipins (Tab. 9/ 3.6.1) nach Verfütterung oxidierter Fette höher als nach Verfütterung von frischem Fett.

Erhöhte Phospholipidkonzentrationen sind ein Hinweis auf die Vergrößerung und Vermehrung (Proliferation) des endoplasmatischen Retikulums, das von einer Doppelmembran umgeben ist. Eine Proliferation des endoplasmatischen Retikulums wurde in Zusammenhang mit einem Anstieg von mikrosomalen Enzymen des Xenobiotikastoffwechsel (HUANG et al. 1988, LAMBONI et al. 1998) oder einer Proliferation der Peroxisomen (REDDY und KRISHNAKANTA 1975, PALUT 1997, CHAO et al. 2001) festgestellt. Da Peroxisomen aus dem endoplasmatischen Retikulum entstehen, ist eine Peroxisomenproliferation mit erhöhten Phospholipidkonzentrationen verbunden.

In der vorliegenden Arbeit führte die Verfütterung der oxidierten Fette zu einer Peroxisomenproliferation (vgl. 4.4.4). Die Intensität der Peroxisomenproliferation kann anhand der Genexpression der ACO beurteilt werden (FAN et al. 1996). Infolge der oxidierten Diätfette wurde in dieser Arbeit ein 2facher Expressionsanstieg der ACO (Tab. 6/ 3.4.4) festgestellt. Bei einer Peroxisomenproliferation, die zum Beispiel durch Herbizide, Diabetes oder Hunger ausgelöst wurde, erhöhte sich die Expression der Acyl-CoA-Oxidase dagegen um das 7 bis 30fache (KROETZ et al. 1998, RASPÉ et al. 1999, PALUT et al. 2001). Dies lässt auf eine verhältnismäßig moderate Peroxisomenproliferation durch die oxidierten Diätfette in dieser Studie schließen und wäre eine Erklärung für die unveränderten Lebergewichte (Tab. 4/ 3.1.2) und die vergleichsweise mäßig erhöhten Phospholipidkonzentrationen in der Leber.

### **4.6.2 Fettsäurezusammensetzung**

In einer Studie von EDER (1999) wurden nach Verfütterung oxidierter Fette Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung der Leberlipide festgestellt, die auf eine gestörte Synthese von MUFA und PUFA durch Desaturation und Elongation hinweisen und mit Folgen für die Membraneigenschaften und die Bildung der biologisch aktiven Eicosanoide verbunden sind. Ein wesentliches Ziel der Arbeit war deshalb, den Einfluss oxidierter Diätfette auf die Fettsäurezusammensetzung der Lipide zu untersuchen, um Rückschlüsse auf die Synthese von MUFA und PUFA ziehen zu können.

In den Phospholipiden der Leber zeigte sich nach Fütterung mit oxidierten Fetten, dass mit Ausnahme der Arachidonsäure (20:4n-6) alle n-6-Fettsäuren höher konzentriert und alle n-3-Fettsäuren geringer konzentriert waren als nach der Fütterung mit frischem Fett (Tab. 10, 11, 12/ 3.6.2 ff.). Die Ursache dafür ist bislang unklar. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf einen erhöhten oxidativen Abbau von n-3-Fettsäuren in den Mikrosomen sowie in den Peroxisomen und eine auf eine gesteigerte Synthese von n-6-Fettsäuren:

*Peroxisomale  $\beta$ -Oxidation:* Kürzlich stellten TRAN und CHRISTOPHERSEN (2002) sowie INFANTE et al. (2002) fest, dass bei der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation bevorzugt n-3-Fettsäuren abgebaut werden. Da infolge der oxidierten Diätfette die Thiolase und die ACO (geschwindigkeitsbestimmend) deutlich höher exprimiert wurden (Tab. 6/ 3.4.4, Tab. 7/ 3.4.3), kann ein verstärkter peroxisomaler Abbau von n-3-Fettsäuren eine wesentliche Ursache für die verminderte Konzentration an n-3-Fettsäuren sein.

*Mikrosomale  $\omega$ -Oxidation:* Die mikrosomale  $\omega$ -Oxidation von mittel- und langkettigen Fettsäuren durch Cytochrom P<sub>450</sub>-Enzyme des endoplasmatischen Retikulums ist ein weiterer, wenn auch untergeordneter Reaktionsweg der Fettsäureoxidation. Im Gegensatz zu den meisten P<sub>450</sub> ist die CYP4A-Familie spezialisiert auf die Oxidation von Fettsäuren, die dann als Substrate der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation zur Verfügung stehen (GONZALES 1989, NELSON et al. 1993, REDDY 1994, NGUYEN et al. 1999). Da die Verfütterung der oxidierten Fette in der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit LIN et al. (2001) zu einer deutlichen Erhöhung der Genexpression verschiedener Cytochrom P<sub>450</sub>-Enzyme führte und die Expression von CYP4A1 sogar um den Faktor 14 anstieg (Tab. 7/ 3.4.3), könnte eine erhöhte mikrosomale Fettsäureoxidation für die verminderten n-3-Fettsäuren zumindest mitverantwortlich sein.

*Autoxidation von n-3-Fettsäuren:* In der Literatur werden verminderte Konzentrationen an PUFA in den Membranen im Zusammenhang mit einer angestiegenen Autoxidation von PUFA als Folge der oxidativen Belastung durch oxidierte Diätfette diskutiert (z.B. HAYAM et al. 1993, AMMOUCHE et al. 2002). Vitamin E wird in die Membran eingebaut und schützt diese vor Lipidperoxidation (BURTON und INGOLD 1989, NAMIKI 1990). Da die verminderte Konzentration an n-3-PUFA in den Phospholipiden der vorliegenden Studie nur unwesentlich durch die Vitamin E-Aufnahme der Tiere beeinflusst wurde, dürfte eine Autoxidation für die verminderten Konzentrationen der n-3-Fettsäuren eher von geringer Bedeutung sein.

*Synthese von MUFA und PUFA:* Auch eine veränderte Fettsäuresaturation und -elongation kann die veränderte Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide in der vorliegenden Arbeit erklären:

**Synthese von MUFA und PUFA.** In der Literatur werden Rückschlüsse auf die Synthese von MUFA und PUFA zumeist über die Fettsäurezusammensetzung der Lipide erfasst. Dafür wird der Quotient aus Endprodukt und Ausgangsprodukt der Fettsäuresaturation gebildet.

In der vorliegenden Arbeit war der Quotient aus MUFA und SFA in den Gesamtlipiden, mit dem die  $\Delta 9$ -Desaturation erfasst werden kann (WAHLE und DAVIS 1975), infolge der Fütterung mit oxidierten Fetten nicht verändert (Tab. 10/ 3.6.2).

Für Rückschlüsse auf die  $\Delta 6$ - und  $\Delta 5$ -Desaturation wird in der Literatur die Arachidonsäure (20:4n-6) in den Phospholipiden herangezogen. Es werden also die Quotienten aus den Fettsäuren 20:4-n-6 / 20:3-n-6 sowie 20:4n-6 / 18:2n-6 gebildet (vgl. Abb. 9) (z.B. D'AQUINO et al. 1985, HOCHGRAF et al. 1997).

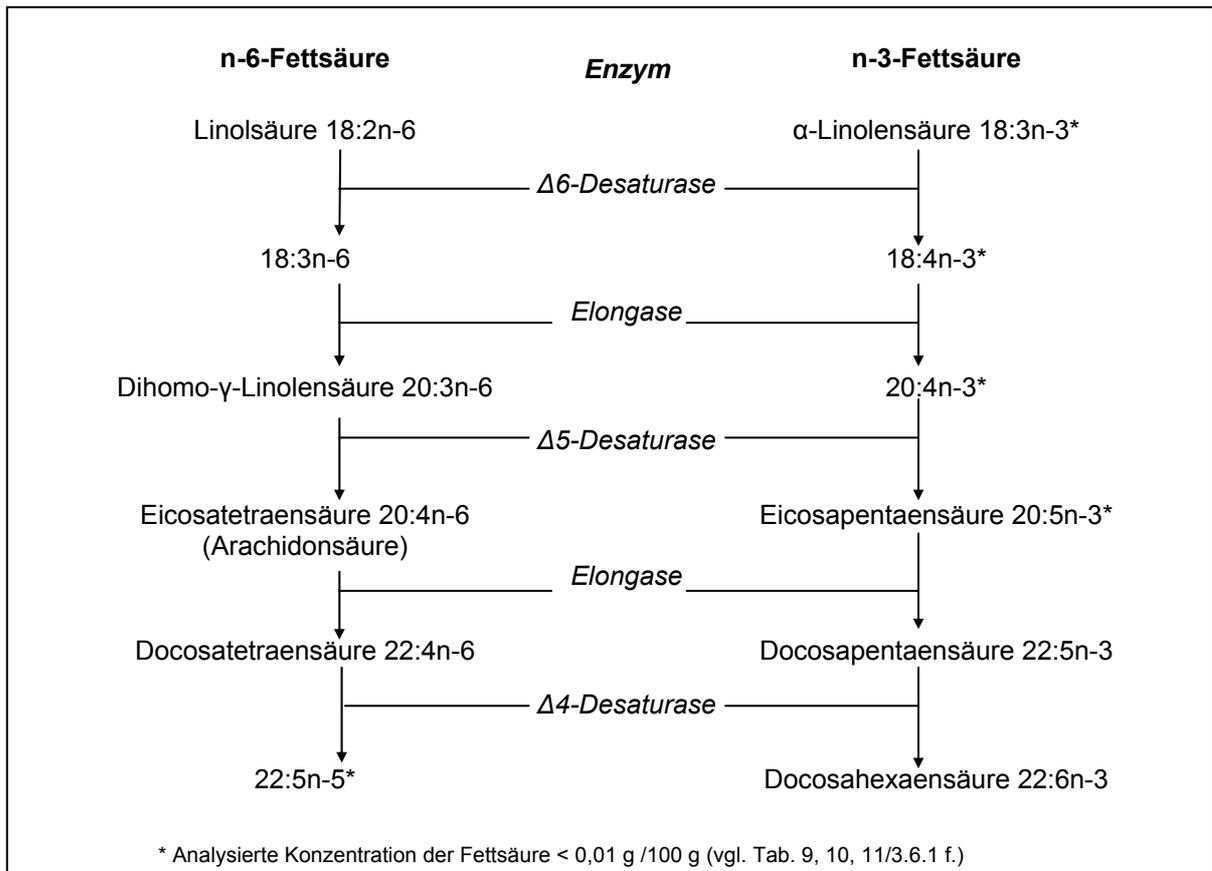


Abbildung 9: Darstellung der wichtigsten Stoffwechselwege zur Desaturation und Elongation von ungesättigten Fettsäuren

Da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf einen verstärkten Abbau der Arachidonsäure hinweisen (siehe unten), wurde die Arachidonsäure nicht in die Quotientenbildung einbezogen. Stattdessen wurden die Quotienten aus den Fettsäuren 20:3n-6 / 18:2n-6 sowie 22:4n-6 / 20:3n-6 berechnet (vgl. Abb. 9). Die Synthese der PUFA wird damit sowohl anhand der Desaturation als auch der Elongation der n-6-Fettsäuren beurteilt.

