

Aus dem Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften

(Direktor: Prof. Dr. M. Rodehutsord)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III

(Dekan: Prof. Dr. P. Wycisk)

der

Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg



**„Wirkung oxidierter Fette auf den Lipidstoffwechsel der Ratte während der
Reproduktion unter besonderer Berücksichtigung des Peroxisomen Proliferator-
aktivierten Rezeptors α “**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Trophologie (Dr. troph)

vorgelegt von

Diplom-Trophologin

Corinna Dathe

geb. am 28.07.1977

in Halle/Saale

Gutachter: Prof. Dr. habil. K. Eder

Prof. Dr. habil. G. Stangl

Prof. Dr. habil. G. Rimbach

Verteidigung am: 15.10.2007

Halle/Saale 2007

urn:nbn:de:gbv:3-000012709

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000012709>]

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VII
1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden.....	8
2.1 Versuchsdesign.....	10
2.1.1 Versuchsansatz 1.....	10
2.1.2 Versuchsansatz 2.....	11
2.1.3 Versuchsansatz 3.....	12
2.1.4 Versuchsansatz 4.....	13
2.2 Zusammensetzung und Herstellung der Diäten.....	15
2.3 Charakterisierung der Diätfette.....	17
2.3.1 Fettsäurespektrum.....	17
2.3.2 Tocopherolkonzentration.....	17
2.3.3 Peroxidzahl.....	18
2.3.4 Säurezahl.....	18
2.3.5 Konjugierte Diene.....	19
2.3.6 Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen.....	20
2.3.7 Gesamt-Carbonylverbindungen.....	20
2.3.8 Polare und unpolare Verbindungen.....	21
2.4 Versuchstiere.....	22
2.4.1 Haltung und Fütterung.....	22
2.4.2 Vaginalabstrich.....	23
2.5 Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials.....	24
2.5.1 Milchentnahme.....	24
2.5.2 Blutgewinnung.....	24
2.5.3 Organentnahme.....	25
2.5.4 Extraktion der Gesamtlipide.....	25
2.5.4.1 Extraktion der Gesamtlipide aus Diäten.....	25
2.5.4.2 Extraktion der Gesamtlipide aus der Leber.....	26
2.5.4.3 Extraktion der Gesamtlipide aus der Milch.....	26

2.6 Analysenmethoden.....	27
2.6.1 Tocopherolkonzentration.....	27
2.6.2 Konzentration an Triglyceriden und Cholesterin.....	27
2.6.3 Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma.....	28
2.6.4 Fettsäurespektrum der Milch.....	29
2.6.5 Phospholipidbestimmung mittels Phosphor-Assay.....	29
2.6.6 Expressionsanalyse ausgewählter Gene in Leber und Milchdrüse.....	30
2.6.6.1 Isolierung der RNA und deren Konzentrationsbestimmung.....	30
2.6.6.1.1 RNA-Agarosegelelektrophorese.....	31
2.6.6.2 Reverse Transkription.....	32
2.6.6.3 Polymerase-Ketten-Reaktion.....	32
2.6.6.3.1 Primer.....	34
2.6.6.3.2 DNA- Agarosegelelektrophorese.....	36
2.7 Statistik.....	36
3. Ergebnisse.....	37
3.1 Charakterisierung der Diätfette.....	37
3.1.1 Fettsäurespektrum.....	37
3.1.2 Fettkennzahlen.....	37
3.2 Versuchsansatz 1: Ergebnisse der laktierenden Ratten und der Nachkommen (Neugeborene, Jungtiere [20Tage], Adulte [10Wochen]).....	40
3.2.1 Gewichtsentwicklung.....	40
3.2.2 α -Tocopherolkonzentrationen.....	43
3.3 Versuchsansatz 2: Ergebnisse der trächtigen und laktierenden Ratten.....	46
3.3.1 Relative mRNA-Konzentrationen des PPAR α und seiner Zielgene in der Leber.....	46
3.4 Versuchsansatz 3: Ergebnisse der trächtigen Ratten und der Föten.....	48
3.4.1 Gewichtsentwicklung und relative Lebergewichte der trächtigen Tiere.....	48
3.4.2 Konzentration an Triglyceriden in Leber und Plasma und relative mRNA- Konzentration von Transkriptionsfaktoren und Genen des Triglyceridstoffwechsels in der Leber.....	49
3.4.3 Konzentration an Cholesterin in Leber und Plasma und relative mRNA- Konzentration von SREBP-2 und der HMG-CoA-Reduktase in der Leber..	53
3.4.4 Konzentration an Phospholipiden in der Leber.....	54

3.5 Versuchsansatz 4: Ergebnisse der laktierenden Ratten und der Nachkommen (Jungtiere [20 Tage]).....	56
3.5.1 Gewichtsentwicklung sowie relative Lebergewichte der laktierenden Tiere.	56
3.5.2 Konzentration an Triglyceriden in Leber und Plasma, Konzentration an NEFA im Plasma und relative mRNA-Konzentration von Trankriptionsfaktoren und Genen des Triglyceridstoffwechsels in der Leber.....	58
3.5.3 Konzentration an Triglyceriden und Fettsäuren in der Milch und relative mRNA-Konzentrationen von Transkriptionsfaktoren und Genen des Triglyceridstoffwechsels in der Milchdrüse.....	61
3.5.4 Konzentration an Cholesterin in Leber und Plasma und relative mRNA- Konzentration des SREBP-2 und seiner Zielgene in der Leber.....	64
3.5.5 Konzentration an Phospholipiden in der Leber.....	65
4. Diskussion.....	66
4.1 Charakterisierung der oxidierten Fette und deren Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der trächtigen und laktierende Tiere.....	66
4.2 Einfluss oxidiertes Fette auf den Vitamin E-Status der laktierenden Tiere und deren Nachkommen.....	68
4.3 Einfluss von Trächtigkeit und Laktation auf die mRNA-Konzentration des PPAR α und seiner Zielgene in der Leber.....	73
4.4 Einfluss oxidiertes Fette auf den Triglyceridstoffwechsel während der Trächtigkeit in der Leber.....	75
4.5 Einfluss oxidiertes Fette auf den Triglyceridstoffwechsel während der Laktation in der Leber und Milchdrüse.....	79
4.6 Einfluss oxidiertes Fette auf den Cholesterinstoffwechsel während Trächtigkeit und Laktation in der Leber.....	83
5. Zusammenfassung.....	86
6. Summary.....	90
Literaturverzeichnis.....	94

Abkürzungsverzeichnis

ACO	Acyl-CoA-Oxidase
CPT1a	Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1a
CYP4A1	Cytochrom P450 4A1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FABP	fatty-acid-binding-protein, Fettsäure-bindendes Protein
FAT	fatty-acid-translocase, Fettsäuretranslokase
FATP	fatty-acid-transport-protein, Fettsäure-Transport-Protein
FSS	Fettsäuresynthetase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GH	growth hormone, Wachstumshormon
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxyl-3-Methyl-Glutaryl-CoA-Reduktase
HODE	13-Hydroxy-9,11-octadecadiensäure
HPLC	high-performance liquid chromatography, Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HPODE	13-Hydroxyperoxy-9,11-octadecadiensäure
LCAD	Long-chain-acyl-CoA-dehydrogenase, langkettige Acyl-CoA- Dehydrogenase
LDL	Low density lipoprotein, Lipoproteine geringer Dichte
LDL-Rezeptor	Lipoproteine geringer Dichte-Rezeptor
LPL	Lipoproteinlipase
LPOP	Lipidperoxidationsprodukte
LXR	Liver-X-receptor, Leber-X-Rezeptor
MCAD	Medium-chain-acyl-CoA-dehydrogenase, mittelkettige Acyl- CoA-Dehydrogenase
mRNA	messenger ribonucleic acid, Messenger-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NEFA	non-esterified-fatty-acids, nichtveresterte Fettsäuren
PCR	polymerase-chain-reaction, Polymerase-Ketten-Reaktion
POZ	Peroxidzahl
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor, Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor
PPRE	PPAR response elements
PUFA	polyunsaturated fatty acids, mehrfach ungesättigte Fettsäuren
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SREBP	sterol regulatory element-binding protein
SZ	Säurezahl
TÄ	Tocopheroläquivalente
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
VLDL	Very low density lipoprotein, Lipoproteine sehr geringer Dichte

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Seite
1 Versuchsbedingungen; Anzahl der Versuchstiere, Zusammensetzung und Behandlung der Diätfette sowie Dauer der Versuche 1, 3, 4.....	14
2 Zusammensetzung der Diät	15
3 Mineralstoffvormischung der Diät.....	15
4 Vitaminvormischung der Diät.....	16
5 Anzahl und Körpermasse der verwendeten Versuchstiere.....	22
6 Eigenschaften der für die in der Realtime-detection-PCR verwendeten Primer für die Spezies <i>Rattus norvegicus</i>	34
7 Zusammensetzung der verwendeten Diätfette und deren Fettkennzahlen vor und nach Einbringen in die Diät (V1, V3, V4).....	39
8 Wurfgrößen und Gewichtsentwicklung der Würfe (Tag 1 bis Tag 20) und der Jungtiere (Tag 20 bis Woche 10) (V1).....	42
9 α -Tocopherolkonzentrationen in ausgewählten Geweben der Muttertiere und deren Nachkommen (V1).....	45
10 Triglyceridkonzentrationen in Leber und Plasma der trächtigen Tiere und in der Leber der Föten (V3).....	50
11 mRNA-Konzentrationen von Transkriptionsfaktoren und Genen der Fettsäureoxidation und der Fettsäuresynthese in der Leber der trächtigen Tiere und deren Föten (V3), bezogen auf GAPDH.....	52
12 Cholesterinkonzentrationen in Leber und Plasma der trächtigen Tiere und in der Leber deren Föten (V3).....	53
13 mRNA-Konzentrationen des SREBP-2 und der HMG-CoA-Reduktase in der Leber trächtiger Tiere (V3) , bezogen auf (GAPDH).....	54
14 Phospholipidkonzentrationen in der Leber der trächtigen Tiere und deren Föten (V3).....	55
15 Wurfgröße und Gewichtsentwicklung der Würfe bis Tag 20 (V4).....	57
16 Triglyceridkonzentrationen in Leber und Plasma sowie Konzentration an NEFA im Plasma der laktierenden Tiere (V4).....	59

Fortsetzung Tabellenverzeichnis

Tabelle	Seite
17 mRNA-Konzentrationen von Transkriptionsfaktoren und Genen der Fettsäureoxidation, des Fettsäuretransports und der Fettsäuresynthese in der Leber der laktierenden Tiere (V4), bezogen auf GAPDH.....	60
18 Konzentration an Triglyceriden und Fettsäuren in der Milch laktierender Tiere (V4).....	62
19 mRNA-Konzentrationen von Transkriptionsfaktoren und Genen der Fettsäureoxidation, des Fettsäuretransports und der Fettsäuresynthese in der Milchdrüse der laktierenden Tiere (V4), bezogen auf GAPDH.....	63
20 Cholesterinkonzentrationen in Leber und Plasma der laktierenden Tiere (V4)...	64
21 mRNA-Konzentrationen des SREBP-2 und seiner Zielgene in der Leber laktierender Tiere (V4), bezogen auf GAPDH.....	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Seite
1 Anhäufung von verhornten Epithelzellen im Vaginalabstrich einer Ratte im Östrus (200x) (V3).....	24
2 Anhäufung vorwiegend von Leukozyten sowie einigen Epithelzellen und neutrophilen Granulozyten einer Ratte im Diöstrus (200 x) (V3).....	24
3 Gewichtsentwicklung der weiblichen Ratten vor und während Verpaarung, Trächtigkeit und Laktation (V1).....	40
4 mRNA-Konzentration des PPAR α in der Leber trächtiger Tiere und laktierender Tiere am Tag 10 und 20 im Vergleich zur Leber weiblicher, adulter Kontrolltiere (V2).....	47
5 mRNA-Konzentration der CPT1a in der Leber trächtiger Tiere und laktierender Tiere am Tag 10 und 20 im Vergleich zur Leber weiblicher, adulter Kontrolltiere (V2).....	47
6 mRNA-Konzentration des CYP4A1 in der Leber trächtiger Tiere und laktierender Tiere am Tag 10 und 20 im Vergleich zur Leber weiblicher, adulter Kontrolltiere (V2).....	47
7 mRNA-Konzentration der ACO in der Leber trächtiger Tiere und laktierender Tiere am Tag 10 und 20 im Vergleich zur Leber weiblicher, adulter Kontrolltiere (V2).....	47
8 Gewichtsentwicklung der weiblichen Ratten während Verpaarung und Trächtigkeit (V3).....	48
9 Relative Lebergewichte der trächtigen Tiere (V3).....	49
10 Gewichtsentwicklung der weiblichen Ratten während der Laktation (V4).....	56
11 Relative Lebergewichte der laktierenden Tiere (V4).....	58
12 Konzentrationen an Phospholipiden (PL) in der Leber der laktierenden Tiere (V4).....	65

1. Einleitung

Hierzulande ist gegenwärtig eine große Präferenz für die Aufnahme von frittierte Nahrung zu erkennen. Die im Prozeß des Erhitzens und Frittierens der Lebensmittel verwendeten Fette werden oftmals über eine lange Zeit hohen Temperaturen ausgesetzt und unterliegen dadurch einer Oxidation. Einflussfaktoren für eine Oxidation von Fetten sind Wärme, Licht und Sauerstoff. Besonders mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids [PUFA]) sind labile Komponenten, die rasch einer Lipidperoxidation unterzogen werden können (ESTERBAUER 1993, HALLIWELL und CHIRICO 1993). Dabei entstehen eine Vielzahl von primären und sekundären Lipidperoxidationsprodukten (LPOP), die den Metabolismus von Mensch und Tier maßgeblich beeinflussen können. Studien mit verschiedenen Tierspezies zeigten bereits, dass die Aufnahme oxidierte Fette zur Akkumulation von LPOP in Geweben führt und die Ausbildung von oxidativem Stress verursachen kann (ENGBERG et al. 1996, LIU und HUANG 1995). In Humanstudien wurde gezeigt, dass LPOP über das Intestinum absorbiert und anschließend in Lipoproteine eingebaut werden (STAPRANS et al. 1999, URSINI et al. 1998). Eine Anhäufung von LPOP wurde bereits in Verbindung mit Krankheiten wie Arteriosklerose, Alzheimer und Krebs gebracht (ADDIS 1986, CHISOLM und STEINBERG 2000, KUBOW 1992, TABET et al. 2000).

Vitamin E (Tocopherol) stellt das wirksamste lipidlösliche Antioxidans dar (MEYDANI 1995). Es schützt PUFA in Membranlipiden, Lipoproteinen und Depotfetten vor einer Zerstörung durch eine Lipidperoxidation (BURTON 1994). Das α -Tocopherol besitzt von allen Vitamin E-Derivaten die höchste biologische Aktivität (KAYDEN und TRABER 1993). Es ist bekannt, dass die Verfütterung oxidierte Fette zu verminderten α -Tocopherolkonzentrationen in Geweben von Ratten (D'AQUINO et al. 1985, EDER et al. 2003a, LIU und HUANG 1995, SÜLZLE et al. 2004, YOSHIDA und KAJIMOTO 1989) und Schweinen (EDER und STANGL 2000) führt. Dabei beruht die verminderte Vitamin E-Konzentration in Geweben nach Aufnahme oxidierte Fette auf einem verstärkten Katabolismus dieses Vitamins aufgrund der Reaktion mit Lipidperoxidationsprodukten (EDER und STANGL 2000, ENGBERG et al. 1996, LIU und HUANG 1995, 1996, SRINIVASAN und PUGALENDI 2000). Auch in der Leber laktierender Ratten und deren Neugeborener wurden nach Verfütterung oxidierte Fette verminderte α -Tocopherolkonzentrationen gemessen (BRANDSCH und EDER 2004). Die maternale Aufnahme oxidierte Fette beeinflusste offensichtlich den Vitamin E-Status der Nachkommen. Tierexperimentelle Studien zeigten, dass pre- bzw. postnatale Ernährung

langanhaltende Auswirkungen auf das Wachstum und den Metabolismus haben kann (KOROTKOVA et al. 2005, LUCAS et al. 1996, ZHANG et al. 2005) und auch die Ausbildung verschiedener Krankheiten, z. B. Diabetes, Atherosklerose und Adipositas beeinflussen kann (HAHN 1984, SMART 1986). Dieser Effekt wird als *fetal programming* bezeichnet, da im Fetus programmatische Veränderungen stattfinden, die noch im Erwachsenenalter erkennbar sind, obgleich die ernährungsbedingte Ursache dafür nicht mehr existiert (LUCAS 1991, McARDLE et al. 2006).

Da bisher keine Studien darüber vorliegen, inwiefern die maternale Aufnahme oxidierter Fette das Wachstum und den Vitamin E-Status von Nachkommen programmieren kann, wurde in vorliegender Arbeit dieser Fragestellung nachgegangen. Die Untersuchungen wurden am Modelltier Ratte durchgeführt, da es im Hinblick auf Reproduktion und Stoffwechsel dem Menschen sehr ähnlich ist. Es wurde untersucht, ob die Fütterung oxidierter Fette an weibliche Ratten während der Reproduktion den Vitamin E-Status der Nachkommen in unterschiedlichen Entwicklungsstufen (Neugeborene, Jungtiere [20Tage], Adulte [10Wochen]) beeinträchtigt bzw. eine hohe Vitamin E-Supplementierung den Vitamin E-Status im Muttertier und den Nachkommen verbessern kann und dadurch dem durch oxidierte Fette hervorgerufenen verstärkten Katabolismus von Vitamin E entgegenwirken kann. So wurden im **Versuchsansatz 1 (V1)** weiblichen Ratten vor und während der Reproduktion (Verpaarung, Trächtigkeit, Laktation) oxidierte Fette gefüttert. Die Diäten erhielten zum einen eine hohe Vitamin E-Supplementierung (250 mg α -Tocopheroläquivalente/ kg Diät), die dem 10fachen Vitamin E- Bedarf entsprach (MUGGLI 1994). Zum anderen wurden die Diäten mit einer niedrigen Vitamin E-Supplementierung (25 mg α -Tocopheroläquivalente/ kg Diät) versehen, die dem Mindestbedarf an Vitamin E entsprach (MUGGLI 1994). Um zunächst Aussagen über den Vitamin E-Status im Muttertier nach Verfütterung oxidierter Fette treffen zu können, wurden die α -Tocopherolkonzentrationen in Leber, Plasma, Milchdrüse und Milch gemessen. Die Bestimmung des Vitamin E-Status in den Nachkommen unterschiedlicher Entwicklungsstufen wurde in Leber und Plasma vorgenommen. Die Gewichte der Nachkommen wurden wöchentlich kontrolliert, um Aussagen über einen möglichen Einfluss oxidierter Fette und der Vitamin E-Supplementierung auf das Wachstum treffen zu können.

Während Trächtigkeit und Laktation unterliegt der Lipidstoffwechsel sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte massgeblichen Veränderungen (HERRERA und AMUSQUIVAR 2000, SMITH et al. 1998). Die ersten beiden Trimester der Trächtigkeit sind von anabolen Stoffwechselvorgängen geprägt. Durch eine gesteigerte Lipogenese im Fettgewebe kommt es

zum Aufbau von Energiereserven. Im letzten Trimester der Trächtigkeit und während der Laktation schaltet der Organismus auf katabole Stoffwechselprozesse im Fettgewebe um (HERRERA 2000); dann ist die Triglyceridsynthese vermindert und die Lipolyse erhöht (HERRERA et al. 1991). In der Leber liegt dann eine erhöhte Fettsäure- und Triglyceridsynthese mit einer erhöhten Produktion an very low density lipoprotein (VLDL) (WARTH et al. 1975, WASFI et al. 1980, ZIMMERMANN und HUMMEL 1978) und einer verminderten Fettsäureoxidation (OLLER DO NASCIMENTO und WILLIAMSON 1986) vor. Diese metabolischen Veränderungen sind notwendig, um während der Laktation der Milchdrüse ausreichend Lipide für die Milch zur Verfügung stellen zu können.

An der Regulation des Lipidstoffwechsels ist maßgeblich der Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptor α (PPAR α) beteiligt. PPAR α , von ISSEMANN und GREEN (1990) entdeckt, wird vorwiegend in metabolisch aktivem Gewebe wie Leber, Niere und Herz exprimiert (BRAISSANT et al. 1996) und gehört zur Familie der Liganden-aktivierten, nuklearen Rezeptoren. Neben PPAR α gehören zur Familie der PPAR's zudem PPAR β/δ und PPAR γ (DREYER et al. 1992). Nach einer Aktivierung des PPAR α durch Liganden (so genannte Peroxisomen-Proliferatoren), welche synthetischer (Fibrate) bzw. natürlicher (ungesättigte Fettsäuren) Art sein können (DESVERGNE und WAHLI 1999, GOETTLICHER et al. 1992), bildet dieser ein Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR). Dieser Komplex bindet an PPAR response elements (PPRE) in der Promotorregion der Zielgene, welche u. a. den hepatischen Fettsäurekatabolismus mittels peroxisomaler, mitochondrialer und mikrosomaler Oxidation regulieren, und führt zu deren Transkription (DESVERGNE und WAHLI 1999). Eines der Zielgene stellt die Acyl-CoA-Oxidase (ACO) dar, Schlüsselenzym der peroxisomalen β -Oxidation langkettiger Fettsäuren (KUNAU et al. 1995). Die Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1a (CPT1a) und die mittelkettige bzw. langkettige [medium-chain und long-chain] Acyl-CoA-Dehydrogenase (MCAD, LCAD) sind Schlüsselenzyme der mitochondrialen β -Oxidation (BARTLETT und EATON 2004, LE et al. 2000, McGARRY und BROWN 1997). CytochromP4504A1 (CYP4A1) fungiert als Schlüsselenzym der mikrosomalen ω -Oxidation, welches die Hydroxylierung von Fettsäuren katalysiert (AOYAMA et al. 1990). Die Folge einer PPAR α -Aktivierung ist die Induktion einer Peroxisomenproliferation in der Leber von Nagetieren (CHAO et al. 2005, DESVERGNE und WAHLI 1999, HESS et al. 1965, REDDY et al. 1980) mit der möglichen Ausbildung eines Lebercarzinoms (REDDY und RAO 1992). Peroxisomen bilden sich aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER), welches ein u. a. aus Phospholipiden aufgebautes Membransystem darstellt. Deshalb geht eine Peroxisomenproliferation demzufolge mit

erhöhten Konzentrationen an Phospholipiden und erhöhten Lebergewichten durch Zunahme von Anzahl und Größe der intrazellulären Peroxisomen einher (HESS et al. 1965, PETERS et al. 2005).

Bei Mäusen wurde die Reduktion der Fettsäureoxidation in der Leber am Ende der Trächtigkeit (GRIMBERT et al. 1993) bereits mit verminderten mRNA-Konzentrationen des PPAR α und seiner Zielgene ACO und CPT1a (SWEENEY et al. 2006) in Verbindung gebracht. Derartige Untersuchungen liegen bei Ratten bisher nicht vor. So wurde in vorliegender Arbeit erstmalig untersucht, ob auch in der Leber von Ratten am Ende der Trächtigkeit und während der Laktation eine verminderte Expression des PPAR α nachweisbar ist, die für die verminderte Fettsäureoxidation verantwortlich sein könnte. Dieser Fragestellung lag **Versuchsansatz 2 (V2)** zugrunde, bei dem weibliche, adulte Kontrolltiere sowie trächtige und laktierende Tiere mit einer kommerziellen Altromindiät gefüttert wurden. In der Leber der Versuchstiere wurden die mRNA-Konzentrationen des PPAR α und seiner Zielgene (ACO, CPT1a, CYP4A1) bestimmt.

Die Wirkungen oxidierter Fette auf den Triglyceridstoffwechsel sind vielfältig. So fungiert oxidiertes Fett als PPAR α -Aktivator und bewirkt eine Hochregulierung der Zielgene mit der Folge verminderter Triglyceridkonzentrationen in Leber und Plasma von männlichen (CHAO et al. 2001, 2004, 2005, SÜLZLE et al. 2004) und weiblichen Ratten (CHAO et al. 2004). Des Weiteren zeigte sich nach Verfütterung oxidierter Fette bei männlichen Ratten eine Verminderung der Genexpression und der Aktivität der Fettsäuresynthetase (FSS) und des Transkriptionsfaktors sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) als weitere Ursache verminderter Triglyceridkonzentrationen (EDER et al. 2003b, EDER und KIRCHGESSNER 1998). SREBP-1c dient der Aktivierung von Genen für die Lipidsynthese (HORTON et al. 2002, SHIMANO et al. 1999).

Untersuchungen darüber, ob oxidierte Fette auch in der Leber trächtiger und laktierender Ratten in der Lage sind, den PPAR α zu aktivieren bzw. die Fettsäuresynthese zu vermindern, liegen bisher nicht vor und sind Gegenstand vorliegender Arbeit. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Behandlung trächtiger Ratten mit Fibraten (synthetischen PPAR α -Aktivatoren) eine erhöhte PPAR α -Expression in deren Leber bewirkt (SORIA et al. 2005). Zudem verursachte eine Behandlung trächtiger Ratten mit Clofibrat in der fetalen Leber eine Peroxisomenproliferation (STEFANINI et al. 1989) und Induktion von CYP4A1 (SIMPSON et al. 1996). Clofibrat ist offensichtlich in der Lage, den PPAR α transplazentar zu aktivieren.

So wurde in **Versuchsansatz 3 (V3)** untersucht, ob die Fütterung oxidierter Fette während der Trächtigkeit eine Aktivierung des PPAR α mit nachfolgender Peroxisomenproliferation in der Leber trächtiger Ratten und deren Föten bewirken kann und Komponenten des oxidierten Fettes somit die Plazenta passieren können. Während Verpaarung und Trächtigkeit wurde weiblichen Ratten oxidiertes Fett gefüttert. Zum Vergleich wurde Clofibrat als geeignete Kontrollsubstanz zur Aktivierung des PPAR α gefüttert. Um Aussagen über eine PPAR α -Aktivierung mit Hochregulierung der PPAR α -Zielgene in der Leber trächtiger Ratten und deren Föten treffen zu können, wurde die mRNA-Konzentration des PPAR α und seiner Zielgene (ACO, CPT1a, CYP4A1, MCAD, LCAD) bestimmt. Der Einfluss oxidierter Fette auf die hepatische Fettsäuresynthese trächtiger Tiere und der Föten wurde mit Messung der mRNA-Konzentration von SREBP-1c und FSS untersucht. Abschließend folgte die Messung der Triglyceridkonzentrationen in Leber und Plasma. Zur Beurteilung einer Peroxisomenproliferation wurden die Lebergewichte der trächtigen Tiere und die Phospholipidkonzentration in der Leber trächtiger Tiere und der Föten bestimmt.

Eine Studie, die sich erstmalig mit der Wirkung oxidierter Fette auf den Lipidstoffwechsel der Milchdrüse laktierender Ratten beschäftigte, wies signifikant verminderte Triglyceridkonzentrationen in der Milch auf, die zu verminderten Gewichten der säugenden Nachkommen führten (BRANDSCH et al. 2004). Die Ursache für die verminderten Triglyceridkonzentrationen in der Rattenmilch ist bislang unklar. So wurde in **Versuchsansatz 4 (V4)**, bei dem ausschließlich während der Laktation weiblichen Ratten oxidiertes Fett gefüttert wurde, untersucht, welche Mechanismen für die verminderten Triglyceridkonzentrationen in der Milch durch oxidierte Fette verantwortlich sind. Die Leber unterliegt während der Laktation anabolen Stoffwechselprozessen mit verstärkter Fettsäuresynthese und verminderter Fettsäureoxidation, um der Milchdrüse ausreichend Lipide zur Verfügung zu stellen. Veränderungen im hepatischen Triglyceridstoffwechsel können demnach Auswirkungen auf den Triglyceridstoffwechsel der Milchdrüse haben, sodaß es notwendig war, den Einfluss oxidierter Fette auf den Triglyceridstoffwechsel in Leber und Milchdrüse während der Laktation zu untersuchen. Zunächst wurde untersucht, ob die Fütterung oxidierter Fette während der Laktation eine Aktivierung des PPAR α in der Leber und Milchdrüse laktierender Ratten hervorruft und ein verstärkter Fettsäurekatabolismus die verminderten Triglyceridkonzentrationen bewirken kann. Hierfür wurden die mRNA-Konzentrationen des PPAR α und seiner Zielgene sowie die Triglyceridkonzentrationen in Leber, Plasma und Milch bestimmt. Die hepatische Fettsäuresynthese laktierender Tiere

wurde mit Messung der mRNA-Konzentration von SREBP-1c und FSS untersucht. Zur Beurteilung einer Peroxisomenproliferation in der Leber laktierender Ratten wurden die Lebergewichte und die Phospholipidkonzentrationen ermittelt.

Milchtriglyceride können drei unterschiedlichen Quellen entstammen: 1. der Biosynthese der mittelkettigen Fettsäuren (C8-C14) und ihrer Veresterung in der Milchdrüse, 2. der Aufnahme der langkettigen Fettsäuren (C18-C22) aus Triglyceriden der Chylomikronen und VLDL der Leber (NEVILLE et al. 1980), wobei die Hydrolyse der Triglyceride durch die Lipoproteinlipase (LPL) erfolgt und 3. der Aufnahme freier Fettsäuren (non-esterified-fatty-acids [NEFA]) aus dem Plasma, die aus der Hydrolyse der Triglyceride vom Fettgewebe entstammen und mittels Fettsäuretransporter in die Milchdrüse gelangen.

Ogleich bekannt ist, dass die Fettsäuresynthese in der Milchdrüse laktierender Ratten durch die Verfütterung oxidierter Fette nicht beeinflusst wird (BRANDSCH et al. 2004), wurde die mRNA-Konzentration von SREBP-1c und FSS in der Milchdrüse sowie die Konzentration an mittelkettigen Fettsäuren in der Milch zur Unterstützung der bereits vorliegenden Ergebnisse bestimmt. Der Einfluss oxidierter Fette auf die Aufnahme langkettiger Fettsäuren aus den Lipoproteinen wurde mit Messung der mRNA-Konzentration der LPL in die Milchdrüse sowie mit Messung der Konzentration an langkettigen Fettsäuren in der Milch ermittelt. Zudem wurde untersucht, ob oxidierte Fette die Aufnahme der NEFA aus dem Plasma in die Milchdrüse beeinflussen. Hierfür wurde die Konzentration an NEFA im Plasma sowie die mRNA-Konzentrationen der Fettsäuretransporter fatty-acid-binding-protein (FABP), fatty-acid-transport-protein (FATP) und fatty-acid-translocase (FAT/CD36) in die Milchdrüse ermittelt. Parallel dazu erfolgte die Messung der mRNA-Konzentration der LPL und der Fettsäuretransporter in der Leber. Da Milchlipide eine entscheidende Energiequelle für das postnatale Wachstum und die Entwicklung der Jungtiere sind (GIRARD et al. 1992), wurden die Gewichte der Nachkommen über die 20-tägige Laktationsperiode kontrolliert.

Tierexperimentelle Studien zeigten, dass auch der Cholesterinstoffwechsel durch Verfütterung oxidierter Fette beeinflusst wird (CHAO et al. 2005, EDER et al. 2004, HOCHGRAF et al. 1997, SÜLZLE et al. 2004). Die Ursache verminderter Cholesterinkonzentrationen in der Leber laktierender Ratten nach Aufnahme oxidierter Fette (BRANDSCH und EDER 2004) ist bislang unklar und war somit Gegenstand von V3 und V4. SREBP-2, ein wichtiger Regulator des Cholesterinstoffwechsels, bewirkt bei verminderten Cholesterinkonzentrationen die Transkription seiner Zielgene (3-Hydroxyl-3-Methyl-Glutaryl-CoA-Reduktase [HMG-CoA-Reduktase], Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor [LDL-Rezeptor]) (HORTON 2002,

HORTON et al. 2002). Dabei spielt die HMG-CoA-Reduktase eine zentrale Rolle in der Regulation des Cholesterinmetabolismus und der Plasmacholesterinkonzentrationen (DIETSCHY 1997), während der LDL-Rezeptor die zelluläre Aufnahme von cholesterinreichen LDL-Partikeln vermittelt (DIETSCHY 1984). Um Aussagen über eine Beeinflussung des SREBP-2 durch oxidierte Fette während Trächtigkeit (V3) bzw. Laktation (V4) treffen zu können, wurden in der Leber der Versuchstiere die mRNA-Konzentrationen des SREBP-2 und seiner Zielgene gemessen. Zudem wurden die Konzentrationen an Cholesterin in Leber und Plasma bestimmt.

Frühere Studien zeigten, dass stark oxidierte Fette zu Wachstumsverzögerungen bei Ratten führen (AMMOUCHE et al. 2002). Daher erfolgte die Oxidation der Fette in den Versuchsansätzen 1, 3 und 4 jeweils bei niedriger Temperatur (55-60°C) über einen längeren Zeitraum (25-29 Tage), da derart oxidierte Fette bisher keine Wachstumsverzögerungen bei Ratten auslösten (BRANDSCH et al. 2004, EDER et al. 2002). Zur Unterstützung dieser Ergebnisse wurde das Wachstum der weiblichen Ratten wöchentlich protokolliert. Frisches Fett wurde in V1, V3 und V4 als Kontrolle gefüttert. In oxidierten Fetten liegen verminderte Konzentrationen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren und α -Tocopherol im Vergleich zu frischen Fetten vor (CORCOS BENEDETTI et al. 1987, HOCHGRAF et al. 1997, LIU und HUANG 1995). Zur Vermeidung von Effekten infolge einer differierenden Fettsäurezusammensetzung wurde das frische Fett dem oxidierten Fett hinsichtlich der Fettsäurezusammensetzung mit Orientierung an der Linolsäure angeglichen. Da eine ad libitum Fütterung oxidiertes Fett an Ratten aufgrund des ranzigen Geschmacks zu einem verminderten Futterverzehr führen kann (YOSHIDA und KAJIMOTO 1989), erfolgte die Fütterung der weiblichen Ratten nach einem kontrollierten Fütterungssystem, um eine einheitliche Futteraufnahme zu gewährleisten. Zur Bestimmung des Oxidationsgrades der Fette wurden Fettkennzahlen in Form der Peroxidzahl (POZ), der Säurezahl (SZ), der konjugierten Diene sowie der Thiobarbitursäure-reaktiven-Substanzen (TBARS), der Carbonyle und der polaren Komponenten gemessen.

Die Arbeit hat insgesamt zum Ziel, neue Erkenntnisse im Hinblick auf die Wirkung oxidiertes Fett auf den Lipidstoffwechsel von weiblichen Ratten während der Reproduktion und deren Nachkommen zu gewinnen. Es werden Aussagen darüber getroffen, ob oxidiertes Fett, die während der Reproduktion aufgenommen werden, das Wachstum und den Stoffwechsel der Nachkommen nachteilig beeinträchtigen können.

2. Material und Methoden

Chemikalien

Agarose

Ammoniummolybdat

Ascorbinsäure

Borsäure

Chloroform

Clofibrat

DEPC

DNA-Marker (100bp)

Dinitrophenylhydrazin 2,4

Dioxan 1,4

dNTP-Mix

EDTA

Eisessig

Ethanol

Ether

Ethidiumbromid

Formaldehyd

Formamid

Glycerol

Glycin

GoTaq® DNA Polymerase

GoTaq® MgCl₂

5 x GoTaq® Flexi Puffer

5 x Green GoTaq® Flexi Puffer (Ladepuffer)

Heparin

Hexan

HV-Kalibrator (Ecoline)

Isopropanol

Kaliumchlorid

Kaliumdihydrogenphosphat

Kaliumjodid

Herkunft

Serva, Electrophoresis GmbH,
Heidelberg, Deutschland

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Merck, Darmstadt, Deutschland

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Gene Craft, Lüdinghausen, Deutschland

J.T.Baker, Deventer, Holland

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Gene Craft, Lüdinghausen, Deutschland

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Promega, Mannheim, Deutschland

Promega, Mannheim, Deutschland

Promega, Mannheim, Deutschland

Promega, Mannheim, Deutschland

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Merck, Darmstadt, Deutschland

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Merck, Darmstadt, Deutschland

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Ketamin (Ketavet ®)	Pharmazia &Upjohn, Erlangen, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mops [N-Morpholino-propansulfonsäure]	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumthiosulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
NEFA C-Kit	Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland
Oligo dT18	Operon, Köln, Deutschland
Oxytocin	Atosost GmbH, Twistringen, Deutschland
Pentadecaensäure- Methyl ester	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Perchlorsäure (70%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Petroleumbenzin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phenolphthalein	VEB Laborchemie Apolda, Deutschland
Primer (Realtime-detection-PCR)	Operon, Köln, Deutschland
Pyrogallol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
RevertAid™-M-MuLV (Reverse-Transkriptase)	Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
RevertAid™-M-MuLV 5 x Puffer	Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
Testkit Triglyceride/ Cholesterin (Ecoline S +)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tetraethoxypropan	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Thiobarbitursäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tocopherolkalibratoren	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Toluol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trimethylsulfoniumhydroxid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Triphenylphosphin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris	Serva, Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Triton X 100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trizol® -Reagenz	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Xylazin (Rompun®)	Bayer Vital AG, Leverkusen, Deutschland

2.1 Versuchsdesign

Der vorliegenden Arbeit liegen insgesamt vier Versuchansätze am Modelltier Ratte zugrunde. Die Versuchsansätze 1, 3 und 4, bei denen oxidierte Fette gefüttert wurden, sind zusammenfassend in Tabelle 1 dargestellt.

