

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaften

**„Wirkungen exzessiver Vitamin E-Aufnahme auf den antioxidativen Status und
auf die Hämolyseempfindlichkeit der Erythrozyten bei unterschiedlichen
Diätfetten am Modelltier Ratte“**

Der Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
(Dekan: Prof. Dr. habil. W. Merbach)

als

Dissertation

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

vorgelegt von

Diplom-Trophologin
Diana Flader

geb. am 07.03.1976
in Nordhausen

Gutachter: Prof. Dr. habil. K. Eder
PD Dr. habil. M. Brandsch
Prof. Dr. habil. G. Flachowsky

Verteidigung am: 9.12.2002

Halle/Saale 2002

urn:nbn:de:gbv:3-000004327

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004327>]

Inhaltsverzeichnis		Seite
Tabellen- und Abbildungsverzeichnisverzeichnis		V
Abkürzungsverzeichnis		VIII
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	4
2.1	Versuchsaufbau und erfaßte Parameter	4
2.2	Durchführung der Fütterungsversuche	6
2.2.1	Zusammensetzung der Diät	6
2.2.2	Charakterisierung der Diäten	8
2.2.3	Tiermaterial und Haltung der Versuchstiere	10
2.2.4	Gewinnung des Probenmaterials	11
2.3	Analytische Methoden	12
2.3.1	Bestimmung der Konzentration an α -Tocopherol	12
2.3.2	Bestimmung der scheinbaren Verdaulichkeit von Vitamin E	13
2.3.3	Bestimmung der Konzentration an Ascorbinsäure (Vitamin C)	13
2.3.4	Bestimmung der Enzymaktivitäten antioxidativer Enzyme und der Konzentration an Glutathion	14
2.3.4.1	Superoxiddismutase	14
2.3.4.2	Glutathionperoxidase	15
2.3.4.3	Katalase	16
2.3.4.4	Glutathion	16
2.3.4.5	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	17
2.3.5	Oxidationsempfindlichkeit der Lipoproteine geringer Dichte	18
2.3.6	Bestimmung der Marker der Lipidperoxidation	19
2.3.6.1	Konzentration an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen	19
2.3.6.2	Konzentration an 7- β -Hydroxycholesterol	20
2.3.7	Bestimmung der Hämolyse neigung der Erythrozyten <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	20
2.3.7.1	Bestimmung der osmotischen Hämolyseresistenz der Erythrozyten	20
2.3.7.2	Freies Hämoglobin im Plasma	21
2.3.7.3	Laktatdehydrogenase im Plasma	22
2.3.7.4	Saure Phosphatase im Plasma	22

2.3.7.5	Bindungskapazität des Haptoglobins	23
2.3.8	Bestimmung von Parametern des Lipidstoffwechsels	23
2.3.8.1	Extraktion der Gesamtlipide	23
2.3.8.2	Analytik der Fettsäuren	24
2.3.8.3	Bestimmung der Konzentration an Triglyceriden und an Cholesterin	24
2.3.8.4	Trennung der Phospholipide	25
2.3.9	Proteinbestimmung	26
2.3.10	Charakterisierung der Diäten	26
2.3.10.1	Bestimmung der Peroxidzahl	26
2.3.10.2	Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes	27
2.3.11	Statistische Auswertung und Ergebnisdarstellung	27
3.	Ergebnisse	29
3.1	Einfluss der Vitamin E-Konzentrationen der Diät und der Art der Diätfette auf Futteraufnahme und Lebendmassenzunahme der Tiere	29
3.2	Charakterisierung des antioxidativen Schutzsystems	29
3.2.1	Einfluss der Vitamin E-Konzentrationen der Diät und der Art der Diätfette auf die Konzentration an α -Tocopherol in verschiedenen Geweben	29
3.2.2	Einfluss der Vitamin E-Konzentrationen der Diät und der Art der Diätfette auf die Konzentration an α -Tocopherol im Kot und die scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E	33
3.2.3	Einfluss der Vitamin E-Konzentrationen der Diät und der Art der Diätfette auf die Konzentration an Ascorbinsäure (Vitamin C) im Plasma	35
3.2.4	Einfluss der Vitamin E-Konzentrationen der Diät und der Art der Diätfette auf die Enzyme des antioxidativen Schutzsystems und auf die Konzentration an Glutathion	35
3.2.4.1	Aktivität der Enzyme Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase in der Leber	35
3.2.4.2	Konzentration an Glutathion in der Leber	38
3.2.4.3	Aktivität der Glutathionperoxidase im Plasma	38