Die Verfütterung von oxidierten Fetten führte zu einer deutlichen Erhöhung beider Quotienten, sodass auf eine gesteigerte  $\Delta 6$ - und  $\Delta 5$ -Desaturation und Elongation der n-6-Fettsäuren infolge der Verfütterung oxidiertes Fett geschlossen werden kann (Tab. 11, 12/ 3.6.3 f). Auch D'AQUINO et al. (1985), BLANC et al. (1992), LOPEZ-VARELA et al. (1995) und HOCHGRAF et al. (1997) kamen nach Verfütterung oxidiertes Fett zu diesem Schluss.

In dieser Arbeit zeigte sich ein deutlicher Einfluss vom Oxidationsgrad der Diätfette auf die Desaturation und Elongation der Fettsäuren ( $OF_{50^\circ} > OF_{105^\circ} \geq OF_{190^\circ}$ ). Da im  $OF_{50^\circ}$  die Konzentration an primären Oxidationsprodukten am höchsten war, ist anzunehmen, dass diese dabei den größten Einfluss hatten.

Der Quotient der Fettsäurenkonzentrationen aus dem Endprodukt und dem Ausgangsprodukt der  $\Delta 4$ -Desaturation ( $22:6n-3 / 22:5n-3$ ; vgl. Abb. 9) war infolge der Verfütterung oxidierter Fette deutlich kleiner ((Tab. 11, 12/ 3.6.3 f). Dies kann auf die verminderten Konzentrationen an n-3-Fettsäuren (vgl. oben) zurückzuführen sein. Auch eine verminderte  $\Delta 4$ -Desaturation, speziell von n-3-Fettsäuren, ist denkbar: Bei der Desaturation und Elongation konkurrieren die n-6- und n-3-Fettsäuren um die gleichen Enzyme (vgl. Abb. 9). Da die Konzentrationen an n-3-Fettsäuren aber vermindert und die an n-6-Fettsäuren hingegen erhöht waren, könnte die  $\Delta 4$ -Desaturation zum Nachteil der n-3-Fettsäuren verlaufen sein und somit zusätzlich zu den verminderten Konzentrationen an n-3-Fettsäuren in den Phospholipiden der Leber beigetragen haben.

**Eicosanoidsynthese und die Membranfluidität.** Die Verfütterung oxidierter Fette führte zu erhöhten Konzentrationen an n-6- und zu verminderten Konzentrationen an n-3-Fettsäuren in den Leberphospholipiden, sodass anhand der resultierenden Gesamt-PUFA, die keine Veränderungen aufwiesen, keine Rückschlüsse auf die Membranfluidität gezogen werden können. Die erhöhten Konzentrationen an n-6- und die verminderten Konzentrationen an n-3-Fettsäuren sind jedoch von physiologischer Bedeutung für die Synthese der aus den beiden Reihen gebildeten Eicosanoide, da n-6- und n-3-Fettsäuren um die Enzyme der Eicosanoidsynthese konkurrieren und die resultierenden Produkte teilweise gegensätzliche Wirkungen haben (SCHWARTZMANN et al. 1996, NGUYEN 1999).

Da in der vorliegenden Arbeit die Konzentration aller n-6-Fettsäuren, nicht aber die der Arachidonsäure ( $20:4n-6$ ) erhöht war und eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturation wahrscheinlich ist (Tab. 11 - 12/ 3.6.3 ff.), kann vermutet werden, dass die Arachidonsäure verstärkt abgebaut wurde: Arachidonsäure wird über Cytochrome der CYP4A- und CYP4F-Familie zu Eicosanoiden metabolisiert (HELVIG et al. 1998, NGUYEN et al. 1999, KIKUTA et al. 2002): Es zeigte sich in dieser Arbeit, dass die Verfütterung der oxidierten Fette die Expression von Genen der CYP4A1- und CYP4F-Familie deutlich erhöhte ( $n = 5$ , Tab. 7/ 3.4.3). Die aus Arachidonsäure gebildeten Eicosanoide fördern unter anderem Entzündungsvorgänge und bewirken eine PPAR $\alpha$ -Aktivierung (FORMAN et al. 1997, COWART 2002).

Aufgrund der Konkurrenz der Fettsäuren in der Eicosanoidsynthese würden dann weniger Eicosanoide aus der Eicosapentaensäure gebildet werden, was sich, wie auch verminderte Konzentrationen von n-3-Fettsäuren (vgl. oben), negativ auf die Membranfluidität und die membranständigen Enzyme auswirken kann (BRENNER 1989, HAYAM et al. 1993, HOCHGRAF et al. 1997). Dass die Verfütterung der oxidierten Fette in dieser Studie die

Membranfluidität verminderte, kann aus dem erhöhten Quotienten der Konzentrationen von Gesamt-Phospholipiden zum Cholesterin der Leber, aus der geringeren Anzahl an Doppelbindungen einer mittleren Fettsäure in den Phospholipiden (Doppelbindungsindizes, Tab. 11, 12/ 3.6.3 f., SHINITZKI 1984) sowie aus der erhöhten Genexpression der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase (Tab. 14/ 3.7) geschlossen werden. HAYAM et al. (1993) stellten im Zusammenhang mit der Verfütterung von oxidierten Fetten eine verminderte Membranfluidität fest und wiesen eine angestiegene Aktivität der membranständigen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase als Kompensationsmechanismus zur Aufrechterhaltung der Membranfluidität nach. Da auch die Desaturasen und Elongasen membranständige Enzyme sind, kann die erhöhte Desaturation/Elongation, die sich aus den Fettsäurenquotienten ableiten lässt (vgl. oben), zu den erhöhten Konzentrationen von n-6-Fettsäuren in den Phospholipiden geführt haben und als Kompensationsmechanismus zur Aufrechterhaltung der Membranfluidität interpretiert werden.

#### **4.6.3 $\Delta 9$ -, $\Delta 6$ - und $\Delta 5$ -Desaturase**

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die sich aus der Fettsäurezusammensetzung der Leberlipide für die Desaturation von MUFA und PUFA ableiten ließen (4.6.2), erhöhte die Fütterung mit oxidierten Fetten die Genexpression von  $\Delta 6$ - und  $\Delta 5$ -Desaturase, während die Genexpression der  $\Delta 9$ -Desaturase unbeeinflusst blieb (Tab. 13/ 3.6.5). Die erhöhten Konzentrationen an n-6-Fettsäuren in den Phospholipiden, die nach der Verfütterung der oxidierten Fette festgestellt wurden (Tab. 11, 12/ 3.6.3 f.), können also auf eine erhöhte Genexpression der  $\Delta 6$ - und  $\Delta 5$ -Desaturase zurückzuführen sein.

Dass bei der Beurteilung der Desaturation anhand der Fettsäurezusammensetzung der Leberlipide ein deutlicher Einfluss vom Oxidationsgrad der Fette festgestellt wurde, bei der Genexpression der Desaturasen hingegen nicht, kann ein Hinweis darauf sein, dass die Genexpression und die Enzymaktivität der Desaturasen durch oxidierte Fette in unterschiedlicher Intensität beeinflusst wurde. Auch MANABU et al. (2000) und RODRÍGUEZ et al. (2001) stellten einen unterschiedlich starken Einfluss von Peroxisomenproliferatoren, zu denen auch oxidierte Fette zählen (4.4.4), auf die Genexpression und Enzymaktivität der Desaturasen fest. Unter diesen Umständen könnten primäre LPOP stärker als sekundäre LPOP auf die Desaturation von Fettsäuren gewirkt haben, obwohl sie sich in der Erhöhung der Genexpression glichen (vgl. 4.6.2).

Aus der Literatur sind bislang keine Ergebnisse zum Einfluss oxidiertes Diätfette auf die Genexpression der Desaturasen bekannt. Die erhöhte Genexpression der  $\Delta 6$ - und  $\Delta 5$ -Desaturase, die nach Verfütterung oxidiertes Diätfette festgestellt wurde, kann als Kompensationsmechanismus für die verminderte Membranfluidität infolge des verstärkten Abbaus von n-3-Fettsäuren verstanden werden (vgl. 4.6.2). Zusätzlich kann dabei auch ein Zusammenhang zur Aktivierung des PPAR $\alpha$  durch die Verfütterung der oxidierten Fette bestehen, denn auch

ALEGRET et al. (1995), DICZFALUSY et al. (1995), MILLER und NTAMBI (1996), MADSEN et al. (1997), MANABU (2000), RODRIGUEZ et al. (2001) sowie SONG et al. (2002) stellten eine erhöhte Genexpression der Desaturasen durch verschiedene PPAR $\alpha$ -Aktivatoren fest.

Die molekularen Mechanismen der Regulation der Desaturasen sind jedoch unklar, insbesondere da neuere Untersuchungen zeigten (z.B. MATSUZAKA et al. 2002), dass die Desaturasen neben einem aktivierten PPAR $\alpha$  auch durch das aktivierte SREBP-1 verstärkt exprimiert werden und PPAR $\alpha$  und SREBP-1 aber prinzipiell in gegensätzliche Funktionen involviert sind. Der Nachweis für eine direkte Bindung der beiden Rezeptoren an die Gene von  $\Delta 6$ - und  $\Delta 5$ -Desaturase steht jedoch noch aus (RODRÍGUEZ et al. 2001, NAKAMURA und NARA 2002, SONG et al. 2002).

#### 4.7 Einfluss eines oxidierten Fettes auf die Expression hepatischer Gene

Um Hinweisen nachzugehen, dass die Verfütterung von oxidierten Fetten nicht nur das antioxidative Schutzsystem und den Lipidstoffwechsel beeinflusst (BIRD et al. 1981, HAGEMANN et al. 1991, EDER und KIRCHGESSNER 1998a, QUILES et al. 2002), wurde eine Expressionsanalyse mit mRNA der Leber durchgeführt, da die Leber das zentrale Organ im Stoffwechsel ist.