2.1.1 Versuchsansatz 1

In diesem zweifaktoriellen Versuchansatz wurde das Fett und die α -Tocopherol-Konzentration in semisynthetischen Diäten variiert. Neben dem oxidierten Fett als Behandlung wurde frisches Fett als Kontrolle eingesetzt.

Die Oxidation eines Fettgemisches aus 40% Sonnenblumenöl (Brölio Europe GmbH, Hamm, Deutschland), 10% Leinöl (Kunella Feinkost GmbH, Cottbus, Deutschland) und 50% Schweineschmalz (LARU, Langensiepen&Ruckebier, Bottrop, Deutschland) erfolgte in einer elektrischen Friteuse (Saro Gastro-Products GmbH, Emmerich, Deutschland) unter permanenter Sauerstoffzufuhr bei einer Temperatur von 55°C über einen Zeitraum von 29 Tagen.

Nach Beendigung der Oxidation wurde das Fettsäurespektrum des Fettgemisches gemessen. Während der Oxidation kommt es zu einem Verlust an PUFA im Fett. Um auszuschließen, dass Effekte nach Behandlung mit oxidiertem Fett im Vergleich zum frischen Fett aufgrund einer unterschiedlichen Fettsäurezusammensetzung auftreten, wurde das Fettsäurespektrum des frischen Fettes dem oxidierten Fett angepasst. Das frische Fett stellte somit ein Gemisch aus 20,5% Sonnenblumenöl (Brölio Europe GmbH) 4,5% Leinöl (Kunella Feinkost GmbH) und 75% Schweineschmalz (LARU) dar. Dabei orientierte man sich an der Linolsäure.

Vitamin E wurde als α -Tocopherol in den Konzentrationen 25 bzw. 250 mg α -Tocopheroläquivalente/ kg Diät (TÄ/ kg Diät) zugegeben. Dabei entsprachen 25 mg TÄ/ kg Diät dem Mindestbedarf an Vitamin E, der sich aus den ungesättigten Fettsäuren, welche mit dem Diätfett zugegeben werden, ergibt (MUGGLI, 1994). 250 mg TÄ/ kg Diät stellten das Zehnfache des Vitamin E-Bedarfs dar. Die Zugabe von α -Tocopherol zu den semisynthetischen Diäten erfolgte mit 50%-igem all-rac- α -Tocopherylacetat.

Die in dem frischen Fett bereits vorhandene Tocopherolkonzentration wurde zunächst chromatographisch mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (2.3.2) ermittelt und bei der Kalkulation der hinzuzugebenden Menge an α -Tocopheroläquivalent berücksichtigt. Man beachtete bei der Berechnung der Supplementierung zudem, dass 1 mg α -Tocopherol 1 mg α -

Tocopheroläquivalente entsprach und dieses wiederum 1,49 mg α -Tocopherylacetat entsprach.

Für V1 ergaben sich 4 Versuchsgruppen:

Fr 25 = frisches Fett + 25 mg α -Tocopheroläquivalente

Fr 250 = frisches Fett + 250 mg α -Tocopheroläquivalente

Ox 25 = oxidiertes Fett + 25 mg α -Tocopheroläquivalente

Ox 250 = oxidiertes Fett + 250 mg α -Tocopheroläquivalente

Die kontrollierte Fütterung an weibliche Ratten erfolgte 3 Wochen vor der Verpaarung, während Verpaarung und Trächtigkeit bis zum Tag 19 der Laktation über einen Zeitraum von insgesamt 61 Tagen.

2.1.2 Versuchsansatz 2

In diesem Versuchsansatz erfolgte eine ad libitum Fütterung von weiblichen Ratten während der Reproduktion (Trächtigkeit, Verpaarung) mit einer käuflich erworbenen Altromin-Diät (Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lage, Deutschland) ohne weitere Zusätze. Als Kontrolle dienten weibliche, adulte, unverpaarte Ratten.

Die Fütterung an die weiblichen Ratten begann im Alter von 10 Wochen. Die Dauer der Fütterung der weiblichen, adulten Kontrollratten betrug 1 Woche; im Alter von 11 Wochen fand die Probennahme statt. Die Fütterung der weiblichen, verpaarten Ratten erfolgte bis zum Tag 20 der Trächtigkeit bzw. bis zum Tag 10 oder Tag 20 der Laktation. Zu diesen Zeitpunkten fand die Probennahme statt.

Für V2 ergaben sich 4 Versuchsgruppen:

Adulte, weibliche Kontrolltiere

Trächtige Tiere (Tag 20)

Laktierende Tiere (Tag 10)

Laktierende Tiere (Tag 20)

2.1.3 Versuchsansatz 3

In diesem einfaktoriellen Versuch wurde der Faktor Fett in den semisynthetischen Diäten modifiziert. Neben dem oxidierten Fett wurde zudem frisches Fett mit Clofibrat (4 g/ kg Diät) als Behandlung eingesetzt. In Bezug auf die eingesetzte Menge an Clofibrat erfolgte eine Orientierung an der Arbeit von MESIA-VELA et al. (2004) für weibliche Ratten. Als Kontrolle wurde ausschließlich frisches Fett verwendet.

Um einen hohen Anteil an oxidierten Fettsäuren für die Gewährleistung einer effektiven Initiierung einer PPAR α -Aktivierung in den Versuchstieren zu erhalten, wurde ausschließlich Sonnenblumenöl mit einem hohen Anteil an PUFA zur Oxidation verwendet. Die Oxidation von 100% Sonnenblumenöl (K Classic, Kaufland Warenhandel, Neckarsulm, Deutschland) erfolgte in einer elektrischen Friteuse (Saro Gastro-Products GmbH) bei einer Temperatur von 60°C und einer permanenten Sauerstoffzufuhr über einen Zeitraum von 25 Tagen. Das frische Fett stellte ein Gemisch aus 54% Sonnenblumenöl (K Classic) und 46% Schweineschmalz (LARU) dar und wurde anhand des Fettsäurespektrums des oxidierten Fettes ermittelt. Die Orientierung erfolgte erneut anhand der Linolsäure. Der Grund der Anpassung der Fettsäurespektren vom frischen und oxidierten Fett wurde bereits unter 2.1.1 erwähnt.

Die semisynthetischen Diäten wurden mit 50%-igem α -Tocopherylacetat so supplementiert, dass je eine Endkonzentration von 50 mg α -Tocopheroläquivalente/ kg Diät in den drei verschiedenen Diäten vorlag. Diese Konzentration deckte den Bedarf an Vitamin E, bezogen auf die in den Diätfetten enthaltenen ungesättigten Fettsäuren (MUGGLI 1994).

Für V3 ergaben sich 3 Versuchsgruppen:

Fr 50 = frisches Fett + 50 mg α -Tocopheroläquivalente

Ox 50 = oxidiertes Fett + 50 mg α -Tocopheroläquivalente

Clof 50 = frisches Fett + 50 mg α -Tocopheroläquivalente + Clofibrat

Die kontrollierte Fütterung erfolgte an weibliche Ratten vom Beginn der Verpaarung bis zum Tag 19 der Trächtigkeit über einen Zeitraum von insgesamt 19 Tagen.

2.1.4 Versuchsansatz 4

In diesem einfaktoriellen Versuch wurde der Faktor Fett in den semisynthetischen Diäten variiert. Neben dem oxidierten Fett als Behandlung wurde frisches Fett als Kontrolle verwendet.

Zur Gewährleistung einer effektiven Initiierung einer PPAR α -Aktivierung in den Versuchstieren durch oxidierte Fettsäuren wurde ausschließlich Sonnenblumenöl mit einem hohen Anteil an PUFA zur Oxidation verwendet. Die Oxidation von 100% Sonnenblumenöl (K Classic, Kaufland Warenhandel, Neckarsulm, Deutschland) erfolgte in einer elektrischen Friteuse (Saro Gastro-Products GmbH) unter permanenter Sauerstoffzufuhr bei einer Temperatur von 60°C über einen Zeitraum von 25 Tagen. Anhand des Fettsäurespektrums des oxidierten Fettes wurde das Mischverhältnis des frischen Fettes so gewählt, dass es dem Fettsäurespektrum des oxidierten Fettes ähnelte. Man orientierte sich an der Linolsäure. Das frische Fett stellte somit ein Gemisch aus 59,5% Sonnenblumenöl (Brölio Europe GmbH) und 40,5% Schweineschmalz (LARU) dar. Der Grund der Anpassung der Fettsäurespektren vom frischen und oxidierten Fett wurde bereits unter 2.1.1 erwähnt.

Die Supplementierung von Vitamin E zu den semisynthetischen Diäten erfolgte mit 50%-igem α -Tocopherylacetat. Es lag je eine Endkonzentration von 50 mg α -Tocopheroläquivalente/ kg Diät in den Diäten mit frischem und oxidiertem Fett vor, wobei diese den Bedarf an Vitamin E, bezogen auf die in den Diätfetten enthaltenen ungesättigten Fettsäuren, deckte (MUGGLI 1994).

Für V4 ergaben sich 2 Versuchsgruppen:

Fr 50 = frisches Fett + 50 mg α -Tocopheroläquivalente

Ox 50 = oxidiertes Fett + 50 mg α -Tocopheroläquivalente

Die kontrollierte Fütterung erfolgte an trächtige Ratten mit Beginn der Geburt (Tag 1) bis zum Tag 20 der Laktation über einen Zeitraum von insgesamt 20 Tagen.

In den Versuchsansätzen 1, 3 und 4 wurden die eingesetzten Fette mittels Fettkennzahlen charakterisiert. Der jeweilige Oxidationsprozess der Fette wurde mittels Bestimmung der POZ (siehe 2.3.3) überwacht. Die Erhitzung des Fettes wurde beendet, sobald die gewünschte POZ erreicht wurde.

Tab.1 Versuchsbedingungen; Anzahl der Versuchstiere, Zusammensetzung und Behandlung der Diätfette sowie Dauer der Versuche 1, 3, 4

Parameter	Versuch 1		Versuch 3			Versuch 4	
Fett	Frish	Oxidiert	Frish	Oxidiert	Frish+Clofibrat	Frish	Oxidiert
mg a-Tocopherol-äquivalente/ kg Diät	25 250	25 250	50	50	50	50	50
Anzahl weibliche Versuchstiere	12 12	12 12	12	12	12	12	12
Zusammensetzung des Fettes (%)	SoÖl:LeÖl:ScSc 20,5: 4,5: 75	SoÖl:LeÖl:ScSc 40: 10: 50	SoÖl:ScSc 54 : 46	SoÖl 100	SoÖl:ScSc 54 : 46	SoÖl:ScSc 59,5 : 40,5	SoÖl 100
Behandlung des Fettes (Temperatur, Zeit)	unbehandelt	29 Tage, 55°C, Sauerstoffzufuhr, Friteuse	unbehandelt	25 Tage, 60°C, Sauerstoffzufuhr, Friteuse	Unbehandelt	unbehandelt	25 Tage, 60°C, Sauerstoffzufuhr, Friteuse
Fütterungsperiode	61 Tage (21 Tage vor Verpaarung bis Tag 19 der Laktation)		19 Tage (Tag 1-Tag 19 der Trächtigkeit)			20 Tage (Tag 1 bis Tag 20 der Laktation)	

SoÖl- Sonnenblumenöl; LeÖl- Leinöl, ScSc- Schweineschmalz

2.2 Zusammensetzung und Herstellung der Diäten

Für die Versuchsansätze 1, 3 und 4 wurden semisynthetische Diäten hergestellt. Die Zusammensetzung der Diäten ist in Tabelle 2 aufgeführt. Sie orientiert sich an den Empfehlungen des „American Institute of Nutrition“ für Ratten während der Trächtigkeit und Laktation (REEVES et al. 1993). In Tabelle 3 und 4 sind die Gehalte der zugesetzten Mineralstoffe und Vitamine in der Diät dargestellt.

Tab. 2 Zusammensetzung der Diät

Komponenten	g/ kg Diät
Casein	200
Maisstärke	390
Zucker	200
Fett ¹	100
Cellulose	50
Vitamin- und Mineralstoffvormischung	60
DL-Methionin	2

¹frisches bzw. thermisch behandeltes Fett

Tab. 3 Mineralstoffvormischung der Diät

Mengenelemente	mg/ kg Diät
Calcium	6300
Phosphor	3700
Natrium	1039
Kalium	3600
Chlorid	1630
Magnesium	600

Fortsetzung Tab. 3

Spurenelemente	mg/ kg Diät
Eisen	75
Zink	38
Mangan	10
Kupfer	8
Jod	0,2
Selen	0,3
Molybdän	0,1
Chrom	1
Nickel	0,5

Tab. 4 Vitaminvormischung der Diät

Vitamine	mg/ kg Diät
Vitamin A	800
Vitamin D ₃	200
Vitamin K	0,75
Vitamin B ₁	5
Vitamin B ₂	6
Vitamin B ₆	6
Vitamin B ₁₂	0,025
Nicotinsäure	30
Folsäure	2
Pantothensäure	15
Biotin	0,2
Cholinchlorid	1000

Die Vitamin und Mineralstoffvormischung wurde mit Saccharose auf einen Anteil von insgesamt 60 g/ kg Diät vorgemischt und der Trockenmischung beigegeben.

Das frische bzw. oxidierte Fett hatte in allen drei Versuchsansätzen einen Anteil von 10% an der Gesamtdiät. Es wurden je 100 g Fett mit dem entsprechenden Anteil an Tocopherylacetat vermischt und mit 900 g der Trockenmischung unter Mithilfe von Wasser zu einem Teig geknetet. Anschließend wurden die Diäten gefriergetrocknet, bei -20°C gelagert und waren so vor Verfallsprozessen geschützt.

2.3 Charakterisierung der Diätfette

2.3.1 Fettsäurespektrum

Die Bestimmung des Fettsäurespektrums der Diätfette erfolgte mittels Gaschromatographie.

Durchführung

Es erfolgte zunächst eine Methylierung der Fettsäuren mit 100 µl Trimethylsulfoniumhydroxid (BUTTE 1983); anschließend wurden die gebildeten Fettsäuremethylester gaschromatographisch aufgetrennt (Hewlett Packard 5890, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) und mittels Flammenionisationsdetektor quantifiziert. Die Trennung erfolgte an einer 30 m langen FFAP-Silica-Trennsäule (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) mit einem Innendurchmesser von 0,53 mm. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 8,9 ml/min eingesetzt. Die Identifizierung der Fettsäuremethylester erfolgte über deren Retentionszeiten und die Auswertung wurde mit Hilfe der HP 3365 Chemstation durchgeführt.

2.3.2 Tocopherolkonzentration

Die Ermittlung der Tocopherolkonzentrationen in den Diätfetten erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) nach den Methoden von BALZ et al. (1993) und COORS (1991).

Durchführung

Es wurden 20 µl des Fettes mit 1 ml Pyrogallol (1% in Ethanol) versetzt und durch 150 µl gesättigter Natriumhydroxidlösung verseift. Die Inkubation verlief 30 min bei 70°C; anschließend wurden die Tocopherolisomere mit 2 ml Hexan extrahiert. Die Isomere wurden

chromatographisch an der HPLC-Anlage der 1100-er Serie aufgetrennt (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland).

Die Auftrennung erfolgte an einer Kieselgelsäule (LiChrospher® Si 60, 5µm, 250 x 4mm², Agilent Technologies) bei einem Fluss von 1 ml/min des Laufmittels n-Hexan:1,4Dioxan (94:6,v/v); die Säulentemperatur betrug 30°C. Die Quantifizierung der Tocopherolisomere wurde mittels externer Tocopherolkalibratoren über eine Fluoreszenzdetektion durchgeführt (Extinktion 295 nm; Emission 330 nm).

2.3.3 Peroxidzahl

Die Bestimmung der POZ, welche den peroxidisch gebundenen Sauerstoff in Fetten angibt, erfolgte nach der Methode von WHEELER (1932). Diese Fettkennzahl dient im Allgemeinen der Erfassung des Oxidationszustandes von Fetten.

Durchführung

1 g eines oxidierten Fettes bzw. 5 g eines frischen Fettes wurden in 30 ml Eisessig-Chloroform-Gemisch (3:2, v/v) gelöst und mit 2 ml Kaliumjodidlösung versetzt. Dieser Ansatz wurde für 1 min kräftig geschüttelt und die Reaktion anschließend mit 30 ml Wasser gestoppt. Die Jodmenge, die durch die Reaktion mit den Peroxidgruppen freigesetzt wurde, konnte durch Titration mit 0,05 N Natriumthiosulfat bestimmt werden.

Berechnung

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

E

a-Verbrauch Natriumthiosulfat (ml) - Probe

b-Verbrauch Natriumthiosulfat (ml) - Wasser

N-Normalität Natriumthiosulfat

E -Fetteinwaage

2.3.4 Säurezahl

Die Bestimmung der SZ erfolgte nach der DGF-Einheitmethode C-V 2 (81). Diese Fettkennzahl gibt an, welche Menge an Kaliumhydroxid erforderlich ist, um die in 1 g Fett enthaltenen freien Säuren zu neutralisieren.

Durchführung

10 g Fett wurden in einem 50 ml Ethanol-Toluol-Gemisch (1:1, v/v) unter Schwenken gelöst. Die in der Probe vorhandenen Säuren wurden mit einer 0,1 N Kalilauge gegen eine 1%-ige Phenolphthaleinlösung bis zum Farbumschlag titriert.

Berechnung

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

56,1-Molare Masse von KOH
a-Verbrauch an KOH (ml)
N-Normalität von KOH
E-Fetteinwaage

2.3.5 Konjugierte Diene

Bei einer fortschreitenden Wärmebehandlung von Fetten steigt infolge einer Spaltung und Umlagerung der Doppelbindungen der Anteil von konjugierten Dien-Strukturen. Diese Strukturen besitzen aufgrund ihrer Doppelbindung eine optische Aktivität. Die Bestimmung des Diengehaltes in den Fettgemischen beruht auf der Methode von RECKNAGEL und GLENDE (1984).

Durchführung

Es wurden 0,01 g Fett in 10 ml Hexan gelöst und in einer Quarzküvette gegen den Blindwert mit Hexan bei einer Wellenlänge von 234 nm mittels Spektralphotometer (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) gemessen.

Berechnung

$$c[\text{mmol/l}] = \frac{\Delta E}{\epsilon * d}$$

c-Konzentration Diene
 ΔE -Extinktionsänderung
 ϵ -Molarer Extinktionskoeffizient
konjugierter Diene (29.500 l*mol⁻¹*cm⁻¹)
d-Schichtdicke

Die Konzentration an Dienen wurde anschließend auf die Fetteinwaage bezogen.

2.3.6 Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen

Die TBARS sind ein Maß für Carbonylverbindungen in oxidierten Fetten, welche durch die Spaltung von Hydroperoxiden entstehen. Die Aldehyde, im besonderen das Malondialdehyd, bilden mit der Thiobarbitursäure ein farbiges Reaktionsprodukt, welches spektralphotometrisch ermittelt wird. Die Bestimmung der TBARS erfolgt nach der Methode von SIDWELL et al. (1954).

Durchführung

Es wurden je 0,2 g Fett mit 4 ml Chloroform und 4 ml Thiobarbitursäure(TBA)-Reagenz [0,67 g TBA/ 100 ml Reinstwasser; TBA + Eisessig → (1:1; v/v)] versetzt. Anschließend wurden die Proben für 4 min geschüttelt; die dabei entstandene wässrige Phase wurde abgenommen und für 30 min bei 95°C erhitzt. Es erfolgte die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 532 nm mittels Spektralphotometer (Ultrospec 2000) in Glasküvetten.

Berechnung

Unter Verwendung eines Kalibrators (1,1,3,3,-Tetraethoxypropan) wurde eine Kalibrationsgerade erstellt, über deren lineare Gleichung die Konzentration an TBARS in den Proben (mmol/kg Fett) ermittelt wurde.

2.3.7 Gesamt-Carbonylverbindungen

Die Bestimmung der Gesamt-Carbonylverbindungen erfolgte nach einer Methode von ENDO et al. (2001). Aldehyde und Ketone reagieren mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (2,4-DNP) zu 2,4-Dinitrophenylhydrazon (2,4-DNPH), welches spektralphotometrisch ermittelt werden kann.

Durchführung

Es wurden 0,1 g Fett in einer 5 ml aldehydfreien Isopropanol-Triphenylphosphin-Lösung gelöst. Das Triphenylphosphin wurde hinzu gegeben, um eine weitere Oxidation der Proben zu vermeiden. Der Ansatz wurde mit 2,4-DNP-Lösung (0,05% in 3,5%-igem HCL-saurem Isopropanol) versetzt und bei 40°C für 20 min inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit 1 ml 2%-iger Kalilauge versetzt und für 2 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Im

Überstand konnte anschließend der Gehalt an Carbonylverbindungen spektralphotometrisch (Ultraspec 2000) bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen werden.

Berechnung

Über eine lineare Gleichung einer Kalibrationsgeraden von n-Hexanal konnte die Menge an Gesamt-Carbonylen (mmol/kg Fett) ermittelt werden.

2.3.8 Polare und unpolare Verbindungen

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

Durchführung

Es wurde 1g Fett eingewogen, auf ein Volumen von 10 ml mit einem Petroleumbenzin-Diethylether- Gemisch (90:10, v/v) gebracht, gemischt und auf eine Kieselgelsäule mit einer Korngröße von 0,2-0,5 mm aufgetragen. Durch ein Spülen der Säule mit 60 ml des Petroleumbenzin-Diethylether-Gemisches erfolgte ein Herauslösen der unpolaren Fraktion. Die Elution der polaren Fraktion wurde mit dem Spülen von 50 ml Diethylether gewährleistet. Die vollständige Trennung der polaren und unpolaren Fraktionen wurde anschließend mittels Dünnschichtchromatographie überprüft.

Die gewonnenen Eluate wurden mithilfe eines Rotationsverdampfers (Rotavapor, Büchi, Schweiz) getrocknet und anschließend zurück gewogen. Der prozentuale Anteil an polaren und unpolaren Verbindungen im Fett konnte aus dem Verhältnis der Rückwaage zur Einwaage errechnet werden.

2.4 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten in allen Versuchsansätzen ausgewachsene weibliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles-River Wiga, Sulzfeld, Deutschland). In Tabelle 5 sind Anzahl und Gruppierung der jeweiligen Versuchstiere sowie die Körpermasse der Tiere zu Beginn eines jeden Versuches dargestellt.

Tab. 5 Anzahl und Körpermasse der verwendeten Versuchstiere

Versuch	Anzahl Versuchstiere	Gruppen	Körpermasse (g) bei Versuchsbeginn
1	48	4 Gruppen	$198 \pm 13^*$
2	16	4 Gruppen	$258 \pm 20^*$
3	36	3 Gruppen	$238 \pm 27^*$
4	24	2 Gruppen	$257 \pm 17^*$

*Werte = Mittelwerte \pm Standardabweichung

Die Aufteilung der Tiere auf die Gruppen eines jeden Versuchsansatzes erfolgte zufällig, wobei gewährleistet wurde, dass bei Versuchsbeginn gleiche mittlere Lebendmassen in allen Gruppen innerhalb eines Versuchs vorlagen.

Mit Erreichen der Zuchtreife, welche ab Alterswoche 12 vorliegt, wurden die weiblichen Ratten in allen vier Versuchsansätzen mit männlichen Ratten (Sprague-Dawley) für sieben Tage verpaart. In V1, V2 und V4 wurde nach der Geburt der Nachkommen jeder Wurf gewogen. In V2 wurde die gesamte Anzahl der Nachkommen beim Muttertier belassen; in V1 und V4 wurde der Wurf anschließend auf sieben Nachkommen pro Muttertier reduziert. In V3 erfolgte nach einer Trächtigkeitsdauer von 19 Tagen die Gewinnung des Probenmaterials der Föten.

2.4.1 Haltung und Fütterung

Die Versuchstiere wurden einzeln in Macrolonkäfigen mit Einstreu gehalten, die mit einem Metallgitterdeckel geschlossen wurden. Im Versuchsterraum lag eine durchschnittliche Temperatur von $22 \pm 2^\circ\text{C}$ vor, eine relative Luftfeuchte von 50-60% sowie eine künstliche Beleuchtung im 12h Hell-Dunkel-Rhythmus.

Die Fütterung der Tiere in V1, V3 und V4 erfolgte während der Versuchsperioden kontrolliert, um sicherzustellen, dass jedes Tier innerhalb eines Versuchs dieselbe Futtermenge zu sich nahm. Dabei orientierte man sich an dem Tier mit dem geringsten Verzehr. Die Fütterung der Tiere in V2 erfolgte ad libitum.

In V1 lag die tägliche Futteraufnahme zu Beginn des Versuchs (3 Wochen vor Verpaarung) bei 8g/ Tier und wurde bis zum Ende des Versuchs (Laktation) auf 35g/ Tier angehoben. In V3 wurde die Futteraufnahme vom Beginn bis zum Ende des Versuchs (Trächtigkeit) von 14g/ Tier auf 17g/ Tier gesteigert. In V4 erfolgte eine Steigerung der täglichen Futteraufnahme vom Beginn bis zum Ende des Versuchs (Laktation) von anfänglich 20g/ Tier auf 36g/ Tier. Wasser stand in allen Versuchsansätzen ad libitum zur Verfügung. Wöchentlich wurde die Lebendmassezunahme der Versuchstiere in den vier Versuchsansätzen protokolliert.

2.4.2 Vaginalabstrich

Um in Versuchsansatz 3 zu gewährleisten, dass das Alter der heranwachsenden Föten aus den trächtigen Muttertieren annähernd gleich ist, wurden diese 3 bzw. 1 Tag vor der Verpaarung einem Vaginalabstrich unterzogen. Die weibliche Ratte zeigt einen 4-5-tägigen Sexualzyklus (Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus), wobei diese Zyklusphasen anhand differierender Mengen von Zelltypen im Vaginalabstrich unterschieden werden können.

Durchführung

Jeweils vormittags erfolgten die Vaginalabstriche, welche auf einem Objektträger abgestrichen wurden.

Zunächst wurde der auf dem Objektträger befindliche Abstrich in 70%-igem Ethanol für 5 min fixiert, anschließend mit Methylblau (0,01% in H₂O) angefärbt und unter dem Mikroskop betrachtet.

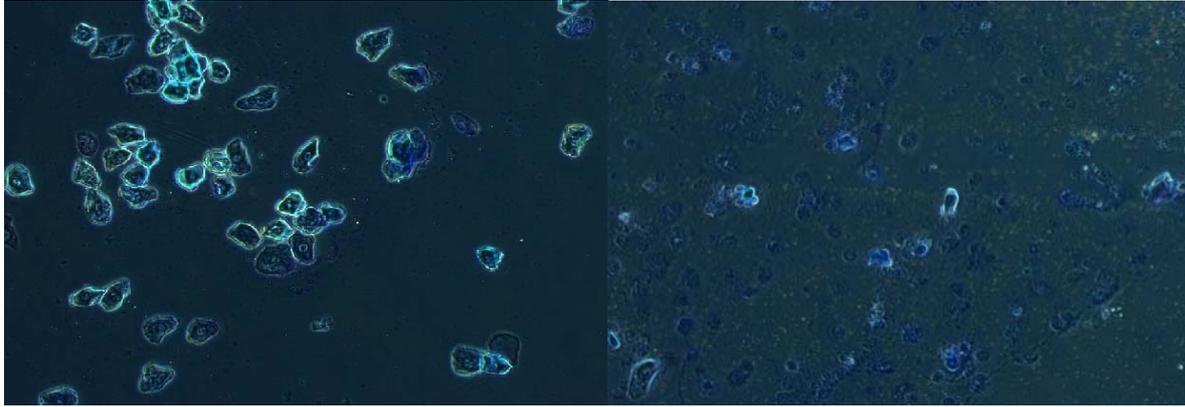


Abb. 1 Anhäufung von verhornten Epithelzellen im Vaginalabstrich einer Ratte im Östrus (200x) (V3)

Abb. 2 Anhäufung vorwiegend von Leukozyten sowie einigen Epithelzellen und neutrophilen Granulozyten einer Ratte im Diöstrus (200 x) (V3)

2.5 Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials

2.5.1 Milchentnahme

Der Tag der Geburt der Nachkommen wird als Tag 1 der Laktation bezeichnet. Am Tag 15 der Laktation erfolgte die Milchentnahme am Muttertier in V1 und V4, wobei diese zuvor mit Ketamin (1 ml/ kg Körpermasse) und Xylazin (0,28 ml/ kg Körpermasse) betäubt wurden. Zudem wurde Oxytocin (0,1 ml/ Tier) injiziert, um den Milchfluss zu stimulieren. Bereits 1 h vor Milchentnahme bis 2 h danach wurde das Muttertier von ihren Nachkommen getrennt. Das Melken erfolgte mittels einer Melkmaschine mit Unterdruck (Eigenbau Institut für Ernährungsphysiologie, TU München Weihenstephan, Deutschland); etwa 2 ml Milch wurden von jeder Ratte gewonnen.

2.5.2 Blutgewinnung

In V1 wurden am Tag der Geburt je drei Neugeborene pro Muttertier dekapitiert und anschließend entblutet. Am Tag 20 der Laktation wurden die Muttertiere und je drei ihrer säugenden Jungtiere unter Etherbetäubung dekapitiert und das Blut wurde in Heparinmonovetten aufgefangen. Je vier ihrer Nachkommen wurden bis zur Adoleszenz (Woche 10) aufgezogen, anschließend dekapitiert und entblutet. Das Blut wurde in Heparinmonovetten aufgefangen. 12 h vor der Tötung erfolgte eine Nüchterung der Tiere.

In V2 wurden die weiblichen, unverpaarten Kontrolltiere sowie die weiblichen Tiere in den unterschiedlichen Stadien der Reproduktion dekapitiert und entblutet, jedoch ohne Blutgewinnung.

In V3 wurden am Tag 19 der Trächtigkeit die Muttertiere unter Etherbetäubung mit anschließender Entblutung dekapitiert. Das Blut wurde in Heparinmonovetten aufgefangen und das Fötenmaterial wurde gewonnen.

In V4 wurde am Tag 20 der Laktation die Dekapitierung der Muttertiere unter Etherbetäubung durchgeführt. Das Blut wurde in Heparinmonovetten aufgefangen.

Sowohl in V3 als auch V4 wurde 5 h vor der Dekapitierung eine Fütterung einer definierten Menge der Diäten durchgeführt, um eventuelle Veränderungen der Genregulation, die bei Nahrungsentzug auftreten könnten, zu vermeiden.

In V1, V3 und V4 wurde das gewonnene Blut bei 3000 U/min und 4°C für 10 min zentrifugiert (Zentrifuge-Multifuge 1S-R, Heraeus® (Kendro, Langenselbold, Deutschland)). Das Plasma wurde gewonnen, anschließend aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.5.3 Organentnahme

Die Leber der Muttertiere wurde in den Versuchsansätzen 1-4 entnommen, gewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

10 mg Leber wurden für die Isolierung der RNA separat in ein autoklaviertes Reaktionsgefäß gegeben und nach dem Schockgefrieren bei -80 °C gelagert.

Die Milchdrüsen der Muttertiere wurden in V1 und V4 entnommen. Auch hier wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert. 10 mg der Milchdrüse wurden für die RNA- Isolierung separat schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.5.4 Extraktion der Gesamtlipide

2.5.4.1 Extraktion der Gesamtlipide aus Diäten

Die Extraktion der Gesamtlipide aus den Diäten zur Bestimmung der Fettkennzahlen erfolgte in V1, V3 und V4.

Durchführung

30 g einer zerkleinerten Diät wurden für 1h in 30 ml Hexan-Isopropanol (3:2,v/v) (HARA und RADIN 1978) extrahiert; der Extrakt wurde anschließend in Rundkolben überführt und am Rotationsverdampfer für 15 min bei 40°C eingeengt (Rotavapor). Das extrahierte Fett wurde bei -20°C gelagert.

2.5.4.2 Extraktion der Gesamtlipide aus der Leber

Die Extraktion der Gesamtlipide aus der Leber in V3 und V4 zur Bestimmung der Triglycerid-, Cholesterin-, und Phospholipidkonzentrationen erfolgte nach einer modifizierten Methode von EDER und KIRCHGESSNER (1994), welcher die Methode von HARA und RADIN (1978) zugrunde liegt.

Durchführung

0,5 g Leber wurden mit 4 ml eines Hexan-Isopropanol-Gemisches (3:2,v/v) versetzt und anschließend im Schüttelinkubator (G 25 Incubator Shaker, New Brunswick, Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey) für 18 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Extrakt wurde abpipettiert und bei -20°C gelagert.

2.5.4.3 Extraktion der Gesamtlipide aus der Milch

Die Extraktion der Gesamtlipide aus der Milch erfolgte in V4 zur Bestimmung der Triglyceridkonzentration.

Durchführung

Es wurden 50 mg Milch mit 1 ml Chloroform versetzt und anschließend für 1h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Chloroformphase abpipettiert und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

2.6 Analysenmethoden

2.6.1 Tocopherolkonzentration

Die Ermittlung der Tocopherolkonzentrationen in den Geweben Leber und Milchdrüse sowie im Plasma und der Milch in V1 erfolgte mittels HPLC nach den Methoden von BALZ et al. (1993) und COORS (1991), wie bereits in Kapitel 2.3.2 beschrieben wurde. Es wurden je 50 mg Leber und Milchdrüse bzw. 200µl Plasma und Milch für die Bestimmung der Tocopherolkonzentration eingesetzt.

2.6.2 Konzentration an Triglyceriden und Cholesterin

Die Messung der Konzentrationen an Triglyceriden und Cholesterin in Leber und Plasma in V3 und V4 sowie der Konzentration an Triglyceriden in der Milch in V4 erfolgte mithilfe des ECOLINE S-Testkits.

Triglyceride werden mittels Lipoproteinlipase zu Glycerin und freien Fettsäuren abgebaut; das Glycerin wird anschließend weiter umgesetzt. Dabei entsteht Wasserstoffperoxid, das gemeinsam mit 4-Aminoantipyrin und Chlorphenol zu einem farbigem Chinonimin umgesetzt wird. Dieses Chinonimin wird bei 550 nm spektralphotometrisch gemessen.

Cholesterin und seine Ester werden durch Detergenzien freigesetzt und anschließend durch Cholesterinesterasen hydrolysiert und durch Cholesterinoxidase oxidiert. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid wird mittels 4-Aminoantipyrin und Phenol ebenfalls zu einem farbigem Chinonimin umgesetzt, welches spektralphotometrisch bei 500 nm gemessen wird.

Durchführung

Die Cholesterin- und Triglyceridkonzentration wurden im Plasma direkt gemessen. Für die Messung der Cholesterin- und Triglyceridkonzentration in der Leber und der Triglyceridkonzentration in der Milch wurden Aliquote der Lipidextrakte verwendet (siehe 2.5.4). Zunächst erfolgte das Verdampfen des Lösungsmittels Hexan-Isopropanol bzw. Chloroform. Danach wurden die Proben mit 20 µl eines Triton X 100-Chloroform-Gemisches (1:1,w/w) versetzt, um die Fette in eine hydrophile Form zu bringen. Das Lösungsmittel Chloroform verdampfte erneut. Es erfolgte die spektralphotometrische Messung (Ultrospec 2000) der Triglyceride und des Cholesterins.

Als Kalibrator für die Messung der Triglyceride in Lipidextrakten wurde reines Sonnenblumenöl (25 µg/50 µl Hexan) und für die Messung von Cholesterin wurde reines Cholesterin (Sigma C8503; 25 µg/ 50 µl Hexan) eingesetzt. Für die Messung der Lipide im Plasma wurde ein kommerzieller HV-Kalibrator (Ecoline) verwendet.

Berechnung

$$c [\mu\text{g/ml}] = \frac{E_p * C_{st}}{E_{st}}$$

c-Konzentration an Cholesterin/ Triglyceriden
Ep-Extinktion Probe
Cst-Konzentration Standard
Est-Extinktion Standard

Die Lipidkonzentrationen der Gewebeproben wurden auf die Einwaage der Proben bezogen.