3.2.4.4	Aktivität der antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase im Erythrozytencytosol	39
3.2.4.5	Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase im Erythrozytencytosol	39
3.2.4.6	Konzentration an Glutathion im Erythrozytencytosol	40
3.2.5	Lag-Time und maximale Konzentration an konjugierten Dienen nach Kupfer-induzierter Oxidation der Lipoproteine geringer Dichte	42
3.3	Einfluss der Vitamin E-Konzentrationen der Diät und der Art der Diätfette auf Marker der Lipidperoxidation	44
3.3.1	Konzentration an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen im Plasma	44
3.3.2	Konzentration an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen in der Leber	44
3.3.3	Konzentration an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen im Erythrozytencytosol	45
3.3.4	Konzentration an 7- β -Hydroxycholesterol in der Leber	45
3.4	Einfluss der Vitamin E-Konzentrationen und der Art der Diätfette auf die Hämolyse neigung der Erythrozyten	47
3.4.1	Hämolyse neigung der Erythrozyten in hypotonen Kochsalzlösungen	47
3.4.2	Konzentration der Hämolyse marker im Plasma	49
3.5	Einfluss der Vitamin E-Konzentrationen und der Art der Diätfette auf Parameter des Lipidstoffwechsels	50
3.5.1	Konzentration an Triglyceriden in verschiedenen Geweben	50
3.5.2	Konzentration an Cholesterin in verschiedenen Geweben	51
3.5.3	Konzentration an Cholesterin in der Erythrozytenmembran	54
3.5.4	Konzentration an Triglyceriden im Kot und scheinbare Verdaulichkeit der Triglyceride	54
3.5.5	Konzentration an Cholesterin im Kot	54
3.5.6	Fettsäurezusammensetzung der Neutrallipid-, Phosphatidyl-ethanolamin- und Phosphatidylcholinfraktion in der Leber	56
3.5.7	Fettsäurezusammensetzung der Erythrozytenmembran	61
4.	Diskussion	63

4.1	Futteraufnahme und Gewichtsentwicklung der Tiere	64
4.2	Charakterisierung des antioxidativen Schutzsystems	64
4.2.1	Vitamin E-Status und –Stoffwechsel	64
4.2.2	Konzentration an Ascorbinsäure (Vitamin C im Plasma)	67
4.2.3	Aktivität antioxidativer Enzyme in der Leber bzw. im Plasma	68
4.2.4	Konzentration an Glutathion in der Leber	72
4.2.5	Lag-Time nach Kupfer-induzierter Oxidation der Lipoproteine geringer Dichte und maximale Konzentration an konjugierten Dienen	73
4.3	Parameter der Lipidperoxidation	75
4.3.1	Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen in Leber und Plasma	76
4.3.2	Konzentration an 7- β -Hydroxycholesterol in der Leber	77
4.3.3	Fettsäurezusammensetzung der Neutrallipid-, Phosphatidyl- ethanolamin- und Phosphatidylcholinfraktion der Leber	79
4.4	Einfluss der Vitamin E-Zulagen und der Diätfette auf die Hämolyse neigung der Erythrozyten	80
4.4.1	Osmotische Hämolyse resistenz der Erythrozyten in hypotonen Kochsalzlösungen	81
4.4.2	Hämolyse marker im Plasma	83
4.4.3	Aktivität antioxidativer Enzyme und Konzentration an Glutathion im Erythrozytencytosol	86
4.4.4	Konzentration an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen im Erythrozytencytosol	89
4.4.5	Fettsäurezusammensetzung der Erythrozytenmembran	91
4.5	Parameter des Lipidstoffwechsels	93
4.5.1	Konzentration an Triglyceriden und Cholesterin im Plasma, in den Lipoproteinfraktionen und in der Leber	93
5.	Schlussfolgerung und Ausblick	95
6.	Zusammenfassung	97
6.	Summary	100
	Literaturverzeichnis	103