Da Expressionsanalysen mittels cDNA-Array erst seit kurzem angewendet werden, finden sich in der Literatur nur wenige Hinweise zur Bewertung der so gewonnenen Daten. Insgesamt wird die Empfindlichkeit dieser Methode als geringer eingeschätzt als zum Beispiel die der RTD-PCR (YANG und SPEED 2002, TOM DIECK et al. 2003). Andererseits wurden bei Untersuchungen mit cDNA-Arrays die Anzahl der veränderten Gene unterschätzt (bei willkürlich festlegten Faktor als Schwellenwert für das Signalverhältnis von Behandlungs- und Kontrollgruppe von  $\geq 1,6$ ) (TANIGUCHI et al. 2001, TOM DIECK et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Auswertung der Array-Daten wie in der Literatur üblich anhand eines Faktors als Schwellenwert für das Signalverhältnis von Behandlungs- und Kontrollgruppe. Um möglichst viele Expressionsveränderungen zu erfassen, wurde ein Faktor von  $\geq 1,4$  gewählt. Als zusätzliches Qualitätskriterium wurde die Differenz der Expressionssignale angegeben, da auch schwache Signale zu entsprechend großen Faktoren führen können, die dann aber durch eine geringe Signaldifferenz gekennzeichnet sind (vgl. 2.4.6). Aufgrund des technisch aufwendigen Verfahrens der Expressionsanalyse mittels cDNA-Array sind die Untersuchungen zumeist auf ein Array pro Gruppe beschränkt. In der vorliegenden Studie wurden das Array-Experiment auf die Untersuchung der Gruppe mit dem Diätfett OF50°C begrenzt, dafür wurden jedoch drei Arrays pro Gruppe angefertigt, um die gewonnenen Daten zusätzlich statistisch auswerten zu können. So konnten mögliche Einflüsse der Behandlungsfaktoren mittels zweifaktorieller Varianzanalyse statistisch abgesichert werden. Hinsichtlich der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit einer geringen Anzahl von Beobachtungen ( $n = 3$ ) ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse häufiger mit einer hohen Standardabweichung verbunden sind als bei einer hohen Zahl an Beobachtungen, was den Nachweis eines signifikanten Einflusses eines Behandlungsfaktors erschwert.

Es zeigte sich, dass die Fütterung mit OF50°C die Expression einer Reihe von Genen erhöhte, die Proteine mit Funktionen im Xenobiotikastoffwechsel kodieren. Bereits HUANG et al. (1988) stellten fest, dass oxidiertes Diätfett die Enzymaktivität mikrosomaler Enzyme erhöht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass oxidiertes Diätfett bereits auf der Transkriptionsebene zu einer erhöhten Biotransformation von Xenobiotika geführt hat. Biotransformationsreaktionen schützen vor Zellschäden, indem Xenobiotika in wasser-

löslichere und dadurch besser ausscheidbare Metaboliten umgewandelt werden. Die meisten veränderten Gene des Xenobiotikametabolismus (Tab. 14, 3.7) haben eine große Substratbreite, wie die CYP-Enzyme (Oxidationsreaktionen; SOUČEK und GUT 1992) und die Alkoholdehydrogenase (Abbau von Carbonylverbindungen, PLAPP 1994), sodass keine Rückschlüsse auf spezielle LPOP als Auslöser für die Effekte möglich sind.

Gruppen mit oxidiertem Diätfett wiesen eine höhere Expression von verschiedenen Glutathion-S-Transferasen (GST) und der Glutathion-Peroxidase auf. Bei der GST5-5 wurde ein signifikanter Einfluss des Diätfettes in Interaktion mit der Vitamin E-Konzentration der Diät festgestellt. Diese Veränderungen deuten auf Veränderungen im Redoxsystem des multifunktionellen endogenen Antioxidans Glutathion. Eine höhere Expression von Glutathion-S-Transferasen und Glutathion-Peroxidase weisen auf oxidativen Stress durch reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) hin (CHASSEAUD 1979).

Eine verstärkte ROS-Bildung kann auch durch die Aktivierung des PPAR $\alpha$  verursacht worden sein (4.4.4). Die Aktivierung des PPAR $\alpha$  führt zur Proliferation von Peroxisomen, deren Enzyme am oxidativen Abbau von PUFA, Eicosanoiden und Xenobiotika beteiligt sind (ISSEMANN und GREEN 1990). Neben den peroxisomalen Enzymen werden durch PPAR $\alpha$  auch Enzyme des mitochondrialen und mikrosomalen Abbauwegs aktiviert (HAWKINS et al. 1987), wobei ebenfalls ROS entstehen (PALUT 1997, DESVERGNE und WAHLI 1999). In der vorliegenden Arbeit erhöhte die Verfütterung des oxidierten Fettes die Genexpression von peroxisomalen, mitochondrialen und mikrosomalen Enzymen, was auf eine erhöhte ROS-Entstehung hinweist (Tab. 7, 3.4.3). Die Fütterung mit oxidiertem Fett aktivierte außerdem die Genexpression verschiedener Cytochrom P<sub>450</sub>-Enzyme (Tab. 14, 3.7), die nicht zu den Zielgenen des PPAR $\alpha$  zählen (GONZALEZ et al. 1991, SINGELTON et al. 1998), aber ebenfalls zur Bildung von ROS beitragen (ALBANO et al. 1996).

Die durch oxidiertes Diätfett signifikant erhöhte Transkription von proteasomalen und lysosomalen Enzymen (Cathepsine) (Tab. 14, 3.7) sind ein Indikator für eine gesteigerte Kapazität der Zelle zum Schutz vor toxischen Effekten durch ROS. Proteasomale und lysosomale Enzyme sind am Abbau von oxidierten Proteinen beteiligt, die zu irreversiblen Membranschäden führen können (GRUNE et al. 2003). Die signifikant erhöhte Expression von Cathepsin B, die infolge der Verfütterung des oxidierten Fettes festgestellt wurde, steht jedoch auch im Zusammenhang mit einer erhöhten Zellproliferierung (WERNEBURG et al. 2002). Studien von PETERS et al. (1997a) und CATTLEY (2003) zeigten, dass eine Langzeitbehandlung mit Peroxisomenproliferatoren zur erhöhten Zellproliferation führt, indem die Balance zwischen Mitose und Apoptose zugunsten der Mitose beeinflusst wird.

Im Zusammenhang mit mitogenen Effekten wird auch die erhöhte Expression von einigen CYP-Enzymen, vor allem von CYP3A, vom Inhibitor der Metalloproteinase 2 (TIMP 2) und von Guanin-Nukleotid-bindenden-Proteinen (G-Proteine) diskutiert (ROEB et al. 1997, ARTHUR 1998, LAKE et al. 1998). Da die Fütterung mit oxidierten Fetten in der vorliegenden Studie

signifikant zu einer Peroxisomenproliferation (4.4.4), erhöhten Expressionen von CYP- und CYP3A-Enzymen, TIMP 2 und G-Proteinen führte (Tab. 14, 3.7), sind mitogene Effekte durch oxidiertes Diätfett nicht auszuschließen.

Es wird vermutet, dass die Erhöhung von peroxisomalen, mitochondrialen und mikrosomalen Enzymaktivitäten in der Leber über die entstandenen ROS und Wasserstoffperoxid genotoxisch wirkt (SUNSETH 1992, PETERS et al. 1997a, HOLDEN und TUGWOOD 1999, YELDANDI et al. 2000). Da Genexpressionen dieser Enzyme infolge oxidierter Diätfette signifikant erhöht war (Tab. 7/ 3.4.3) und die Expression des Amphotericin, das an Reparaturprozessen beteiligt ist (NAGAKI et al. 1992), signifikant vermindert war (Tab. 14, 3.7), ist auch eine genotoxische Wirkung von oxidiertem Diätfett nicht auszuschließen.

Neben den Genen des Xenobiotikametabolismus, des endogenen antioxidativen Schutzsystems und Genen, die im Zusammenhang mit mitogenen und genotoxischen Effekten stehen, wurden noch weitere Gene verändert exprimiert: Die infolge der Fütterung mit oxidiertem Fett signifikant verminderte Expression der DNA-bindenden-Protein-Inhibitoren Id-2 und Id-3 weist auf einen Einfluss auf die Immunantwort (PAN et al. 1999) durch die Verfütterung des oxidierten Fettes und kann im Zusammenhang mit einer verstärkten Eicosanoidbildung (vgl. 4.4.4 und 4.6.2) und verstärkten entzündlichen Reaktionen stehen (ADAM 1995). Die signifikant verminderte Genexpression von verschiedenen ribosomalen Proteinen durch oxidiertes Diätfett deutet auf eine beeinträchtigte Proteinbiosynthese.

Die in der vorliegenden Arbeit mittels cDNA-Array gefundenen Ergebnisse stellen einen ersten Überblick über den Einfluss oxidierter Diätfette auf die Expression hepatischer Gene dar. Die Aufnahme von oxidiertem Diätfett führte unabhängig von der Vitamin E-Konzentration der Diät zu einer signifikanten Beeinflussung der Expression von Genen im Lipid- und Protein- und im Xenobiotikastoffwechsel und beeinflusst auch die Genexpression verschiedener intrazellulärer Effektoren, Aktivatoren und Repressoren signifikant. Die Ergebnisse zeigen auch, dass einige Effekte des Diätfetts durch eine erhöhte Vitamin E-Konzentration vermindert wurden und deshalb in Zusammenhang mit einer erhöhten oxidativen Belastung durch oxidiertes Diätfett stehen könnten. Außerdem wurde festgestellt, dass die Expression einiger Gene durch die Vitamin E-Konzentration der Diät und unabhängig vom Diätfett beeinflusst wurde (Tab. 14, 3.7). Aufgrund der verhältnismäßig geringen Empfindlichkeit der Methode sollten diese Ergebnisse jedoch in weiteren Untersuchungen verifiziert werden (siehe oben).

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Thermisch behandelte Fette enthalten primäre und sekundäre Lipidperoxidationsprodukte (LPOP), die in Abhängigkeit ihrer Konzentration die physiologischen Eigenschaften von Fetten beeinflussen. Aus vorangegangenen Untersuchungen mit verschiedenen Tierspezies ist bekannt, dass durch die Verfütterung von thermisch oxidierten Fetten neben dem antioxidativen Schutzsystem auch der Lipidstoffwechsel beeinflusst wird. Nach der Verfütterung von oxidierten Fetten wurden verminderte Triglyceridkonzentrationen in den Geweben und eine veränderte Fettsäurezusammensetzung der Leberlipide festgestellt. Die Wirkmechanismen dafür sind bislang nicht geklärt. Unklar ist auch die Bedeutung der Konzentrationen an primären und sekundären LPOP für die Wirkungen oxidiertes Diätfette.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Wirkungen und Wirkmechanismen von moderat oxidierten Diätfetten in Abhängigkeit der Konzentrationen an primären und sekundären LPOP auf den Lipidstoffwechsel zu untersuchen. Es wurde der Frage nachgegangen, ob die durch oxidierte Diätfette verminderten Triglyceridkonzentrationen die Folge einer verminderten Liponeogenese oder auch die Folge einer gesteigerten Lipolyse sind und ob oxidierte Diätfette die Liponeogenese und die Lipolyse bereits auf der Ebene der Genexpression beeinflussen können. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob die Verfütterung oxidiertes Fette zu einer Aktivierung des Peroxisomenproliferation-aktivierenden Rezeptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) in der Leber führt, der die Genexpression einiger lipolytischer Enzyme reguliert. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob die durch oxidierte Diätfette veränderte Fettsäurezusammensetzung der Leberlipide die Folge einer veränderten Fettsäuredesaturation sein kann. Außerdem wurde untersucht, ob oxidiertes Diätfett neben dem Lipidstoffwechsel auch den Stoffwechsel weiterer Metabolite in der Leber auf der Transkriptionsebene beeinflussen kann. Um festzustellen, ob die erfassten Wirkungen durch LPOP oder durch eine oxidative Belastung verursacht werden, wurde die Vitamin E-Konzentration der Diät variiert.