2.6.3 Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma

Die Ermittlung der freien Fettsäuren (NEFA) im Plasma in V4 erfolgte mithilfe des NEFA C-Kits, einem enzymatischen Farbstest. Dabei werden NEFA mit einer Acyl-CoA-Synthetase versetzt und anschließend wird das entstehende Acyl-CoA durch eine zugesetzte Acyl-CoA-Oxidase oxidiert. Die entstandenen Hydrogenperoxide bilden nach Zugabe einer Peroxidase einen roten Farbstoff, welcher spektralphotometrisch bei 550 nm gemessen wird. Die Intensität des roten Farbstoffs ist dabei proportional der Konzentration an unveresterten Fettsäuren im Plasma.

Durchführung

Die Messung der NEFA im Plasma erfolgt entsprechend der Herstellerangaben.

Berechnung

$$\text{NEFA [mg/dl]} = \frac{E_p * C_{st}}{E_{st}}$$

Ep-Extinktion Probe
Cst- Konzentration Standard
Est- Extinktion Standard

2.6.4 Fettsäurespektrum der Milch

Die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung in den Lipidextrakten der Rattenmilch in V4 erfolgte mittels Gaschromatographie, wie bereits in Kapitel 2.3.1 beschrieben wurde.

Nach Identifizierung der Fettsäuremethylester über ihre Retentionszeiten erfolgte deren Quantifizierung durch den mitgeführten internen Standard Pentadecaensäure-Methylester.

2.6.5 Phospholipidbestimmung mittels Phosphor-Assay

Die Ermittlung der Gesamtpospholipide in den Lipidextrakten der Leber (siehe 2.5.4.2) in V3 und V4 nach einer Methode von ROUSER et al. (1970) erfolgte durch eine Phosphorbestimmung nach einem vorangegangenen Säureaufschluss durch Veraschung. Das dabei freigesetzte anorganische Phosphat reagiert mit Ammoniummolybdat zu einem Komplex, welcher spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 800 nm gemessen wird.

Durchführung

Es wurden je 20 µl der Lipidextrakte in spezielle Veraschungsglasröhrchen pipettiert; ein Abdampfen des Lösungsmittels Hexan-Isopropanol folgte. Nach einer Zugabe von 325 µl 70%-iger Perchlorsäure erfolgte eine Veraschung für 30-45min bei 250°C.

Als Kalibrator diente eine Kaliumhydrogenphosphatlösung (439 mg/ 1 l Reinstwasser). Für die Erstellung der Kalibrationsgerade wurden folgende Konzentrationen verwendet : 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml, 8 µg/ml und 10 µg/ml. Dem verwendeten Kalibrator wurden ebenfalls 325 µl 70%-ige Perchlorsäure zugesetzt; jedoch ohne nachfolgende Veraschung.

Nach Abkühlung der Probenröhrchen wurden zu den Proben bzw. dem Kalibrator 1650 µl Reinstwasser, 250 µl Ammoniummolybdatlösung (2,5 g/ 100 ml Reinstwasser) und 250 µl Ascorbinsäurelösung (10 g/ 100 ml Reinstwasser) zugegeben und gut gemischt. Nach einer Inkubation für 5 min bei 100°C in einem Wasserbad wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 800nm (Ultrospec 2000) gemessen.

Berechnung

Unter Verwendung des Kalibrators wurde eine Kalibrationsgerade erstellt, über deren lineare Gleichung die Konzentration an Gesamtpospholipiden (µmol/g Leber) ermittelt wurde.

2.6.6 Expressionsanalyse ausgewählter Gene in Leber und Milchdrüse

Die Analyse der Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren und Gene des Triglycerid- und Cholesterinstoffwechsels erfolgte in der Leber (V2, V3 und V4) sowie in der Milchdrüse (V4) der Versuchstiere.

2.6.6.1 Isolierung der RNA und deren Konzentrationsbestimmung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus der Leber und der Milchdrüse erfolgte mittels Trizol® - Reagenz.

Durchführung

Um sicherzustellen, dass im Prozess der Isolierung der RNA das Wirken von RNasen vermieden wird, wurde ausschließlich Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltes Reinstwasser verwendet. Dafür wurde 1 l Reinstwasser mit 1 ml DEPC versetzt, in einem Wasserbad bei 37°C für 24 h inkubiert und anschließend autoklaviert.

Zunächst wurde die Gewebeprobe mit 1 ml Trizol versetzt und für 3 min bei 15 Hz in einem Tissue-Lyser (Qiagen, Hilden, Deutschland) homogenisiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform erfolgte eine Zentrifugation (Biofuge fresco Heraeus®; Kendro) für 15 min bei 13.000 U/min und 4°C. Es wurden zwei Phasen ausgebildet; die untere organische Phase enthielt die DNA und die Proteine und in der oberen wässrigen Phase befand sich die RNA. Letztere wurde in neue, autoklavierte Reaktionsgefäße überführt und nach einer Zugabe von 500 µl Isopropanol erneut bei 13.000 U/ min und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das gewonnene RNA-Pellet mit 1 ml 75%-igem Ethanol gewaschen und für 5 min bei 9700 U/ min und 4°C abermals zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes wurden die RNA-Pellets getrocknet, anschließend in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und für 10 min bei 60°C in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte am Spektralphotometer (Ultrospec 2000) durch Messung der optischen Dichte in Quarzküvetten. Dafür wurde die RNA 1: 100 mit DEPC-Wasser verdünnt und anschließend bei einer Extinktion von 260 nm und 280 nm (Extinktion für Proteine) gegen den Leerwert gemessen. Um Aussagen über die R

einheit der Probe treffen zu können, wurde der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm und der Extinktion bei 280 nm ermittelt. Bei Werten von $> 1,7$ wurde davon ausgegangen, dass wenig Protein in der Probe vorliegt.

Berechnung

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

A= Extinktion bei 260 nm

40 = Dichte von 1,0 bei 260 nm

V= Verdünnungsfaktor (100)

Es wurde davon ausgegangen, dass eine optische Dichte von 1,0 bei 260 nm 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA entspricht.

2.6.6.1.1 RNA-Agarosegelelektrophorese

Die Überprüfung der Qualität der isolierten RNA erfolgte mithilfe der Gelelektrophorese. Bei Vorliegen intakter RNA sind bei Eukaryoten zwei scharfe Banden der rRNA, die 28 S und 18 S, erkennbar, wobei die 28 S-rRNA-Bande die doppelte Intensität im Vergleich zur 18 S-rRNA-Bande aufweisen sollte. Da die RNA zur Ausbildung von Sekundärstrukturen neigt, muss die Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen erfolgen; geeignetes Mittel zur Denaturierung ist das Formaldehyd.

Durchführung

Die Gelelektrophorese-Apparatur (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) wurde mit 1 x FA Gellaufpuffer (100 ml 10 x FA Gelpuffer, 20 ml 37 % Formaldehyd, 880 ml DEPC-Wasser) ausgefüllt.

Für ein 1,2%-iges Agarose-Gel wurden 0,36 g Agarose mit 3 ml 10 x FA Gelpuffer (200 mM Mops [N-Morpholino-propansulfonsäure], 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, Reinstwasser) und 26,5 ml DEPC-Wasser versetzt und unter vorsichtigem Aufkochen gelöst. Nach einer Abkühlung auf 65°C wurden dem Gemisch 12 μl Ethidiumbromid und 540 μl 37%-iges Formaldehyd zugegeben; das Gel wurde dann unverzüglich gegossen.

Nach Aushärtung und Äquilibration des Gels im Puffer wurden die Proben aufgetragen. Je 10 μl Probe, die 4 μg RNA (gelöst in DEPC-Wasser) enthielt, wurden mit je 2 μl 5 x RNA-Gelladepuffer (20 mg Bromphenolblau, 80 μl 500 mM EDTA, 720 μl 37% Formaldehyd, 2 ml Glycerol, 3,1 ml Formamid, 4 ml 10 x FA-Gelpuffer) versetzt und für 5 min bei 65°C in einem Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Danach wurden die Proben kurz auf Eis gegeben

und sofort auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer angelegten Spannung von 80 Volt.

2.6.6.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription, eine Umschreibung der isolierten mRNA (2.6.6.1) in die einzelsträngige copy-Desoxyribonukleinsäure (cDNA) erfolgte mit Hilfe der RevertAidTM-M-MuLV Reverse-Transkriptase.

Durchführung

Für die Herstellung des Mastermixes mit einem Endvolumen von 25 µl wurden 1,2 µg totale RNA, 12,45 µl DEPC-H₂O, 5 µl 5 x Puffer, 1,25 µl dNTP-Mix, 0,5 µg Oligo dT18 und 60u Reverse Transkriptase verwendet.

Die Umschreibung der mRNA in die cDNA erfolgte im Thermocycler (MWG Biotech, Primus 96 plus, Ebersberg, Deutschland) bei 40°C für 60 min. Anschließend wurde die Aktivität der Reversen Transkriptase bei 70 °C für 10 min gestoppt. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

2.6.6.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase-chain-reaction [PCR]) dient der Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels spezifischer Primerpaare (SAIKI et al. 1986, MULLIS et al. 1992). Nach der thermischen Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge bei 95°C lagert sich je ein Oligodesoxyribonukleotid als Primer an die zu amplifizierende DNA-Sequenz bei einer definierten Temperatur an (Annealing). Anschließend synthetisiert das Enzym Taq-Polymerase bei einer Temperatur von 72°C die DNA entlang der Region zwischen den Primern (Elongation). So entstehen zwei neue Doppelstrangstrukturen.

Durch die kontinuierliche Wiederholung von Denaturierung der DNA, Annealing der Primer sowie Elongation der Primer wird eine exponentielle Vermehrung der gesuchten DNA-Fragmente erreicht.

In vorliegender Arbeit wurden die Methode der Realtime detection PCR mittels Realtime-Cycler (Rotor Gene 2000, Kalifornien, Corbett Research, USA) angewendet. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der herkömmli

chen PCR; sie bietet die Möglichkeit einer relativen Quantifizierung. Die Quantifizierung erfolgt hierbei über eine realtime Fluoreszenzmessung, wobei die Fluoreszenz proportional zur Menge der entstehenden PCR-Produkte zunimmt. Der eingesetzte fluoreszierende Farbstoff, Sybr Green, lagert sich während der Annealingphase in die entstehenden Doppelstränge ein und diese beginnen durch eine vorliegende Lichtquelle zu fluoreszieren. Der Messparameter bei der Realtime detection PCR ist der Ct-Wert; der cycle threshold. Dieser Wert entspricht der Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal vom Hintergrund abhebt. Die Amplifikation befindet sich dann in einer exponentiellen Phase.

Die relativen mRNA-Konzentrationen der Produkte werden nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode nach PFAFFL (2001) ermittelt. Dabei erfolgt zunächst die Ermittlung des ΔCt -Wertes als Differenz der Ct-Werte des Referenzgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) und des jeweiligen Zielgens für jede Probe. Die Differenz aus den ΔCt -Werten der Kontrollproben und der behandelten Proben ergab dann den $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert. Die Änderung der relativen mRNA-Konzentrationen der behandelten Proben, verglichen zu den Kontrollproben, wurden anschließend mithilfe der Formel $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ errechnet.

Die Erstellung der Schmelzkurve gibt anschließend Auskunft darüber, ob es sich um das gesuchte Produkt oder etwa um Fehlprodukte bzw. Primerdimere handelt. Zur Überprüfung der Produkte anhand der Produktlänge erfolgte eine anschließende DNA-Agarosegelelektrophorese, die in Kapitel 2.6.6.3.2 beschrieben wird.

Durchführung

Für die Herstellung des Mastermixes mit einem Endvolumen von 20 μl wurden 2 μl cDNA, 8,11 μl DEPC- H_2O , 26,7 pmol der spezifischen Primer, 500 μmol dNTP-Mix, 4 μl 5 x Puffer, 3,5 mmol/l MgCl_2 , 0,5 μl Sybr-Green (1:1000 mit DEPC- H_2O , v/v) und 1,25 u GoTaq® Flexi DNA Polymerase verwendet.

Dieser Ansatz wurde in der Realtime-Cycler mit folgendem Ablauf inkubiert:

Dauer	Temperatur	Phasenbezeichnung
2 min	95°C	Vordenaturierung
20 sec	95°C	Denaturierung
30 sec	55-65°C	Annealing
40 sec	72°C	Elongation
5s/°C	50-99°C	Schmelzkurve

↓ n Zyklen

2.6.6.3.1 Primer

Die für die jeweiligen Gene spezifischen Primer wurden mithilfe des Programmes PRIMER SELECT 4.0 (DNASTAR, USA) für die Spezies Ratte (*Rattus norvegicus*) ausgewählt und von der Firma Operon bezogen. Der Tabelle 6 kann man die in der Realtime-detection-PCR verwendeten Primer, deren Primersequenzen samt ihrer Produktgröße und der spezifischen Annealingtemperatur entnehmen.

Tab. 6 Eigenschaften der für die in der Realtime-detection-PCR verwendeten Primer für die Spezies *Rattus norvegicus*

Gen	Primersequenz	Produktgröße	Annealing- temperatur
GAPDH	for:5'GCATGG CCTTCCGTGTTC3' rev:5'GGGTGGTCCAGGGTTTCTTACTC3'	337 bp	60°C
ACO	for:5'CTTTCTTGCTTGCCTTCCTTCTCC3' rev:5'GCCGTTTCACCGCCTCGTA3'	415 bp	60°C
CPT1a	for:5'GGAGACAGACACCATCCAACATA3' rev:5'AGGTGATGGACTTGCAAACC3'	416 bp	60°C
PPAR α	for:5'CCCTCTCTCCAGCTTCCAGCCC3' rev:5'CCACAAGCGTCTTCTCAGCCATG3'	555 bp	65°C
FSS	for:5'CCTCCCCTGGTGGCTGCTACAA3' rev:5'CCTGGGGTGGGCGGTCTTT3'	224 bp	60°C
SREBP-1c	for:5'GGAGCCATGGATTGCACATT3' rev:5'AGGAAGGCTTCCAGAGAGGA3'	191 bp	55°C
HMG-CoA- Reduktase	for:5'AAGGGGCGTGCAAAGACAATC3' rev:5'ATACGGCACGGAAAGAACCATAGT3'	406 bp	56°C
SREBP-2	for:5'CCGGTAATGATGGGCCAAGAGAAAG3' rev:5'AGGCCGGGGGAGACATCAGAAG3'	400 bp	60°C

Fortsetzung Tab. 6

LDL-Rezeptor	for:5'AGAAGTGCAGGGCCGAAGACAC3' rev:5'AAACCGCTGGGACATAGGCACTCA3'	490 bp	65°C
CYP 4A1	for:5'CAGAATGGAGAATGGGGACAGC3' rev:5'TGAGAAGGGCAGGAATGAGTGG3'	460 bp	65°C
MCAD	for:5'CAAGAGAGCCTGGGAACTTG3' rev:5'CCCCAAAGAATTTGCTTCAA3'	154bp	60°C
LCAD	for:5'AAGGATTTAAGGGCAAGAAGC3' rev:5'GGAAGCGGAGGCGGAGTC3'	380bp	60°C
FATP	for:5'GGTAGCAAATGCACCCTCAT3' rev:5'CTCCTGCTGTGAGAGGA3'	375 bp	60°C
FABP	for:5'ACCATCCACTGCCGTCTTAC3' rev:5'CCCCGATGCGTAGGTATTCT3'	328 bp	60°C
FAT/CD36	for:5'TCGTATGGTGTGCTGGACAT3' rev:5'GGCCCAGGAGCTTTATTTTC3'	357 bp	60°C
LPL _{MD}	for:5'TCATCAACTGGCTGGAGGAAG3' rev:5'TATGCCTTGCTGGGGTTTTCT3'	450bp	56°C
LPL _L	for:5'TCCCACCACAACGAAGTACA3' rev:5'TCAGCCAGGGCATTATTTTC3'	205 bp	60°C

bp-Basenpaare, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; ACO: Acyl-CoA-Oxidase, CPT: Carnitin-Palmitoyl-Transferase, PPAR: Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor, FSS: Fettsäuresynthetase, SREBP: Sterol regulatory element-binding protein, HMG-CoA-Reduktase: 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA-reduktase, LDL-Rezeptor: Low-density-lipoprotein-Rezeptor, CYP: Cytochrom, MCAD: Medium-chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase, LCAD: Long-chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase, FATP: Fatty-acid-transfer-protein, FABP: Fatty-acid-binding-protein, FAT: Fatty-acid-translokase, LPL_{MD}: Lipoproteinlipase-Milchdrüse, LPL_L: Lipoproteinlipase-Leber.

2.6.6.3.2 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Produkte der Realtime-detection-PCR wurden mittels DNA-Agarosegelelektrophorese überprüft. Der eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid lagert sich zwischen die Basenpaare der DNA an und kann anschließend unter UV-Licht in einer Photoeinrichtung (Syngene Genenius, Synopticus, USA) mittels der Software GENE SNAP photometrisch erfasst werden.

Durchführung

Die Gelelektrophorese-Apparatur (PEQLAB Biotechnologie GmbH) wurde mit 0,5 x TBE-Puffer (100 ml 5 x TBE-Puffer/ 1 l Reinstwasser; 5x TBE- Puffer: 54 g Tris, 27,5 g Borsäure, 3,72 g EDTA; / 1 l Reinstwasser, pH=8,0) ausgefüllt.

Zur Herstellung eines 1,2%-igen Agarosegels wurden 0,84 g Agarose mit 70 ml 0,5 x TBE-Puffer versetzt und unter vorsichtigem Aufkochen gelöst. Nach einer Abkühlung auf 65°C erfolgte eine Zugabe von 27 µl Ethidiumbromid; das Gel wurde anschließend unverzüglich gegossen. Nach Aushärtung und Äquilibrierung des Gels im Puffer wurden die Proben aufgetragen.

Je 10 µl Probe wurden mit je 2 µl DNA-Ladepuffer versetzt und sofort auf das Gel aufgetragen. Zur Überprüfung der Produktgröße wurde ein 100bp DNA-Marker mitgeführt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer angelegten Spannung von 80 Volt.

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung der vorliegenden Daten aus den Versuchsansätzen 1-4 erfolgte mit dem Statistikprogramm MINITAB (Release 13, Minitab Ltd., Michigan, USA). Die Daten aus V1 wurden zweifaktoriell mithilfe der ANOVA/ General Linear Modell (GLM) ausgewertet; die relevanten Faktoren waren die Art des Fettes, die Vitamin E Konzentration sowie die Interaktion dieser beiden Faktoren. In V2, V3 und V4 wurden die jeweiligen Mittelwerte der einzelnen Gruppen mittels Fisher-Test verglichen.

Die Signifikanzgrenze wurde bei $p < 0,05$ festgelegt. Tendenzielle Signifikanzen von $p < 0,10$ sind gesondert angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Diätfette

Die einzelnen Parameter, die zur Charakterisierung der verwendeten frischen und oxidierten Fette in den Versuchsansätzen 1, 3 und 4 dienen, sind in Tabelle 7 dargestellt.

3.1.1 Fettsäurespektrum

Da die Oxidation der Diätfette zu leichten Veränderungen im Fettsäuremuster führte, wurde das frische Diätfett durch Mischung von zwei bis drei Fettarten so hergestellt, dass es hinsichtlich des Fettsäuremusters, im speziellen der Linolsäure, annähernd dem oxidierten Fett innerhalb eines Versuchsansatzes entsprach. So lagen ähnliche Linolsäurekonzentrationen sowie ähnliche Fettsäurespektren des frischen und oxidiertes Fettes in jedem einzelnen Versuch vor.

3.1.2 Fettkennzahlen

Die POZ war in den oxidierten Fetten im Vergleich zu den frischen Fetten in den Versuchen 1, 3 und 4 vor Einbringen in die Diät jeweils um die Faktoren 80, 62 und 50 stark erhöht. Nach Einbringung der Fette in die Diäten erhöhte sich die POZ in den frischen Fetten um den Faktor 2 (V1) bzw. um den Faktor 3 (V4); in V3 blieb die POZ unverändert. Die POZ der oxidierten Fette war nach Einbringung in die Diät in Versuch 1 und 3 leicht vermindert; in Versuch 4 dagegen leicht erhöht. Somit war die POZ in den oxidierten Fetten im Vergleich zu den frischen Fetten in den Versuchen 1, 3 und 4 nach Einbringen in die Diät nur noch um die Faktoren 33, 35 und 20 erhöht.

Die Säurezahl, ausschließlich vor Einbringen der Fette in die Diät gemessen, war in den oxidierten Fetten im Vergleich zu den frischen Fetten in V1, V3 und V4 um die Faktoren 2, 12 und 5 erhöht.

Die Konzentration an konjugierten Dienen nahmen in den oxidierten Fetten im Vergleich zu den frischen Fetten vor Einbringen in die Diäten in V1, V3 und V4 um die Faktoren 17, 20 und 27 zu. Nach Einbringen der Fette in die Diäten nahm die Dienkonzentration in den frischen Fetten in V1 und V3 etwas zu, blieb aber in V4 konstant; in den oxidierten Fetten

nahm die Dienkonzentration in V1 zu, in V3 und V4 dagegen ab. Somit erhöhte sich die Konzentration an konjugierten Dienen in den oxidierten Fetten im Vergleich zu den frischen Fetten nach Einbringung in die Diäten in V1, V3 und V4 nur noch um die Faktoren 13, 11 und 19.

In den oxidierten Fetten lag vor deren Einbringung in die Diäten eine Erhöhung der Konzentration an TBARS um das jeweils 7-fache in V1, V3 und V4 im Vergleich zu den frischen Fetten vor. Nach Einbringung in die Diäten wurden die Konzentrationen an TBARS in frischen und oxidierten Fetten nur unwesentlich verändert; lediglich in V3 sank die Konzentration im oxidierten Fett auf ein Viertel. In V1 wurden bei Zulage der hohen Vitamin E-Konzentration (250 mg TÄ/kg Diät) im oxidiertem Fett niedrigere Konzentrationen an TBARS gemessen als bei Zulage der niedrigen Vitamin E-Konzentration (25 mg TÄ/kg Diät).

Die Carbonylkonzentration, die ausschließlich in V1 gemessen wurde, erhöhte sich im oxidierten Fett um das 22-fache im Vergleich zum frischen Fett. Durch Einbringung in die Diät stieg die Konzentration an Carbonylen in dem frischen und oxidierten Fett an, wobei noch immer eine 20-fach höhere Konzentration im oxidierten Fett im Vergleich zum frischen Fett vorlag.

Die polaren Komponenten, die ebenfalls ausschließlich in V1 gemessen wurden, waren im oxidierten Fett im Vergleich zum frischen Fett um den Faktor 26 erhöht. Durch Einbringung in die Diät stieg der Anteil polarer Komponenten im frischen Fett, während er im oxidierten Fett leicht abnahm. Somit war der Anteil polarer Komponenten im oxidierten Fett nach Einbringung in die Diät nur noch um den Faktor 6 erhöht.

Tab.7 Zusammensetzung der verwendeten Diätfette und deren Fettkennzahlen vor und nach Einbringen in die Diät (V1, V3, V4)

	Versuch 1				Versuch 3		Versuch 4	
	Frisches Fett		Oxidiertes Fett		Frisches Fett	Oxidiertes Fett	Frisches Fett	Oxidiertes Fett
Zusammensetzung								
Diätfett (%)	SoÖl:LeÖl:ScSc 20,5: 4,5: 75 (w/w/w)		SoÖl:LeÖl:ScSc 40 : 10 : 50 (w/w/w)		SoÖl : ScSc 54 : 46 (w/w)	SoÖl 100	SoÖl: ScSc 59,5 : 40,5 (w/w)	SoÖl 100
Hauptfettsäuren* (%)								
Palmitinsäure	21,9		20,0		15,3	10,5	13,9	9,1
Stearinsäure	13,2		11,8		9,7	6,0	8,4	5,3
Ölsäure	36,0		39,7		29,4	35,4	30,9	38,3
Linolsäure	21,1		21,8		42,4	45,4	43,4	44,7
α -Linolensäure	3,2		2,8		0,3	0,03	0,4	0,05
Peroxidationsprodukte								
<i>vor Einbringen in die Diät:</i>								
Peroxidzahl (mEqO ₂ / kg)	10		785		6	373	9	412
Säurezahl (gKOH/ kg)	1,56		2,60		0,55	6,32	0,83	4,50
Diene (mmol/kg)	10		172		10	193	7	197
TBARS (mmol/kg)	0		7,73		0	7,54	0	7,05
Carbonyle (mmol/kg)	1,77		38,3		-	-	-	-
Polare Komponenten (%)	1,43		37,8		-	-	-	-
<i>nach Einbringen in die Diät:</i>								
Vitamin E (mg TÄ/ kg)	25	250	25	250	50	50	50	50
Peroxidzahl (mEqO ₂ / kg)	19	23	691	667	7	230	26	520
Diene (mmol/kg)	12,8	15,5	185	193	12	139	7	138
TBARS (mmol/kg)	0	0	7,14	5,61	0,06	1,85	0	6,28
Carbonyle (mmol/kg)	2,37	2,39	47,2	45,3	-	-	-	-
Polare Komponenten (%)	10,5	4,77	34,4	37,6	-	-	-	-

SoÖl:Sonnenblumenöl, LeÖl:Leinöl, ScSc:Schweineschmalz, TBARS:Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen, TÄ:Tocopheroläquivalent. * Mit den restlichen, nicht aufgeführten Fettsäuren ergibt die Summe an Fettsäuren 100%.

3.2 Versuchsansatz 1: Ergebnisse der laktierenden Ratten und der Nachkommen (Neugeborene, Jungtiere [20Tage], Adulte [10Wochen])

3.2.1 Gewichtsentwicklung

In Versuchsansatz 1 wurden weiblichen Ratten vor und während der Reproduktion über einen Gesamtzeitraum von 61 Tagen frisches bzw. oxidiertes Fett mit einer niedrigen bzw. einer hohen Vitamin E-Konzentration gefüttert. Zunächst wurde untersucht, inwiefern ein Einfluss des oxidierten Fettes und der differierenden Vitamin E-Konzentration auf die Gewichtsentwicklung der weiblichen Tiere in den Behandlungsgruppen Ox 25 [n=11] und Ox 250 [n=10] im Vergleich zu den Kontrollgruppen Fr 25 [n=11] und Fr 250 [n=11] über die Versuchsdauer vorlag. Die Anzahl [n] an weiblichen Versuchstieren stellt dabei die tatsächlich trächtigen Ratten dar. In Abbildung 3 ist die Gewichtsentwicklung der laktierenden Ratten über die Dauer des Versuchs dargestellt. Aus dieser Abbildung ist ersichtlich, dass die Entwicklung des Körpergewichtes der weiblichen Ratten über die gesamte Versuchsdauer vom jeweiligen Diätfett unabhängig war, jedoch durch die Vitamin E-Konzentration am Ende des Versuchs signifikant beeinflusst wurde ($p < 0,05$). Eine hohe Vitamin E-Zulage resultierte sowohl bei der Behandlungsgruppe (Ox 250) als auch bei der Kontrollgruppe (Fr 250) in jeweils höheren Körpergewichten im Vergleich zu den Gruppen, die mit einer niedrigen Vitamin E-Zulage bedacht waren (Fr 25 und Ox 25).

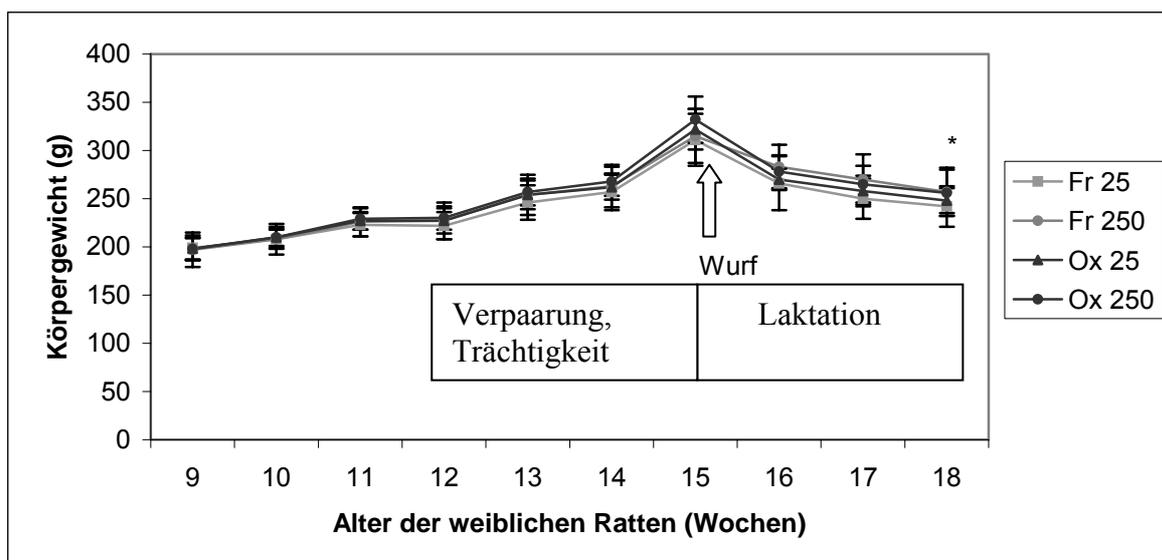


Abb. 3 Gewichtsentwicklung der weiblichen Ratten vor und während Verpaarung, Trächtigkeit und Laktation (V1). Die Fütterung der Ratten mit den Versuchsdiäten erfolgte im Alter von 9 bis 18 Wochen. Zwei Gruppen erhielten Diäten mit frischem Fett (Kontrolle) mit 25 mg bzw. 250 mg α -Tocopheroläquivalente/kg Diät (Fr 25, Fr 250); zwei Gruppen erhielten Diäten mit oxidiertem Fett mit 25 mg bzw. 250 mg α -Tocopheroläquivalente/kg Diät (Ox 25, Ox 250). n=11/ Gruppe, außer Ox250 n=10. *Gewichte von Fr 250 [270±26g] und Ox 250 [266±19g] sind signifikant höher als von Fr 25 [250±21g] und Ox 25 [257±16g] ($p < 0,05$).

Zudem wurde untersucht, ob die Behandlung der Muttertiere mit oxidiertem Fett und einer niedrigen bzw. hohen Vitamin E-Konzentration (Ox 25, Ox 250) einen Einfluß auf die Gewichtsentwicklung der Nachkommen von Geburt an bis zum Alter von 20 Tagen bzw. bis zum Alter von 10 Wochen im Vergleich zur Kontrolle (Fr 25, Fr 250) hatte.

Der Wurf eines jeden Muttertieres wurde nach der Geburt auf 7 Nachkommen reduziert. Vom Zeitpunkt der Geburt (Tag 1) bis zum Ende der Laktationsperiode (Tag 20) erfolgte eine Kontrolle der Gewichtsentwicklung des standardisierten Wurfes pro Muttertier. Die Gewichtsentwicklung von je 4 der Jungtiere (Tag 20) pro Muttertier wurde zudem bis zur Adoleszenz (Woche 10) kontrolliert. Der Tabelle 8 ist die jeweilige Wurfgröße als Gesamtheit aus lebenden und toten Nachkommen und der Wurfgröße abzüglich der Totgeburten am Tag der Geburt sowie die Gewichtsentwicklung der Würfe bis Tag 20 und der Jungtiere bis zum Alter von 10 Wochen der Kontroll- und Behandlungsgruppen zu entnehmen. Die Größe der gesamten Würfe und der Würfe abzüglich der Totgeburten wurde weder von der Fettart noch von der Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst. Die Gewichte der Würfe der Behandlungsgruppen (Ox 25, Ox 250) am Tag der Geburt unterschieden sich weder vor (Daten sind nicht gezeigt) noch nach der Reduzierung des Wurfes signifikant von den Kontrollgruppen (Fr 25, Fr 250). Auch bis zum Ende der Laktationsperiode (Tag 20) konnten keine signifikanten Unterschiede in der Gewichtsentwicklung der Würfe der Behandlungsgruppen (Ox 25, Ox 250) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Fr 25, Fr 250) festgestellt werden. Die zweifaktorielle Analyse aber zeigte einen tendenziell signifikanten Einfluss des Fettes auf die Wurfgewichte am Tag 20 sowie die gesamte Zunahme der Wurfgewichte vom Tag 1 bis Tag 20.

Die Kontrolle der Gewichtsentwicklung von je 4 der Nachkommen pro Wurf ab dem Alter von 20 Tagen bis zu einem Alter von 10 Wochen ließ keine signifikanten Unterschiede in den Behandlungsgruppen (Ox 25, Ox 250) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Fr 25, Fr 250) erkennen.

Ergebnisse

Tab.8 Wurfgrößen und Gewichtsentwicklung der Würfe (Tag 1 bis Tag 20) und der Jungtiere (Tag 20 bis Woche 10) (V1)

Fett	Frisches Fett		Oxidiertes Fett		ANOVA
	25	250	25	250	
Vitamin E (mg TÄ/kg)					Signifikanter Einfluss von:
Anzahl trächtige Tiere (n=12/ Gruppe)	11	11	11	10	
Wurfgröße gesamt	11,4 ± 3,3	12,6 ± 2,2	12,5 ± 2,6	13,1 ± 2,8	-
Wurfgröße lebend	11,2 ± 3,2	12,5 ± 2,3	12,1 ± 2,4	12,9 ± 2,9	-
Wurfgewicht (g) (n=7/ Wurf)					
Tag 1 (Geburt)	39,7 ± 4,5	37,2 ± 2,6	40,8 ± 3,8	39,9 ± 3,1	-
Tag 8	85,9 ± 12,1	82,9 ± 15,2	92,9 ± 15,	88,1 ± 10,2	-
Tag 14	178 ± 17	170 ± 23	173 ± 22	172 ± 16	-
Tag 20	249 ± 19	253 ± 27	242 ± 24	236 ± 23	Fett (p = 0,10)
Zunahme Wurfgewicht (Tag 1-20)	210 ± 18	216 ± 26	201 ± 24	196 ± 22	Fett (p = 0,054)
Körpergewicht Jungtiere (g) (m/w) (n=4/ Wurf)					
Woche 4	67,9 ± 9,9	71,4 ± 9,6	71,5 ± 9,2	66,8 ± 9,4	-
Woche 10	253 ± 65	251 ± 58	243 ± 56	259 ± 53	-
Körpergewichtszunahme (Woche 4-10)	185 ± 61	180 ± 54	171 ± 51	192 ± 50	-

Werte=Mittelwert ± Standardabweichung. m=männlich, w=weiblich. Signifikanz des Einflussfaktors Fett mittels ANOVA ermittelt.

3.2.2 α -Tocopherolkonzentrationen

Nach Fütterung der weiblichen Ratten mit Diäten mit frischem bzw. oxidiertem Fett mit einer niedrigen bzw. hohen Vitamin E-Supplementierung vor und während Verpaarung, Trächtigkeit und Laktation erfolgte die Ermittlung des Vitamin E-Status in Leber, Plasma, Milchdrüse und Milch der laktierenden Ratten und in Leber und Plasma der Nachkommen. Die α -Tocopherolkonzentrationen der Versuchstiere sind in Tabelle 9 dargestellt.

Ein signifikanter Einfluss des Faktors Vitamin E war bei den Muttertieren deutlich erkennbar. Die α -Tocopherolkonzentrationen waren in Leber, Plasma, Milchdrüse und Milch der Muttertiere, deren Diäten frisches bzw. oxidiertes Fett und eine hohen Vitamin E-Zulage (250 mg TÄ/kg) erhielten, signifikant höher im Vergleich zu Leber, Plasma, Milchdrüse und Milch der Muttertiere, deren Diäten mit frischem bzw. oxidiertem Fett und einer geringen Vitamin E-Zulage versehen waren (25 mg TÄ/kg Diät). Dabei waren massive Unterschiede zwischen frischem und oxidiertem Fett ausschließlich in der maternalen Leber zu erkennen. Bei Fütterung von frischem Fett führte die Zulage einer hohen Vitamin E-Konzentration (Fr 250) in der Leber zu einer 19-fach höheren α -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur Zulage einer niedrigen Vitamin E-Konzentration (Fr 25); bei Fütterung von oxidiertem Fett mit der Zulage einer hohen Vitamin E-Konzentration (Ox 250) lag dagegen nur noch eine 9-fach höhere Konzentration an α -Tocopherol im Vergleich zur Zulage einer niedrigen Vitamin E-Konzentration (Ox 25) vor.