Es wurde ein Fütterungsversuch mit 80 wachsenden, männlichen SPRAGUE-DAWLEY Ratten durchgeführt, die über 9 Wochen eine semisynthetische Diät erhielten, deren Diätfett und Vitamin E-Konzentration variiert wurde. Die Diäten enthielten entweder 25 mg oder 250 mg  $\alpha$ -Tocopheroläquivalente/kg. Der Fettanteil der Diät betrug 10% und bestand aus einem Sonnenblumenöl-Schweineschmalzgemisch (50:50, m/m), das entweder frisch (FF) oder durch Wärmezufuhr mäßig oxidiert (OF) war.

Um oxidierte Diätfette mit einem hohen mittleren und niedrigen Gehalt an primären LPOP zu erzeugen (Oxidationsgrad) erfolgte die Oxidation des Fettgemisches bei 50°C für 63 Tage [OF50°C], bei 105°C für 81 Stunden [OF105°C] oder bei 190°C für 24 Stunden [OF190°C]. Die in den Diätfetten entstandenen LPOP wurden durch verschiedene Fettkennzahlen erfasst: Primäre LPOP wurden neben der Peroxidzahl über die Konzentrationen an konjugierten Dienen und an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen bestimmt. Für die Ermittlung der sekundären LPOP wurden die Konzentrationen an polaren Verbindungen und an Gesamt-Carbonylen analysiert. Durch die unterschiedliche thermische Behandlung wurden oxidierte Diätfette mit einer hohen [OF50°C], mittleren [OF105°C] und niedrigen [OF190°C] Konzentration an primären LPOP erzeugt (Peroxidzahl: 804, 150 und 3,5 mEq O<sub>2</sub>/kg).

Um Sekundäreffekte infolge einer unterschiedlichen Fettsäurezusammensetzung und einer unterschiedlichen  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration von frischem im Vergleich zu oxidiertem Diätfett zu vermeiden, wurde die Fettsäurezusammensetzung und die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration der Diätfette angeglichen. Zur Gewährleistung einer einheitlichen Futteraufnahme wurde ein restriktives Fütterungssystem angewendet.

Es wurde die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in Plasma, Leber, Abdominalfett und Kot und die Triglyceridkonzentration in Plasma, Lipoproteinen und Leber analysiert. Für die Beurteilung der Liponeogenese erfolgte die Bestimmung der relativen mRNA-Konzentration und der Aktivität der lipogenen Enzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) und Fettsäure-Synthase (FSS) in der Leber. Für die Beurteilung der Lipolyse wurde die Genexpression von lipolytischen Enzymen in der Leber ermittelt. Als Markergen für die Peroxisomenproliferation wurde die mRNA-Konzentration an Acyl-CoA-Oxidase (ACO) in der Leber analysiert.

Die Fettsäurezusammensetzung der Gesamt- und Phospholipide der Leber wurde erfasst, um Rückschlüsse auf den Fettsäurestoffwechsel, die Eicosanoidbildung und die Membranfluidität ziehen zu können. Für die Beurteilung der Synthese von ungesättigten Fettsäuren wurde die Genexpression der  $\Delta$ 9-,  $\Delta$ 6- und  $\Delta$ 5-Desaturasen in der Leber bestimmt. Außerdem wurde ein Expressionsprofil von Genen der Leber mittels cDNA-Array erstellt.

Die Lebendmassezunahme war bei den Tieren mit oxidierten Diätfetten und geringer Vitamin E-Konzentration der Diät unabhängig vom Oxidationsgrad der Fette etwas niedriger als bei Tieren mit frischem Diätfett. Da das Gewichtsdefizit bei der höheren Vitamin E-Konzentration der Diät ausgeglichen wurde, kann der Effekt als Folge einer erhöhten oxidativen Belastung interpretiert werden. Die Verfütterung oxidiertes Fette verminderte die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in der Leber und im Abdominalfett. Da die Fütterung mit OF190°C die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in der Leber stärker verminderte als die Fütterung mit OF50°C, sind vermutlich neben primären LPOP, die in OF50°C höher konzentriert waren als in OF190°C, insbesondere sekundäre LPOP an der Verminderung des Vitamin E-Status beteiligt.

Die Verfütterung der drei oxidierten Fette führte im Vergleich zu frischem Diätfett neben verminderten Triglyceridkonzentrationen in Plasma, VLDL und Leber auch zu verminderten Aktivitäten und zu verminderten mRNA-Konzentrationen der lipogenen Enzyme. Dabei wurden die Enzymaktivitäten, nicht jedoch die mRNA-Konzentrationen durch OF50°C und OF105°C stärker vermindert als durch OF190°C. Die Genexpression lipolytischer Enzyme, insbesondere der mitochondrialen, peroxisomalen und mikrosomalen Fettsäureoxidation war bei Tieren mit oxidiertem Diätfett höher als bei Tieren mit frischem Fett. Die Verfütterung der drei oxidierten Fette führte unabhängig vom Oxidationsgrad des Fettes zu einer höheren mRNA-Konzentration an ACO als die Verfütterung von frischem Fett, wodurch die Aktivierung des PPAR $\alpha$  durch oxidierte Fette nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse zeigen, dass die durch oxidierte Diätfette verminderten Triglyceridkonzentrationen die Folge einer verminderten Liponeogenese sind und auch die Folge einer erhöhten Lipolyse sein können. Oxidierte Fette beeinflussen die Lipogenese und die Lipolyse bereits auf der Transkriptionsebene. Als eine Ursache für die erhöhte Lipolyse wurde die Aktivierung des PPAR $\alpha$  nachgewiesen.

Die Verfütterung der oxidierten Fette führte zu einer veränderten Fettsäurezusammensetzung der Leberlipide: Mit Ausnahme der Arachidonsäure (20:4n-6) waren die Konzentrationen aller n-6-Fettsäuren höher, während die Konzentrationen aller n-3-Fettsäuren geringer waren als nach der Verfütterung von frischem Fett. Die Effekte waren zumeist bei OF50°C deutlicher als bei OF105°C und OF190°C. Tiere mit oxidiertem Diätfett wiesen ein höheres Phospholipid-Cholesterin-Verhältnis, einen geringeren Doppelbindungsindex der Fettsäuren der Phospholipide sowie eine erhöhte Genexpression der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase auf als Tiere mit frischem Diätfett, woraus auf eine verminderte Membranfluidität geschlossen werden kann. Die Quotienten der Fettsäuren aus den Ausgangs- und Endprodukten der  $\Delta$ 6- und  $\Delta$ 5-, nicht aber der  $\Delta$ 9-Desaturation und Elongation waren bei Tieren mit oxidierten Diätfetten höher als bei Tieren mit frischem Diätfett und weisen auf eine erhöhte Synthese von n-6-Fettsäuren durch oxidiertes Diätfett. Im Vergleich zu Tieren mit frischem Diätfett hatten Tiere mit oxidierten Diätfetten unabhängig vom Oxidationsgrad des Fettes eine höhere mRNA-Konzentration von  $\Delta$ 6- und  $\Delta$ 5- Desaturase, während die mRNA-Konzentration der  $\Delta$ 9-Desaturase nicht beeinflusst wurde.

Die Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass die verminderte Konzentration an n-3-Fettsäuren in den Leberphospholipiden nach Fütterung mit oxidierten Fetten durch die verstärkte Expression von Enzymen des peroxisomalen Fettsäureabbaus verursacht worden ist, während die erhöhte Konzentration an n-6-Fettsäuren die Folge einer gesteigerten Desaturation ist und als Kompensationsmechanismus zum verstärkten Abbau der n-3-Fettsäuren und zur Wiederherstellung der durch oxidiertes Diätfett verminderten Membranfluidität interpretiert werden kann. Die erhöhte Expression der mikrosomalen Cytochrome der 4A- und 4F-Enzyme nach Fütterung mit oxidiertem Fett deuten auf eine verstärkte Oxidation

der Arachidonsäure zu Eicosanoiden, die wiederum die Membranfluidität vermindern, entzündungsfördernd wirken und auch PPAR $\alpha$  aktivieren.

Die Wirkungen der oxidierten Diätfette auf die untersuchten Parameter des Lipidstoffwechsels waren weitgehend unabhängig von der Vitamin E-Konzentration der Diät. Daraus lässt sich folgern, dass die festgestellten Wirkungen nicht durch eine erhöhte Lipidperoxidation infolge einer erhöhten oxidativen Belastung durch oxidierte Diätfette verursacht wurden. Vielmehr ist anzunehmen, dass die Wirkungen durch bestimmte LPOP verursacht wurden, die als Signalmoleküle gezielt über nukleare Rezeptoren wie, zum Beispiel PPAR $\alpha$ , die Genexpression regulieren. Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass oxidierte Diätfette den PPAR $\alpha$  aktivieren. Die Ergebnisse lassen zudem vermuten, dass PPAR $\alpha$  ein bedeutender Mediator der Wirkungen oxidiertes Diätfette auf den Stoffwechsel ist, da nicht nur Gene der Lipolyse reguliert wurden. In der Literatur werden im Zusammenhang mit einer PPAR $\alpha$ -Aktivierung auch verminderte Expressionen lipogener Enzyme, und veränderte Expressionen von Genen mit mitogenen, genotoxischen und immunologischen Effekten diskutiert, die auch in dieser Arbeit nach Verfütterung oxidiertes Fette festgestellt wurden. Die Ergebnisse weisen aber auch darauf hin, dass bestimmte LPOP unabhängig von der Genexpression direkt die Aktivität der Enzyme beeinflussen können: Das OF50°C, das hohe Konzentrationen an primären Oxidationsprodukten enthielt, hatte einen stärkeren Effekt auf die Aktivitäten, nicht aber auf die Genexpressionen lipogener Enzyme und übte einen stärkeren Effekt auf die Desaturationsprodukte, nicht aber auf die Genexpression der Desaturasen aus als OF190°C, das niedrige Konzentrationen an primären LPOP aufwies.

Die in der vorliegenden Arbeit mittels cDNA-Array gefundenen Ergebnisse stellen einen ersten Überblick über den Einfluss oxidiertes Diätfette auf die Expression hepatischer Gene dar. Es wurde festgestellt, dass die Aufnahme von oxidiertes Diätfett unabhängig von der Vitamin E-Konzentration der Diät zu einer signifikanten Beeinflussung der Expression von Genen im Lipid- Protein- und Xenobiotikastoffwechsel führt und die Expression von Genen beeinflusst, die im Zusammenhang mit mitogenen, genotoxischen und immunologischen Effekten stehen. Die Ergebnisse zeigen auch, dass einige Effekte des Diätfetts durch eine erhöhte Vitamin E-Konzentration vermindert wurden und deshalb in Zusammenhang mit einer erhöhten oxidativen Belastung durch oxidiertes Diätfett stehen können. Außerdem wurde festgestellt, dass die Expression einiger Gene durch die Vitamin E-Konzentration der Diät und unabhängig vom Diätfett beeinflusst wurde. Aufgrund des semiquantitativen Charakters der cDNA-Array-Methode sollten die Ergebnisse in weiteren Untersuchungen verifiziert werden.

## 5 SUMMARY

Thermally oxidized fats containing primary and secondary lipid peroxidation products (LPOP) which are known to affect the physiological properties of dietary fats. Former studies in animals demonstrated, that besides the antioxidant defence system, feeding diets with oxidized fats affected also the metabolism of lipids: the concentration of triglycerides in plasma, very low-density lipoproteins (VLDL) and liver was lowered and the fatty acid composition of liver lipids was changed. The mechanism by which oxidized fats act is not fully understood as yet. Also unclear is the meaning of primary and secondary LPOP in exertion these effects.

This study was undertaken to investigate effects of moderate oxidized dietary fats on lipid metabolism in dependence on the concentration in primary and secondary LPOP. A main objective was to examine whether the lipid-lowering effects of oxidized dietary fats are caused by a reduced liponeogenesis or also by an increased lipolysis and whether these effects might be triggered by a change in gene expression. Moreover it was to examine whether feeding oxidized fats leads to an activation of the peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) in liver. PPAR $\alpha$  regulates gene expression of several lipolytic enzymes. Furthermore it was to investigate whether the changes in fatty acid composition of liver lipids after feeding oxidized fat are due to a change in the desaturation of fatty acids. Besides the effects on lipid metabolism, it was intended to find out whether feeding oxidized fat might exert further effects of on hepatic gene expression. To establish whether the effects are attributed to LPOP or to an increase of oxidative strain, the concentration in vitamin E of the diet was varied.

An experiment with 80 growing male SPRAGUE-DAWLEY rats was carried out over a period of 9 weeks. Animals were fed semi synthetic diets differed in dietary fat (fresh [FF] vs. thermally oxidized [OF] and dietary vitamin E concentration (25 mg vs. 250 mg  $\alpha$ -tocopherol equivalents/ kg). The dietary fat (10% per diet) consisted in a mixture of sunflower oil and lard (50:50, w/w). To investigate the effects of dietary oxidized fats containing high, medium or low concentrations in primary LPOP (degree of oxidation) dietary fat was prepared under three different conditions: by heating at temperatures of 50°C over 6 weeks [OF50°C], at 105°C over 81 hours [OF105°C] or at 190°C over 24 hours [OF190°C]. Peroxide value, concentrations of thiobarbituric acid reactive substances and conjugated dienes were considered as parameters of primary LPOP. Concentrations in carbonyls and polar compounds were analysed to record secondary LPOP. Due to the different thermally

oxidation, fats contained high, medium or low concentrations of primary LPOP (peroxide values: 804, 150 und 3.5 mEq O<sub>2</sub>/kg).

To avoid secondary effects due to differences in fatty acid composition and in concentration of vitamin E between oxidized and fresh dietary fat, diets were equalized in fatty acid composition as well as in concentration of vitamin E. To achieve uniformity in diet consumption between animals with fresh or oxidized dietary fat, a restrictive feeding system was carried out.

Concentration of  $\alpha$ -tocopherol in plasma, liver abdominal fat and feces and concentration of triglycerides in plasma, lipoproteins and liver were analyzed. To investigate liponeogenesis, relative mRNA concentrations and activities of fatty acid synthase (FAS) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) in liver were examined. To investigate lipolysis, gene expression of several lipolytic enzymes in liver was determined. Expression of acyl CoA oxidase (ACO) was analyzed as a markergene for peroxisome proliferation.

To draw conclusion about metabolism of fatty acid, synthesis of eicosanoids and fluidity of membrane, the fatty acid composition of lipids and phospholipids of liver was analyzed. To assess the synthesis of unsaturated fatty acids mRNA-concentration of  $\Delta 9$ ,  $\Delta 6$  and  $\Delta 5$ -desaturases was determined. Besides, an expression profile of hepatic genes was carried out.

The body weight gain of animals received oxidized fat and low dietary vitamin E was slightly lower than of animals received fresh fat. Because animals with a high intake of Vitamin E did not show these differences, the effect might be caused by an increased oxidative strain due to feeding oxidized fats. Feeding the tree oxidized fats lowered concentration of  $\alpha$ -tocopherol in liver and abdominal fat. Since feeding OF190°C lowered the concentration of  $\alpha$ -tocopherol in liver more than feeding OF50°C, primary LPOP, witch were concentrated high in OF50°C are probably not mainly responsible for lowering the concentration of  $\alpha$ -tocopherol in liver but secondary LPOP.

Feeding the tree oxidized fats led to reduced concentrations of triglycerides in plasma, VLDL and liver and to reduced concentrations of mRNA and activities of FAS and G6PDH compared to fresh fat. Activities but not mRNA concentrations of G6PDH and FAS were lower in animals fed with OF50°C and OF105°C compared to animals fed with OF190°C. Gene expression of lipolytic enzymes, especially of enzymes involved in mitochondrial, peroxisomal and microsomal fatty acid oxidation was higher after feeding oxidized fat compared to fresh fat. Moreover all three oxidized dietary fats led to an increased gene expression of ACO compared to fresh fat, through which an activation of PPAR $\alpha$  was indirectly proofed.

Results show that the reduced triglyceride concentrations in plasma and liver are due to an impaired liponeogenesis and can also be due to an increased lipolysis. Oxidized fats affect lipogenesis and lipolysis at the level of transcription. As one trigger for increased lipolysis after feeding oxidized fats, the activation of PPAR $\alpha$  was detected.

Feeding oxidized fats changed fatty acid concentration of lipids in liver: In animals with dietary oxidized fat – excepting arachidonic acid (20:4n-6) – concentrations of n-6-fatty acids were increased whereas concentrations of n-3-fatty acids were decreased compared to feeding fresh fat. The effects were stronger at OF50°C than at OF105°C or at OF190°C.

Animals whose diet contained oxidized fat had higher concentration of phospholipids, a lower double bound index of fatty acids and an increased expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase than rats, whose diet contained fresh fat. These changes indicate a decrease in membrane fluidity due to dietary oxidized fat. The ratio of fatty acids representing end and start product of Δ6- and Δ5- but not Δ9-desaturation and elongation were higher in animals fed oxidized fat than in animals fed fresh fat and indicate an increase in synthesis of PUFA. Compared to animals fed fresh fat animals fed oxidized fat had, independent of the degree of oxidation, higher mRNA concentrations of Δ6- and Δ5-desaturases, whereas mRNA concentration of Δ9-desaturases was not changed.

Results indicate, that lower concentrations of n-3 fatty acids after feeding oxidized fats were a consequence of an increased expression of genes encoding proteins involved in fatty acid oxidation, whereas higher concentrations of n-6 fatty acids were a consequence of increased fatty acid desaturation and might be understood as mechanism to compensate increased oxidation of n-3 fatty acid and to maintain membrane fluidity. The increased expression of microsomal cytochrome 4A and 4F in animals fed oxidized fats indicates an increased oxidation of arachidonic acid to eicosanoids, which are able to reduce membrane fluidity, promote inflammation and activate PPARα.

The effects of dietary oxidized fats on examined parameters of lipid metabolism were largely independent of the dietary vitamin E concentration. So it is to conclude, that the effects were not caused by increased lipid peroxidation due to increased oxidative strain. Rather it is to suppose, that dietary oxidized fat act through certain LPOP right above nuclear receptors like PPARα, which regulates gene expression. Altogether the results of this study lead to supposition, that PPARα is an important mediator of the effects of dietary oxidized fat on metabolism, because not only gene expression of lipolysis was regulated. The changed expression of lipogenic, mitogenic, genotoxic and inflammatory genes, found in this study are discussed in literature in connection with activation of PPARα. But results leading as well to supposition, that certain LPOP influence directly the activities of enzymes: After feeding of OF50°C, containing high concentration of primary LPOP, activities of lipogenic enzymes were decreased more than its gene expression and products of desaturation were higher than gene expression of responsible desaturases compared to feeding with OF190°C which contained high concentrations of primary LPOP.

The Results received by cDNA array representing a very first overview of the effects on hepatic gene expression by feeding oxidized fats. It was found, that dietary oxidized fat led - independent of dietary concentration of vitamin E - to significant changes of the expression of genes encoding proteins involved in metabolism of lipids, proteins and xenobiotica and to significant changes of gene expression, witch are related to mitogenic, genotoxic and inflammatory effects. But the results show as well, that some further effects of dietary oxidized fats were diminished by the intake of a high concentration of vitamin E. This leads to the conclusion, that these effects are connected with an increased oxidative strain after feeding oxidized fat. Besides, there were also some genes, which expression was affected just by the intake of high concentration of vitamin E but not by dietary oxidized fat. Because of the semi quantitative character of the array method, these results should be verified in further studies.

## 6 LITERATUR

- Adam O. (1995) Rheumatischer Formenkreis. In: Biesalski H-K, Fürst P, Kasper H, Kluthe R, Pöler W, Puchstein C, Stähelin HB. (Hrsg) Ernährungsmedizin. 430-435, Thieme-Verlag, Stuttgart, New York
- Albano E, Clot P, Morimoto M, Tomasi A, Ingelman-Sundberg M, French SW. (1996) Role of cytochrome P450E1-dependent formation of hydroxyethyl free radical in the development of liver damage in rats intragastrically fed with ethanol. *Hepatology* 23: 155-163
- Alegret M, Cerequeda E, Ferrando R, Vázquez M, Sánchez RM, Adzet T, Merlos M, Laguna JC. (1995) Selective modification of rat hepatic microsomal fatty acid chain elongation and desaturation by fibrates. *Br J Pharmacol* 114: 1351-1358
- Alexander JC, Valli VE, Chanin BE. (1987) Biological observations from feeding heated corn oil and heated peanut oil to rats. *J Toxicol Environ Health* 21: 295-309
- Ames BN. (1966) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol* VIII: 115-118
- Ammouche A, Rouaki F, Bitam A, Bellal MM. (2002) Effect of ingestion of thermally oxidized sunflower oil on the fatty acid composition and antioxidant enzymes of rat liver and brain in development. *Annu Nutr Metab* 46: 268-275
- Apostolakos MJ, Schuermann WH, Frampton MW, Utell MJ, Willey JC. (1993) Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 213: 277-284
- Ariyoshi K, Adachi J, Ueno Y, Rajendram R, Preedy VR. (2002) Effect of chronic ethanol-feeding on oxysterols in rat liver. *Free Radical Res* 36: 661-666
- Arthur MJ, Mann DA, Iredale JP. (1998) Tissue inhibitors of metalloproteinases, hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Gastroenterol Hepatol* 13: 33-38
- Balz MK, Schulte E, Thier H-P. (1993) Simultaneous Determination of  $\alpha$ -Tocopheryl-acetate, Tocopherols and Tocotrienols by HPLC with Fluorescence Detection. *Foods Fat Sci Technol* 95: 215-220
- Battino M, Quiles JL, Huertas JR, Ramiez-Tortosa MC, Cassinello M, Mataix, J, Lopez-Frias M, Manas M. (2002) Feeding fried oil changes antioxidant and fatty acid pattern of rat and affects rat liver mitochondrial respiratory chain components. *J Bioenerg Biomembr* 34: 127-134
- Becardt C, Dior C. (1990) Quantification of phospholipids. *J High Res Chrom* 126
- Billek G. (1980) Heated oils - chemistry and nutritional aspects. *Nutr Metab* 24 (Suppl 1): 200-210
- Bird RP, Basrur PK, Alexander JC. (1981) Cytotoxicity of thermally oxidized fats. *In Vitro* 17: 379-404
- Blanc P, Revol A, Pacheco H. (1992) Chronical ingestion of oxidised oil in the rat: Effect on lipid composition and on cytidyl transferase activity in various tissues. *Nutr Res* 12: 833-844