Ein signifikanter Einfluss des Faktors Fett war in Leber und Plasma der Muttertiere deutlich erkennbar. Die Fütterung oxidierter Fette mit einer niedrigen Vitamin E-Zulage (Ox 25) führte zu einer signifikanten Verminderung der α -Tocopherolkonzentrationen in der Leber um 67% und im Plasma um 46% im Vergleich zur Kontrollgruppe (Fr 25). Die Fütterung oxidierter Fette mit einer hohen Vitamin E-Konzentration (Ox 250) bewirkte ebenfalls signifikant niedrigere α -Tocopherolkonzentrationen in der Leber um 86% und im Plasma um 32% im Vergleich zur Kontrollgruppe (Fr 250).

In der Milchdrüse führte die Verfütterung oxidierter Fette mit einer niedrigen Vitamin E-Zulage (Ox 25) zu keinen Unterschieden der α -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe (Fr 25). Die Fütterung oxidierter Fette mit einer hohen Vitamin E-Konzentration (Ox 250) bewirkte eine tendenziell verminderte α -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe (Fr 250) ($p = 0,064$).

In der Milch führte die Verfütterung oxidierter Fette mit einer niedrigen Vitamin E-Zulage (Ox 25) zu einer tendenziell verminderten α -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur

Kontrollgruppe (Fr 25) ($p = 0,085$). Die Fütterung oxidierter Fette mit einer hohen Vitamin E-Konzentration (Ox 250) bewirkte eine um 16% signifikant niedrigere α -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe (Fr 250).

Ein signifikanter Effekt des Faktors Vitamin E wurde in der Leber der Neugeborenen, in Leber und Plasma der Jungtiere [20 Tage] sowie in der Leber der männlichen, adulten Nachkommen [10 Wochen] gemessen. Bei Fütterung von frischem bzw. oxidiertem Fett an deren Muttertiere führte die Zulage von hohen Vitamin E-Konzentrationen (Fr 250, Ox 250) zu höheren α -Tocopherolkonzentrationen als die Zulage von niedrigen Vitamin E-Konzentrationen (Fr 25, Ox 25).

In der Leber der Nachkommen (Neugeborenen, Jungtiere, männliche und weibliche adulte Nachkommen) wurde nach Verfütterung oxidierter Fette an deren Muttertiere aber kein signifikanter Unterschied der α -Tocopherolkonzentrationen bei den Behandlungsgruppen (Ox 25, Ox 250) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Fr 25, Fr 250) festgestellt.

Im Plasma der Jungtiere [20 Tage] führte die Verfütterung oxidierter Fette mit einer niedrigen Vitamin E-Zulage (Ox 25) an die Muttertiere nicht zu verminderten α -Tocopherolkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Fr 25). Die Fütterung oxidierter Fette mit einer hohen Vitamin E-Konzentration (Ox250) bewirkte eine um 30% höhere α -Tocopherolkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Fr 250).

Im Plasma der männlichen, adulten Nachkommen konnte nach Verfütterung oxidierter Fette kein signifikanter Unterschied der α -Tocopherolkonzentration der Behandlungsgruppen (Ox 25, Ox 250) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Fr 25, Fr 250) festgestellt werden.

Tab.9 α -Tocopherolkonzentrationen in ausgewählten Geweben der Muttertiere und deren Nachkommen (V1)

Fett Vitamin E (mg TÄ/ kg)	Frisches Fett		Oxidiertes Fett		ANOVA Signifikanter Einfluss von:
	25	250	25	250	
Muttertiere					
n=10-11/ Gruppe					
Leber (nmol/g)	81,5 ± 15,8 ^b	1515 ± 695 ^a	27,2 ± 6,8 ^{b*}	237 ± 144 ^b	Fett, VitE, Fett x VitE (p< 0,001)
Plasma (nmol/ml)	10,9 ± 1,9 ^c	33,9 ± 6,1 ^a	6,0 ± 1,1 ^d	23,2 ± 4,4 ^b	Fett, VitE (p< 0,001), Fett x VitE (p< 0,05)
Milchdrüse (nmol/g)	55,1 ± 25,6 ^c	246 ± 68 ^a	42,9 ± 15,9 ^{cd}	179 ± 84 ^b	Fett (p< 0,05), VitE (p< 0,001)
Milch (nmol/g)	34,9 ± 9,7 ^c	121 ± 24 ^a	27,7 ± 5,4 ^c	102 ± 30,7 ^b	Fett (0,06), VitE (p< 0,001)
Neugeborene					
n=10-11/ Gruppe					
Leber (nmol/g)	3,08 ± 1,82 ^b	8,05 ± 2,73 ^a	2,33 ± 0,35 ^b	11,03 ± 3,46 ^a	VitE (p< 0,001)
Jungtiere (20Tage)					
n=10-11/ Gruppe					
Leber (nmol/g)	45,9 ± 6,7 ^b	242 ± 61 ^a	46,4 ± 13,3 ^b	215 ± 75 ^a	VitE (p< 0,001)
Plasma (nmol/ml)	25,1 ± 2,8 ^c	43,4 ± 8,8 ^b	27,8 ± 3,8 ^c	55,7 ± 6,3 ^a	Fett, VitE (p< 0,001), Fett x VitE (p< 0,05)
Adulte Tiere (10 Wo)					
männlich					
n=12-20/ Gruppe					
Leber (nmol/g)	43,0 ± 12,2	45,3 ± 12,7	35,7 ± 15,6	47,4 ± 12,4	VitE (p< 0,05)
Plasma (nmol/ml)	15,9 ± 2,6	15,1 ± 2,6	14,7 ± 1,9	14,8 ± 3,9	-
Adulte Tiere (10 Wo)					
Weiblich					
n=12-23/ Gruppe					
Leber (nmol/g)	79,6 ± 22,1	80,0 ± 28,1	76,6 ± 19,5	74,9 ± 24,5	-

Werte=Mittelwert ± Standardabweichung. ^{a,b,c,d} Unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im multiplen Mittelwertsvergleich nach Fisher. Signifikanz der Einflussfaktoren Fett, VitE, Fett*VitE ermittelt. *signifikant unterschiedlich zu Frisches Fett 25. Vit-Vitamin; Wo-Woche.

3.3 Versuchsansatz 2: Ergebnisse der trächtigen und laktierenden Ratten

3.3.1 Relative mRNA-Konzentrationen des PPAR α und seiner Zielgene in der Leber

In Versuchsansatz 2 sollte untersucht werden, ob eine vom jeweiligen Reproduktionsstadium differierende Expression des PPAR α und seiner Zielgene in der Leber weiblicher Ratten vorliegt. Die Analyse erfolgte in der Leber trächtiger Tiere am Tag 20 [n=3] sowie in der Leber laktierender Tiere am Tag 10 [n=3] und am Tag 20 [n=2]. Die Anzahl [n] an weiblichen Versuchstieren während der Reproduktion stellt dabei die tatsächlich trächtigen Ratten dar. Als Kontrolle dienten weibliche, adulte, unverpaarte Tiere (n=4).

In den Abbildungen 4-7 sind die relativen mRNA-Konzentrationen des PPAR α und seiner Zielgene (ACO, CPT1a, CYP4A1) in der Leber der trächtigen Ratten (Tag 20) und der laktierenden Ratten (Tag 10 und 20) im Vergleich zur Leber adulter Kontrolltiere dargestellt. Aus Abbildung 4 ist ersichtlich, dass verminderte mRNA-Konzentrationen des PPAR α in der Leber laktierender Ratten am Tag 10 und 20 im Vergleich zu den adulten Kontrolltieren vorlagen. Diese waren aber nicht signifikant. In der Leber trächtiger Ratten am Tag 20 hingegen konnten keine verminderten mRNA-Konzentrationen des PPAR α im Vergleich zu den adulten Kontrolltieren festgestellt werden.

Abbildung 5 zeigt in der Leber laktierender Ratten am Tag 20 eine signifikant verminderte mRNA-Konzentration der CPT1a und in der Leber laktierender Ratten am Tag 10 eine tendenziell verminderte mRNA-Konzentration der CPT1a im Vergleich zur Kontrolle. Die mRNA-Konzentration der CPT1a in der Leber trächtiger Ratten blieb im Vergleich zur Kontrolle unverändert.

In Abbildung 6 ist erkennbar, dass auch die mRNA-Konzentration der CYP4A1 in der Leber laktierender Ratten am Tag 20 signifikant vermindert war im Vergleich zur Kontrolle. In der Leber trächtiger Ratten und laktierender Ratten am Tag 10 konnten keine Differenzen bezüglich der mRNA-Konzentration im Vergleich zu den adulten Kontrolltieren festgestellt werden.

Die mRNA-Konzentration der ACO zeigte keine Differenzen in der Leber der trächtigen und laktierenden Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren, wie aus Abbildung 7 ersichtlich ist.

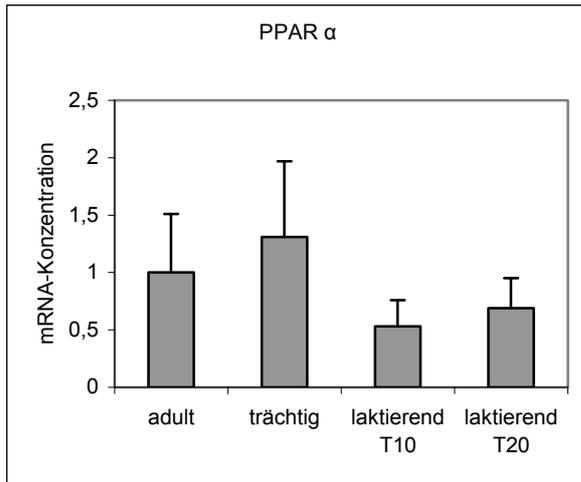


Abb. 4 mRNA-Konzentration des PPAR α in der Leber trächtiger Tiere und laktierender Tiere am Tag 10 und 20 im Vergleich zur Leber weiblicher, adulter Kontrolltiere (V2). n=2-4.

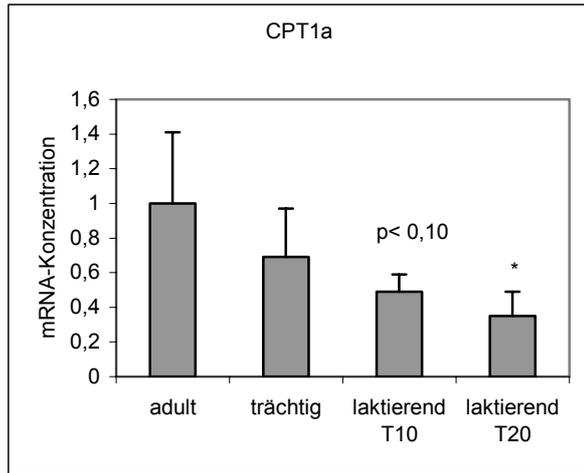


Abb. 5 mRNA-Konzentration der CPT1a in der Leber trächtiger Tiere und laktierender Tiere am Tag 10 und 20 im Vergleich zur Leber weiblicher, adulter Kontrolltiere (V2). *Signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$). n=2-4.

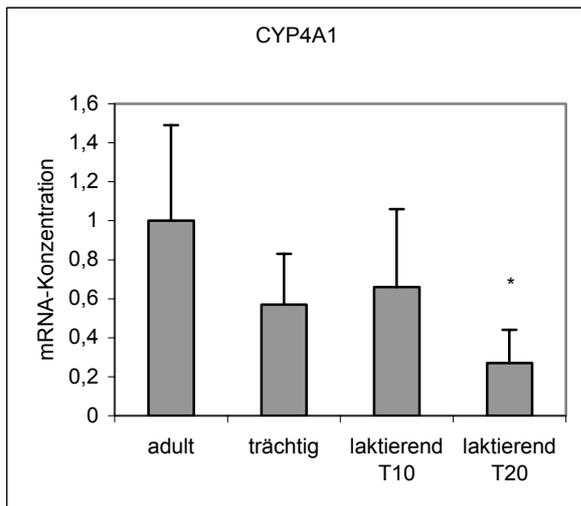


Abb. 6 mRNA-Konzentration des CYP4A1 in der Leber trächtiger Tiere und laktierender Tiere am Tag 10 und 20 im Vergleich zur Leber weiblicher, adulter Kontrolltiere (V2). *Signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$). n=2-4.

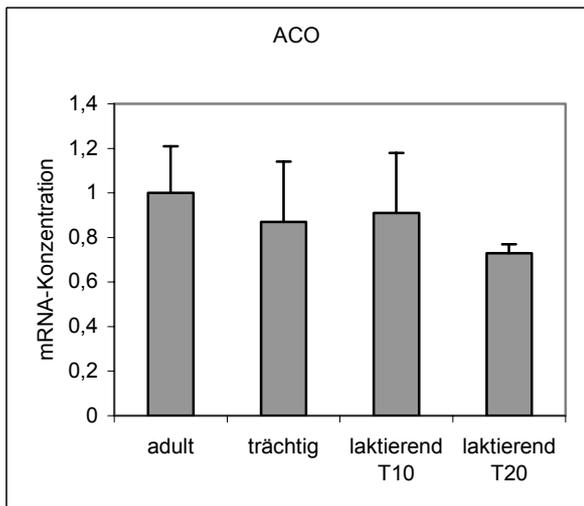


Abb. 7 mRNA-Konzentration der ACO in der Leber trächtiger Tiere und laktierender Tiere am Tag 10 und 20 im Vergleich zur Leber weiblicher, adulter Kontrolltiere (V2). n=2-4.

3.4 Versuchsansatz 3: Ergebnisse der trächtigen Ratten und der Föten

3.4.1 Gewichtsentwicklung und relative Lebergewichte der trächtigen Tiere

In Versuchsansatz 3 wurde weiblichen Ratten über einen Gesamtzeitraum von 19 Tagen frisches bzw. oxidiertes Fett bzw. frisches Fett mit Clofibrat gefüttert. Zunächst wurde untersucht, inwiefern ein Einfluss von oxidiertem Fett (Ox 50 [n=11]) bzw. Clofibrat (Clf 50 [n=7]) auf die Gewichtsentwicklung der weiblichen Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe (Fr 50 [n=11]) über die Versuchsdauer vorlag. Die Anzahl [n] an weiblichen Versuchstieren stellt dabei die tatsächlich trächtigen Ratten dar.

In Abbildung 8 ist die Gewichtsentwicklung der weiblichen Ratten über die 19-tägige Trächtigkeitsdauer dargestellt. In dieser Abbildung ist erkennbar, dass keine signifikanten Unterschiede in der Gewichtsentwicklung der trächtigen Tiere in den Behandlungsgruppen Ox 50 und Clf 50 im Vergleich zur Kontrollgruppe Fr 50 vorlagen.

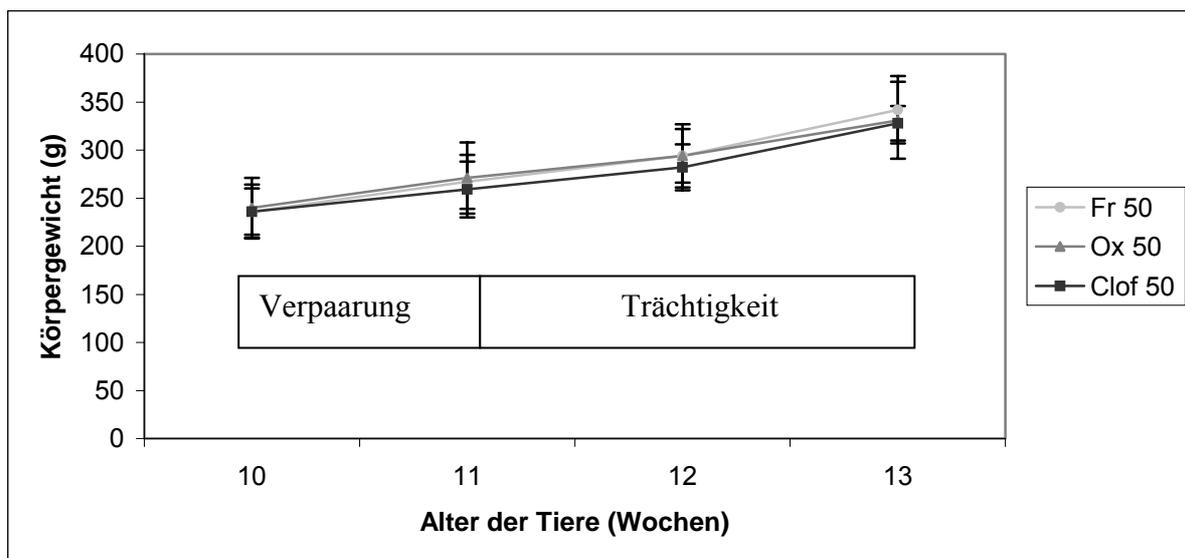


Abb. 8 Gewichtsentwicklung der weiblichen Ratten während Verpaarung und Trächtigkeit (V3). Die Fütterung der Ratten mit den Versuchsdiäten erfolgte während der gesamten Verpaarungs- und Trächtigkeitsphase. Die Tiere der ersten Gruppe erhielten Diäten mit frischem Fett (Kontrolle) mit 50 mg α -Tocopheroläquivalente/kg Diät (Fr 50), die Tiere der zweiten Gruppe erhielten Diäten mit oxidiertem Fett mit 50 mg α -Tocopheroläquivalente/kg Diät (Ox 50) und die Tiere der dritten Gruppe erhielten Diäten mit frischem Fett + Clofibrat (4g/ kg Diät) mit 50 mg α -Tocopheroläquivalenten/kg Diät (Clf 50). n=11/ Gruppe, außer Clf 50 n=7.

Um Aussagen über eine Peroxisomenproliferation in der Leber der trächtigen Ratten nach Behandlung mit oxidiertem Fett bzw. Clofibrat im Vergleich zur Kontrolle treffen zu können, wurden die auf das Körpergewicht bezogenen relativen Lebergewichte ermittelt.

In Abbildung 9 sind die relativen Lebergewichte der trächtigen Ratten dargestellt. Es ist erkennbar, dass die trächtigen Tiere der Behandlungsgruppen Ox 50 und Clof 50 signifikant höhere relative Lebergewichte aufwiesen als die der Kontrollgruppe Fr 50.

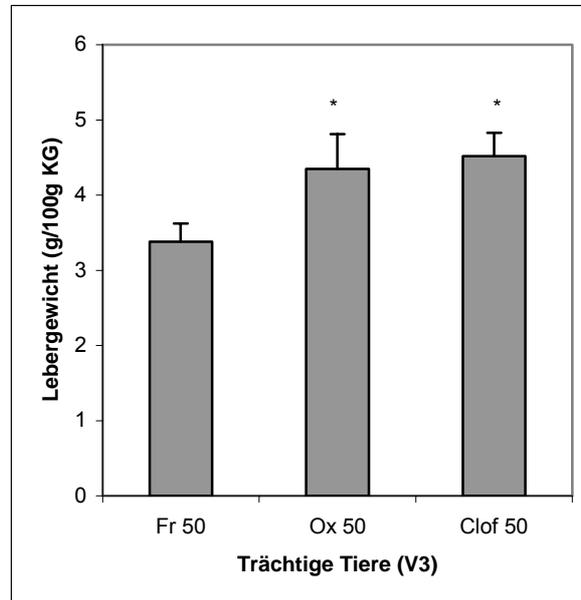


Abb. 9 Relative Lebergewichte der trächtigen Tiere (V3). Die Fütterung der Tiere während der Trächtigkeit erfolgte entweder mit Diäten (50 mg α Tocopheroläquivalente/kg Diät) mit frischem Fett (Fr 50), mit oxidiertem Fett (Ox 50) oder mit frischem Fett + Clofibrat (Clof 50). n=11/ Gruppe, außer Clof 50 n=7. *Signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,05$). KG-Körpergewicht.

3.4.2 Konzentration an Triglyceriden in Leber und Plasma und relative mRNA-Konzentration von Transkriptionsfaktoren und Genen des Triglyceridstoffwechsels in der Leber

Zur Untersuchung des Triglyceridstoffwechsels nach Verfütterung oxidierter Fette bzw. Clofibrat an trächtige Ratten wurde die Konzentration an Triglyceriden in Leber und Plasma der trächtigen Ratten sowie in der Leber der Föten ermittelt. Es folgte die Untersuchung des Einflusses oxidierter Fette bzw. Clofibrat auf die mRNA-Konzentration des PPAR α und seiner Zielgene sowie des SREBP-1c und des Zielgens FSS.

In Tabelle 10 sind die Triglyceridkonzentrationen in Leber und Plasma der trächtigen Ratten und in der Leber der Föten dargestellt. Die Fütterung von oxidiertem Fett bzw. Clofibrat bewirkte im Vergleich zur Kontrolle in der Leber der trächtigen Tiere eine signifikante Verminderung der Triglyceridkonzentrationen um 59% bzw. 56%. Im Plasma wurde die Triglyceridkonzentration nach Verfütterung oxidierter Fette um 70% gesenkt; bei der Clofibratgruppe dagegen kam es nicht zu einer Verminderung der Triglyceridkonzentration.

Auch in der Leber der Föten konnte nach Verfütterung von oxidiertem Fett bzw. Clofibrat an deren Muttertiere eine signifikante Verminderung der Triglyceridkonzentrationen festgestellt werden.

Tab. 10 Triglyceridkonzentrationen in Leber und Plasma der trächtigen Tiere und in der Leber der Föten (V3)

Fett Vitamin E (mg TÄ/ kg)	Frisches Fett 50	Oxidiertes Fett 50	Frisches Fett + Clofibrat 50
Trächtige Tiere			
Leber (µmol/g)	21,86 ± 6,03^a	9,09 ± 2,37^b	9,69 ± 2,68^b
Plasma (mmol/l)	4,56 ± 2,21^a	1,40 ± 0,86^b	3,26 ± 1,68^a
Föten			
*Leber (µmol/g)	7,09 ± 0,53^a	5,61 ± 0,61^b	5,57 ± 0,72^b

Werte=Mittelwert ± Standardabweichung, Trächtige Tiere n=11, außer frisches Fett + Clofibrat n=7.

^{a,b}Unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich nach Fisher (p<0,05). *Werte=Mittelwert ± Standarderror, Föten n=12-23 (Wiederholungen), Triglyceridkonzentration mittels SAS ausgewertet.

In Tabelle 11 sind die relativen mRNA-Konzentrationen der Transkriptionsfaktoren und Zielgene der Fettsäureoxidation und der Fettsäuresynthese in der Leber der trächtigen Tiere und deren Föten dargestellt. Die Proben der Föten stellen dabei je einen Pool aus drei Fötenlebern derselben Mutter dar.

Nach Verfütterung von oxidiertem Fett bzw. Clofibrat konnte sowohl in der Leber der trächtigen Ratten als auch deren Föten hinsichtlich der mRNA-Konzentration des PPAR α kein Unterschied in Bezug auf die Kontrolle mit frischem Fett festgestellt werden.

Die mRNA-Konzentration der ACO war in der Leber trächtiger Ratten nach Verfütterung von oxidiertem Fett bzw. von Clofibrat um den Faktor 4 bzw. 5 signifikant erhöht. Die Fötenleber wies ebenfalls eine signifikant erhöhte mRNA-Konzentration der ACO auf; nach Verfütterung von oxidiertem Fett an deren Muttertiere nahm diese um den Faktor 2 zu und nach Verfütterung von Clofibrat um den Faktor 3,5 im Vergleich zur Verfütterung von frischem Fett.

Die relative mRNA-Konzentration der CPT1a erhöhte sich in der Leber der trächtigen Ratten nach Verfütterung von oxidiertem Fett um den Faktor 2,5; nach Verfütterung von Clofibrat dagegen änderte sich die mRNA-Konzentration der CPT1a im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht. In der Leber der Föten nahm die mRNA-Konzentration der CPT1a nach der Fütterung

oxidiertes Fett an deren Muttertiere um den Faktor 2,2 zu; nach der Fütterung von Clofibrat kam es sogar zu einer Erhöhung der Expression um den Faktor 18 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die relativen mRNA-Konzentrationen der MCAD und LCAD waren in der Leber der trächtigen Tiere nach Verfütterung oxidiertes Fett bzw. von Clofibrat signifikant erhöht im Vergleich zu den Muttertieren, die frisches Fett erhielten. In der Leber der Föten, deren Muttertiere oxidiertes Fett erhielten, war ebenfalls eine signifikant erhöhte mRNA-Konzentration der MCAD und der LCAD im Vergleich zur Fötenleber der Kontrolltiere zu verzeichnen. Die Leber der Föten, deren Muttertiere Clofibrat erhielten, zeigten bezüglich der mRNA-Konzentration der MCAD keine Veränderungen im Vergleich zur Leber der Föten, deren Muttertiere mit frischem Fett gefüttert wurden. Die LCAD hingegen wies in der Leber der Föten, deren Muttertieren Clofibrat gefüttert wurde, eine signifikant vermehrte Expression im Vergleich zur Leber der Föten der Muttertiere, die frisches Fett erhielten, auf.

Die mRNA-Konzentration von CYP4A1 wurde sowohl in der Leber der Muttertiere als auch deren Föten nach Fütterung mit oxidiertem Fett bzw. mit Clofibrat signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht.

Die mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c und FSS unterschieden in der Leber trächtiger Tiere und der Föten trotz großer Unterschiede aufgrund der großen Streuung nach Behandlung mit oxidiertem Fett bzw. Clofibrat im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant voneinander.

Tab. 11 mRNA-Konzentrationen von Transkriptionsfaktoren und Genen der Fettsäureoxidation und der Fettsäuresynthese in der Leber der trächtigen Tiere und deren Föten (V3), bezogen auf GAPDH

Fett	FF	OF	FF + Cl	FF	OF	FF + Cl
Vitamin E (mg TÄ/kg)	50	50	50	50	50	50
	Trächtige Tiere			Föten		
PPAR α	1,00 \pm 0,49 ^{ab}	1,56 \pm 0,99 ^a	0,63 \pm 0,29 ^b	1,00 \pm 0,70	0,32 \pm 0,20	0,75 \pm 0,31
<i>Peroxisomale β-Oxidation von Fettsäuren</i>						
ACO	1,00 \pm 0,56 ^b	3,97 \pm 2,27 ^a	4,78 \pm 1,75 ^a	1,00 \pm 0,53 ^b	2,22 \pm 1,10 ^a	3,47 \pm 3,16 ^a
<i>Mitochondriale β-Oxidation</i>						
CPT1a	1,00 \pm 0,54 ^b	2,48 \pm 1,98 ^a	0,77 \pm 0,30 ^b	1,00 \pm 0,37 ^c	2,18 \pm 1,01 ^b	17,57 \pm 10,32 ^a
MCAD	1,00 \pm 0,47 ^b	2,68 \pm 1,00 ^a	1,89 \pm 0,64 ^a	1,00 \pm 0,41 ^b	3,23 \pm 1,25 ^a	1,47 \pm 0,57 ^{ab}
LCAD	1,00 \pm 0,31 ^b	2,04 \pm 0,52 ^a	1,75 \pm 0,65 ^a	1,00 \pm 0,23 ^c	1,92 \pm 0,77 ^b	3,83 \pm 1,96 ^a
<i>Mikrosomale ω-Oxidation von Fettsäuren</i>						
CYP4A1	1,00 \pm 0,55 ^c	4,42 \pm 2,98 ^b	8,30 \pm 2,93 ^a	1,00 \pm 0,73 ^c	6,02 \pm 3,85 ^b	28,34 \pm 1,81 ^a
SREBP-1c	1,00 \pm 0,32	1,25 \pm 0,76	0,99 \pm 0,46	1,00 \pm 0,92	0,55 \pm 0,40	0,26 \pm 0,19
<i>Fettsäuresynthese</i>						
FSS	1,00 \pm 0,37	0,89 \pm 0,46	0,82 \pm 0,59	1,00 \pm 0,37	1,16 \pm 0,33	1,48 \pm 0,55

Werte=Mittelwert \pm Standardabweichung, Trächtige Tiere n= 11, außer frisches Fett + Clofibrat n=7; Föten n=5-8, ^{a,b,c} Unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich nach Fisher (p<0,05). FF: Frisches Fett, OF: Oxidiertes Fett, FF+Cl: Frisches Fett + Clofibrat.

3.4.3 Konzentration an Cholesterin in Leber und Plasma und relative mRNA-Konzentration von SREBP-2 und der HMG-CoA-Reduktase in der Leber

Zur Untersuchung des Cholesterinstoffwechsels nach Verfütterung von oxidiertem Fett bzw. Clofibrat an trächtige Ratten wurde die Konzentration an Cholesterin in Leber und Plasma der trächtigen Ratten sowie in der Leber der Föten ermittelt. Es folgte die Untersuchung des Einflusses von oxidiertem Fett bzw. Clofibrat auf die mRNA-Konzentration des SREBP-2 und eines seiner Zielgene.

In Tabelle 12 sind die Cholesterinkonzentrationen der trächtigen Tiere in Leber und Plasma und deren Föten in der Leber dargestellt. Nach Verfütterung oxidiertes Fett nahm in der Leber der trächtigen Tiere die Cholesterinkonzentration um 23% im Vergleich zur Kontrollgruppe ab; nach Verfütterung von Clofibrat kam es zu einer Abnahme der Cholesterinkonzentration um 34%. Im Plasma der trächtigen Tiere lag eine signifikante Verminderung der Cholesterinkonzentrationen nach Verfütterung von oxidierten Fetten vor; nach Verfütterung von Clofibrat sank die Cholesterinkonzentration tendenziell ($p = 0,097$).

In der Leber der Föten, deren Muttertiere entweder mit oxidierten Fetten oder mit Clofibrat gefüttert wurden, konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Cholesterinkonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

Tab.12 Cholesterinkonzentrationen in Leber und Plasma der trächtigen Tiere und in der Leber deren Föten (V3)

Fett Vitamin E (mg TÄ/kg)	Frisches Fett 50	Oxidiertes Fett 50	Frisches Fett+ Clofibrat 50
Trächtige Tiere			
Leber ($\mu\text{mol/g}$)	11,0 \pm 1,6 ^a	8,42 \pm 0,87 ^b	7,19 \pm 1,25 ^b
Plasma (mmol/l)	0,97 \pm 0,32 ^a	0,65 \pm 0,20 ^b	0,73 \pm 0,20 ^{ab}
Föten			
Leber ($\mu\text{mol/g}$)	6,72 \pm 1,47	6,76 \pm 1,63	6,87 \pm 1,65

Werte=Mittelwert \pm Standardabweichung, Trächtige Tiere n=11, außer frisches Fett + Clofibrat n=7; Föten n=12-18 (Wiederholungen). ^{a,b} Unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich nach Fisher ($p < 0,05$).

Aufgrund der unveränderten Cholesterinkonzentrationen in der Leber der Föten nach Behandlung mit oxidiertem Fett bzw. Clofibrat erfolgte die Untersuchung des Cholesterinstoffwechsels auf der Ebene der Transkription ausschließlich in der Leber der trächtigen Tiere. Der Tabelle 13 sind die mRNA-Konzentrationen des SREBP-2 und seines Zielgenes HMG-CoA-Reduktase in der Leber der trächtigen Tiere zu entnehmen. Die mRNA-Konzentration des SREBP-2 wurde in der Leber der trächtigen Tiere nach Verfütterung oxidierter Fette nicht verändert; die Tiere, die mit Clofibrat gefüttert wurden, verzeichneten dagegen eine verminderte mRNA-Konzentration von SREBP-2 um 42% im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die mRNA-Konzentration der HMG-CoA-Reduktase wurde in der Leber der trächtigen Tiere nach Verfütterung oxidierter Fette nicht beeinflusst; nach Verfütterung von Clofibrat dagegen kam es zu einer Abnahme der mRNA-Konzentration um 63% im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Tab. 13 mRNA-Konzentrationen des SREBP-2 und der HMG-CoA-Reduktase in der Leber trächtiger Tiere (V3) , bezogen auf GAPDH

Fett Vitamin E (mg TÄ/kg)	Frisches Fett 50	Oxidiertes Fett 50	Frisches Fett + Clofibrat 50
SREBP 2	1,00 ± 0,34^a	1,20 ± 0,34^a	0,58 ± 0,21^b
HMG-CoA-Reduktase	1,00 ± 0,58^a	0,88 ± 0,46^a	0,37 ± 0,16^b

Werte=Mittelwert ± Standardabweichung, n=11, außer frisches Fett + Clofibrat n=7. ^{a,b} Unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich nach Fisher (p<0,05).

3.4.4 Konzentration an Phospholipiden in der Leber

Um Aussagen über eine Peroxisomenproliferation in der Leber trächtiger Tiere und der Föten nach Verfütterung oxidierter Fette bzw. von Clofibrat vornehmen zu können, wurde die Konzentration an Phospholipiden ermittelt. Die Konzentration an Phospholipiden in der Leber der trächtigen Tiere und deren Föten ist der Tabelle 14 zu entnehmen.

In der Leber der trächtigen Ratten kam es nach Behandlung mit oxidiertem Fett bzw. mit Clofibrat nicht zu einer Erhöhung der Phospholipidkonzentration im Vergleich zur Kontrolle mit frischem Fett. In der Leber der Föten dagegen lag nach Behandlung mit oxidiertem Fett eine signifikante Erhöhung der Konzentration der Phospholipide vor (p < 0,05); nach Behandlung mit Clofibrat waren keine Unterschiede der Phospholipidkonzentration messbar.

Tab.14 Phospholipidkonzentrationen in der Leber der trächtigen Tiere und deren Föten (V3)

Fett	Frisches Fett	Oxidiertes Fett	Frisches Fett + Clofibrat
Vitamin E (mg TÄ/kg)	50	50	50

Trächtige Tiere

PL ($\mu\text{mol/g}$)	107 ± 17	116 ± 18	119 ± 20
--------------------------	-----------------	-----------------	-----------------

Föten

PL ($\mu\text{mol/g}$)	61,9 ± 25,6^b	91,1 ± 31,7^a	63,8 ± 43,1^{ab}
--------------------------	--------------------------------	--------------------------------	---------------------------------

Werte=Mittelwert ± Standardabweichung, Trächtige Tiere n=11, außer frisches Fett + Clofibrat n=7, Föten n=9-16 (Wiederholungen). Unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich nach Fisher ($p < 0,05$). PL-Phospholipide.

3.5 Versuchsansatz 4: Ergebnisse der laktierenden Ratten und der Nachkommen (Jungtiere [20 Tage])

3.5.1 Gewichtsentwicklung sowie relative Lebergewichte der laktierenden Tiere

In Versuchsansatz 4 wurde weiblichen Ratten über einen Gesamtzeitraum von 20 Tagen frisches bzw. oxidiertes Fett gefüttert. Zunächst wurde untersucht, inwiefern ein Einfluss von oxidiertem Fett (Ox 50 [n=11]) im Vergleich zum frischen Fett (Fr 50 [n=11]) auf die Gewichtsentwicklung der weiblichen Tiere über die Versuchsdauer vorlag. Die Anzahl [n] an weiblichen Versuchstieren stellt dabei die tatsächlich trächtigen Ratten dar.

In Abbildung 10 ist die Gewichtsentwicklung der Muttertiere während der Laktation dargestellt. Aus dieser Abbildung ist ersichtlich, dass die Gewichtsentwicklung der laktierenden Tiere, denen oxidierte Fette gefüttert wurden über die gesamte Versuchsdauer keine Unterschiede im Vergleich zu den laktierenden Tieren aufzeigte, denen frische Fette gefüttert wurden.

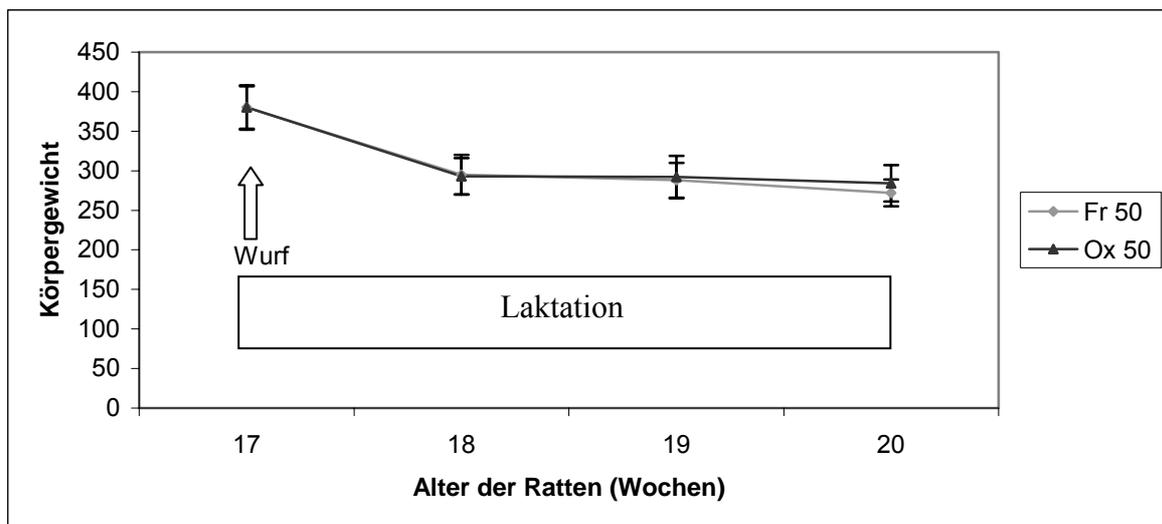


Abb. 10 Gewichtsentwicklung der weiblichen Ratten während der Laktation (V4). Die Fütterung der Ratten mit den Versuchsdiäten erfolgte ab dem Wurf bis zum Ende der Laktationsperiode. Die Tiere der ersten Gruppe erhielten Diäten mit frischem Fett (Kontrolle) mit 50 mg α -Tocopheroläquivalente/kg Diät (Fr 50), die Tiere der zweiten Gruppe erhielten Diäten mit oxidiertem Fett mit 50 mg α -Tocopheroläquivalente/kg Diät (Ox 50). n=11/ Gruppe.