- Borsting CF, Engberg RM. (1994) Inclusion of oxidised fish oil in mink diets: 1. The influence on nutrient digestibility and fatty acid accumulation in tissues. *J Anim Physiol Anim Nutr* 72: 132-145
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 255-260
- Braissant O, Fougère F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. (1996) Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR alpha, beta and gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137: 354-366
- Brenner RR. (1989) Factors influencing fatty acid chain elongation and desaturation. In: Vergroesen AJ, Crawford M. (eds) *The role of fats in human nutrition*. 45-79, Academic press, London
- Burton GW, Ingold KU. (1989) Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann NY Acad Sci* 570: 7-22
- Butte W, Kirsch M, Denker J. (1989) The determination of pentachlorophenol and tetrachlorophenol in wadden sediment (*Maya arenaria*) using triethylsulfonium hydroxide for extraction and pyrolytic ethylation. *Int J Environ Anal Chem* 2: 141-153
- Cattley RC. (2003) Regulation of cell proliferation and cell death by peroxisome proliferators. *Microsc Res Tech*. 61: 179-184
- Chao PM, Chao CY, Lin FJ, Huang C. (2001) Oxidized frying oil up-regulates hepatic acyl-CoA oxidase and cytochrome P450 4A1 genes in rats and activates PPARalpha. *J Nutr* 131: 3166-3174
- Chao PM, Huang CJ. (2001) Activation of PPAR-alpha by dietary oxidised frying oil. *Ann Nutr Metab* 45: 389-395
- Chardingny JM, Sébédio JL, Grandgirard A, Martine L, Berdaux O, Vatele JM. (1996) Identification of novel trans isomers of 20:5n-3 in liver lipids of rats fed a heated oil. *Lipids* 31: 165-168
- Chasseaud LF. (1979) The role of glutathione and glutathione S-transferase in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv Cancer Res* 29: 175-179
- Chinetti G, Fruchart J-C, Staels B. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflam Res* 49: 497-505
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem* 18: 5294-5299
- Cho HP, Nakamura MT, Clark SD. (1999) Cloning, expression and nutritional regulation of the mammalian delta 6 desaturase. *J Biol Chem* 274:471-477
- Christiansen EN, Lund JS, Rortveit T, Rustan AC. (1991) Effect of dietary n-3 and n-6 fatty acids on fatty acid desaturation in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1082: 57-62
- Christie WW. (1985) Chromatographic analysis of phospholipids. In: *Z Lebensm Unters Forsch* 181: 171-182, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

- Clarke SD, Jump DB. (1994) Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu Rev Nutr* 14: 83-98
- Cohn JS. (2002) Oxidized fat in the diet, postprandial lipaemia and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 13: 19-24
- Cohn W, Gross P, Grun H, Loechleiter F, Muller DPR, Zulauf M. (1992) Tocopherol transport and absorption. *Proc Nutr Soc* 51: 179-188
- Coors U. (1991) Anwendung des Tocopherolmusters zur Erkennung von Fett- und Ölmischungen. *Fat Sci Technol* 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* 34: 221-231
- Corcos-Benedetti P, D'Aquino M, Di Felice M, Gentili V, Tagliamonte B, Tomassi G. (1987) Effects of a Fraction of Thermally Oxidized Soy Bean Oil on Growing Rats. *Nutr Rep Int* 36: 387- 401
- Cowart LA, Weiß S, Hsu MH, Johnson EF, Krishna MU, Falck JR, Capdevila JH. (2002) The CYP4A isoforms hydroxylate epoxyeicosatrienoic acids to form high affinity peroxisome proliferator-activated receptor Ligands. *J Biol Chem* 277: 35105-35112
- Dallongeville J, Bauge E, Tailleux A, Jeffrey M, Peters F, Gonzalez FJ. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is not rate-limiting for the lipoprotein-lowering action of fish oil. *Biol Chem* 276: 4634-4639
- D'Aquino M, Di Felice M, Tomassi G. (1985) Vitamin E status and effects of thermoxidised fats on structural  $\alpha$ -tocopherol and fatty acid of different rat tissues. *Nutr Rep Int* 32: 1179-1186
- Deliverie P, Fuhrmann C, Teissier E, Fruchart J, Duriez P, Staels B. (2000) Oxidized phospholipids activate PPARalpha in a phospholipase A2 dependent manner. *FEBS Lett* 471: 34-38
- Demoz A, Vaagenes N, Aarsaether E, Hvattim J, Skorve J, Göttlicher M, Lillehaug JR, Gibson GG, Gustafsson JA, Hood S, Berge RK. (1994) Coordinate induction of hepatic fatty acyl-CoA-oxidase and P4504A1 in rat after activation of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) by sulphur substituted fatty acid analogues. *Xenobiotica* 24: 943-956
- Desvergne B, Wahli W. (1999) Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocr Rev* 20: 649-688
- Deutsch J. (1995) Glucose-6-Phosphate dehydrogenase, In: Bergmeyer HU. (ed) *Methods of Enzymatic Analysis* 3: 190-197, Verlag Chemie, VCH, Weinheim
- Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzales FJ, Wali W. (1996) The PPARalpha leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384: 39-43
- Devchand PR, Wahli W. (1998) Leukotriene B4: agonist for the fat regulator PPAR $\alpha$ . In: Rodger I, Botting J, Dahle S-E. (eds) *Leukotrienes: New Concepts and Targets for Therapy*. 119-124, Kluwer Academic Publishers and William Harvey Press

- Diagne A, Fauvel J, Record M, Chap H, Douste-Blazy L. (1983) Studies on ether Phospholipids: II. Comparative composition of various tissues from human, rat and guinea. *Biochim Biophys Acta* 793: 221-231
- Diczfalusy U, Eggertsen G, Alexon SE. (1995) Clofibrate treatment stearyl-CoA desaturase mRNA level and enzyme activity in mouse liver. *Biochim Biophys Acta* 1259: 313-316
- Dobarganes M, Velasco J, Dieffenbacher A. (2000) Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols in oils and fats. *Pure Appl Chem* 72: 1563-1575
- Dreyer C, Keller H, Mahfoudi A, Laudet V, Krey G, Wahli W. (1993) Positiveregulation of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Biol Cell* 77: 67-76
- Eder K, Kirchgessner M. (1994) Dietary fat influences the effect of zinc deficiency on liver lipids and fatty acids in rats force feed equal quantities of diet. *J Nutr* 124: 1917-1926
- Eder K, Kirchgessner M. (1997) The effect of a moderately oxidised soybean oil on lipid peroxidation in rat low-density lipoproteins at low and high dietary vitamin E levels. *J Anim Physiol Anim Nutr* 78:230-243
- Eder K, Kirchgessner M. (1998a) Vitamin E status and tissue fatty acid composition in rats fed a moderately oxidized soybean oil at low or high vitamin E supply. *J Anim Physiol Anim Nutr* 79: 80-91
- Eder K, Kirchgessner M. (1998b) The effect of dietary vitamin E supply and a moderately oxidized oil on activities of hepatic lipogenic enzymes in rats. *Lipids* 33: 277-283
- Eder K, Kirchgessner M. (1999) The effect of a moderately thermoxidised dietary fat on the vitamin E status, the fatty acid composition of tissue lipids, and the susceptibility of low-density lipoproteins to lipid peroxidation in rats. *Fett/Lipid* 101: 178-184
- Eder K, Stangl G. (2000) Plasma tyroxine and cholesterol concentrations of miniature pigs are influenced by thermally oxidized dietary lipids. *J Nutr* 130: 116-121
- Eder K. (1999) The Effects of a Dietary Oxidized Oil on Lipid Metabolism in Rats. *Lipids* 34: 717-725
- Edwards PA, Kennedy MA, Mak PA. (2002) LXRs, oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. *Vascul Pharmacol* 38: 249-256
- Endo Y, Li CM, Tagiri-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* 78: 1021-1024.
- Fan CY, Pan J, Chu R, Lee D, Kluckman KD, Usuda N, Singh I, Yeldandi AV, Rao MS, Maeda N, Reddy JK. (1996) Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem* 271: 24698-24710
- Fillion L, Henry CJ. (1998) Nutrient losses and gains during frying: a review. *Int J Food Sci Nutr* 49: 157-168
- Forman BC, Chen J, Evans R M. (1997) Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids and eicosanoids are ligands for PPAR. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4312-4317
- Frankel EN. (1998) *Lipid Oxidation*. The Oily Press, Dundee.

- Gabriel HG, Alexander JC, Valli VE. (1977) Biochemical and histological effects of feeding thermally oxidized rapeseed oil and lard to rats. *Can J Comp Med* 1: 98-106
- Garg ML, Thomson AB, Clandinin MT. (1988) Effect of dietary cholesterol and/omega 3 fatty acids on lipid composition and delta 5-saturase activity of rat liver microsomes. *J Nutr* 118: 661-668
- Gassen HG, Schimpf G (Hrsg) (1999) *Gentechnische Methoden - Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin, 2. Auflage
- Gonzalez FJ. (1989) The molecular biology of Cytochrom P450s. *Pharmacol Rev* 40:243-288
- Gonzalez FJ. (1992) Control of constitutively-expressed developmentally-activated rat hepatic cytochrome P450 genes. *Keio J Med* 41: 68-75.
- Gonzalez FJ, Ueno T, Umeno M, Song BJ, Veech RL, Gelboin HV. (1991) Microsomal ethanol oxidizing system: transcriptional and posttranscriptional regulation of cytochrome P450, CYP2E1. *Alcohol (Suppl 1)*: 97-101
- Green S. (1995) PAR: a mediator of peroxisome proliferator action. *Mutat Res* 333: 101-109
- Grune T, Merker K, Sandig G, Davies K. (2003) Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 305: 709-718
- Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DD, Kelly DP. (1994) The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Regulates Mitochondrial Fatty Acid Oxidative Enzyme Gene Expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11012-11016
- Hadorn H, Zürcher K. (1966) Beurteilung von Speisefetten aufgrund des UV-Spektrums. *Mitt gebiete Lebensm Hyg* 57:189
- Hagemann 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* 29: 689-698
- Hara A, Radin NS. (1978) Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem* 90: 420-426
- Hayam I, Cogan U, Mokady S. (1993) Dietary oxidized oil enhances the activity of (Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>)ATPase and acetylcholinesterase and lowers the fluidity of rat erythrocyte membrane. *J Nutr Biochem* 4: 10563-10569
- Hayam I, Cogan U, Mokady S. (1995) Dietary oxidised oil and the activity of antioxidant enzymes and lipoprotein peroxidations in rats. *Nutrition Research* 15: 1037-1044
- Hawkins JM, Jones WM, Bonner FW, Gibson GG. (1987) The effect of peroxisome proliferators on microsomal, peroxisomal and mitochondrial enzyme activities in liver and kidney. *Drug Metab Rev* 18: 441-515
- Helvig C, Dishman E, Capdevila JH. (1998) Molecular, enzymatic, and regulatory characterization of rat kidney cytochrome P450 4A2 and 4A3. *Biochemistry* 37: 12546-12558
- Herzberg GR, Rogerson M. (1988) Hepatic Fatty Acid Synthesis and Triglyceride Secretion in Rats Fed Fructose- or Glucose-Based Diets Containing Corn Oil, Tallow or Marine Oil. *J Nutr* 118: 1061-1067

- Hochgraf E, Mokady S, Cogan U. (1997) Dietary Oxidized Linoleic Acid Modifies Lipid Composition of Rat Liver Microsomes and Increases Their Fluidity. *J Nutr* 127: 681-686
- Holden PR, Tugwood JD. (1999) Peroxisome proliferator activated receptor alpha: role in rodent liver cancer and species differences. *J Mol Endocrinol* 22: 1-8
- Horton JD. (2002) Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans* 30: 1091-1095
- Huang CJ, Cheung NS, Lu VR. (1988) Effect of deteriorated frying oil and dietary protein levels on liver microsomal enzymes in rats. *J Jpn Oil Chem Soc* 65: 1796-1803
- Hui DY, Howles PN. (2002) Carboxylester lipase: structure-function relationship and physiological role in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J Lipid Res* 43: 2017-2030
- Infante JP, Tschanz CL, Shaw N, Michaud AL, Lawrence P, Brenna JT. (2002) Straight-chain acyl-CoA oxidase knockout mouse accumulates extremely long chain fatty acids from alpha-linolenic acid: evidence for runaway carousel-type enzyme kinetics in peroxisomal beta-oxidation diseases. *Mol Genet Metab* 75: 108-119
- Iritani N, Hosomi H, Fukuda H, Ikeda H. (1995) Polyunsaturated fatty acid regulation of lipogenic enzyme gene expression in liver of genetically obese rat. *Biochim Biophys Acta* 1255: 1-8
- Iritani N, Komiya M, Fukuda H, Sugimoto T. (1998) Lipogenic Enzyme Gene Expression is Quickly Suppressed in Rats by a Small Amount of Exogenous Polyunsaturated Fatty Acids. *J Nutr* 128: 967-972
- Isseman I, Green S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptors superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 645-650
- Isseman I, Prince R, Tugwood J, Green S. (1992) A role for fatty acid and liver fatty acid binding protein in peroxisome proliferation? *Biochem Soc Trans* 20: 824-827
- Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383: 728-731
- Johnson SB, Kramer TR, Briske-Anderson M, Holman RT. (1989) Fatty acid pattern of tissue phospholipids in copper and iron deficiencies. *Lipids* 24: 141-145
- Kanazawa K, Kanazawa E, Natake M. (1985) Uptake of secondary autoxidation products of linoleic acid by the rat. *Lipids* 20: 412-419
- Kappus H, Diplock AT. (1992) Tolerance and safety of vitamin E: toxicological position report. *Free Radical Biol Med* 12: 63-81, 13: 55-74
- Katsurada A, Iritani N, Fukuda H, Noguchi T, Tanaka T. (1986) Effects of Dietary Nutrients on Lipogenic Enzyme and mRNA Activities in Rat Liver During Induction. *Biochim Biophys Acta* 877: 350-358
- Kikuta Y, Kusunose E, Kusunose M. (2002) Prostaglandin and leukotriene omega-hydroxylases. *Prostaglandins* 68-69: 345-362
- Kliwer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. (1991) Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Natl Acad Sci USA* 91: 7355-7359

- Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM. (1997) Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with PPAR. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4318-4323
- Kramer TR, Briske-Anderson M, Holman RT. (1984) Influence of reduced food intake on polyunsaturated fatty acid metabolism in zinc deficiency rat. *J Nutr* 114: 1224-1230
- Kroetz DL, Yook P, Costet P, Bianchi P, Pineau T. (1998) Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha Controls the Hepatic CYP4A Induction Adaptive Response to Starvation and Diabetes. *J Biol Chem* 273: 31581-31589
- Kubow S. (1992) Routes of Formation and Toxic Consequences of Lipid Peroxidation Products in Foods. *Free Radical Biol Med* 12: 63-81
- Lake BG, Renwick AB, Cunninghame ME, Price RJ, Surry D, Evans DC. (1998) Comparison of the effects of some CYP3A and other enzyme inducers on replicative DNA synthesis and cytochrome P450 isoforms in rat liver. *Toxicology* 131: 9-20
- Lamboni C, Sébédio JL, Perkins EG. (1998) Cyclic fatty acid monomers from dietary heated oil affect rat liver enzyme activity. *Lipids* 33: 675-681
- Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW. (1995) Target disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* 15: 3012-3022
- Lemberger T, Saladin R, Vasquez M, Assimacopoulos F, Staels B, Desvergne B, Wahli W, Auwerx J. (1996) Expression of the PPAR gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *J Biol Chem* 271: 1764-1769
- Lin FJ, Tang YL, Wu YJ, Huang CJ. (2001) Isoforms of liver microsomal cytochrome P-450 of rats fed oxidized frying oil. *Ann Nutr Metab* 45: 389-396
- Liu JF, Huang CJ. (1995) Tissue  $\alpha$ -tocopherol retention in male rats is compromised by feeding diets containing oxidized frying oil. *J Nutr* 125: 3071-3080
- Lopez-Valera S, Sanchez-Munitz FJ, 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* 33: 181-189
- Madsen L, Froyland L, Grav HJ, Berge RK. (1997) Up-regulated delta 9-desaturase gene expression by hypolipidemic peroxisome-proliferating fatty acids results in increased oleic acid content in liver and VLDL: accumulation of delta 9-desaturated metabolite of tetradecylthioacetic acid. *J Lipid Res* 38: 554-563
- Manabu T, Nakamura MT, Hyekyung P, Cho HP, Steven D, Clarke SD. (2000) Regulation of Hepatic D-6 Desaturase Expression and Its Role in the Polyunsaturated Fatty Acid Inhibition of Fatty Acid Synthase Gene Expression in Mice. *Am Soc Nutr Sci* 130: 1561-1565
- Marcus SL, Miyata KS, Zhang BW, Subramani S, Rachubinski RA, Capone JP. (1993) Diverse peroxisome proliferator-activated receptors bind to the peroxisome proliferator-responsive elements of the rat hydratase/dehydrogenase and fatty acyl-CoA oxidase genes but differentially induce expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5723-5727
- Martin JC, Joffre F, Siess MH, Vernevault MF, Collenot P, Genty M, Sébédio JL. (2000) Cyclic fatty acid monomers from heated oil modify the activities of lipid synthesizing and oxidizing enzymes in rat liver. *Am Soc Nutr Sci* 22: 1524-1535

- Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Yoshikawa T, Hasty AH, Tamura Y, Osuga J, Okazaki H, Iizuka Y, Takahashi A, Sone H, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. (2002) Dual regulation of mouse Delta(5)- and Delta(6)-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPARalpha. *J Lip Res* 43: 911-920
- Miller CW, Ntambi JM. (1996) Peroxisome proliferators induce mouse liver stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9443-9448
- Minnich A, Tian N, Byan L, Bilder G. (2001) A potent PPAR{alpha} agonist stimulates mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol* 280: 270-279
- Mörssel J-Th. (1990) Fortschrittsbericht Lipidperoxidation 1. Mitteilung Primärreaktionen. *Die Nahrung* 34: 3-12
- Mörssel J-Th, Meusel D. (1990) Fortschrittsbericht Lipidperoxidation 2. Mitteilung Primärreaktionen. *Die Nahrung* 34:13-27
- Muggli R. (1994) Physiological requirements of vitamin E as a function of the amount and type of polyunsaturated fatty acid. *World Rev Nutr Diet* 75: 166-168
- Mühlhardt C. (2002) Molekularbiologie / Genomics. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin, 3. Auflage
- Nagaki S, Yamamoto M, Yumoto Y, Shirakawa H, Yoshida M, Teraoka H. (1992) Non-histone chromosomal proteins HMG1 and 2 enhance ligation reaction of DNA double-strand breaks. *Biochem Int* 26:953-61.
- Nakamura MT, Nara TY. (2002) Gene regulation of mammalian desaturases. *Biochem Soc Trans* 30: 1076-1079
- Namiki M. (1990) Antioxidants, antimutagens. *Crit Rev Food Sci Nutr* 29: 143-153
- Narasimhamurthy K, Raina PL. (1999) Long term feeding effects of heated and fried oils on lipids and lipoproteins in rats. *Mol Cell Biochem* 195: 143-153
- Naumann C, Bassler R. (1976) Methodenbuch Band III, Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. (Ergänzungslieferung 1997). VDLUFA-Verlag, Darmstadt
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki, Stegemann JJ, Fryersisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotho O, Esterbrook RW, Gunsalus IC. (1993) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6: 1-42
- Nepokroeff CM, Lakshmanan MR, Porter JW. (1975) Fatty-acid synthase from rat liver. *Methods Enzymol* 35: 37-44
- Nguyen X, Wang MH, Reddy KM, Falck JR, Schwarzman ML. (1999) Kinetic profile of the rat cyp4A1 isoforms: Arachachidonic acid metabolism and isoform- specific inhibitors. *Am J Physiol* 276: 1691-1700
- Nolen GA, Alexander JC, Artman NR. (1976) Long-term rat feeding study with used frying oil. *J Nutr* 93: 337-348
- Ntambi JM. (1992) Dietary regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in mouse liver. *J Biol Chem* 267:10925-10930

- NUTRITIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). (1995) Nutrient requirements of the laboratory rat. In: Overton J, Poos MI, Backwell D. (ed): Nutrient requirements of laboratory animals 4: 11-79
- Okuda KI. (1994) Liver mitochondrial P450 involved in cholesterol catabolism and vitamin D activation. *J Lipid Res* 35: 361-72
- Orada M, Mijazawa Z, Kaneda T. (1986) Distribution of <sup>14</sup>C after Oral Administration of (U-<sup>14</sup>C) Labeled Methyl Linoleate Hydro-peroxides and Their Secondary Oxidation Products in Rats. *Lipids* 21: 150-154
- Palut D. (1997) Proliferation of peroxisomes in the hepatocarcinogenic process. *Rocz Panstw Zakl Hig* 48: 1-11
- Palut D, Ludwicki JK, Kostka G, Kopec-Szlezak J, Wiadrowska B, Lembowicz K. (2001) Studies of early hepatocellular proliferation and peroxisomal proliferation in Wistar rats treated with herbicide diclofop. *Toxicology* 158: 119-126
- Pan L, Sato S, Frederick JP, Sun XH, Zhuang Y. (1999) Impaired immune responses and B-cell proliferation in mice lacking the *Id* gene. *Mol Cell Biol* 19: 5969-5980
- Pardun H. (1976) Analyse der Nahrungsfette. In: Kiesmeier F. (ed) Grundlagen und Fortschritte der Lebensmitteluntersuchung und Lebensmitteltechnologie: 226-235, Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg
- Paul S, Mittal GS. (1997) Regulating the use of degraded oil/fat in deep-oil/fat-food frying. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37: 635-662
- Peters JM, Cattley RC, Gonzalez FJ. (1997a) Role of PPAR alpha in the mechanism of the nongenotoxic carcinogen and Peroxysome proliferators Wy-14,643. *Carcinogenesis* 18: 2029-2033
- Peters JM, Hennuyer N, Staels B, Fruchart, JC, Fievet C, Gonzalez FJ, Auverx J. (1997) Alteration in lipoprotein metabolism in peroxisome-proliferation activated receptor alpha deficient mice. *J Biol Chem* 272: 27307-27312
- Plapp BV. (1994) Control of alcohol metabolism. *EXS* 71: 311-322
- Poling CE, Eagle E, Durand AMA, Fisher M. (1970) Long-term responses of rats to heat-treated dietary fats: weight gains, food and energy efficiency, longevity and histopathology. *Lipids* 5: 128-133
- Porsgaard T, Zhang H, Nielsen RG, Hoy CE. (1999) Absorption in rat of rapeseed, soybean and sunflower oils before and following moderate heating. *Lipids* 34: 727-732
- Prip-Buus C, Thumelin S, Chatelain F, Pegorier J P, Girard J. (1995) Hormonal and nutritional control of liver fatty acid oxidation and ketogenesis during development. *Biochem Soc Trans* 23: 500-505
- Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Ramiez-Tortosa MC, Cassinello M, Mataix, J, Lopez-Frias M, Manas M. (2002) The intake of fried virgin or sunflower oils differentially induces oxidative Stress in rat liver microsomes. *Br J Nutr* 88: 57-65
- Raspé E, Madsen L, Lefebre A-M, Leitersdorf I, Gelman L, Peinado-Onsurbe J, Dallongeville J, Fruchart J-C, Berge R, Staels B. (1999) Modulation of rat liver apolipoprotein gene expression and serum lipid levels by tetradecylthioacetic acid (TTA) via PPAR{alpha} activation. *J Lipid Res* 40: 2099-2110

- Recknagel RO, Glende EA Jr. (1984) Spectrophotometric Detection of Lipid Conjugated Dienes. *Methods Enzymol* 105:331-337
- Reddy JK, Krishnakanta TP. (1975) Hepatic peroxisome proliferation: induction by two novel compounds structurally unrelated to clofibrate. *Science* 190: 787-789
- Reddy JK. (1994) Peroxysomal lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 14: 343-370
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. (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. *J Nutr* 123, 1939-1951
- Rodriguez C, Cabrero A, Roglans N, Adzet T, Sanchez RM, Vazquez M, Ciudad CJ, Laguna JC. (2001) Differential induction of stearyl-CoA desaturase and acyl-CoA oxidase genes by fibrates in HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* 61: 57-64
- Roeb E, Purucker E, Breuer B, Nguyen H, Heinrich PC, Rose-John S, Matern S. (1997) TIMP expression in toxic and cholestatic liver injury in rat. *Hepatology* 27: 535-544
- Schoofjans K, Staels B and Auwerx J. (1996) Role of peroxsome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrate and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res* 37: 907-925
- Schroepfer GJ, Jr. (2000) Oxysterols: Modulators of Cholesterol Metabolism and Other Processes. *Physiol Rev* 80: 361-554
- Schwartzman ML, da Silva JL, Lin F, Nishimura M, Abraham NG. (1996) Cytochrome P450 4A expression and arachidonic acid omega-hydroxylation in the kidney of the spontaneously hypertensive rat. *Nephron* 73: 652-655
- Sébédio JL, Grandgirard A. (1989) Cyclic fatty acids: natural sources, formation during heat treatment, synthesis and biological properties. *Prog Lipid Res* 28: 303-336
- Shinitzki M. (1984) Membrane fluidity and cellular function. *Physiology membrane fluidity* 1: 1-51
- Sidwell CG, Salwin H, Benca M, Mitchell JH Jr. (1954) The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. *J Am Oil Chemists Soc* 31: 603-606
- Simpson AE. (1997) The cytochrome P450 (CYP4) family. *Gen Pharmacol* 28: 351-359
- Singleton DW, Lei X-D, Webb SJ, Prough RA, Geoghegan TE. (1999) Cytochrome P-450 mRNAs Are Modulated by Dehydroepiandrosterone, Nafenopin, and Triiodothyronine. *Drug Metab Dispos* 27: 193-200
- 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
- Song HW, Nara TY, Nakamura MT. (2002) Delayed induction of delta-6 and delta-5 desaturases by a peroxisome proliferator. *Biochem Biophys Res Commun* 20: 832-838
- Sorvall. (1997) Anleitung zur Trennung von Serum-Lipoprotein. *Sorvall News* 5: 1-2
- Soucek P, Gut I. (1992) P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotica* 22: 83-103

- Sundseth SS, Waxman DJ. (1992) Sex-dependent expression and clofibrate inducibility of cytochrome P450 4A fatty acid omega-hydroxylases: male specificity of liver and kidney Cyp 4A2 mRNA and tissue specific regulation by testosterone. *J Biol Chem* 267: 3915-3921
- Taniguchi M, Miura K, Iwao H, Yamanaka S. (2001) Quantitative assessment of microarrays comparison with Northern Blot analyses. *Genomics* 71:34-39
- Tom Dieck H, Döring F, Roth H-P, Daniel H. (2003) Changes in rat hepatic gene Expression in response to zinc deficiency as assessed by DNA array. *Am Soc Nutr Sci* 133: 1004-1010
- Tontonoz P, Mangelsdorf DJ. (2003) Liver x receptor signalling pathway in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol* 17: 985-993
- Tran TN, Christophersen BO. (2002) Partitioning of polyunsaturated fatty acid oxidation between mitochondria and peroxisomes in isolated rat hepatocytes studied by HPLC separation of oxidation products. *Biochim Biophys Acta* 1583: 195-204
- Tugwood JD, Isseman I, Anderson RG, Bundel RK, MCPheat WL, Green S. (1992) The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognise a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl-CoA-oxidase gene. *EMBO J* 11: 433-439
- Wahle KWJ, Davis NT. (1975) Effect of dietary copper deficiency in the rat on fatty acid composition of adipose tissue and desaturase activity of liver microsomes. *Br J Nutr* 34: 105-112
- Weihe WH. (1987) The laboratory rat. In: *The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals*. 309-330, 6. Auflage, Longman Scientific & Technical, London
- Werneburg NW, Guicciardi ME, Bronk SF, Gores GJ. (2002) Tumor necrosis factor-alpha-associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: 947-956
- Wheeler (1932) In: *DFG-Einheitsmethoden C-VI 6A (84), Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen*. Band 1, 2. Auflage (2001) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- Xu J, Nakamura MT, Cho HP, Clarke SD. (1999) Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 274: 23577-23588
- Yang YH, Speed T. (2002) Design issues for cDNA microarray experiments. *Nat Rev Genet* 3: 579-588
- Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK. (2000) Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. *Mutat Res* 17: 159-77
- Yoshida H, Kajimoto G. (1989) Effect of dietary vitamin E on the toxicity of autoxidized oil to rats. *Ann Nutr Metab* 33: 153-161
- Zhao J, Araki N, Nishimoto SK. (1995) Quantitation of matrix Gla protein mRNA by competitive polymerase chain reaction using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an internal control. *Gene* 155: 159-65

## LEBENS LAUF

Andrea Sülzle

Geboren am 04.06.1975 in Nordhausen

- 09/1982 - 07/1990                    POLYTECHNISCHE-OBERSCHULE W.I. LENIN, Nordhausen
- 09/1990 - 07/1994                    GOTTFRIED-HERDER-GYMNASIUM, Nordhausen  
*Abschluss:* Abitur
- 10/1994 - 07/1999                    FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT, Jena  
Studium der Ernährungswissenschaften  
*Praktikum:* FACHHOCHSCHULE ANHALT, Bernburg,  
                  Institut für Ernährung und Landwirtschaft,  
                  Mitarbeit an einer Studie für den Ernährungsbericht  
                  Qualitätsuntersuchungen am Geflügelfleisch  
*Diplomarbeit:* „Iodversorgung, Iodstatus und Iodbilanz  
                  stillender und nichtstillender Frauen  
                  mit und ohne Iodsupplementierung“;  
                  VDO<sub>E</sub>-Wissenschaftspreis 2000  
*Abschluss:* Diplom Trophologin
- 10/ 1999 - 03/ 2000                    KLINIK DR. OTTO BUCHINGER, Bad Pyrmont  
- Fachklinik für ernährungsabhängige Erkrankungen-  
Tätigkeit als Ernährungsberaterin, Diätküche
- 04/ 2000 - 12/ 2002                    MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT, Halle-Wittenberg  
- Institut für Ernährungswissenschaften -  
Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin
- 12/ 2002 - 09/ 2003                    MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT, Halle-Wittenberg  
Promotionsstudentin

## **ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation „Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss oxidierter Fette auf ausgewählte Parameter des Lipidstoffwechsels am Modelltier Ratte“ selbständig angefertigt habe und alle hierzu verwendeten Quellen und Hilfsmittel genau und vollständig angegeben sind. Die vorliegende Dissertation wurde bisher an keiner anderen Universität für eine Promotion eingereicht. Ich selbst habe mich zuvor noch nicht um einen Doktorgrad beworben.

Halle/Saale, den 30.09.2003

.....  
Andrea Sülzle

## **Dank**

*Hier möchte ich all jenen danken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben. An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Klaus Eder für die Übertragung des Projektes, die Gewährung der vielseitigen Arbeits- und Forschungsmöglichkeiten und für die umfassende und konstruktive Unterstützung.*

*Besonders danke ich Herrn Dr. Frank Hirche für die Beratung und die vielen praktischen Ideen bei der Entwicklung der Analysemethoden sowie für die wertvolle Hilfe bei der Etablierung der cDNA-Array-Technologie. Für die zuverlässige Durchführung der Fettsäureanalytik bedanke ich mich bei Herrn Wolfgang Böttcher.*

*Bei Frau Dr. Corinna Brandsch möchte ich mich für die Unterstützung bei tierexperimentellen Fragestellungen sowie für das sorgfältige und kritische Lesen des Manuskriptes bedanken. Für die umfassende Unterstützung bei der Fertigstellung der Dissertation und für die konstruktiven Diskussionen danke ich Herrn Dirk Raßbach.*

*Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern und Doktoranden des Institutes für Ernährungswissenschaften für ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft und insbesondere Frau Dipl. troph. Uta Keller für die in jeder Hinsicht hervorragende Zusammenarbeit im Rahmen des gemeinsamen Forschungsprojektes.*

*Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes.*