Zudem wurde untersucht, ob die Behandlung der Muttertiere mit oxidiertem Fett einen Einfluß auf die Gewichtsentwicklung der Nachkommen bis zum Tag 20 im Vergleich zur Kontrolle hat.

Die Fütterung der Diäten mit frischem bzw. oxidiertem Fett an die Muttertiere erfolgte erst mit Geburt der Nachkommen. Der Wurf eines jeden Muttertieres wurde nach der Geburt auf 7 Nachkommen reduziert. Vom Zeitpunkt der Geburt (Tag 1) bis zum Ende der Laktationsperiode (Tag 20) erfolgte eine Kontrolle der Gewichtsentwicklung des standardisierten Wurfes pro Muttertier. Der Tabelle 15 ist die Gewichtsentwicklung der Würfe bis Tag 20 zu entnehmen. Ein Einfluss des oxidierten Fettes auf das Wachstum der Nachkommen war bereits am Tag 8 der Laktation bis zum Ende der Laktationsperiode am Tag 20 erkennbar; es lag eine signifikant verminderte Zunahme der Wurfgewichte der Muttertiere, die mit oxidiertem Fett behandelt wurden, vor im Vergleich zu den Wurfgewichten der Muttertiere, die frisches Fett erhielten.

Tab.15 Wurfgröße und Gewichtsentwicklung der Würfe bis Tag 20 (V4)

Fett	Frishes Fett	Oxidiertes Fett
Vitamin E (mg TÄ/kg)	50	50
Anzahl trächtige Tiere (n=12/ Gruppe)	11	11
Wurfgröße gesamt	13,1 ± 1,8	14,5 ± 1,9
Wurfgröße lebend	13,0 ± 1,8	14,4 ± 1,9
Wurfgewicht (g) (n=7/ Wurf)		
Tag 1 (Geburt)	44,7 ± 2,9	43,9 ± 2,5
Tag 8	107 ± 12^a	86,8 ± 15,3^b
Tag 14	201 ± 18^a	149 ± 24^b
Tag 20	282 ± 24^a	207 ± 30^b
Zunahme Wurfgewicht (d 1-d 20)	238 ± 22^a	164 ± 29^b

Werte=Mittelwert ± Standardabweichung; ^{a, b} Unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich nach Fisher (p< 0,05).

Zur Beurteilung einer Peroxisomenproliferation in der Leber laktierender Ratten nach Behandlung mit oxidiertem Fett wurden die auf das Körpergewicht bezogenen relativen Lebergewichte ermittelt. In Abbildung 11 sind die relativen Lebergewichte der laktierenden Ratten dargestellt. Es waren keine Unterschiede hinsichtlich der relativen Lebergewichte der laktierenden Tiere zwischen der Behandlungsgruppe mit oxidiertem Fett und der Kontrollgruppe mit frischem Fett zu erkennen.

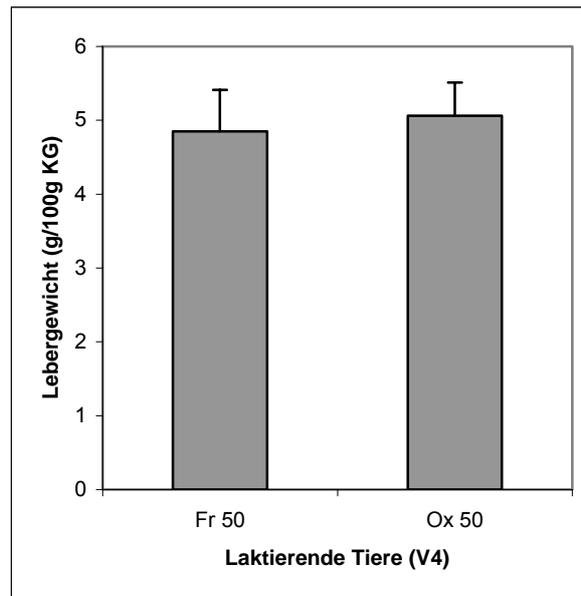


Abb. 11 Relative Lebergewichte der laktierenden Tiere (V4). Die Fütterung der Tiere während der Laktation erfolgte entweder mit Diäten (50 mg α -Tocopheroläquivalente/kg Diät) mit frischem Fett (Fr 50) oder mit oxidiertem Fett (Ox 50) n=11/ Gruppe. KG-Körpergewicht.

3.5.2 Konzentration an Triglyceriden in Leber und Plasma, Konzentration an NEFA im Plasma und relative mRNA-Konzentration von Transkriptionsfaktoren und Genen des Triglyceridstoffwechsels in der Leber

Zur Untersuchung des Triglyceridstoffwechsels in der Leber nach Verfütterung oxidierter Fette an laktierende Ratten wurde die Konzentration an Triglyceriden in Leber und Plasma sowie die Konzentration an NEFA im Plasma der laktierenden Ratten ermittelt. Es folgte die Untersuchung des Einflusses oxidierter Fette auf die mRNA-Konzentration des PPAR α und seiner Zielgene, der LPL und der Fettsäuretransporter sowie des SREBP-1c und des Zielgens FSS.

Der Tabelle 16 ist die Konzentration an Triglyceriden in Leber und Plasma der laktierenden Ratten sowie die Konzentration an NEFA im Plasma der laktierenden Ratten zu entnehmen.

In Leber und Plasma der laktierenden Tiere, die mit oxidiertem Fett gefüttert wurden, lagen signifikant verminderte Triglyceridkonzentrationen vor im Vergleich zu den Muttertieren, die mit frischem Fett gefüttert wurden.

Die Konzentration an NEFA war im Plasma der Muttertiere, die oxidierte Fette erhielten, ebenfalls signifikant vermindert im Vergleich zum Plasma der Muttertiere, die frische Fette erhielten.

Tab. 16 Triglyceridkonzentrationen in Leber und Plasma sowie Konzentration an NEFA im Plasma der laktierenden Tiere (V4)

Fett	Frisches Fett	Oxidiertes Fett
Vitamin E (mg TÄ/ kg)	50	50
Triglyceride		
Leber (µmol/g)	59,1 ± 28,4^a	8,8 ± 2,6^b
Plasma (mmol/l)	0,76 ± 0,16^a	0,32 ± 0,08^b
NEFA		
Plasma (mmol/l)	0,42 ± 0,09^a	0,34 ± 0,07^b

Werte=Mittelwert ± Standardabweichung, n=11. ^{a,b} Unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich nach Fisher ($p < 0,05$). NEFA-non-esterified-fatty-acids.

In Tabelle 17 sind die relativen mRNA-Konzentrationen von Transkriptionsfaktoren und Genen, die an der Fettsäureoxidation, der Fettsäuresynthese und am Fettsäuretransport beteiligt sind, in der Leber der laktierenden Muttertiere dargestellt.

In der Leber laktierender Tiere nahm die mRNA-Konzentration des PPAR α signifikant in der Behandlungsgruppe mit oxidiertem Fett im Vergleich zur Kontrollgruppe mit frischem Fett zu. Die Verfütterung oxidierter Fette führte zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA-Konzentration der ACO um den Faktor 5 bei der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die relative mRNA-Konzentration der CPT1a erhöhte sich signifikant um den Faktor 5 nach Verfütterung oxidierter Fette im Vergleich zur Verfütterung frischer Fette. Die mRNA-Konzentration der MCAD nahm nach Verfütterung oxidierter Fette signifikant um den Faktor 6 im Vergleich zur Verfütterung frischer Fette zu. Die mRNA-Konzentration der CYP4A1 war in der Behandlungsgruppe signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die relativen mRNA-Konzentrationen von FABP, FATP sowie FAT/CD 36 waren in der Leber der Muttertiere, denen oxidierte Fette gefüttert wurden, signifikant höher als in der Leber der Kontrolltiere. Die relative mRNA-Konzentration der LPL war in der Leber der Muttertiere nach Verfütterung oxidierter Fette signifikant höher als in der Leber der Muttertiere, die frisches Fett erhielten.

Die relative mRNA-Konzentration des SREBP-1c blieb nach Behandlung mit oxidiertem Fett im Vergleich zur Kontrolle mit frischem Fett unverändert. Es konnte eine tendenziell

verminderte mRNA-Konzentration der FSS nach Verfütterung des oxidierten Fettes an die laktierenden Ratten im Vergleich zur Verfütterung des frischen Fettes festgestellt werden ($p=0,068$).

Tab. 17 mRNA-Konzentrationen von Transkriptionsfaktoren und Genen der Fettsäureoxidation, des Fettsäuretransports und der Fettsäuresynthese in der Leber der laktierenden Tiere (V4), bezogen auf GAPDH

Fett Vitamin E (mg TÄ/kg)	Frishes Fett 50	Oxidiertes Fett 50
PPAR α	1,00 \pm 0,35^b	1,74 \pm 0,27^a
<i>Peroxisomale β-Oxidation von Fettsäuren</i>		
ACO	1,00 \pm 0,61^b	5,25 \pm 2,20^a
<i>Mitochondriale β-Oxidation</i>		
CPT1a	1,00 \pm 0,64^b	5,15 \pm 3,69^a
MCAD	1,00 \pm 0,66^b	5,58 \pm 2,49^a
<i>Mikrosomale ω-Oxidation von Fettsäuren</i>		
CYP4A1	1,00 \pm 0,77^b	2,14 \pm 1,03^a
<i>Fettsäuretransport</i>		
FATP	1,00 \pm 0,88^b	2,25 \pm 0,67^a
FABPpm	1,00 \pm 0,92^b	3,26 \pm 2,55^a
FAT/ CD 36	1,00 \pm 0,35^b	4,43 \pm 2,33^a
LPL	1,00 \pm 0,66^b	2,26 \pm 1,44^a
SREBP-1c	1,00 \pm 0,23	0,89 \pm 0,19
<i>Fettsäuresynthese</i>		
*FSS	1,00 \pm 0,38	0,74 \pm 0,24

Werte=Mittelwert \pm Standardabweichung, n=11. ^{a,b} Unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich nach Fisher ($p<0,05$). * $p < 0,10$.

3.5.3 Konzentration an Triglyceriden und Fettsäuren in der Milch und relative mRNA-Konzentrationen von Transkriptionsfaktoren und Genen des Triglyceridstoffwechsels in der Milchdrüse

Zur Untersuchung des Triglyceridstoffwechsels in der Milchdrüse nach Verfütterung oxidierter Fette an laktierende Ratten wurde die Konzentration an Triglyceriden und der einzelnen Fettsäuren in der Milch der laktierenden Ratten ermittelt. Es folgte die Untersuchung des Einflusses oxidierter Fette auf die mRNA-Konzentration des PPAR α und seiner Zielgene, der LPL und der Fettsäuretransporter sowie des SREBP-1c und des Zielgens FSS.

Der Tabelle 18 kann man die Konzentration an Triglyceriden und Fettsäuren in der Milch laktierender Ratten entnehmen. Es ist erkennbar, dass die Triglyceridkonzentration in der Milch nach Verfütterung oxidierter Fette im Vergleich zur Verfütterung frischer Fette signifikant vermindert war.

Die Konzentration an mittelkettigen Fettsäuren (C8-C14) blieb in der Behandlungsgruppe nach Verfütterung oxidierter Fette im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Verfütterung frischer Fette unverändert. Dagegen lagen nach Verfütterung oxidierter Fette signifikant verminderte Konzentrationen an Palmitinsäure (C16) und an langkettigen Fettsäuren (C18-C22) im Vergleich zur Verfütterung frischer Fette vor.

Tab. 18 Konzentration an Triglyceriden und Fettsäuren in der Milch laktierender Tiere (V4)

Fett Vitamin E (mg TÄ/kg)	Frisches Fett 50	Oxidiertes Fett 50
Triglyceride ($\mu\text{mol/g}$)	270 \pm 48^a	177 \pm 74^b
Fettsäuren ($\mu\text{mol/g}$)		
C 8 :0	38,3 \pm 5,9	38,3 \pm 16,7
C 10:0	76,4 \pm 15,7	88,1 \pm 36,5
C 12:0	50,4 \pm 13,7	65,3 \pm 29,0
C 14:0	43,1 \pm 14,2	56,6 \pm 28,4
C 16:0	171 \pm 36^a	95,8 \pm 46,3^b
C16:1 (n-7)	18,0 \pm 4,4^a	6,0 \pm 2,3^b
C 18:0	43,8 \pm 10,9^a	21,0 \pm 9,2^b
C 18:1 (n-9)	187 \pm 34^a	83 \pm 34^b
C 18:2 (n-6)	144 \pm 24^a	60 \pm 28^b
C 18:3 (n-3)	2,3 \pm 0,6^a	0,8 \pm 0,5^b
C 20:0	0,7 \pm 0,2^a	0,4 \pm 0,2^b
C 20:1 (n-9)	2,8 \pm 1,8	1,5 \pm 0,6
C 20:2 (n-6)	5,8 \pm 1,5^a	2,2 \pm 1,1^b
C 20:3 (n-6)	4,3 \pm 1,3^a	2,1 \pm 1,0^b
C 20:4 (n-6)	15,0 \pm 3,2^a	5,9 \pm 3,1^b
C 22:4 (n-6)	3,7 \pm 1,1^a	1,4 \pm 0,6^b
C 22:5 (n-3)	1,0 \pm 0,3^a	0,5 \pm 0,2^b
C 22:6 (n-3)	1,1 \pm 0,3^a	0,6 \pm 0,3^b
Summe C 8-C 14	208 \pm 47	248 \pm 108
C 16	189 \pm 40^a	102 \pm 48^b
Summe C 18-C 22	412 \pm 71^a	179 \pm 78^b

Werte=Mittelwert \pm Standardabweichung, n=11. ^{a,b} Unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich nach Fisher ($p < 0,05$).

In Tabelle 19 sind die mRNA-Konzentrationen von Transkriptionsfaktoren und Genen der Fettsäureoxidation, des Fettsäuretransports und der Fettsäuresynthese in der Milchdrüse der laktierenden Tiere dargestellt. Der Transkriptionsfaktor PPAR α konnte in der Milchdrüse der laktierenden Ratten nicht detektiert werden. Die Gene ACO und CPT1a wurden zwar exprimiert, zeigten jedoch in der Behandlungsgruppe mit oxidiertem Fett keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die mRNA-Konzentrationen der Fettsäuretransporter FATP, FABP und der FAT/CD36 waren in der Milchdrüse nach Verfütterung oxidiertes Fette signifikant vermindert im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche frisches Fett erhielt. Die mRNA-Konzentration der LPL war in der Milchdrüse nach Verfütterung oxidiertes Fette signifikant vermindert im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Nach Verfütterung oxidiertes Fette unterschieden sich die mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c und der FSS in der Milchdrüse der Muttertiere, die oxidiertes Fette erhielten, nicht im Vergleich zur Milchdrüse der Muttertiere, denen frisches Fett gefüttert wurde.

Tab. 19 mRNA-Konzentrationen von Transkriptionsfaktoren und Genen der Fettsäureoxidation, des Fettsäuretransports und der Fettsäuresynthese in der Milchdrüse der laktierenden Tiere (V4), bezogen auf GAPDH

Fett Vitamin E (mg TÄ/kg)	Frishes Fett 50	Oxidiertes Fett 50
PPAR α	n.d.	n.d.
<i>Peroxisomale β-Oxidation von Fettsäuren</i>		
ACO	1,00 \pm 0,38	1,26 \pm 0,42
<i>Mitochondriale β-Oxidation</i>		
CPT1a	1,00 \pm 0,56	1,22 \pm 0,66
<i>Fettsäuretransport</i>		
FATP	1,00 \pm 0,32 ^a	0,65 \pm 0,38 ^b
FABP	1,00 \pm 0,70 ^a	0,38 \pm 0,16 ^b
FAT/ CD 36	1,00 \pm 0,60 ^a	0,51 \pm 0,36 ^b
LPL	1,00 \pm 0,75 ^a	0,44 \pm 0,36 ^b
<i>Fettsäuresynthese</i>		
SREBP-1c	1,00 \pm 0,65	0,94 \pm 0,72
FSS	1,00 \pm 0,68	0,71 \pm 0,68

Werte=Mittelwert \pm Standardabweichung, n=11. ^{a,b} Unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich nach Fisher ($p < 0,05$). n.d. = nicht detektierbar.

3.5.4 Konzentration an Cholesterin in Leber und Plasma und relative mRNA-Konzentration des SREBP-2 und seiner Zielgene in der Leber

Zur Untersuchung des Cholesterinstoffwechsels nach Verfütterung oxidierter Fette an laktierende Ratten wurde die Konzentration an Cholesterin in Leber und Plasma ermittelt. Es folgte die Untersuchung des Einflusses oxidierter Fette auf die Genexpression des SREBP-2 und seiner Zielgene. In Tabelle 20 sind die Cholesterinkonzentrationen der laktierenden Tiere in Leber und Plasma dargestellt. Nach Verfütterung oxidierter Fette war in Leber und Plasma der laktierenden Tiere eine signifikante Abnahme der Cholesterinkonzentration im Vergleich zur Verfütterung von frischen Fetten zu verzeichnen.

Tab.20 Cholesterinkonzentrationen in Leber und Plasma der laktierenden Tiere (V4)

Fett Vitamin E (mg TÄ/ kg)	Frisches Fett 50	Oxidiertes Fett 50
Leber ($\mu\text{mol/g}$)	15,88 \pm 4,16 ^a	8,71 \pm 1,13 ^b
Plasma (mmol/l)	1,49 \pm 0,33 ^a	1,11 \pm 0,24 ^b

Werte=Mittelwert \pm Standardabweichung, n=11. ^{a,b} Unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich nach Fisher ($p < 0,05$).

In Tabelle 21 sind die mRNA-Konzentrationen des SREBP-2 und seiner Zielgene in der Leber der laktierenden Tiere dargestellt. Die mRNA-Konzentrationen des SREBP-2, der HMG-CoA-Reduktase und des LDL-Rezeptors ließen nach Verfütterung oxidierter Fette keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennen.

Tab. 21 mRNA-Konzentrationen des SREBP-2 und seiner Zielgene in der Leber laktierender Tiere (V4), bezogen auf GAPDH

Fett Vitamin E (mg TÄ/kg)	Frisches Fett 50	Oxidiertes Fett 50
HMG-CoA-Reduktase	1,00 \pm 0,35	1,14 \pm 0,38
SREBP 2	1,00 \pm 0,28	0,95 \pm 0,14
LDL-Rezeptor	1,00 \pm 0,36	1,01 \pm 0,21

Werte=Mittelwert \pm Standardabweichung, n=11. ^{a,b} Unterschiedliche Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich nach Fisher ($p < 0,05$).

3.5.5 Konzentration an Phospholipiden in der Leber

Um Aussagen über eine Peroxisomenproliferation in der Leber der laktierenden Tiere nach Verfütterung oxidierter Fette treffen zu können, wurde die Konzentration an Phospholipiden ermittelt. Der Abbildung 12 sind die Phospholipidkonzentrationen in der Leber der laktierenden Tiere zu entnehmen. Es lagen keine signifikant erhöhten Konzentrationen an Phospholipiden in der Leber der laktierenden Tiere, welche mit oxidiertem Fett gefüttert wurden, im Vergleich zu den Tieren, die mit frischem Fett gefüttert wurden, vor.

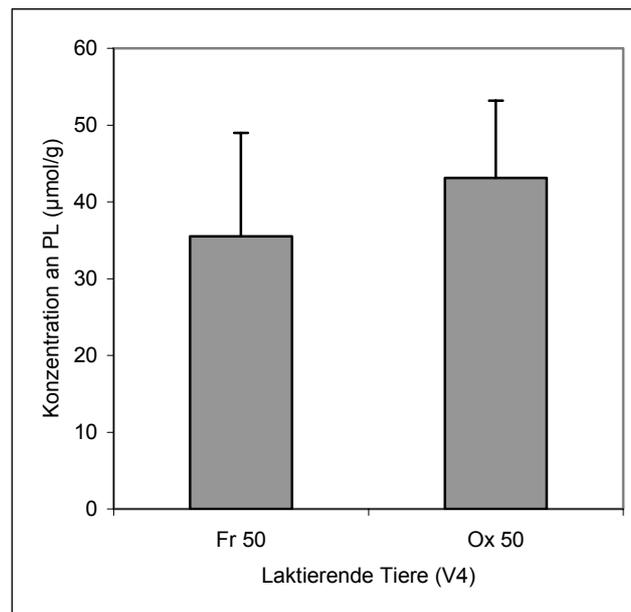


Abb. 12 Konzentrationen an Phospholipiden (PL) in der Leber der laktierenden Tiere (V4). Die Fütterung der Tiere während der Laktation erfolgte entweder mit Diäten (50 mg α -Tocopheroläquivalente/kg Diät) mit frischem Fett (Fr 50) oder mit oxidiertem Fett (Ox 50) n=11/ Gruppe.

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung der oxidierten Fette und deren Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der trächtigen und laktierenden Tiere

Die Charakterisierung oxidiertes Fette ist oftmals mit Problemen behaftet. Die thermische Behandlung von Fetten lässt zahlreiche Produkte entstehen, die zum Teil instabil sind und zerfallen können. Etwa 200 Zerfallsprodukte wurden in erhitzten Fetten bereits identifiziert (CHANG et al. 1978). Dabei ist die Menge an Produkten, die im Prozess der Lipidoxidation entsteht, von den Bedingungen der Oxidation (Zufuhr an Sauerstoff, Temperatur) und der Zusammensetzung des verwendeten Fettes (Anteil ungesättigter Fettsäuren, Vorliegen von Antioxidanzien) abhängig (COHN 2002).

Um das verwendete Fettgemisch (V1) bzw. die reinen Fette (V3, V4) einigermaßen charakterisieren zu können, wurden die im Prozess der Oxidation gebildeten primären und sekundären LPOP analysiert. Die Initiierung einer Lipidperoxidation erfolgt mit einem Angriff eines Radikals auf ungesättigte Fettsäuren, wobei von einer Methylengruppe der Fettsäure ein Wasserstoffatom abstrahiert wird. Es folgt die Bildung eines Peroxylradikals, welches anschließend ein weiteres Peroxylradikal generiert und dadurch zu Hydroxyperoxiden umgebildet wird (PORTER 1984). Diese stellen die primären LPOP dar. Die Bestimmung der primären LPOP in den Fetten erfolgte u.a. mit der Quantifizierung der POZ und der SZ. Die Oxidation der ungesättigten Fettsäuren resultiert zudem in der Formation von konjugierten Dienen (GIROTTI 1985), welche ebenfalls zu den primären LPOP zählen und bestimmt wurden. Die oxidierten Fette (V1, V3, V4) enthielten im Vergleich zum jeweils frischen Fettgemisch sowohl vor als auch nach Einbringen in die Diät einen sehr hohen Anteil an primären LPOP. Primäre Lipidhydroperoxide können mit Sauerstoff reagieren und im fortgeschrittenen Prozess der Lipidperoxidation in sekundäre Produkte, wie z. B. Epoxyhydroperoxide, Ketohydroperoxide und zyklische Peroxide zerfallen. Auch Aldehyde, Ketone, Alkohole und Hydrocarbone können als sekundäre Produkte entstehen (ALEXANDER 1986, COHN 2002). Aussagen über die Bildung von sekundären LPOP in den Fetten wurden mit Bestimmung der Konzentration an TBARS sowie in V1 zusätzlich mit Bestimmung der Carbonyle und der polaren Komponenten getroffen. Die sekundären LPOP waren in den oxidierten Fetten im Vergleich zum jeweiligen frischen Fettgemisch sowohl vor als auch nach Einbringen in die Diät erhöht, wenn auch in geringerem Maße im Vergleich zur Arbeit von BRANDSCH und EDER (2004). Aufgrund der unterschiedlichen Ausgangsfette und dem differierenden Anteil an PUFA in V1, V3 und

V4 ist ein Vergleich der entstandenen LPOP untereinander sowie mit Arbeiten, die bereits bekannt sind, aber wenig sinnvoll bzw. aussagekräftig.

Die in allen Versuchsansätzen gleich gewählten Oxidationsbedingungen der Fette (niedrige Temperatur [55-60°C], langer Zeitraum [25-29 Tage]) gingen auch in anderen Studien mit der Bildung eines hohen Anteils vorwiegend primärer LPOP in den Fetten einher (BRANDSCH et al. 2004, EDER et al. 2003a, SÜLZLE et al. 2004). Die Gabe stark oxidiertes Fette an Ratten führte in früheren Studien zu einem verminderten Futtermittelverzehr (BLANC et al. 1992, YOSHIDA und KAJIMOTO 1989) mit der Folge eines verminderten Wachstums der Versuchstiere (AMMOUCHE et al. 2002, CORCOS BENEDETTI et al. 1987, NWANGUMA et al. 1999). Die genannten Oxidationsbedingungen wurden daher in vorliegender Arbeit gewählt, da derart oxidierte Fette in früheren Arbeiten keine Wachstumsverzögerungen bei Ratten erkennen ließen und demnach als moderat oxidiert gelten (BRANDSCH et al. 2004, EDER et al. 2002). Zudem beeinflussen solch moderat oxidierte Fette mit einem hohen Anteil primärer LPOP den Lipidstoffwechsel der Ratten, der in V3 und V4 untersucht wurde, stärker als Fette, die bei einer hohen Temperatur über einen kurzen Zeitraum erhitzt wurden (EDER et al. 2003a). Die langandauernde Oxidation bei relativ geringer Temperatur lässt dabei oxidierte Fettsäuren, wie z. B. die 13-Hydroxyperoxy-9,11-octadecadiensäure (HPODE) aus der Linolsäure entstehen. Die HPODE kann anschließend zur 13-Hydroxy-9,11-octadecadiensäure (HODE) reduziert werden (LEE und BLAIR 2001). Diese Fettsäuren gelten als starke PPAR α -Agonisten (DESVERGNE und WAHLI 1999, KÖNIG und EDER 2006). Die Gewährleistung einer effektiven Initiierung einer PPAR α -Aktivierung in den Versuchen 3 und 4 bestärkte somit die Wahl der Oxidationsbedingungen der Fette. Da für den Prozeß des Frittierens in Fast-Food-Restaurants Fett oftmals tagelang erhitzt wird, in welchem sich ein hoher Anteil von Lipidperoxiden befindet (FRANKEL et al. 1984), können die am Versuchstier gewonnenen Ergebnisse in vorliegender Arbeit auch für den Menschen relevant sein.

Die in den Versuchsansätzen gewonnenen Daten der Gewichtsentwicklung der trächtigen und laktierenden Ratten zeigten, dass das oxidierte Fett keine Reduzierung der Körpergewichtsentwicklung der trächtigen (V3) bzw. laktierenden (V1, V4) Tiere zur Folge hatte. Diese Daten bestätigen demnach die Arbeiten von BRANDSCH et al. (2004) und EDER et al. (2002) und lassen schlussfolgern, dass die in den drei Versuchsansätzen verwendeten thermisch behandelten Fette moderat oxidiert waren. Auch Auffälligkeiten wie z. B. Diarrhoe, Dermatitis, Seborrhö und Haarausfall traten durch oxidierte Fette

(ALEXANDER et al. 1987) bei den trächtigen und laktierenden Ratten nicht auf. Die Fütterung der weiblichen Ratten (V1, V3, V4) nach einem kontrollierten Fütterungssystem gewährleistete zudem eine einheitliche Futterraufnahme mit Angleichung des Fettsäuremusters und des Vitamin E-Gehaltes im frischen und oxidierten Fett (EDER und STANGL 2000). Auch Clofibrat (V3) ließ keine Reduzierung der Körpergewichtsentwicklung bei trächtigen Ratten erkennen.

Die Arbeiten von YOSHIDA und KAJIMOTO (1989) und von LIU und HUANG (1995, 1996) zeigten, dass eine zusätzliche Supplementierung von Tocopherolen zu einer Diät mit oxidierten Fetten das Wachstum von Ratten verbessern bzw. deren Todesrate vermindern kann im Vergleich zu einer Diät mit oxidierten Fetten und einem sehr geringen Gehalt an Tocopherolen. Es wurde vermutet, dass die Wachstumsverzögerungen nach Verfütterung von oxidierten Fetten auf oxidativen Stress zurückzuführen sind, denen durch eine hohe Vitamin E-Supplementierung vorgebeugt werden kann (EDER et al. 2002).

Auch in V1 bewirkte die Supplementierung von 250 mg α -Tocopheroläquivalenten zur Diät am Ende der Laktation signifikant höhere Körpergewichte der laktierenden Ratten im Vergleich zur Supplementierung von nur 25 mg α -Tocopheroläquivalenten. Entgegen der Studien von EDER et al. (2003a) und SÜLZLE et al. (2004) an männlichen Ratten zeigten sich aber bei den laktierenden Ratten keine Wachstumsunterschiede zwischen der Behandlungsgruppe mit oxidiertem Fett und der Kontrollgruppe mit frischem Fett, sodass das Auftreten von oxidativem Stress als Ursache für die verminderten Körpergewichte ausgeschlossen werden kann.

Eine hohe Supplementierung von Vitamin E kann demnach während der gesamten Reproduktionsphase zu einer Verbesserung des Wachstums von laktierenden Ratten beitragen und die Fütterung von moderat oxidierten Fetten bewirkt während der Reproduktion keine Beeinträchtigung der Gewichtsentwicklung.

4.2 Einfluss oxidierter Fette auf den Vitamin E-Status der laktierenden Tiere und deren Nachkommen

Vitamin E als bedeutendes lipidlösliches Antioxidans (CHEESEMAN et al. 1986, MEYDANI 1995, NIKI 1987) ist in der Lage, die Lipidperoxidation zum Abbruch zu bringen, indem es die Lipidperoxyradikale durch Übertragung eines H-Atoms abfängt und damit die Ausbildung eines α -Tocopheroxyradikals bewirkt (BURTON 1994). Vitamin E wird im Zuge der Lipidperoxidation somit selbst verbraucht. Nach Verfütterung oxidierter Fette konnte

demnach in verschiedenen Tierspezies gezeigt werden, dass sich die α -Tocopherolkonzentrationen in Diäten und Geweben vermindern (D'AQUINO et al. 1985, ENGBERG et al. 1996, LIU und HUANG 1995, YOSHIDA und KAJIMOTO 1989), auch wenn das eingesetzte frische und oxidierte Fett in seiner Vitamin E-Konzentration angeglichen wurde (BRANDSCH und EDER 2004, EDER und STANGL 2000, SÜLZLE et al. 2004).

In V1 wurde der Fragestellung nachgegangen, ob die Fütterung oxidiertes Fett an weibliche Ratten während der Reproduktion den Vitamin E-Status der Nachkommen in unterschiedlichen Entwicklungsstufen (Neugeborene, Jungtiere [20Tage], Adulte [10Wochen]) beeinträchtigt bzw. eine hohe Vitamin E-Supplementierung den Vitamin E-Status im Muttertier und den Nachkommen verbessern kann. Eine hohe Supplementierung von Vitamin E nach Verfütterung oxidiertes Fett führte zu einer Verbesserung des Vitamin E-Status in Leber, Plasma, Milch und Milchdrüse der Muttertiere. Selbiges wurde bereits bei männlichen Ratten beobachtet (EDER et al. 2002, SÜLZLE et al. 2004). Verglichen zur Kontrolle mit frischem Fett lagen nach Verzehr oxidiertes Fett mit einer niedrigen und hohen Supplementierung aber dennoch stark verminderte Konzentrationen an α -Tocopherol in Leber und Plasma der laktierenden Tiere vor. Diese verminderten α -Tocopherolkonzentrationen durch oxidiertes Fett lassen demnach auf einen verstärkten Katabolismus von Vitamin E aufgrund der Reaktion mit Lipidperoxydationsprodukten schließen (EDER und STANGL 2000, ENGBERG et al. 1996, LIU und HUANG 1995, 1996, SRINIVASAN und PUGALENDI 2000). Eine hohe Gabe von α -Tocopherol zu einem oxidiertes Fett kann demnach toxische Effekte im laktierenden Tier mildern, reicht aber nicht aus, um diesen Effekten und der Bildung von Lipidperoxydationsprodukten vollständig vorzubeugen (YOSHIDA und KAJIMOTO 1989).

Der Transport von α -Tocopherol in die einzelnen Gewebe erfolgt auf dem Weg der Lipide, im besonderen der Triglyceride und des Cholesterins, mittels Lipoproteinen (DEBIER und LARONDELLE 2005, GOTTO et al. 1986). Verminderte Triglycerid - und Cholesterinkonzentrationen nach Verfütterung oxidiertes Fett wurden bereits mehrfach gezeigt (CHAO et al. 2001, 2004, 2005, EDER et al. 2003b, EDER et al. 2004, EDER und KIRCHGESSNER 1998, SÜLZLE et al. 2004) und stehen wahrscheinlich zudem in Zusammenhang mit den verminderten α -Tocopherolkonzentrationen in den Geweben der Muttertiere.

Ein Transport der mit der Nahrung aufgenommenen Lipidperoxyde in das Gewebe und Plasma wurde bereits beschrieben (BUNYAN et al. 1968, KANEDA et al. 1955, URSINI et al. 1998).

Lipidperoxidationsprodukte können anschließend von der Leber mittels Lipoproteinen in andere Gewebe, u. a. zur Milchdrüse transportiert werden. Aufgrund der durch oxidierte Fette nur mäßig reduzierten α -Tocopherolkonzentrationen in Milch und Milchdrüse kann angenommen werden, dass ein Transport der LPOP von der Leber zur Milchdrüse nur in geringem Maße erfolgte. Möglicherweise liegt der Grund dafür im rasch eintretenden Zerfall bzw. Abbau der Lipidperoxidationsprodukte bereits in der Leber.

Die positiven Wirkungen einer α -Tocopherol-Supplementierung an trächtige Ratten auf deren Nachkommen zeigten sich u.a. in einer Anreicherung von α -Tocopherol im fetalen Gewebe und dadurch einem Schutz vor Radikal-vermittelten Krankheiten (VIANA et al. 1999) sowie in einer Verminderung embryonaler Fehlbildungen (INDART et al. 2002, VIANA et al. 1996). Auch eine Humanstudie zeigte die positive Korrelation zwischen hohen Geburtsgewichten und hohen Vitamin E-Gaben an schwangere Mütter (LEE et al. 2004).

In V1 spiegelte sich die hohe Vitamin E-Supplementierung zur maternalen Diät mit frischem bzw. oxidiertem Fett anhand von hohen α -Tocopherolkonzentrationen in der Leber der Neugeborenen und in Leber und Plasma der Jungtiere im Vergleich zur niedrigen Vitamin E-Supplementierung und niedrigen α -Tocopherol-Konzentrationen wider. Die sehr geringen α -Tocopherol-Konzentrationen in der Leber der Neugeborenen in den Kontroll- und Behandlungsgruppen gehen dabei mit dem geringen Transfer von Vitamin E über die Plazenta einher (MARTIN und HURLEY 1977). Die weitaus höheren Konzentrationen an α -Tocopherol in Leber und Plasma der 20-Tage-alten Jungtiere in den Kontroll- und Behandlungsgruppen im Vergleich zu den Neugeborenen beruhen auf dem wesentlich effizienteren Transfer von Vitamin E über die Milch (MARTIN und HURLEY 1977, PAZAK und SCHOLZ 1996).

Verminderte α -Tocopherol-Konzentrationen lagen in den Geweben der Neugeborenen und der Jungtiere, deren Muttertiere oxidierte Fette erhielten, im Vergleich zu den Nachkommen, deren Muttertiere frische Fette erhielten, aber nicht vor. Im Plasma der Jungtiere wurden sogar höhere Konzentrationen an α -Tocopherol nach Verfütterung oxidierter Fette an deren Muttertiere im Vergleich zur Verfütterung frischer Fette gemessen. Selbiges wurde auch von BRANDSCH und EDER (2004) beobachtet, deren Ursache aber bislang unklar ist. Ein Einfluss maternal oxidierter Fette auf den Vitamin E-Status der Neugeborenen und säugenden Jungtiere lag somit nicht vor. Der im laktierenden Tier vermutete verstärkte Katabolismus von Vitamin E aufgrund der Anhäufung von LPOP kann demnach im Gewebe der Neugeborenen und säugenden Nachkommen ausgeschlossen werden. Entgegen der Arbeit

von ROGERS et al. (1999), in der ein transplazentarer Transfer von LPOP beschrieben wurde, blieb dieser in V1 vermutlich aus. Auch ein Transfer von LPOP über die Milch fand offensichtlich nicht bzw. nur in geringem Maße statt und beeinflusste den Stoffwechsel der Nachkommen nicht.

Die adulten Nachkommen wurden ab dem Alter von 20 Tagen bis zum Alter von 10 Wochen mit einer kommerziellen Altromindiät gefüttert. In der Leber der männlichen Nachkommen war der Einfluss der hohen Vitamin E-Supplementierung an die Muttertiere anhand hoher α -Tocopherolkonzentrationen im Vergleich zur niedrigen Vitamin E-Supplementierung noch immer sichtbar. Die Hauptspeicherorte für α -Tocopherol sind Leber, Fettgewebe und Skelettmuskel (BURTON 1994), in denen 90% des gesamten α -Tocopherols gespeichert werden (BJORNEBOE et al. 1990). Die Zufuhr hoher Vitamin E-Konzentrationen mit der Milch zum säugenden Jungtier führte offensichtlich zur Speicherung hoher Vitamin E-Mengen, die somit noch im Alter von 10 Wochen sichtbar waren. In der Leber der weiblichen Nachkommen konnte dies aber nicht festgestellt werden. Auch KOROTKOVA et al. (2005) stellten fest, dass bestimmte Faktoren in der maternalen Diät verstärkt den Stoffwechsel männlicher Nachkommen beeinflussen. Die deutlich höheren α -Tocopherol-Konzentrationen in der Leber weiblicher Nachkommen im Vergleich zur Leber männlicher Nachkommen sind auf geschlechtsspezifische Unterschiede zurückzuführen (FEINGOLD und COLBY 1992, TIIDUS et al. 1999).

Ein Einfluss der maternalen oxidierten Fette konnte anhand der unveränderten α -Tocopherolkonzentrationen in den Geweben der adulten, männlichen und weiblichen Nachkommen nicht festgestellt werden. Ein erhöhter Katabolismus von Vitamin E aufgrund einer möglichen Anhäufung von LPOP fand im adulten Stadium, wie auch bei den Neugeborenen und den säugenden Tieren, nicht statt. Diese Ergebnisse widersprechen der Studie von BRANDSCH und EDER (2004), die in der Leber neugeborener Ratten, deren Muttertiere mit oxidierten Fetten gefüttert wurden, verminderte α -Tocopherolkonzentrationen sowie verminderte Wurfgewichte vom Tag der Geburt bis zum Ende der Laktation gemessen hatten.

Im eigenen Versuch konnte eine signifikante Verminderung der Körpermasseentwicklung der Neugeborenen bis zum Ende der Laktationsperiode (Tag 20) bzw. bis zum Erreichen des adulten Stadiums (Woche 10) durch oxidierte Fette unabhängig von der Vitamin E-Versorgung nicht festgestellt werden. Nur die Wurfgewichte am Tag 20 sowie die Gesamtzunahme des Wurfes von Geburt bis zum Ende der Laktation (Tag 20) war bei den Nachkommen, deren Muttertiere oxidierte Fette aufnahmen, tendenziell vermindert, im

Vergleich zu den Nachkommen, deren Muttertiere frische Fette erhielten. Dieser Effekt hob sich aber bis Woche 10 wieder auf. Auch die Wurfgröße und die Anzahl der Totgeburten wurde durch das oxidierte Fett nicht beeinflusst. Eine mögliche Erklärung der widersprüchlichen Ergebnisse könnte im differierenden Anteil an PUFA in den verwendeten Fettgemischen beider Studien liegen. In V1 war der PUFA-Anteil um die Hälfte geringer im Vergleich zum verwendeten Fett-Gemisch der Studie von BRANDSCH und EDER (2004). Da die gesättigten Fettsäuren im Vergleich zu PUFA weniger anfällig für eine Radikal-vermittelte-Oxidation sind (COSGROVE et al. 1987), ist anzunehmen, dass in V1 die Lipidperoxidation im geringeren Maße vollzogen wurde und somit Folgen für die Nachkommen ausblieben. Ein Vergleich der entstandenen LPOP ist aufgrund der unterschiedlichen Ausgangsfette aber wenig sinnvoll. Eine Aufnahme von oxidierten Fetten mit einem hohen Anteil an PUFA, die einer starken Lipidperoxidation unterliegen, bewirken demnach eine starke Beeinträchtigung des Vitamin E-Status im Gewebe und der Gewichtsentwicklung der Nachkommen im Vergleich zu einer Aufnahme von oxidierten Fetten mit einem geringeren Anteil an PUFA und einer vermutlich geringeren Ausprägung einer Lipidperoxidation. Auch HERRERA (2002) stellte fest, dass eine hohe Aufnahme von mehrfach ungesättigten Fettsäuren vom Muttertier eine erhöhte Lipidperoxidation im Fötus bewirken kann. PUFA sind aber notwendig für Wachstum und Entwicklung bei Mensch und Tier (XIANG und ZETTERSTROM 1999), sodaß eine Reduktion des Anteils an PUFA in der Nahrung auch mit einer Beeinträchtigung der Entwicklungsprozesse einhergehen könnte.

Die Arbeiten von HAHN (1984), KOROTKOVA et al. (2005), LUCAS et al. (1996), SMART (1986) und ZHANG et al. (2005) zeigen, dass die pre- bzw. postnatale Ernährung langanhaltende Auswirkungen auf das Wachstum und den Metabolismus haben kann. Die Fütterung oxidiertes Fett mit einem geringen Anteil an PUFA bewirken zwar eine starke Beeinträchtigung des maternalen Vitamin E-Status in den Geweben, haben aber offensichtlich keine Auswirkungen auf den fetalen Stoffwechsel bis zum Erwachsenenalter. Eine hohe Vitamin E-Supplementierung zur maternalen Diät kann dagegen noch im Erwachsenenalter der Nachkommen sichtbar sein und könnte demnach in Zusammenhang mit der Prävention Radikal-vermittelter Erkrankungen diskutiert werden. Eine Programmierung des fetalen Stoffwechsels kann demnach auch im positiven Sinne erfolgen und wurde in der Literatur bereits beschrieben. PALINSKI et al. (2001) zeigten, dass eine Gabe von Vitamin E an trächtige Kaninchen das Fortschreiten atherogener Läsionen in der Aorta der Nachkommen verminderte.

4.3 Einfluss von Trächtigkeit und Laktation auf die mRNA-Konzentration des PPAR α und seiner Zielgene in der Leber

Der Lipidstoffwechsel unterliegt während Trächtigkeit und Laktation beim Menschen und bei der Ratte massgeblichen Veränderungen (HERRERA und AMUSQUIVAR 2000, SMITH et al. 1998). Die ersten beiden Trimester der Trächtigkeit sind von anabolen Stoffwechselfvorgängen geprägt. Durch eine gesteigerte Lipogenese im Fettgewebe kommt es zum Aufbau von Energiereserven. Im letzten Trimester der Trächtigkeit und während der Laktation schaltet der Organismus auf katabole Stoffwechselprozesse im Fettgewebe um (HERRERA 2000); die Triglyceridsynthese ist dann vermindert und die Lipolyse erhöht (HERRERA et al. 1991). In der Leber liegt dann eine erhöhte Fettsäure- und Triglyceridsynthese mit einer erhöhten Produktion an VLDL (WARTH et al. 1975, WASFI et al. 1980, ZIMMERMANN und HUMMEL 1978) und einer verminderten Fettsäureoxidation vor (OLLER DO NASCIMENTO und WILLIAMSON 1986). So kann der erhöhte Bedarf an metabolischen Substraten für die Milchproduktion während der Laktation gewährleistet werden (BAUMANN und CURRIE 1980, WILLIAMSON 1980).

Bei Mäusen wurde die Reduktion der Fettsäureoxidation in der Leber am Ende der Trächtigkeit (GRIMBERT et al. 1993) bereits mit verminderten mRNA-Konzentrationen des PPAR α und seiner Zielgene ACO und CPT1a (SWEENEY et al. 2006) in Verbindung gebracht. In V2 wurde untersucht, ob auch in der Leber der Ratte eine Relation zwischen den Phasen der Reproduktion (Ende der Trächtigkeit [Tag 20] bzw. Mitte und Ende der Laktation [Tag 10 bzw. Tag 20]) und der Expression des PPAR α besteht.

In der Leber trächtiger Ratten konnten im Vergleich zur Leber adulter, weiblicher Kontrollratten keine Unterschiede in der mRNA-Konzentration des PPAR α und seiner Zielgene (CPT1a, CYP4A1, ACO) gemessen werden. Entgegen der Annahme steht die verminderte Fettsäureoxidation am Ende der Trächtigkeit bei Ratten vermutlich nicht in Zusammenhang mit einer verminderten Expression des PPAR α . Möglicherweise aber sind die metabolischen Veränderungen erst auf Proteinebene sichtbar.

In der Leber laktierender Ratten dagegen wurden im Vergleich zur Leber adulter, weiblicher Kontrollratten verminderte mRNA-Konzentrationen des PPAR α (nicht signifikant) und seiner Zielgene CPT1a und CYP4A1 festgestellt; der Effekt war vorwiegend bei laktierenden Ratten am Tag 20 (Ende der Laktation) zu sehen. Anhand der vorliegenden Daten könnte man vermuten, dass während der Laktation die verminderte Fettsäureoxidation in der Leber über

eine verminderte Expression des PPAR α reguliert wird, obgleich die mRNA-Konzentration eines der wichtigsten Zielgene des PPAR α , der ACO, unverändert blieb.

Die Ursache für die verminderte Expression des PPAR α während der Reproduktion könnte in Zusammenhang mit dem Hormonhaushalt stehen, der während Trächtigkeit und Laktation maßgeblichen Veränderungen unterliegt. Eine wichtige Rolle bei den metabolischen Veränderungen in der Ratte am Ende der Trächtigkeit und während der Laktation wird dabei dem Wachstumshormon (growth hormone [GH]) zugesprochen (LETURQUE et al. 1984, MADON et al. 1986). Die Konzentrationen an GH sind während Trächtigkeit und Laktation bei Ratten stark erhöht (ESCALADA et al. 1997). GH ist in der Lage, die Expression des PPAR α zu vermindern bzw. zu hemmen (CARLSSON et al. 2001, FLORES-MORALES et al. 2001, JALOULI et al. 2003) und zeigt zudem hemmende Effekte auf die peroxisomale β -Oxidation (SUGIYAMA et al. 1994, YAMADA et al. 1994). Somit könnte die Regulation der verminderten PPAR α -Expression und Fettsäureoxidation während der Laktation durch GH erfolgen.

Die verminderte Expression eines der PPAR α -Zielgene, der CPT1a, in der Leber laktierender Ratten könnte aber auch im Zusammenhang mit dem Östrogenhaushalt stehen. Bei Ratten steigt die Konzentration an Östrogenen ab dem Tag 16 bis zum Ende der Trächtigkeit ständig an (SHAIKH 1971); zu Beginn der Laktation ist die Östrogenkonzentration niedrig, während sie ab dem Tag 10 ebenfalls wieder zunimmt (SMITH und Neill 1977). Östrogene sind in der Lage, die Fettsäureoxidation in der Leber zu regulieren (WEINSTEIN et al. 1986). Sowohl ALTEN und GROSCURTH (1975) als auch GOWER et al. (2002) wiesen nach, dass Östradiol die Expression von CPT1a in der Leber vermindert, sodass die erhöhten Konzentrationen an Östrogenen am Ende der Laktation ebenfalls die verminderten mRNA-Konzentrationen von CPT1a in der Leber der laktierenden Tiere mit der Folge einer Verminderung der mitochondrialen Fettsäureoxidation erklären könnten. Die Gründe für die ausgebliebenen Effekte in der Leber trächtiger Ratten sind unklar, da die erhöhte Konzentration an Östrogenen am Ende der Trächtigkeit auch zu einer verminderten mRNA-Konzentration von CPT 1a führen könnte.

Die Laktation ist zudem durch eine hohe Prolaktinkonzentration im Serum gekennzeichnet (COWIE et al. 1980). So könnte das Prolaktin, ein Hormon, welches für die Entwicklung und Differenzierung der Milchdrüse sowie für die Milchsekretion verantwortlich ist, auch an der Regulierung des PPAR α während der Reproduktion beteiligt sein, indem es einen Einfluss auf die Fettsäureoxidation nimmt.

4.4 Einfluss oxidierter Fette auf den Triglyceridstoffwechsel während der Trächtigkeit in der Leber

Die Wirkungen oxidierter Fette auf den Triglyceridstoffwechsel wurden mehrfach untersucht. Oxidiertes Fett fungiert als PPAR α -Aktivator mit der Folge verminderter Triglyceridkonzentrationen in Leber und Plasma von männlichen und weiblichen Ratten (CHAO et al. 2001, 2004, SÜLZLE et al. 2004). Bisher lagen aber keine Untersuchungen vor, ob oxidiertes Fett in der Lage ist, den PPAR α auch in der Leber trächtiger Ratten und deren Föten zu aktivieren. Diese Untersuchungen waren Gegenstand in V3. Neben oxidiertem Fett wurde zudem Clofibrat gefüttert, einem synthetischen Liganden des PPAR α (BERGER und MOLLER 2002, DESVERGNE und WAHLI 1999), der transplazentar zum Fötus transportiert werden kann (SIMPSON et al. 1996). Der wirksame Metabolit des Clofibrats ist die Clofibrinsäure. Clofibrat kann in der Leber von Nagetieren den PPAR α aktivieren, eine erhöhte Expression bzw. Aktivität der Gene bzw. Enzyme der β -Oxidation bewirken (GONZALES et al. 1998, GRUM et al. 1994, LAZAROW und De DUVE 1976) und eine Peroxisomenproliferation induzieren (REDDY et al. 1980, REDDY und KRISHNAKANTHA 1975, HESS et al. 1965).

Eine Aktivierung des PPAR α mit Hochregulierung der PPAR α -Zielgene konnte in vorliegender Arbeit erstmalig auch in der Leber trächtiger Ratten und der Föten nach Verfütterung oxidierter Fette ermittelt werden. Diese Ergebnisse sind somit in Übereinstimmung mit den Studien von CHAO et al. (2001), (2004) und SÜLZLE et al. (2004) an adulten, männlichen und weiblichen Ratten. Die in V3 angewandte, langandauernde Fettoxidation bei relativ geringer Temperatur lässt besonders oxidierte Fettsäuren, wie z. B. die HPODE entstehen, die anschließend zur HODE reduziert werden kann. Diese Fettsäuren fungieren als starke PPAR α -Agonisten (DESVERGNE und WAHLI 1999, KÖNIG und EDER 2006) und lösten auch in vivo vermutlich die PPAR α -Aktivierung in der Leber der trächtigen Tiere aus. Während der Trächtigkeit werden nicht maternale Triglyceride, sondern ausschließlich freie, mehrfach ungesättigte Fettsäuren vom Muttertier über die Plazenta zum Fötus transportiert (HAY 1994, HERRERA und AMUSQUIVAR 2000, HERRERA et al. 1998, HERRERA et al. 2006). Die Vermutung liegt nahe, dass - neben den synthetischen PPAR α -Aktivatoren - auch Komponenten des oxidierten Fettes in der Lage sind, die Plazenta zu passieren. Demnach könnte die fetale PPAR α -Aktivierung auch durch die oxidierten Fettsäuren erfolgt sein, die transplazentar vom Muttertier zum Fötus gelangen können.

Der PPAR α bildet nach Aktivierung durch die Liganden ein Heterodimer mit dem RXR. Dieser Komplex bindet an PPRE in der Promotorregion der Gene der β -Oxidation und führt zu deren Transkription (DESVERGNE und WAHLI 1999). Die erhöhte Expression der PPAR α -Zielgene in der Leber der trächtigen Ratten und deren Föten lässt vermuten, dass es im Zuge der Aktivierung des PPAR α durch oxidierte Fette (bzw. Clofibrat) zu einer verstärkten mitochondrialen, peroxisomalen und mikrosomalen Oxidation der Fettsäuren kam. In der fötalen Leber löste das Clofibrat aber wesentlich stärkere Effekte in bezug auf die Hochregulierung der Zielgene aus als das oxidierte Fett. Die mRNA-Konzentration der CPT1a war durch das Clofibrat um den Faktor 18, durch oxidiertes Fett nur um den Faktor 2, erhöht; die mRNA-Konzentration der CYP4A1 war durch das Clofibrat um den Faktor 28, durch oxidiertes Fett nur um den Faktor 6 erhöht. Derartige Unterschiede wurden in der maternalen Leber beider Behandlungsgruppen - mit Ausnahme von CYP4A1 - nicht gemessen.

Die mit einer Aktivierung des PPAR α oftmals einhergehende Erhöhung der mRNA-Konzentration des PPAR α selbst (SORIA et al. 2005) konnte weder in der Leber der trächtigen Tiere noch in der Leber der Föten durch oxidiertes Fett bzw. durch Clofibrat nachgewiesen werden. Auch bei der Arbeit von CHAO et al. (2001) ging nach Verfütterung oxidierter Fette die erhöhte Expression der PPAR α -Zielgene nicht mit einer erhöhten Expression des PPAR α selbst einher. Aufgrund der immensen Erhöhung der mRNA-Konzentrationen der Zielgene in V3 aber kann auf eine deutliche Aktivierung des PPAR α geschlossen werden. Die Untersuchungen der Expression des PPAR α und seiner Zielgene in der Leber erfolgte am nicht-fastenden, ungenücherten Tier, da das Fasten mit einer verstärkten Lipolyse der Triglyceride aus dem Fettgewebe und einem erhöhten Anteil der Fettsäuren im Plasma einhergeht. Diese Fettsäuren könnten als endogene PPAR α -Liganden fungieren und möglicherweise mit den exogenen Liganden, dem oxidierten Fett bzw. Clofibrat, um die PPAR α -Bindungsstellen konkurrieren und somit deren Effekt beeinflussen.

Die Folge einer PPAR α -Aktivierung zeigt sich in der Induktion einer Peroxisomenproliferation in der Leber adulter Nagetiere (CHAO et al. 2005, DESVERGNE und WAHLI 1999, HESS et al. 1965, REDDY et al. 1980). Auch in der Leber von Föten wurde nach Verabreichung von Clofibrat an deren trächtige Muttertiere eine Peroxisomenproliferation beschrieben (STEFANINI et al. 1989).

Eine Peroxisomenproliferation kann anhand der Expression der ACO abgeschätzt werden (FAN et al. 1996). Die Erhöhung der mRNA-Konzentration der ACO war nach Verfütterung

oxidiertes Fett bzw. Clofibrat in der Leber der trächtigen Tiere annähernd gleich. In der fetalen Leber war der Anstieg der mRNA-Konzentration der ACO nach Behandlung mit oxidiertem Fett bzw. Clofibrat der Muttertiere ähnlich, aber im Vergleich zur maternalen Leber etwas geringer. Obgleich Differenzen in der Expression der übrigen PPAR α -Zielgene in der fetalen Leber der beiden Behandlungsgruppen zu erkennen waren, kann man - im Vergleich zu Clofibrat - von starken Effekten des oxidierten Fettes im Hinblick auf eine PPAR α -Aktivierung und Peroxisomenproliferation sprechen. Dies bestätigt auch die mit der Peroxisomenproliferation einhergehende Lebervergrößerung der trächtigen Ratten nach Verfütterung oxidiertes Fett bzw. Clofibrat, die auch in anderen Arbeiten gezeigt wurde (CHAO et al. 2001, 2004, 2005, LAZAROW und DE DUVE 1976, NWANGUMA et al. 1999, YADETIE et al. 2003, YOSHIDA und KAJIMOTO 1989). Die damit verbundenen erhöhten Phospholipidkonzentrationen, die nach Verfütterung oxidiertes Fett mehrfach nachgewiesen wurden (D'AQUINO et al. 1985, EDER 1999, HOCHGRAF et al. 1997, SÜLZLE et al. 2004), konnten ausschließlich in der Leber der Föten, nicht aber der trächtigen Tiere nachgewiesen werden. Auch nach Gabe von Clofibrat wurden keine erhöhten Phospholipidkonzentrationen in der Leber der trächtigen Ratten und deren Föten entgegen der Studien von CATALAN et al. (1979), KYRKLUND und MEIJER (1994) und PENNACCHIOTTI et al. (1996) ermittelt.

Die einzelnen Spezies reagieren unterschiedlich sensitiv auf Peroxisomenproliferatoren. Während Ratten und Mäuse hoch sensitiv auf Peroxisomenproliferatoren reagieren (GRUM et al. 1994, LAZAROW und DUVE 1976), zeigen Menschen nur eine schwache Reaktion auf Peroxisomenproliferatoren (BENTLEY et al. 1993). Dies ist auf eine wesentlich niedrigere PPAR α -Expression in der humanen Leber im Vergleich zur Nagetierleber zurückzuführen (KERSTEN et al. 2000, PALMER et al. 1998, TUGWOOD et al. 1996). Eine Zunahme der Leberperoxisomen nach Gabe von Clofibrat konnte aber auch beim Menschen gezeigt werden (HANEFELD et al. 1983). Auch Schweine, die zu den sogenannten Non-Proliferatoren zählen (HOLDEN und TUGWOOD 1999), zeigten aber nach Behandlung mit Clofibrat eine PPAR α -Aktivierung in der Leber (LUCI et al. 2007). So könnte vermutet werden, dass oxidiertes Fett auch in der Leber des Menschen eine PPAR α -Aktivierung bewirken könnte, wenn auch mit einer deutlich schwächeren Intensität im Vergleich zur Nagetierleber.

Verminderte Triglyceridkonzentrationen nach Aufnahme oxidiertes Fett können die Folge der verstärkten Fettsäureoxidation (CHAO et al. 2001, 2004, SÜLZLE et al. 2004) und der beeinträchtigten Fettsäuresynthese mit Verminderung der Genexpression von SREBP-1c und FSS sein (EDER et al. 2003b). Eine beeinträchtigte Fettsäuresynthese wurde in der Leber der

trächtigen Tiere und deren Föten nicht nachgewiesen. Fibrate sind ebenfalls in der Lage, die Fettsäuresynthese in der Leber zu reduzieren (SCHOONJANS et al. 1996). Die Gabe von Clofibrat zeigte aber in Übereinstimmung mit der Studie von SORIA et al. (2005) bei trächtigen Ratten ebenfalls keine Reduzierung der Leberlipogenese. Es wird demnach vermutet, dass die verminderten Triglyceridkonzentrationen in Leber und Plasma trächtiger Ratten und in der Leber der Föten nach Verfütterung oxidierter Fette bzw. in Leber trächtiger Ratten und deren Föten nach Verfütterung von Clofibrat ausschließlich aus der Aktivierung des PPAR α und der Erhöhung des Fettsäurekatabolismus und nicht aus einer verminderten Fettsäuresynthese resultieren. Die unveränderte Plasmatriglyceridkonzentration trächtiger Tiere nach Verfütterung von Clofibrat ist verwunderlich, da Fibrate bekanntlich die Plasma-Triglyceridkonzentration senken (KERSTEN et al. 2000, KLIEWER et al. 2001, WATTS und DIMMIT 1999). Diesbezüglich sind aber auch differierende Angaben aus der Literatur bekannt. SORIA et al. (2005) wiesen nach Verfütterung von Fenofibrat an trächtige Ratten ebenfalls keine Verminderung, sondern sogar eine Erhöhung der Plasmatriglyceride nach.

Es ist deutlich erkennbar, dass eine Fütterung oxidierter Fette während der Trächtigkeit zu einer Beeinflussung des maternalen und fötalen Triglyceridstoffwechsels führt. Im letzten Trimester der Trächtigkeit, in der die Probenentnahme erfolgte, liegt eine Veränderung des Lipidstoffwechsels im Muttertier vor. In der Leber liegt eine erhöhte Fettsäure- und Triglyceridsynthese (ZIMMERMANN und HUMMEL 1978), eine verminderte Fettsäureoxidation (OLLER DO NASCIMENTO und WILLIAMSON 1986) und eine erhöhte Produktion an VLDL-Triglyceriden (HERRERA et al. 1988, WASFI et al. 1980) vor. Folge solch einer erhöhten Produktion kann die Entwicklung einer maternalen Hypertriglyceridämie sein. Durch die PPAR α -Aktivierung und der damit einhergehenden Induktion eines verstärkten Fettsäurekatabolismus wirkt oxidiertes Fett demnach diesen physiologischen Prozessen im letzten Trimester der Trächtigkeit entgegen mit der Folge einer verminderten Lebertriglyceridkonzentration. Da nur ein geringer Anteil der hepatischen Triglyceridkonzentration aus der de novo Lipogenese entstammt (AGIUS et al. 1981), kann die unveränderte Fettsäuresynthese durch oxidierte Fette den Verlust an hepatischen Triglyceriden offensichtlich nicht ausgleichen. Hepatische Triglyceride werden in VLDL eingebaut und in das Plasma abgegeben. Mithilfe von Lipoproteinlipasen des Kapillarendothels verschiedener Organe, wie z. B. der Milchdrüse, können Fettsäuren aus den VLDL-Triglyceriden mobilisiert werden (GIBBONS et al. 2000). Die Aktivität der LPL ist am Ende der Trächtigkeit im Fettgewebe und in der Leber vermindert, während sie in

Plazenta und Milchdrüse erhöht ist (HERRERA et al. 1988, MARTIN-HIDALGO et al. 1994, OTWAY und ROBINSON 1968), um der Milchdrüse ausreichend Fettsäuren zur Verfügung zu stellen. Durch die erhöhte Fettsäureoxidation in der Leber, die verminderten Lebertriglyceridkonzentrationen und die vermutlich verminderte Konzentration an VLDL-Triglyceriden nach PPAR α -Aktivierung kann möglicherweise keine ausreichende Bereitstellung an Lipiden für die Milchdrüse im nachfolgenden Prozess der Laktation gewährleistet werden. YANG et al. (2006a,b) zeigten an Mäusen, dass die Aktivierung des PPAR α während der Trächtigkeit mit einer beeinträchtigten Entwicklung der Milchdrüse, mit einer Verschlechterung der Laktation und einer erhöhten Mortalität der Nachkommen einhergehen kann.

Auch die Beeinflussung des fetalen Stoffwechsels nach maternaler Aufnahme oxidierter Fette hat Konsequenzen. Im Normalfall ist die fetale Fettsäureoxidation in der Leber niedrig (JONES 1982). So können bevorzugt Fettsäuren zum Fettgewebe gelangen, die für die Triglyceridsynthese verwendet werden (HERRERA und AMUSQUIVAR 2000). Durch die erhöhte Fettsäureoxidation in der fetalen Leber nach maternaler Aufnahme oxidierter Fette liegen demnach nicht mehr ausreichend Fettsäuren vor, die für den Aufbau von Fettspeichern im Fetus notwendig wären.

4.5 Einfluss oxidierter Fette auf den Triglyceridstoffwechsel während der Laktation in der Leber und Milchdrüse

Die Wirkung oxidierter Fette auf den Lipidstoffwechsel von Milch und Milchdrüse laktierender Ratten zeigte sich in einer früheren Studie in signifikant verminderten Triglyceridkonzentrationen in der Milch, die zu verminderten Gewichten der säugenden Nachkommen führten (BRANDSCH et al. 2004). Die Ursache für die verminderten Triglyceridkonzentrationen in der Rattenmilch war bislang unklar und somit Gegenstand der Untersuchungen von V4. Zunächst wurde untersucht, ob nach Aufnahme oxidierter Fette in den Organen Leber und Milchdrüse der laktierenden Ratte eine PPAR α -Aktivierung initiiert wurde.

Erstmals konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse gezeigt werden, dass nach Verfütterung oxidierter Fette auch in der Leber laktierender Ratten eine PPAR α -Aktivierung mit einer erhöhten Expression der PPAR α -Zielgene und des PPAR α selbst stattfand. Die Folge ist vermutlich eine verstärkte mitochondriale, peroxisomale und mikrosomale Oxidation der Fettsäuren, welche die verminderten Triglyceridkonzentrationen in Leber und Plasma bewirkten. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Studien von CHAO et al.

(2001), (2004) und SÜLZLE et al. (2004) an männlichen und weiblichen, nichtträchtigen Ratten und zeigen, dass oxidierte Fette unabhängig von physiologischen Stadien (Trächtigkeit, Laktation) in der Lage sind, den PPAR α in der Leber zu aktivieren. Die in V4 angewandte langandauernde Fettoxidation bei relativ geringer Temperatur lässt v.a. die HPODE entstehen lässt, die anschließend zur HODE reduziert werden kann und vermutlich die PPAR α -Aktivierung in der Leber der laktierenden Tiere auslöste. Die Abschätzung der Intensität der Peroxisomenproliferation erfolgte abermals anhand der Genexpression der ACO. Die Erhöhung der mRNA-Konzentration der ACO in der Leber laktierender Ratten (V4) nach Verfütterung oxidierter Fette war dem Anstieg der mRNA-Konzentration der ACO in der Leber trächtiger Ratten (V3) annähernd gleich. Der Vergleich der Effekte ist möglich, da auch die Ausgangsfette für die Oxidation und die Konzentration an entstandenen primären LPOP, die vermutlich für die PPAR α -Aktivierung verantwortlich sind, in beiden Versuchsansätzen ähnlich waren. Oxidiertes Fett löst demnach mit annähernd gleicher Intensität in der Leber von Ratten während der Reproduktion (Trächtigkeit, Laktation) eine PPAR α -Aktivierung aus. Die mit der Peroxisomenproliferation einhergehenden erhöhten Lebergewichte und erhöhten Konzentrationen an Phospholipiden konnten in laktierenden Ratten aber nicht nachgewiesen werden und deuten demnach auf einen etwas schwächeren Effekt des oxidierten Fettes im Vergleich zu synthetischen PPAR α -Liganden hin. So wurde nach Gabe von Nafenopin bzw. WY-14,643, die zu den synthetischen PPAR α -Liganden gehören, eine deutliche Zunahme der Leberperoxisomen laktierender Ratten festgestellt (FAHL et al. 1983), welches ein eindeutiges Indiz für eine Peroxisomenproliferation ist.

Die Untersuchung der Fettsäuresynthese in der Leber laktierender Ratten zeigte nur eine tendenziell verminderte mRNA-Konzentration der FSS und eine unveränderte mRNA-Konzentration des SREBP-1c. Die verminderten Triglyceridkonzentrationen in Leber und Plasma sind somit hauptsächlich als Folge der PPAR α -Aktivierung und nur in geringem Maße aufgrund der tendenziell verminderten Fettsäuresynthese zu erklären. In V2 konnte gezeigt werden, dass unter normalen physiologischen Bedingungen eine verminderte hepatische Expression des PPAR α und seiner Zielgene während der Laktation vorliegt und dies möglicherweise die Ursache der verminderten Fettsäureoxidation in der Leber laktierender Ratten ist (OLLER DO NASCIMENTO und WILLIAMSON 1986). Auch liegt ab der Mitte der Laktation eine erhöhte hepatische Fettsäuresynthese bei Ratten vor (AGIUS und WILLIAMSON 1980, VERNON und FLINT 1983). Diesen Prozessen wirkt oxidiertes Fett demnach entgegen. Auch der synthetische PPAR α -Ligand Ciprofibrat ist während der

Laktation in der Lage, die Aktivität der Enzyme des Fettsäurekatabolismus in der Leber von Ratten zu erhöhen (STEFANINI et al. 1999). Der verstärkte Fettsäurekatabolismus und die tendenziell verminderte Fettsäuresynthese nach Aufnahme oxidierter Fette beeinträchtigen den hepatischen Triglyceridstoffwechsel und die Versorgung der Milchdrüse mit Triglyceriden aus den VLDL während der Laktation somit maßgeblich.

In der Milchdrüse laktierender Ratten konnte eine PPAR α -Aktivierung nach Verfütterung oxidierter Fette nicht nachgewiesen werden. Die mRNA-Konzentrationen der PPAR α -Zielgene blieben im Vergleich zur Kontrolle unverändert; der PPAR α selbst wurde nicht nachgewiesen. Auch in anderen Arbeiten war der PPAR α in der Milchdrüse von laktierenden Nagetieren kaum detektierbar (GIMBLE et al. 1998, RODRIGUEZ-CRUZ et al. 2006). Aufgrund der während der Laktation benötigten Fette in der Milchdrüse, welche in die Milch abgegeben werden, ist vermutlich die Oxidation von Fettsäuren in der Milchdrüse sehr begrenzt und wird durch oxidiertes Fett nicht beeinflusst. Die bei BRANDSCH et al. (2004) erstmals gezeigten und in vorliegendem Versuch bestätigten signifikant verminderten Konzentrationen an Milchtriglyceriden laktierender Ratten nach Verfütterung oxidierter Fette beruhen demnach nicht auf einem verstärkten Fettsäurekatabolismus in der Milchdrüse.

Die Triglyceride der Milch können u.a. aus der Biosynthese der Fettsäuren und ihrer Veresterung in der Milchdrüse stammen (NEVILLE et al. 1980). Eine Beeinträchtigung der Fettsäuresynthese in der Milchdrüse durch oxidierte Fette wurde bereits ausgeschlossen (BRANDSCH et al. 2004). Die in V4 gewonnenen Daten in Form der unveränderten mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c und der FSS in der Milchdrüse sowie anhand der unveränderten Konzentration der mittelkettigen Fettsäuren der Milch mit 8-14 C-Atomen bestätigen die Studie. Die verminderte Konzentration an Milchtriglyceriden nach Verfütterung oxidierter Fette ist demnach nicht die Folge einer verminderten Fettsäuresynthese in der Milchdrüse. Eine weitere Quelle für die Milchtriglyceride stellt die Aufnahme langkettiger Fettsäuren (C18-C22) in die Milchdrüse dar. Diese Fettsäuren entstammen den Triglyceriden der Chylomikronen und VLDL der Leber (NEVILLE et al. 1980). Dabei erfolgt die Hydrolyse der Triglyceride aus den Lipoproteinen durch die LPL mit Bereitstellung der Fettsäuren und 2-Monoacylglycerol (NEVILLE und PICCIANO 1997, SCOW et al. 1977). Die Fettsäuren werden nach Aufnahme in die Milchdrüse zur Synthese der Triglyceride verwendet und anschließend in die Milch abgegeben (ASSUMPCAO et al. 2002). Die verminderte mRNA-Konzentration der LPL in der Milchdrüse nach Verfütterung oxidierter Fette führte demnach zu einer beeinträchtigten Aufnahme von Fettsäuren aus den Lipoproteinen in die Milchdrüse. Da ausschließlich langkettige Fettsäuren mit 18-22 C-

Atomen mittels der LPL aus den Lipoproteinen freigesetzt werden (ROSS et al. 1985, GREEN et al. 1981), ist somit verständlich, dass durch die verminderte Expression der LPL die Summe der langkettigen Fettsäuren in der Milch nach Verfütterung oxidierter Fette signifikant abnahm. Da langkettige Fettsäuren von großer Bedeutung für die neurologische Entwicklung der Nachkommen sind (CRAWFORD et al. 1976), ist eine Verminderung dieser Fettsäuren nachteilig für die Nachkommen.

Eine dritte Quelle der Milchtriglyceride sind die freien Fettsäuren (NEFA) im Plasma, die aus der Hydrolyse der Triglyceride des Fettgewebes entstammen und in die Milchdrüse über Fettsäuretransporter gelangen. Dabei binden die Fettsäuretransporter FABP, FATP und FAT/CD36 vorwiegend langkettige Fettsäuren (ABUMRAD et al. 1993, ROLF et al. 1995, SCHAFFER und LODISH 1994) und spielen zudem eine wichtige Rolle in der Fettsäureoxidation (ANTONENKOV et al. 2006, EROL et al. 2004). Die signifikant verminderten mRNA-Konzentrationen der Fettsäuretransporter (FABP, FATP, FAT/CD36) in der Milchdrüse laktierender Ratten nach Verfütterung oxidierter Fette bewirken gemeinsam mit der verminderten Expression der LPL eine verminderte Aufnahme an Fettsäuren in die Milchdrüse, die für die Triglyceridsynthese notwendig sind. Die Synthesen der Triglyceride mit langkettigen Fettsäuren in der Milchdrüse war demnach verschlechtert. So resultieren die verminderten Triglyceridkonzentrationen in der Milch nach Verfütterung oxidierter Fette aus einer verminderten Aufnahme an Fettsäuren von Lipoproteinen mittels LPL sowie einer verminderten Aufnahme von Fettsäuren aus dem Plasma durch Fettsäuretransporter in die Milchdrüse.

Unter normalen Bedingungen steigt während der Laktation die Aktivität der LPL in der Milchdrüse an (HAMOSH et al. 1970, OLLER DO NASCIMENTO und WILLIAMSON 1986), während sie in der Leber abnimmt, damit der Milchdrüse verstärkt die Fettsäuren aus den Lipoproteinen für die Triglyceridsynthese zur Verfügung gestellt werden können. Oxidiertes Fett wirkt diesem Prozess entgegen, denn neben der verminderten mRNA-Konzentration der LPL und der Fettsäuretransporter in der Milchdrüse wurde in der Leber eine erhöhte mRNA-Konzentration der LPL und der Fettsäuretransporter gemessen. Diese Verschiebung der Aufnahme und des Transportes der Fettsäuren zur Leber anstelle zur Milchdrüse während der Laktation durch oxidiertes Fett dient offensichtlich dazu, den erhöhten Bedarf an Fettsäuren in der Leber aufgrund der verstärkten Fettsäureoxidation als Folge der PPAR α -Aktivierung zu decken. Die verminderten Konzentrationen an NEFA im Plasma laktierender Ratten unterstützen diese Annahme. Die Notwendigkeit eines erhöhten Fettsäureimports mittels Fettsäuretransporter aufgrund einer erhöhten β -Oxidation wurde auch

von MARTIN et al. (1997) beschrieben. Vermutlich bewirkten oxidierte Fettsäuren die erhöhte Expression der Fettsäuretransporter (FABP, FATP, FAT/CD 36) in der Leber. Auch andere PPAR α -Liganden zeigten den Effekt einer verstärkten Expression von Fettsäuretransportern (ANTONENKOV et al. 2006, GUERRE-MILLO et al. 2000, KAIKAUS et al. 1993, MARTIN et al. 1997, WOLFRUM et al. 1999). Der erhöhte Bedarf an Fettsäuren in der Milchdrüse während der Laktation kann aufgrund dieser Verschiebung und der hepatischen PPAR α -Aktivierung nicht mehr gewährleistet werden. Die unzureichende Aufnahme von Fettsäuren mit einer daraus resultierenden verminderten Triglyceridsynthese in der Milchdrüse bewirken somit die verminderten Triglyceridkonzentrationen in der Milch. Muttermilch ist die einzige Nahrungsquelle für die säugenden Nachkommen und die Milchlipide stellen eine entscheidende Energiequelle für das postnatale Wachstum und die Entwicklung dar (GIRARD et al. 1992). Demnach ist verständlich, dass sich die verminderten Triglyceridkonzentrationen in der Milch in einer signifikanten Verminderung der Körpergewichte der Nachkommen von Tag 8 bis zum Tag 20 der Laktationsperiode nach Verfütterung oxidierter Fette widerspiegeln. Verminderte Fettgehalte in der Milch mit der Folge einer verminderten Gewichtsentwicklung der Nachkommen wurden mehrfach beschrieben (BRANDSCH et al. 2004, RINGSEIS et al. 2004).

Die widersprüchlichen Effekte nach maternaler Aufnahme oxidierter Fette in V1 und V4 in Bezug auf die Gewichtsentwicklung der Nachkommen könnten mit dem differierenden Anteil an PUFA in den verwendeten Fettgemischen beider Studien begründet werden, der in V1 um die Hälfte geringer war im Vergleich zu V4. Der Anteil der im Zuge der Lipidperoxidation entstandenen oxidierten Fettsäuren, die in V4 vermutlich die maßgeblichen Veränderungen des Triglyceridstoffwechsels im Muttertier bewirkten, war demnach in V1 deutlich geringer. Die Vermutung, dass die Aufnahme thermisch behandelte Fette mit einem hohen Anteil an oxidierten Fettsäuren eine wesentlich stärkere Beeinträchtigung der Gewichtsentwicklung der Nachkommen im Vergleich zu einer Aufnahme von oxidierten Fetten mit einem geringeren Anteil an oxidierten Fettsäuren bewirken kann, wird durch die signifikant verminderte Gewichtsentwicklung der Nachkommen in V4 unterstützt.

4.6 Einfluss oxidierter Fette auf den Cholesterinstoffwechsel während Trächtigkeit und Laktation in der Leber

Die in mehreren Studien an Ratten durch oxidierte Fette gezeigten verminderten Cholesterinkonzentrationen in Leber und Plasma (CHAO et al. 2005, BRANDSCH und

EDER 2004, EDER et al. 2004, HOCHGRAF et al. 1997, SÜLZLE et al. 2004) wurden auch bei den trächtigen Ratten (V3) und laktierenden Ratten (V4) nachgewiesen. Somit hat oxidiertes Fett während Trächtigkeit und Laktation auch einen Einfluss auf den Cholesterinstoffwechsel.

Nach Verfütterung von Clofibrat (V3) kam es ausschließlich in der Leber der trächtigen Ratten zu verminderten Cholesterinkonzentrationen, nicht aber im Plasma. Da Fibrate bekanntlich die Plasmacholesterinkonzentration senken (ZIMETBAUM et al. 1991), ist die Ursache für die unveränderten Plasmacholesterinkonzentrationen unklar. Möglicherweise könnte dies in Zusammenhang mit den metabolischen Veränderungen während des letzten Trimesters der Trächtigkeit stehen, die vermutlich den lipidsenkenden Effekt der Fibrate aufheben. Fenofibrat führte bei trächtigen Ratten sogar zu erhöhten Plasmalipidkonzentrationen (SORIA et al. 2005).

SREBP-2 stellt einen wichtigen Regulator des Cholesterinstoffwechsels dar und bewirkt bei verminderten Konzentrationen an Cholesterin in der Zelle eine vermehrte Transkription seiner Zielgene (HMG-CoA-Reduktase, Low-density-lipoprotein-Rezeptor) (HORTON et al. 2002). Zunächst befinden sich inaktive SREBP-Vorläufer im ER, die bei niedrigen Cholesterinkonzentrationen vom SREBP cleavage-activating Protein zum Golgi-Apparat transportiert werden. Der SREBP-Vorläufer wird von zwei Proteasen (site-1 protease, site-2 protease) gespalten und der NH₂-terminale Teil, das sogenannte reife SREBP, freigesetzt. Dieses gelangt in den Zellkern, bindet an die sterol-regulatory elements in der Promotorregion der Zielgene und bewirkt deren Transkription (BROWN und GOLDSTEIN 1997, HORTON et al. 2002, MISEREZ 2001). Dabei spielt die HMG-CoA-Reduktase eine zentrale Rolle in der Regulation des Cholesterinmetabolismus und der Plasmacholesterinkonzentrationen (DIETSCHY 1997) und der LDL-Rezeptor vermittelt die zelluläre Aufnahme von cholesterinreichen LDL-Partikeln (DIETSCHY 1984).

KÖNIG et al. (2007) zeigten, dass eine PPAR α -Aktivierung in der Leber von Ratten nach Gabe von Clofibrat zu einer Verminderung des reifen SREBP-2 führte und dies eine verminderte mRNA-Konzentration der HMG-CoA-Reduktase und des LDL-Rezeptors und somit eine verminderte Cholesterinkonzentration bewirkte. Um die Ursachen der verminderten hepatischen Cholesterinkonzentrationen nach Gabe von oxidiertem Fett (V3, V4) bzw. Clofibrat (V3) erklären zu können, erfolgte die Untersuchung des SREBP-2 und seiner Zielgene nicht auf Proteinebene, sondern auf Genexpressionsebene, um Aussagen über einen möglichen Einfluss bereits auf genregulatorischer Ebene treffen zu können.

Die verminderten hepatischen Cholesterinkonzentrationen nach Gabe von Clofibrat an trächtige Ratten sind vermutlich das Resultat der verminderten Genexpression des SREBP-2, der offensichtlich die verminderte mRNA-Konzentration der HMG-CoA-Reduktase und somit eine verminderte Cholesterinsynthese bewirkte. Die nach Fütterung von Clofibrat gemessene PPAR α -Aktivierung in der Leber trächtiger Ratten beeinflusste offensichtlich SREBP-2 bereits auf Genexpressionsebene.

Das oxidierte Fett hingegen zeigte in der Leber der trächtigen und laktierenden Ratten keinen Effekt auf die mRNA-Konzentration des SREBP-2 und deren Zielgene. Die unveränderten mRNA-Konzentrationen der HMG-CoA-Reduktase (V3, V4) und des LDL-Rezeptors (V4) in der Leber trächtiger und laktierender Tiere nach Verfütterung oxidierter Fette im Vergleich zum frischen Fett lassen keine Rückschlüsse auf eine verminderte Cholesterinsynthese und eine verminderte Aufnahme des Cholesterins in die Zellen zu. Die Aktivierung des PPAR α nach Verfütterung oxidierter Fette in der Leber trächtiger und laktierender Ratten führte demnach nicht zu einer Verminderung des SREBP-2 auf Genexpressionsebene, wie dies nach Gabe von Clofibrat gezeigt werden konnte. Clofibrat und oxidiertes Fett bewirken zwar mit ähnlicher Intensität eine PPAR α -Aktivierung in der Leber, zeigen aber unterschiedliche Wirkungen auf die Genexpression des Transkriptionsfaktors SREBP-2.

HOLLOWAY und RIVERS (1981) beschrieben den Zusammenhang zwischen verminderten Cholesteringehalten und einer hohen Aktivität der α -Hydroxylase, welche für die Transformation des Cholesterins zu Gallensäuren zuständig ist. Die Expression der cholesterol 7 α -Hydroxylase (CYP7A1) wird dabei vom Liver-X-receptor (LXR) kontrolliert (LEHMANN et al. 1997). Möglicherweise hatte oxidiertes Fett in der Leber trächtiger und laktierender Ratten einen Einfluss auf die Aktivierung des LXR, der mit einem erhöhten Abbau von Cholesterin zu Gallensäuren einhergehen würde und die verminderten hepatischen Cholesterinkonzentrationen erklären würde.

Ein Einfluss oxidierter Fette bzw. Clofibrat auf den Cholesterinstoffwechsel der Föten (V3) blieb aus; es wurde keine Verminderung der hepatischen Cholesterinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Die PPAR α -Aktivierung in der fetalen Leber hatte demnach keinen Einfluss auf den Cholesterinstoffwechsel. Da ein Großteil des im Fötus vorliegenden Cholesterins aus der Eigensynthese des Fötus selbst stammt (JUREVICS et al.

1997, SMITH et al. 1998), liegt vermutlich eine relative Unabhängigkeit vom maternalen Cholesterinstoffwechsel vor.

5. Zusammenfassung

Im Prozess des Erhitzens und Frittierens von Lebensmitteln werden die dafür verwendeten Fette oftmals über eine längere Zeit hohen Temperaturen ausgesetzt und können dadurch einer Oxidation unterliegen. Die Aufnahme oxidierter Fette bewirkt eine Anhäufung von primären und sekundären Lipidperoxydationsprodukten (LPOP) in Geweben von Mensch und Tier. LPOP beeinträchtigen bei Ratten den Vitamin E-Status - aufgrund des während der Lipidperoxydation verstärkten Verbrauchs dieses Antioxidans - sowie den hepatischen Triglycerid- und Cholesterinstoffwechsel. Die Wirkungen oxidierter Fett auf den Lipidstoffwechsel von trächtigen und laktierenden Ratten und deren Nachkommen sind kaum bekannt und daher Gegenstand vorliegender Arbeit. Als Modelltier für die Untersuchungen wurde die Ratte gewählt, da sie im Hinblick auf den Metabolismus und die Reproduktionsvorgänge dem Menschen sehr ähnlich ist.

Die Oxidation der verwendeten Fette erfolgte jeweils bei niedriger Temperatur über einen längeren Zeitraum, da derart oxidierte Fette in früheren Studien und auch in dieser Arbeit keine Wachstumsverzögerungen bei Ratten auslösten und somit als moderat oxidiert gelten. Die Fütterung der weiblichen Ratten mit Diäten mit frischem Fett (Kontrolle) bzw. oxidiertem Fett vor und während Verpaarung, Trächtigkeit und/ oder Laktation nach einem kontrollierten Fütterungssystem gewährleistete eine einheitliche Futteraufnahme. Der Oxidationsgrad der verwendeten Fette wurde anhand der primären (Peroxidzahl, Säurezahl, konjugierte Diene) und sekundären (Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen, Carbonyle, polare Komponenten) LPOP bestimmt. Die oxidierten Fette zeichneten sich vorwiegend durch einen hohen Anteil an primären LPOP aus.

Die pre-bzw. postnatale Ernährung kann langanhaltende Auswirkungen auf das Wachstum und den Stoffwechsel der Nachkommen haben (fetal programming). In **Versuchsansatz 1 (V1)** wurde untersucht, ob die Fütterung oxidierter Fette an weibliche Ratten während der Reproduktion das Wachstum und den Vitamin E-Status der Nachkommen in unterschiedlichen Entwicklungsstufen (Neugeborene, Jungtiere [20Tage], Adulte [10Wochen]) beeinträchtigt bzw. eine hohe Vitamin E-Supplementierung den Vitamin E-Status im Muttertier und Nachkommen verbessern kann. Die Diäten wurden mit 25 mg bzw. 250 mg α -Tocopheroläquivalente/kg Diät angereichert. Die α -Tocopherolkonzentrationen wurden in Leber, Plasma, Milch und Milchdrüse im Muttertier sowie in Leber und Plasma in den Nachkommen ermittelt. Bei den Muttertieren führte eine Supplementierung von 250 mg

α -Tocopheroläquivalenten zum oxidierten Fett zwar zu einer Verbesserung des Vitamin E-Status im Gewebe, aber im Vergleich zu den Geweben der Muttertiere, die frisches Fett erhielten, war die α -Tocopherolkonzentrationen stark vermindert. Eine hohe Vitamin E-Supplementierung kann bei Fütterung oxidiertes Fett dem verstärkten Vitamin E-Katabolismus während der Reproduktion nicht vollständig entgegenwirken. Die hohe Vitamin E-Supplementierung zur maternalen Diät mit frischem bzw. oxidiertem Fett war in der Leber der Neugeborenen, der säugenden Jungtiere und der männlichen adulten Nachkommen anhand der hohen α -Tocopherolkonzentrationen nachweisbar. Verminderte α -Tocopherolkonzentrationen nach maternaler Aufnahme oxidiertes Fett wurden aber bei den Nachkommen nicht festgestellt und ein maßgeblicher Transport der LPOP über die Plazenta bzw. die Milch vom Muttertier zu den Nachkommen ist vermutlich auszuschließen. Zudem fand keine langanhaltende Beeinträchtigung des Wachstums von Geburt bis zum Alter von 10 Wochen der Nachkommen nach maternaler Aufnahme oxidiertes Fett statt.

Bei Mensch, Ratte und Maus liegt am Ende der Trächtigkeit und während der Laktation eine verminderte hepatische Fettsäureoxidation vor. Diese steht am Ende der Trächtigkeit bei Mäusen im Zusammenhang mit einer verminderten mRNA-Konzentration des Transkriptionsfaktors Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor α (PPAR α), einem wichtigen Regulator des Lipidstoffwechsels. Da derartige Untersuchungen bei Ratten bisher nicht vorlagen, wurde in **Versuchsansatz 2 (V2)** eine ad libitum Fütterung mit einer Altromin-Diät bis zum Ende der Trächtigkeit bzw. bis zum Tag 10 oder Tag 20 der Laktation durchgeführt und die mRNA-Konzentrationen des PPAR α und seiner Zielgene (Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1a [CPT1a], Acyl-CoA-Oxidase [ACO], Cytochrom P4504A1 [CYP4A1]) in der Leber bestimmt. Als Kontrolle dienten weibliche, nichtträchtige Ratten. Bei laktierenden Ratten, aber nicht bei trächtigen Ratten, wurden verminderte mRNA-Konzentrationen des PPAR α und seiner Zielgene CPT1a und CYP4A1 ermittelt. Es kann vermutet werden, dass die verminderte Fettsäureoxidation während der Laktation die Folge einer verminderten Expression des PPAR α ist. Diese Downregulation könnte im Zusammenhang mit dem veränderten Hormonhaushalt während der Laktation stehen.

Oxidierte Fette vermindern Triglyceridkonzentrationen in der Leber von Ratten durch Aktivierung des PPAR α mit verstärkter Expression der Gene der Fettsäureoxidation und durch Verminderung der Expression des Transkriptionsfaktors sterol regulatory element-binding protein-1c [SREBP-1c] und der Fettsäuresynthetase [FSS]. Synthetische PPAR α -

Liganden (z. B. Clofibrat) können die Plazenta passieren und in der Leber trächtiger Tiere und deren Föten eine PPAR α -Aktivierung bewirken. In **Versuchsansatz 3 (V3)** wurde untersucht, ob oxidierte Fette auch in trächtigen Ratten und transplazentar in Föten eine Aktivierung des PPAR α und/ oder eine Verminderung der Fettsäuresynthese bewirken können. Als Kontrollsubstanz für eine PPAR α -Aktivierung wurde Clofibrat gefüttert. In der Leber der trächtigen Ratten und deren Föten wurden die mRNA-Konzentrationen des PPAR α und seiner Zielgene (ACO, CPT1a, CYP4A1, Medium-chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase [MCAD], Long-chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase [LCAD]) sowie des SREBP-1c und der FSS bestimmt und die Triglyceridkonzentrationen in Leber und Plasma gemessen.

In vorliegender Arbeit wurde erstmalig eine Aktivierung des PPAR α mit Hochregulierung der PPAR α -Zielgene in der Leber trächtiger Ratten und der Föten durch oxidierte Fette nachgewiesen. Da die hepatische Fettsäuresynthese bei trächtigen Ratten und den Föten durch oxidiertes Fett nicht beeinflusst wurde, resultieren die verminderten Triglyceridkonzentrationen in Leber und Plasma trächtiger Ratten und in der Leber der Föten ausschließlich aus der Aktivierung des PPAR α und der Erhöhung des Fettsäurekatabolismus. Oxidiertes Fett ist somit in der Lage, die Plazenta zu passieren und agiert auch bei trächtigen Ratten und bei Föten - mit ähnlicher Intensität wie das Clofibrat - als PPAR α -Agonist.

Oxidierte Fette führen bei laktierenden Ratten zu signifikant verminderten Triglyceridkonzentrationen in der Milch, deren Ursache bislang unklar war und in **Versuchsansatz 4 (V4)** anhand des Triglyceridstoffwechsels in Leber und Milchdrüse untersucht wurde. Eine mögliche PPAR α -Aktivierung wurde mit Messung der mRNA-Konzentrationen des PPAR α und seiner Zielgene in Leber und Milchdrüse sowie der Triglyceridkonzentrationen in Leber, Plasma und Milch bestimmt. Die hepatische Fettsäuresynthese wurde mit Messung der mRNA-Konzentration von SREBP-1c und FSS untersucht.

Erstmalig konnte in der Leber, aber nicht in der Milchdrüse, laktierender Ratten eine Aktivierung des PPAR α durch oxidierte Fette nachgewiesen werden. Die hepatische Fettsäuresynthese war nur tendenziell vermindert, sodaß die verminderten Triglyceridkonzentrationen in Leber und Plasma hauptsächlich auf eine PPAR α -Aktivierung zurückzuführen sind. Die durch oxidierte Fette verursachten verminderten Triglyceridkonzentrationen in der Milch sind nicht die Folge eines verstärkten Fettsäurekatabolismus in der Milchdrüse. Milchtriglyceride entstammen drei unterschiedlichen Quellen (1. Biosynthese mittelkettiger Fettsäuren (C8-C14) und

Veresterung in der Milchdrüse, 2. Aufnahme langkettiger Fettsäuren (C18-C22) aus Triglyceriden der Lipoproteine mittels Lipoproteinlipase (LPL), 3. Aufnahme freier Fettsäuren (non-esterified-fatty-acids [NEFA]) aus Fettgewebstriglyceriden mittels Fettsäuretransporter aus dem Plasma in die Milchdrüse). Die bekannte Nichtbeeinflussung der Fettsäuresynthese in der Milchdrüse laktierender Ratten durch oxidierte Fette wurde durch die unveränderten mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c und FSS sowie die unveränderte Konzentration an mittelkettigen Fettsäuren in der Milch bestätigt. Die gemessenen verminderten mRNA-Konzentrationen der LPL und der Fettsäuretransporter in der Milchdrüse sowie der Konzentration an langkettigen Fettsäuren in der Milch und an NEFA im Plasma zeigen, dass die verminderten Triglyceridkonzentrationen in der Milch die Folge einer verminderten Aufnahme an Fettsäuren aus Lipoproteinen und an NEFA aus dem Plasma in die Milchdrüse sind. Parallel dazu wurden die mRNA-Konzentrationen der LPL und der Fettsäuretransporter in der Leber ermittelt; hier bewirkte oxidiertes Fett erhöhte mRNA-Konzentrationen. Diese Verschiebung des Transportes der Fettsäuren zur Leber anstelle zur Milchdrüse während der Laktation durch oxidiertes Fett dient offensichtlich dazu, den erhöhten Bedarf an Fettsäuren in der Leber aufgrund der verstärkten Fettsäureoxidation als Folge der PPAR α -Aktivierung zu decken. Eine signifikant verminderte Gewichtsentwicklung der Nachkommen war die Folge der verminderten Milchtriglyceridkonzentrationen. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Gewichtsentwicklung der Nachkommen in V1 und V4 nach maternaler Aufnahme oxidierter Fette könnten mit dem differierenden Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids [PUFA]) in den oxidierten Fetten beider Studien begründet werden, der in V1 um die Hälfte geringer war.

Oxidiertes Fett bewirkt signifikant verminderte Cholesterinkonzentrationen in Leber und Plasma laktierender Ratten. Die Ursache hierfür war bislang unklar und Gegenstand von V3 und V4. Die unveränderten mRNA-Konzentrationen des SREBP-2 (V3, V4) und der Zielgene (Hydroxy-Methyl-Glutaryl-CoA-Reduktase [V3, V4], Low-Density-Lipoprotein-Rezeptors [V4]) lassen aber keine Rückschlüsse auf eine verminderte Cholesterinsynthese und eine verminderte Aufnahme des Cholesterins in die Zellen durch oxidierte Fette zu. Der fetale Cholesterinstoffwechsel blieb durch oxidiertes Fett unbeeinflusst.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die maternale Aufnahme oxidierter Fette während der Reproduktion die physiologischen Prozesse der Trächtigkeit und Laktation beeinträchtigt und Auswirkungen auf das Wachstum und den Metabolismus der Nachkommen haben kann.

6. Summary

During heating and deep-frying of food the used fat is exposed to high temperatures over a long period and can undergo oxidation. The uptake of oxidised fat results in an accumulation of primary and secondary lipid peroxidation products (LPOP) in human and animal tissues. LPOP impair the vitamin E status in rats due to the increased consumption of that antioxidant in the course of the lipid peroxidation and the hepatic triglyceride and cholesterol metabolism. The effects of oxidised fats on vitamin E and lipid metabolism of pregnant and lactating animals and their offspring are not well understood and are the focus of the work presented here. In these investigations rats were used as a model as their metabolism and reproduction processes are very similar to that of humans. Oxidation of used fats was prepared at low temperature over a long period of time as these kinds of fat have not shown growth retardation in rats neither in previous studies nor in these studies. This indicates that the used fat was moderately oxidised. Feeding female rats diets with fresh fat (control) or oxidised fat before and during pairing, pregnancy and/ or lactation with a controlled feeding system ensured an equal diet intake. The oxidation level of the used fat was determined by measuring the primary (peroxide value, acid value, conjugated dienes) and secondary (thiobarbituric acid-reactive substances, carbonyls, polar compounds) LPOP. The oxidised fats used in the experiments were found to have predominantly primary LPOP.

Prenatal and postnatal nutrition can have long-term effects on growth and metabolism of offspring (foetal programming). In **experiment 1** it has been investigated whether feeding oxidised fat to female rats during reproduction impairs the growth and vitamin E status of the offspring at different developing stages (newborns, suckling pups [20 days], adults [10 weeks]), and whether high vitamin E supplementation improves the vitamin E status of dams and offspring. The diets were enriched with either 25 mg or 250 mg α -tocopherol equivalents/kg diet. The α -tocopherol concentrations were measured in liver, plasma, milk and mammary gland in dams and in liver and plasma in the offspring. In dams, supplementation of 250 mg α -tocopherol equivalents to oxidised fats improved the vitamin E status in tissues. However, the α -tocopherol concentrations were strongly reduced in tissues of dams fed the oxidised fat compared to those ones fed with fresh fat. A high vitamin E supplementation can not totally counteract the increased vitamin E catabolism when feeding oxidised fat during reproduction. The high vitamin E supplementation of the maternal diet in both groups fed with fresh and oxidised fat was still seen in the liver of newborns, suckling

pups and male adults by high α -tocopherol concentrations. However, decreased α -tocopherol concentrations after feeding oxidised fat to dams were not found in the offspring and a transport of LPOP from dams to the offspring neither along the placenta nor via the milk can be probably excluded. Also, there was no long-term impairment of the growth of the offspring from birth until an age of 10 weeks after feeding oxidised fats to dams.

At the end of pregnancy and during lactation the hepatic fatty acid oxidation decreases in humans and rats. In mice the decreased fatty acid oxidation is correlated with a decreased mRNA concentration of the transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), an important regulator of lipid metabolism. Because such investigations have not been carried out in rats, in **experiment 2** female rats were fed ad libitum a commercial diet until the end of pregnancy or until day 10 or 20 of lactation, and the mRNA concentrations of PPAR α and its target genes (carnitine-palmitoyltransferase1a [CPT1a], acyl-CoA oxidase [ACO], cytochrome P450 4A1 [CYP4A1]) were measured in the livers. Female virgin rats were used as control. In lactating rats, but not in pregnant rats, decreased mRNA concentrations of PPAR α and its target genes CPT1a and CYP4A1 were found. Thus, the decreased fatty acid oxidation during lactation could be a consequence of a decreased expression of PPAR α . This down regulation could be due to changes in hormone metabolism during lactation.

Oxidised fat reduces triglyceride concentrations in the liver of rats. Reasons for this are a PPAR α -activation with an increased expression of genes of fatty acid oxidation and a decreased expression of the transcription factor sterol regulatory element-binding protein-1c [SREBP-1c] and the gene fatty acid synthase [FAS]. Synthetic PPAR α -ligands (clofibrate) can pass through the placenta and cause PPAR α -activation in the liver of pregnant rats and their foetuses. In **experiment 3** it has been investigated whether oxidised fat causes PPAR α -activation, and/ or a decrease in fatty acid synthesis in pregnant rats and their foetuses. Clofibrate was fed as a control for PPAR α -activation. In the liver of pregnant rats and their foetuses the mRNA concentrations of PPAR α and its target genes (ACO, CPT1a, CYP4A1, medium-chain acyl-CoA dehydrogenase [MCAD], long-chain acyl-CoA dehydrogenase [LCAD]) and SREBP-1c and FAS have been measured. In addition, the triglyceride concentrations in liver and plasma have also been determined.

It was shown for the first time, that oxidised fat caused PPAR α -activation with up-regulation of the PPAR α -target genes in the liver of pregnant rats and their foetuses. Because fatty acid synthesis was not influenced by oxidised fat in the liver of pregnant rats and their foetuses, the reduced triglyceride concentrations in liver and plasma of pregnant rats and in liver of fetuses seem to be only a result of PPAR α -activation and increase of fatty acid catabolism. In conclusion, oxidised fat is able to pass through the placenta and can act as a PPAR α -agonist, with a similar intensity as clofibrate.

Oxidised fat reduces significant triglyceride concentrations in milk of lactating rats. The reason for this effect has not been known yet and thus in **experiment 4** the triglyceride metabolism was investigated in liver and mammary gland of lactating rats after feeding oxidised fat. In order to proof PPAR α -activation, in the liver and mammary gland the mRNA concentrations of PPAR α and its target genes have been measured in both organs. Furthermore, the concentrations of triglycerides in liver, plasma and milk were determined. Hepatic fatty acid synthesis was determined by measuring mRNA concentrations of SREBP-1c and FAS.

It was shown for the first time that oxidised fat cause PPAR α -activation in the liver, but not in the mammary gland of lactating rats. Hepatic fatty acid synthesis only tended to decrease, and leads to the conclusion that the decreased triglyceride concentrations in the liver and plasma are predominantly a result of the hepatic PPAR α -activation. The decreased triglyceride concentrations in the milk after feeding oxidised fat are not a result of an increased fatty acid catabolism in mammary gland.

Milk triglycerides come from three different sources: 1. biosynthesis of medium-chain fatty acids (C8-C14) and their esterification in mammary gland, 2. uptake of long-chain fatty acids (C18-C22) from triglycerides from lipoproteins through lipoprotein lipase [LPL], 3. uptake of non-esterified-fatty-acids [NEFA] from triglycerides from adipose tissue through fatty acid transporters from plasma into the mammary gland. It is already known that fatty acid synthesis in the mammary gland from lactating rats after feeding oxidised fat is not influenced. In the present study, the unchanged mRNA concentrations of SREBP-1c and FAS and the unchanged concentrations of medium-chain fatty acids in the milk confirm the previous study. Decreased mRNA concentrations of LPL and fatty acid transporters in mammary gland and decreased concentrations of long-chain fatty acids in milk and of NEFA in plasma have been measured. These results indicate that decreased triglyceride concentrations in the milk after feeding oxidised fat are due to reduced uptake of fatty acids

from lipoproteins and of NEFA from plasma by mammary gland. Parallel to these investigations, the mRNA concentrations of LPL and fatty acid transporters in the liver have been determined; here oxidised fat caused an increase of mRNA concentrations of LPL and fatty acid transporters. This adjustment of the transport of fatty acids to the liver instead to the mammary gland during lactation after feeding oxidised fat might be due to the enhanced demand of fatty acids in the liver caused by the PPAR α -activation.

The reduced concentrations of milk triglycerides caused decreased body weights of suckling pups. The different effects of maternal oxidised fat on the body weight of the offspring in experiments 1 and 4 could be the result of a different content of PUFA in the prepared fats. The content of PUFA was much lower in experiment 1, compare to experiment 4.

Oxidised fat reduces significant cholesterol concentrations in liver and plasma of lactating rats. The reason for this effect was unknown and thus it was the object of experiments 3 and 4. In the livers of pregnant and lactating rats, the unchanged mRNA concentrations of SREBP-2 and its target genes hydroxy-ethyl-glutaryl-CoA-reductase (experiment 3,4) and low-density-lipoprotein-receptor (experiment 4) do not indicate reduced cholesterol synthesis or reduced uptake of cholesterol into cells. Fetal metabolism was not influenced by oxidised fat.

In conclusion, the results show that maternal uptake of oxidised fat can impair the physiologic processes in pregnancy and lactation and can have long-term effects on growth and metabolism in offspring.

Literaturverzeichnis

ABUMRAD, NA.; EL-MAGHRABI, MR.; AMRI, EZ.; LOPEZ E., GRIMALDI, PA. (1993) Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD 36. *J Biol Chem* 268: 17665-17668.

ADDIS, PB. (1986) Occurrence of lipid oxidation products in foods. *Food Chem Toxicol* 24: 1021-1030.

AGIUS, L.; BLACKSHEAR, PJ.; WILLIAMSON, DH. (1981) Rates of triacylglycerol entry into the circulation in the lactating rat. *Biochem J* 196: 637-640.

AGIUS, L.; WILLIAMSON, DH. (1980) Lipogenesis in interscapular brown adipose tissue of virgin, pregnant and lactating rats. The effects of intragastric feeding. *Biochem J* 190: 477-480.

ALEXANDER, JC. (1986) Heated and oxidized fats. *Prog Clin Biol Res* 222: 185-209.

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.

ALTEN, HE.; GROSCURTH, P. (1975) The postnatal development of the ovary in the "nude" mouse. *Anat Embryol* 148: 35-46.

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. *Ann Nutr Metab* 46: 268-275.

ANTONENKOV, VD.; SORMUNEN, RT.; OHLMEIER, S.; AMERY, L.; FRANSEN, M.; MANNAERTS, GP.; HILTUNEN, JK. (2006) Localization of a portion of the liver isoform of fatty-acid-binding protein (L-FABP) to peroxisomes. *Biochem J* 394: 475-484.

AOYAMA, T.; HARDWICK, JP.; IMAOKA, S.; FUNAE, Y.; GELBOIN, HV.; GONZALEZ, FJ. (1990) Clofibrate-induced rat hepatic P450s IVA1 and IVA3 catalyze the ω - and (ω -1)-hydroxylation of fatty acids and the ω -hydroxylation of prostaglandins E₁ and F_{2 α} . *J Lipid Res* 31: 1477-1482.

ASSUMPCAO, RP.; SANTOS, FD.; SETTA, CL.; BARRETO, GF.; MATTA, IEA.; ESTADELLA, D.; AZEREDO, VB.; TAVARES DO CARMO, MG. (2002) Trans fatty acids in maternal diet may impair lipid biosynthesis in mammary gland of lactating rats. *Ann Nutr Metab* 46: 169-175.

BALZ, MK.; SCHULTE, E.; THIER, H.P. (1993) Simultaneous determination of α -tocopheryl acetate, tocopherols and tocotrienols by HPLC with fluorescence detection in foods. *Fat Sci Technol* 95: 215-220.

BARTLETT, K.; EATON, S. (2004) Minireview. Mitochondrial β -oxidation. *Eur J Biochem* 271 : 462-469.

- BAUMANN, DE.; CURRIE, WB. (1980) Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation : a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J Dairy Sci* 63: 1514-1529.
- BENTLEY, P.; CALDER, I. ; ELCOMBE, C.; GRASSO, P.; STRINGER, D.; WIEGAND, H-J. (1993) Hepatic peroxisome proliferation in rodents and its significance for humans. *Food Chem Toxicol* 31: 857-907.
- BERGER, J.; MOLLER, DE. (2002) The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 53: 409-435.
- BJORNEBOE, A.; BJORNEBOE, GE.; DREVON, CA. (1990) Absorption, transport and distribution of vitamin E. *J Nutr* 120: 233-242.
- BLANC, P.; REVOL, A.; PACHECO, H. (1992) Chronical ingestion of oxidized oil in the rat : effect on lipid composition and on cytidyl transferase activity in various tissues. *Nutr Res* 12: 833-844.
- BRAISSANT, O.; FOUFELLE, F.; SCOTTO, C. ; DAUCA, 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.
- BRANDSCH, C.; EDER, K. (2004) Effects of peroxidation products in thermoxidised dietary oil in female rats during rearing, pregnancy and lactation on their reproductive performance and the antioxidative status of their offspring. *Br J Nutr* 92: 267-275.
- BRANDSCH, C.; NASS, N.; EDER, K. (2004) A thermally oxidized dietary oil does not lower the activities of lipogenic enzymes in mammary glands of lactating rats but reduces the milk triglyceride concentration. *J Nutr* 134: 631-636.
- BROWN, MS.; GOLDSTEIN, JL. (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89: 331-340.
- BUNYAN, J.; GREEN, J.; MURRELL, EA.; DIPLOCK, AT.; CAWTHORNE, MA. (1968) On postulated peroxidation of unsaturated lipids in the tissues of vitamin-deficient rats. *Br J Nutr* 22: 97-110.
- BURTON, GW. (1994) Vitamin E: molecular and biological function. *Proc Nutr Soc* 53: 251-262.
- BUTTE, W. (1983) Rapid method for the determination of fatty acid profiles from fats and oils using trimethylsulfonium hydroxide for transesterification. *J Chromatogr* 261: 142-145.
- CARLSSON, L.; LINDEN, D.; JALOULI, M.; OSCARSSON, J. (2001) Effects of fatty acids and growth hormone on liver fatty acid binding protein and PPAR α in rat liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E772-E781.
- CATALAN, RE.; CASTILLON, MP.; PRIEGO, JG. (1979) Effect of clofibrate on the phospholipid biosynthesis in rat liver. *Experientia* 35: 859-860.

CHANG, SS.; PETERSON, RJ.; HO, CT. (1978) Chemical reactions involved in the deep-fat frying of foods. *J Am Oil Chem Soc* 55: 718-727.

CHAO, PM.; CHAO, CY.; LIN, FJ.; HUANG, CJ. (2001) Oxidized frying oil up-regulates hepatic acyl-CoA oxidase and cytochrome P450 4A1 genes in rats and activates PPAR α . *J Nutr* 131: 3166-3174.

CHAO, PM.; HSU, SC.; LIN, FJ.; LI, YJ.; HUANG, CJ. (2004) The up-regulation of hepatic acyl-CoA oxidase and cytochrome P₄₅₀ 4A1 mRNA expression by dietary oxidized frying oil is comparable between male and female rats. *Lipids* 39: 233-238.

CHAO, PM.; YANG, MF.; TSENG, YN.; CHANG, KM.; LU, KS.; HUANG, CJ. (2005) Peroxisome proliferation in liver of rats fed oxidized frying oil. *J Nutr Sci Vitaminol* 51: 361-368.

CHEESEMAN, KH.; COLLINS, M.; MADDIX, S.; MILIA, A.; PROUDFOOT, K.; SLATER, TF.; BURTON, GW.; WEBB, A.; INGOLD, KU. (1986) Lipid peroxidation in regenerating rat liver. *FEBS Lett* 209: 191-196.

CHISOLM, GM.; STEINBERG, D. (2000) The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 28: 1815-1826.

COHN, JS. (2002) Oxidized fat in the diet, postprandial lipaemia and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 13: 19-24.

COORS, U. (1991) Anwendung des Tocopherolmusters zur Erkennung von Fett- und Ölmischungen. *Fat Sci Technol* 93: 519-526.

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.

COSGROVE, JP.; CHURCH, DF.; PRYOR, WA. (1987) The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 22: 299-304.

COWIE, AT.; FORSYTH, IA.; HART, IC. (1980) Hormonal control of lactation. Berlin: Springer-Verlag.

CRAWFORD, MA.; HASSAM, AG.; WILLIAMS, G. (1976) Essential fatty acids and fetal brain growth. *Lancet* 1: 452-453.

D'AQUINO, M.; DI FELICE, M.; TOMASSI, G. (1985) Vitamin E status and effects of thermoxidized fats on structural alpha-tocopherol and fatty acid of different rat tissues. *Nutr Rep Int* 32: 1179-1186.

DEBIER, C.; LARONDELLE, Y. (2005) Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *Br J Nutr* 93: 153-174.

DESVERGNE, B.; WAHLI, W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20: 649-688.

DGF-Einheitmethode C-V 2 (81), Deutsche Einheitmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen. Band 1,2. Auflage (2001) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.

DIETSCHY, JM. (1997) Theoretical considerations of what regulates low-density-lipoprotein and high-density-lipoprotein cholesterol. *Am J Clin Nutr* 65: 1581S-1589S.

DIETSCHY, JM. (1984) Regulation of cholesterol metabolism in man and in other species. *Klin Wochenschr.* 62: 338-345.

DOBARGANES, MC.; VELASCO, J.; DIEFFENBACHER, A. (2000) Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols, and diacylglycerols in oils and fats. *Pure Appl Chem* 72: 1563-1575.

DREYER, C.; KREY, G.; KELLER, H.; GIVEL, F.; HELFTENBEIN, G.; WAHLI, W. (1992) Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68: 879-887.

EDER, K. (1999) The effects of a dietary oxidized oil on lipid metabolism in rats. *Lipids* 34: 717-725.

EDER, K.; KELLER, U.; BRANDSCH, C. (2004) Effects of a dietary oxidized fat on cholesterol in plasma and lipoproteins and the susceptibility of low-density lipoproteins to lipid peroxidation in guinea pigs fed diets with different concentrations of vitamin E and C. *Int J Vitam Nutr Res* 74: 11-20.

EDER, K.; KELLER, U.; HIRCHE, F.; BRANDSCH, C. (2003a) Thermally oxidized dietary fats increase the susceptibility of low density lipoproteins to lipid peroxidation in rats but not their uptake by macrophages. *J Nutr* 133: 2830-2837.

EDER, K.; KIRCHGESSNER, M. (1994) Dietary fat influences the effect of zinc deficiency on liver lipids and fatty acids in rats force-fed equal quantities of diet. *J Nutr* 124: 1917-1926.

EDER, K.; KIRCHGESSNER, M. (1998) 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.; SKUFCA, P.; BRANDSCH, C. (2002) Thermally oxidized dietary fats increase plasma thyroxine concentrations in rats irrespective of the vitamin E and selenium supply. *J Nutr* 132: 1275-1281.

EDER, K.; STANGL, GI. (2000) Plasma thyroxine and cholesterol concentrations of miniature pigs are influenced by thermally oxidized dietary lipids. *J Nutr* 130: 116-121.

EDER, K.; SUELZLE, A.; SKUFCA, P.; BRANDSCH, C.; HIRCHE, F. (2003b) Effects of dietary thermoxidized fats on expression and activities of hepatic lipogenic enzymes in rats. *Lipids* 38: 31-38.

ENDO, Y.; LI, CM.; TARIRI-ENDO, M.; FUJIMOTO, K. (2001) A modified method for the estimation of total carbonyl compounds in heated and frying oils using 2-propanol as a solvent. *J Am Oil Chem Soc* 78: 1021-1024.

ENGBERG, RM.; LAURIDSEN, C.; JENSEN, SK.; JAKOBSEN, K. (1996) Inclusion of oxidized vegetable oil in broiler diets. Its influence on nutrient balance and on the antioxidative status of broilers. *Poult Sci* 75: 1003-1011.

EROL, E.; KUMAR, LS.; CLINE, GW.; SHULMAN, GI.; KELLY, DP.; BINAS, B. (2004) Liver fatty acid-binding protein is required for high rates of hepatic fatty acid oxidation but not for the action of PPAR- α in fasting mice. *FASEB J.* 18: 347-349.

ESCALADA, J.; SANCHEZ-FRANCO, F.; VELASCO, B.; CACICEDO, L. (1997) Regulation of growth hormone (GH) gene expression and secretion during pregnancy and lactation in the rat: role of insulin-like growth factor-I, somatostatin, and GH-releasing hormone. *Endocrinology* 138: 3435-3443.

ESTERBAUER, H. (1993) Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr* 57: 779S-785S, discussion 785S-786S.

FAHL, WE.; LALWANI, ND.; REDDY, MK.; REDDY, JK. (1983) Induction of peroxisomal enzymes in livers of neonatal rats exposed to lactating mothers treated with hypolipidaemic drugs. *Biochem J* 210: 875-883.

FAN, C-Y.; 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-conenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem* 271: 24698-24710.

FEINGOLD, IB.; COLBY, HD. (1992) Sex differences in adrenal and hepatic alpha-tocopherol concentrations in rats. *Pharmacology* 44: 113-116.

FLORES-MORALES, A. STAHLBERG, N. ; TOLLET-EGNELL, P. ; LUNDEBERG, J.; MALEK, RL., QUACKENBUSH, J.; LEE, NH.; NORSTEDT, G. (2001) Microarray analysis of the in vivo effects of hypophysectomy and growth hormone treatment on gene expression in the rat. *Endocrinology* 142: 3163-3176.

FRANKEL, E. SMITH, L.; HAMBLIN, C.; CREVELING, R.; CLIFFORD, A. (1984) Occurrence of cyclic fatty acid isomers in frying fats used for fast foods. *J Am Oil Chem Soc* 61: 87-90.

GIBBONS, GF.; ISLAM, K.; PEASE, RJ. (2000) Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim Biophys Acta* 1483: 37-57.

GIMBLE, JM.; PIGHETTI, GM.; LERNER, MR.; WU, X.; LIGHTFOOT, SA.; BRACKETT, DJ.; DARCY, K.; HOLLINGSWORTH, AB. (1998) Expression of peroxisome proliferator activated receptor mRNA in normal and tumorigenic rodent mammary glands. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 813-817.

GIRARD, J.; FERRE, P.; PEGORIER, JP.; DUEE, PH. (1992) Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. *Physiol Rev* 72: 507-562.

GIROTTI, AW. (1985) Mechanisms of lipid peroxidation. *J Free Radic Biol Med* 1: 87-95.

GOETTLICHER, M.; WIDMARK, E.; LI, Q.; GUSTAFSSON, JA. (1992) Fatty acids activate a chimera of the clofibrilic acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4653-4657.

GONZALES, FJ.; PETERS, JM.; CATTLEY, RC. (1998) Mechanism of action of the nongenotoxic peroxisome proliferators: role of the peroxisome proliferator-activator receptor alpha. *J Natl Cancer Inst* 90: 1702-1709.

GOTTO, AM.; POWNALL, HP.; HAVEL, RJ. (1986) Introduction to the plasma lipoproteins. In: *Methods in Enzymology* 3-41. New York:Academic Press, Inc.

GOWER, BA.; NAGY, TR.; BLAYLOCK, ML.; WANG, C.; NYMAN, L. (2002) Estradiol may limit lipid oxidation via CPT1 expression and hormonal mechanisms. *Obes Res* 10: 167-172.

GREEN, MH.; DOHNER, EL.; GREEN, JB. (1981) Influence of dietary fat and cholesterol on milk lipids and on cholesterol metabolism in the rats. *J Nutr* 111: 276-278.

GRIMBERT, S.; FROMENTY, B.; FISCH, C.; LETTERON, P.; BERSON, A.; DURAND-SCHNEIDER, AM.; FELDMANN, G.; PESSAYRE, D. (1993) Decreased mitochondrial oxidation of fatty acids in pregnant mice: possible relevance to development of acute fatty liver of pregnancy. *Hepatology* 17: 628-637.

GRUM, DE.; HANSEN, LR.; DRACKLEY, JK. (1994) Peroxisomal beta-oxidation of fatty acids in bovine and rat liver. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 109: 281-292.

GUERRE-MILLO, M.; GERVOIS, P.; RASPE, E.; MADSEN, L.; POULAIN, P.; DERUDAS, B.; HERBERT, J-M.; WINEGAR, DA.; WILLSON, TM.; FRUCHART, J-C.; BERGE, RK.; STAELS, B. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor α activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. *J Biol Chem* 275: 16638-16642.

HAHN, P. (1984) Effect of litter size on plasma cholesterol and insulin and some liver and adipose tissue enzymes in adult rodents. *J Nutr* 114: 1231-1234.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 57: 715S-724S; discussion 724S-725S.

HAMOSH, M.; CLARY, TR.; CHERNICK, SS.; SCOW, RO. (1970) Lipoprotein lipase activity of adipose and mammary tissue and plasma triglyceride in pregnant and lactating rats. *Biochem Biophys Acta* 210: 473-482.

HANEFELD, M.; KEMMER, C.; KADNER, E. (1983) Relationship between morphological changes and lipid lowering action of p-chlorophenoxyisobutyric acid (CPIB) on hepatic mitochondria and peroxisomes in man. *Atherosclerosis* 46: 239-246.

HARA, A.; RADIN, NS. (1978) Lipid extraction of tissues with a low toxicity solvent. *Anal Biochem* 90: 420-426.

HAY, WW JR. (1994) Placental transport of nutrients to the fetus. *Horm Res* 42: 215-222.

- HERRERA, E. (2000) Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur J Clin Nutr* 54: S47-51.
- HERRERA, E. (2002) Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine* 19: 43-55.
- HERRERA, E.; AMUSQUIVAR, E. (2000) Lipid metabolism in the fetus and the newborn. *Diabetes Metab Res Rev* 16: 202-210.
- HERRERA, E.; AMUSQUIVAR, E.; LOPEZ-SOLDADO, I.; ORTEGA, H. (2006) Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm Res* 65: 59-64.
- HERRERA, E.; BONET, B.; LASUNCION, MA. (1998) Maternal-fetal transfer of lipid metabolites. In *Fetal and neonatal physiology* (Eds) Polin RA & Fox WW: 447-458. Philadelphia: W.B. Saunders Co.
- HERRERA, E.; LASUNCION, MA.; GOMEZ-CORONADO, D.; ARANDA, P.; LOPEZ-LUNA, P.; MAIER, I. (1988) Role of lipoprotein lipase activity on lipoprotein metabolism and the fate of circulating triglycerides in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 158: 1575-1583.
- HERRERA, E.; LASUNCION, MA.; PALACIN, M.; ZORZANO, A.; BONET, B. (1991) Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freinkel era. *Diabetes* 40: 83-88.
- HESS, R.; STAUBLI, W.; REISS, W. (1965) Nature of the hepatomegalic effect produced by ethyl-chlorophenoxyisobutyrate in the rat. *Nature* 208: 856-858.
- 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 α : role in rodent liver cancer and species differences. *J Mol Endocrinol* 22: 1-8.
- HOLLOWAY, DE.; RIVERS, JM. (1981) Influence of chronic ascorbic acid deficiency acid intake on bile acid metabolism and bile composition in the guinea pigs. *J Nutr* 112: 416-425.
- HORTON, JD. (2002) Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans* 30: 1091-1095.
- HORTON, JD.; GOLDSTEIN, JL.; BROWN, MS. (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109: 1125-1131.
- INDART, A.; VIANA, M.; GROOTVELD, MC.; SILWOOD, CJ.; SANCHEZ-VERA, I.; BONET, B. (2002) Teratogenic actions of thermally-stressed culinary oils in rats. *Free Radic Res* 36: 1051-1058.
- ISSEMANN, I.; GREEN, S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 645-650.

- JALOULI, M.; CARLSSON, L.; AMEEN, C.; LINDEN, D.; LJUNGBERG, A.; MICHALIK, L.; EDEN, S.; WAHLI, W.; OSCARSSON, J. (2003) Sex difference in hepatic peroxisome proliferator-activated receptor α expression: influence of pituitary and gonadal hormones. *Endocrinology* 144: 101-109.
- JONES, CT. (1982) The development of the metabolism in the fetal liver. In: *Biochemical development of the fetus and neonate*, Jones CT (eds). Elsevier: Amsterdam 249.
- JUREVICS, HA.; KIDWAI, FZ.; MORELL, P. (1997) Sources of cholesterol during development of the rat fetus and fetal organs. *J Lipid Res* 38: 723-733.
- KAIKAUS, RM.; CHAN, WK.; ORTIZ DE MONTELLANO, PR.; BASS, NM. (1993) Mechanism of regulation of liver fatty acid-binding protein. *Mol Cell Biochem* 123: 93-100.
- KANEDA, T.; SAKAI, H.; ISHII, S. (1955) Nutritive value or toxicity of highly unsaturated fatty acids. *J Biochem* 42: 561-573.
- KAYDEN, HJ.; TRABER, MG. (1993) Absorption, lipoprotein transport and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *J Lipid Res* 34: 343-358.
- KERSTEN, S.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. (2000) Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405: 421-424.
- KLIEWER, SA.; XU, HE.; LAMBERT, MH.; WILLSON, TM. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res* 56: 239-263.
- KÖNIG, B.; EDER, K. (2006) Differential action of 13-HPODE on PPAR α downstream genes in rat Fao and human HepG2 hepatoma cell lines. *J Nutr Biochem* 17: 410-418.
- KÖNIG, B.; KOCH, A.; SPIELMANN, J.; HILGENFELD, C.; STANGL, GI.; EDER, K. (2007) Activation of PPAR α lowers synthesis and concentration of cholesterol by reduction of nuclear SREBP-2. *Biochem Pharmacol* 73: 574-585.
- KOROTKOVA, M.; GABRIELSSON, BG.; HOLMÄNG, A.; LARSSON, BM.; HANSON, LA.; STRANDVIK, B. (2005) Gender-related long-term effects in adult rats by perinatal dietary ratio of n-6/n-3 fatty acids. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R575-R579.
- KUBOW, S. (1992) Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radic Biol Med* 12: 63-81.
- KUNAU, WH.; DOMMES, V.; SCHULZ, H. (1995) β -oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res* 34: 267-342.
- KYRKLUND, T.; MEIJER, J. (1994) Lipid composition of liver peroxisomes isolated from untreated and clofibrate-treated mice and rats. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 109: 665-673.

LAZAROW, PB.; DE DUVE, C. (1976) A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 2043-2046.

LE, WP.; ABBAS, AS.; SPRECHER, H.; VOCKLEY, J.; SCHULZ, H. (2000) Long-chain acyl-CoA dehydrogenase is a key enzyme in the mitochondrial beta-oxidation of unsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1485: 121-128.

LEE, SH.; BLAIR, IA. (2001) Oxidative DNA damage and cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 11: 148-155.

LEE, BE.; HONG, YC.; LEE, KH.; KIM, YJ.; KIM, WK.; CHANG, NS.; PARK, EA.; PARK, HS. HANN, HJ. (2004) Influence of maternal serum levels of vitamins C and E during the second trimester on birth weight and length. *Eur J Clin Nutr* 58: 1365-1371.

LEHMANN, JM. ; KLIEWER, ST. ; MOORE, LB.; SMITH-OLIVER, TA.; OLIVER, BB.; SU, JL.; SUNDSETH, SS.; WINEGAR, DA.; BLANCHARD, DE.; SPENCER, TA., WILLSON, TM. (1997) Activation of nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone pathway. *J Biol Chem* 272: 3137-3140.

LETURQUE A.; BURNOL, AF.; FERRE', P.; GIRARD, J. (1984) Pregnancy-induced insulin resistance in the rat: assessment by glucose clamp technique. *Am J Physiol* 246: E25-E31.

LIU, JF.; HUANG, CJ. (1996) Dietary oxidized frying oil enhances tissue alpha-tocopherol depletion and radioisotope tracer excretion in vitamin E-deficient rats. *J Nutr* 126: 2227-2235.

LIU, JF.; HUANG, CJ. (1995) Tissue α -tocopherol retention in male rats is compromised by feeding diets containing oxidized frying oil. *J Nutr* 125: 3071-3080.

LUCAS, A. (1991) Programming by early nutrition in man. In: Bock GR, Whelan J, eds. *The childhood environment and adult disease*. Chichester, United Kingdom: John Wiley and Sons 38-55.

LUCAS, A.; BAKER, BA.; DESAI, M.; HALES, CN. (1996) Nutrition in pregnant or lactating rats programs lipid metabolism in the offspring. *Br J Nutr* 76: 605-612.

LUCI, S.; GIEMSA, B.; KLUGE, H.; EDER, K. (2007) Clofibrate causes an up-regulation of PPAR α target genes but does not alter expression of SREBP target genes in liver and adipose tissue of pigs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Epub ahead of print.

MADON, RJ.; ENSOR, DM.; KNIGHTY, CH.; FLINT, DJ. (1986) Effects of an antiserum to rat growth hormone on lactation in the rat. *J Endocrinol* 111: 117-123.

MARTIN, MM.; HURLEY LS. (1977) Effect of large amounts of vitamin E during pregnancy and lactation. *Am J Clin Nutr* 30: 1629-1637.

MARTIN, G.; SCHOONJANS, K.; LEFEBVRE, A-M.; STAELS, B.; AUWERX, J. (1997) Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and Acyl-CoA-Synthetase genes by PPAR α and PPAR γ Activators. *J Biol Chem* 272: 28210-28217.

- MARTIN-HIDALGO, A.; HOLM, C.; BELFRAGE, P.; SCHOTZ, MC.; HERRERA, E. (1994) Lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activity and mRNA in rat adipose tissue during pregnancy. *Am J Physiol* 266: E930-E935.
- McARDLE, HJ.; ANDERSEN, HS.; JONES, H.; GAMBLING, L. (2006) Fetal programming: causes and consequences as revealed by studies of dietary manipulation in rats – a review. *Placenta* 27 Suppl A: S56-S60.
- McGARRY, JD.; BROWN, NF. (1997) Review. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 244: 1-14.
- MESIA-VELA, S.; SANCHEZ, RI.; REUHL, KR.; CONNEY, AH.; KAUFFMAN, FC. (2004) Dietary clofibrate inhibits induction of hepatic antioxidant enzymes by chronic estradiol in female ACI rats. *Toxicology* 200: 103-111.
- MEYDANI, M. (1995) Vitamin E. *Lancet* 345: 170-175.
- MISEREZ, AR. (2001) Die molekulare Basis der intra- und extrazellulären Cholesterin-Homöostase. *Forum Med Suisse* 12: 320-324.
- MUGGLI, R. (1994) Vitamin E-Bedarf bei Zufuhr von Polyenfettsäuren. *Fat Sci Technol* 96: 17-19.
- MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24, 17-27.
- NEVILLE, MC.; ALLEN, JC.; WATTERS, SC. eds. (1980) Lactation: physiology, nutrition and breast feeding. Plenum Press, New York, NY.
- NEVILLE, MC.; PICCIANO, MF. (1997) Regulation of milk lipid secretion and composition. *Ann Rev Nutr* 17: 159-184.
- NIKI, E. (1987) Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 44: 227-253.
- NWANGUMA, BC.; ACHEBE, AC.; EZEANYIKA, LU.; EZE, LC. (1999) Toxicity of oxidized fats II: tissue levels of lipid peroxides in rats fed a thermally oxidized corn oil diet. *Food Chem Toxicol* 37: 413-416.
- OLLER DO NASCIMENTO, CM.; WILLIAMSON, DH. (1986) Evidence for conservation of dietary lipid in the rat during lactation and the immediate period after removal of the litter. *Biochem J* 239: 233-236.
- OTWAY, S.; ROBINSON, DS. (1968) The significance of changes in tissue clearing-factor lipase activity in relation to the lipaemia of pregnancy. *Biochem J* 106: 677-682.
- PALINSKI, W.; D'ARMIENTO, FP.; WITZTUM, JL.; DE NIGRIS, F.; CASANADA, F.; CONDORELLI, M.; SILVESTRE, M.; NAPOLI, C. (2001). Maternal hypercholesterolemia and treatment during pregnancy influence the long-term progression of atherosclerosis in offspring of rabbits. *Circ Res* 89: 991-996.

- PALMER, CN.; HSU, MH.; GRIFFIN, KJ.; RAUCY, JL.; JOHNSON, EF. (1998) Peroxisome proliferator activated receptor- α expression in human liver. *Mol Pharmacol* 53: 14-22.
- PAZAK, HE.; SCHOLZ, RW. (1996) Effects of maternal vitamin E and selenium status during the perinatal period on age-related changes in tissue concentration of vitamin E in rat pups. *Int J Vitam Nutr Res* 66: 126-133.
- PENNACCHIOTTI, GL.; ROTSTEIN, NP.; AVELDANO, MI. (1996) Effects of clofibrate on lipids and fatty acids of mouse liver. *Lipids* 31: 179-185.
- PETERS, JM.; CHEUNG, C.; GONZALEZ, FJ. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor- α and liver cancer: where do we stand? *J Mol Med* 83: 774-785.
- PFAFFL, MW. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
- PORTER, NA. (1984) Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 105: 273-282.
- RECKNAGEL, RO.; GLENDE, EA JR. (1984) Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods Enzymol* 105: 331-337.
- REDDY, JK.; AZARNOFF, DL.; HIGNITE, CF. (1980) Hypolipidaemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogens. *Nature* 283: 397-398.
- REDDY, JK.; KRISHNAKANTHA, T. (1975) Hepatic peroxisome proliferation: induction by two novel compounds structurally unrelated to clofibrate. *Science* 190: 787-789.
- REDDY, JK.; RAO, MS. (1992) Peroxisome proliferation and hepatocarcinogenesis. *IARC Sci Publ* (116): 225-235.
- 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.
- RINGSEIS, R.; SAAL, D.; MÜLLER, A.; STEINHART, H.; EDER, K. (2004) Dietary conjugated linoleic acids lower the triacylglycerol concentration in the milk of lactating rats and impair the growth and increase the mortality of their suckling pups. *J Nutr* 134: 3327-3334.
- RODRIGUEZ-CRUZ, M.; TOVAR, AR.; PALACIOS-GONZALEZ, B.; DEL PRADO, M.; TORRES, N. (2006) Synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in lactating mammary gland: role of $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturases, SREBP-1, PPAR α , and PGC-1. *J Lipid Res* 47: 553-560.
- ROGERS, MS.; MONGELLI, M.; TSANG, KH.; WANG, CC. (1999) Fetal and maternal levels of lipid peroxides in term pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 78: 120-124.

ROLF, B.; OUDENAMPSEN-KRÜGER, E.; BÖRCHERS, T.; FAERGEMAN, NJ.; KNUDSEN, J.; LEZIUS, A.; SPENER, F. (1995) Analysis of the ligand binding properties of recombinant bovine liver type fatty acid binding protein. *Biochim Biophys Acta* 1259: 245-253.

ROSS, A.; DAVILLA, M.; CLEARLY, MP. (1985) Fatty acids and retinyl esters of rat milk. Effects of diet and duration of lactation. *J Nutr* 115: 1488-1497.

ROUSER, G.; FKEISCHER, S.; YAMAMOTO, A. (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5: 494-496.

SAIKI, RK.; BUGAWAN, TL.; HORN, GT.; MULLIS, KB.; ERLICH, HA. (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166.

SCHAFFER, JE.; LODISH, HF. (1994) Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 79: 427-436.

SCHOONJANS, K.; STAELS, B.; AUWERK, J. (1996) Role of the peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res* 37: 907-925.

SCOW, R.; CHERNICK, S.; FLECK, R. (1977) Lipoprotein lipase and uptake of triacylglycerol cholesterol and phosphatidyl choline from chylomicrons by mammary and adipose tissue of lactating rats in vivo. *Biochem Biophys Acta* 487: 297-306.

SHAIKH, AA. (1971) Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy. *Biol Reprod* 5: 297-307.

SHIMANO, H.; YAHAGI, N.; AMEMIYA-KUDO, M.; HASTY, AH.; OSUGA, J-I.; TAMURA, Y.; SHIONOIRI, F.; IIZUKA, Y.; OHASHI, K.; HARADA, K.; GOTODA, T. ISHIBASHI, S.; YAMADA, N. (1999) Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem* 274: 35832-35839.

SIDWELL, CG.; SALWIN, H.; BENCA, M.; MITCHELL, JH. JR. (1954) The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. *J Am Oil Chem Soc* 31: 603-606.

SIMPSON, AECM.; BRAMMAR, WJ.; PRATTEN, MK.; COCKCROFT, N.; ELCOMBE, CR. (1996) Placental transfer of the hypolipidemic drug, clofibrate, induces CYP4A expression in 18.5-day fetal rats. *Drug Metab Dispos* 24: 547-554.

SMART, J. (1986) Undernutrition, learning and memory : review of experimental studies. In: Taylor TG, Jenkins NK, eds. *Proceedings of XII international congress of nutrition*. London: John Libbey, 74-78.

SMITH, JL.; LEAR, SR.; FORTE, TM.; KO, W.; MASSIMI, M.; ERICKSON, SK. (1998) Effect of pregnancy and lactation on lipoprotein and cholesterol metabolism in the rat. *J Lipid Res* 39: 2237-2249.

SMITH, MS.; NEILL, JD. (1977) Inhibition of gonadotropin secretion during lactation in the rat: relative contribution of suckling and ovarian steroids. *Biol Reprod* 17: 255-261.

SORIA, A.; GONZALEZ, MDC.; VIDAL, H.; HERRERA, E.; BOCOS, C. (2005) Triglyceridemia and peroxisome proliferator-activated receptor- α expression are not connected in fenofibrate-treated pregnant rats. *Mol Cell Biochem* 273: 97-107.

SRINIVASAN, KN.; PUGALENDI, KV. (2000) Effect of excessive intake of thermally oxidized sesame oil lipids, lipid peroxidation and antioxidants' status in rats. *Indian J Exp Biol* 38: 777-780.

STAPRANS, I.; HARDMAN, DA.; PAN, XM.; FEINGOLD, KR. (1999) Effect of oxidized lipids in the diet on oxidized lipid levels in postprandial serum chylomicrons of diabetic patients. *Diabetes Care* 22: 300-306.

STEFANINI, S.; MAURIELLO, A.; FARRACE, MG.; CIBELLI, A.; CERU, MP. (1989) Proliferative response of foetal liver peroxisomes to clofibrate treatment of pregnant rats. A quantitative evaluation. *Biol Cell* 67: 299-305.

STEFANINI, S.; NARDACCI, R.; FARIOLI-VECCHIOLI, S.; PAJALUNGA, D.; SARTORI, C. (1999) Liver and kidney peroxisomes in lactating rats and their pups after treatment with ciprofibrate. Biochemical and morphometric analysis. *Cell Mol Biol* 45: 815-829.

SUGIYAMA, H.; YAMADA, J.; SUGA, T. (1994) Effects of testosterone, hypophysectomy and growth hormone treatment on clofibrate induction of peroxisomal β -oxidation in female rat liver. *Biochem Pharmacol* 47: 918-921.

SÜLZLE, A.; HIRCHE, F.; EDER, K. (2004) Thermally oxidized dietary fat upregulates the expression of target genes of PPAR α in rat liver. *J Nutr* 134: 1375-1383.

SWEENEY, TR.; MOSER, AH.; SHIGENAGA, JK.; GRUNFELD, C.; FEINGOLD, KR. (2006) Decreased nuclear hormone receptor expression in the livers of mice in late pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E1313-E1320.

TABET, N.; MANTLE, D.; ORRELL, M. (2000) Free radicals as mediators of toxicity in Alzheimers disease: A review and hypothesis. *Adverse Drug React Toxicol Rev* 19: 127-152.

TIIDUS, PM.; BOMBARDIER, E.; HIDIROGLOU, N. ; MADERE, R. (1999) Gender and exercise influence on tissue antioxidant vitamin status in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 45: 701-710.

TUGWOOD, JD.; ALDRIDGE, TC.; LAMBE, KG.; MACDONALD, N.; WOODYATT, NJ. (1996) Peroxisome proliferator-activated receptors: structures and function. *Ann N Y Acad Sci* 804: 252-265.

URSINI, F.; ZAMBURLINI, A.; CAZZOLATO, G.; MAIORINO, M.; BON, GB.; SEVANIAN, A. (1998) Postprandial plasma lipid hydroperoxides : a possible link between diet and arteriosclerosis. *Free Radical Biol Med* 25: 250-252.

- VERNON, RG.; FLINT, DJ. (1983) Control of fatty acid synthesis in lactation. *Proc Nutr Soc* 42: 315-331.
- VIANA, M.; BARBAS, C.; CASTRO, M.; HERRERA, E.; BONET, B. (1999) Alpha-tocopherol concentration in fetal and maternal tissues of pregnant rats supplemented with alpha-tocopherol. *Ann Nutr Metab* 43: 107-112.
- VIANA, M.; HERRERA, E.; BONET, B. (1996) Teratogenic effects of diabetes mellitus in the rat. Prevention by vitamin E. *Diabetologia* 39: 1041-1046.
- WARTH, MR.; ARKY, RA.; KNOPP, RH. (1975) Lipid metabolism in pregnancy. II. Altered lipid composition in intermediage, very low, low and high-density lipoprotein fractions. *J Clin Endocrinol Metab* 41: 649-655.
- WASFI, I.; WEINSTEIN, I.; HEIMBERG, M. (1980) Increased formation of triglyceride from oleate in perfused livers from pregnant rats. *Endocrinology* 107: 584-596.
- WATTS, GF.; DIMMITT, SB. (1999) Fibrates, dyslipoproteinaemia and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 10: 561-574.
- WEINSTEIN, I.; COOK, GA.; HEIMBERG, M. (1986) Regulation by oestrogen of carnitine palmitoyltransferase in hepatic mitochondria. *Biochem J* 237: 593-596.
- WHEELER (1932) In: DGF-Einheitsmethoden C-VI 6A (84), Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen. Band 1,2. Auflage (2001) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- WILLIAMSON, DH. (1980) Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. *FEBS Lett* 117: K93-K105.
- WOLFRUM, C.; ELLINGHAUS, P.; FOBKER, M.; SEEDORF, U.; ASSMANN, G.; BÖRCHERS, T.; SPENER, F. (1999) Phytanic acid is ligand and transcriptional activator of murine liver fatty acid binding protein. *J Lipid Res* 40: 708-714.
- XIANG, M.; ZETTERSTROM, R. (1999) Relation between polyunsaturated fatty acids and growth. *Acta Paediatr Suppl* 88: 78-82.
- YADETIE, F.; LAEGREID, A.; BAKKE, I.; KUSNIERCZYK, W.; KOMOROWSKI, J.; WALDUM, HL.; SANDVIK, AK. (2003) Liver gene expression in rats in response to the peroxisome proliferator-activated receptor α agonist ciprofibrate. *Physiol Genomics* 15: 9-19.
- YAMADA, J.; SUGIYAMA, H.; TAMURA, H.; SUGA, T. (1994) Hormonal modulation of peroxisomal enzyme induction caused by peroxisome proliferators: suppression by growth and thyroid hormones in cultured rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 315: 555-557.
- YANG, Q.; KUROTANI, R.; YAMADA, A.; KIMURA, S.; GONZALEZ, FJ. (2006a) Peroxisome proliferator-activated receptor α activation during pregnancy severely impairs mammary lobuloalveolar development in mice. *Endocrinology* 147: 4772-4780.

YANG, Q.; YAMADA, A.; KIMURA, S.; PETERS, JM.; GONZALEZ, FJ. (2006b) Alterations in skin and stratified epithelia by constitutively activated PPARalpha. *J Invest Dermatol* 126: 374-385.

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

ZHANG, J.; WANG, C.; TERRONI, PL.; CAGAMPANG, FRA.; HANSON, M.; BYRNE, CD. (2005) High-unsaturated-fat, high-protein, and low-carbohydrate diet during pregnancy and lactation modulates hepatic lipid metabolism in female adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R112-R118.

ZIMETBAUM, P.; FRISHMAN, W.; KAHN, S. (1991) Effects of gemfibrozil and other fibric acid derivatives on blood lipids and lipoproteins. *J Clin Pharmacol* 31: 25-37.

ZIMMERMANN, T.; HUMMEL, L. (1978) Studies on the fatty acid synthesis in maternal and fetal rats. *Acta Biol Med Ger* 37: 223-227.

Lebenslauf

Corinna Dathe

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 28.07.1977

Geburtsort: Halle/ Saale

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

Ausbildung

09/1984 - 08/1985	Deutsche Botschaftsschule, Havanna, Kuba
09/1985 - 08/1986	Polytechnische Oberschule „Heinrich-Heine“, Halle/ Saale
09/1986 - 08/1991	Polytechnische Oberschule „Talamt“, Halle/ Saale
09/1991 - 07/1996	„Gymnasium am Reileck“, Halle/ Saale, Abitur
09/1996 - 11/2002	Studium der Ernährungswissenschaften an der Friedrich-Schiller-Universität (FSU) Jena, Erhalt des Diplomgrades „Dipl.-Troph.“
10/2003 - 09/2006	Promotionsstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/ Saale, Fachbereich Ernährungsphysiologie

Praktika und Tätigkeiten

11/ 1998	Praktikum in der AOK, Halle/ Saale, Ernährungsberatung
03/ 1999	Praktikum im Institut für Ernährungswissenschaften an der FSU Jena, Fachbereich Humanernährung, Laborarbeit
05/ 1999	Praktikum in der Verbraucherzentrale Thüringen, Erfurt, Öffentlichkeitsarbeit
10 - 12/ 2001	Studentische Hilfskraft an der Universität Jena, Fachbereich Humanernährung, Durchführung des Workshops „Bioelektrische Impedanzmessung“
01 - 09/ 2003	Praktikum im Institute of Food Research, Norwich, Großbritannien (Leonardo da Vinci Programm), Mitarbeit an der europäischen Studie „Osteodiet“

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „Wirkung oxidierter Fette auf den Lipidstoffwechsel der Ratte während der Reproduktion unter besonderer Berücksichtigung des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors α “ selbständig angefertigt und diese nicht bereits für eine Promotion oder ähnliche Zwecke an einer anderen Universität eingereicht habe. Alle hierzu benutzten wissenschaftlichen Arbeiten und Hilfsmittel sind genau und vollständig angegeben worden.

Halle/Saale, 20.06.2007

.....

Corinna Dathe

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. habil. K. Eder für die Übertragung des interessanten Themas, die Gewährung der Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Ernährungswissenschaften und die Unterstützung bei wissenschaftlichen Fragestellungen.

Herrn Dr. R. Ringseis gilt mein besonderer Dank für die tatkräftige Unterstützung und die konstruktiven Tipps bei der Anfertigung der Dissertation.

Des weiteren möchte ich allen Mitarbeitern und technischen Assistenten des Institutes für Ernährungswissenschaften danken; im besonderen:

- Frau Dr. C. Brandsch für die Hilfe bei den tierexperimentellen Versuchen
- Herrn Dr. F. Hirche für die Hilfe bei analytischen Fragestellungen
- Herrn Dr. G. Woitow und Herrn Dr. J. Thielebein für die Ermöglichung der Milchentnahmen aus den Versuchstieren
- Herrn W. Böttcher für die Erstellung der Fettsäurespektren
- Frau I. Kaiser für die tatkräftige Mithilfe bei der Probenentnahme bei den tierexperimentellen Versuchen
- den Doktoranden des Institutes für die angenehme Zusammenarbeit.

Der BioService Halle GmbH danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Meinen Eltern und meinen Freunden danke ich für die immer währende mentale Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.