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Nr.	Titel	Seite
Tab. 1	Versuchsdesign des ersten Versuches	4
Tab. 2	Versuchsdesign des zweiten Versuches	4
Tab. 3	Zusammensetzung der Rattendiäten	6
Tab. 4	Cellulose- und Vitamin E-Gehalte der verwendeten Diäten	7
Tab. 5	Zusammensetzung der Mineralstoffzulage	7
Tab. 6	Zusammensetzung der Vitaminzulage	7
Tab. 7	Fettsäurezusammensetzung und Vitamin E-Konzentration der Futterfette im ersten und zweiten Versuch	9
Tab. 8	Konzentrationen an α -Tocopherol in der Diät im ersten Versuch	9
Tab. 9	Konzentrationen an α -Tocopherol in der Diät im zweiten Versuch	10
Tab. 10	Lebendmassezunahme und Futteraufnahme der Tiere im ersten Versuch	30
Tab. 11	Lebendmassezunahme der Tiere im zweiten Versuch	30
Tab. 12	α -Tocopherolkonzentrationen verschiedener Gewebe im ersten Versuch	32
Tab. 13	α -Tocopherolkonzentrationen verschiedener Gewebe im zweiten Versuch	32
Tab. 14	α -Tocopherolkonzentration im Kot und scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E im zweiten Versuch	34
Tab. 15	Vitamin C-Konzentration im Plasma im zweiten Versuch	36
Tab. 16	Aktivität antioxidativer Enzyme und Konzentration von Glutathion in der Leber und Aktivität der Glutathionperoxidase im Plasma im ersten Versuch	36
Tab. 17	Aktivität antioxidativer Enzyme und Konzentration von Glutathion im Erythrozytencytosol	41
Tab. 18	Lag-Time und maximale Konzentration der konjugierten Diene nach Kupfer-induzierter Oxidation der Lipoproteine geringer Dichte im ersten Versuch	43

Tab. 19	Lag-Time und maximale Konzentration der konjugierten Diene nach Kupfer-induzierter Oxidation der Lipoproteine geringer Dichte im zweiten Versuch	43
Tab. 20	Konzentration an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen im Plasma im ersten Versuch	46
Tab. 21	Konzentration an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen in der Leber und in den Erythrozyten und an 7- β -Hydroxycholesterol in der Leber im zweiten Versuch	46
Tab. 22	Hämolyseresistenz der Erythrozyten in hypotonen Natriumchloridlösungen im ersten Versuch	48
Tab. 23	Konzentration der Hämolysemarker im Plasma im zweiten Versuch	48
Tab. 24	Konzentration der Triglyceride im Plasma, in den Lipoproteinfraktionen und in der Leber im ersten Versuch	52
Tab. 25	Konzentration der Triglyceride im Plasma, in den Lipoproteinfraktionen und in der Leber im zweiten Versuch	52
Tab. 26	Konzentration an Cholesterin im Plasma, in den Lipoproteinfraktionen und in der Leber im ersten Versuch	53
Tab. 27	Konzentration an Cholesterin im Plasma, in den Lipoproteinfraktionen und in der Leber im zweiten Versuch	53
Tab. 28	Konzentration an Triglyceriden und Cholesterin im Kot und scheinbare Verdaulichkeit der Triglyceride im ersten Versuch	55
Tab. 29	Konzentration an Triglyceriden und Cholesterin im Kot und scheinbare Verdaulichkeit der Triglyceride im zweiten Versuch	55
Tab. 30	Fettsäurezusammensetzung der Neutrallipidfraktion in der Leber im ersten Versuch	58
Tab. 31	Fettsäurezusammensetzung der Leberphosphatidylethanolaminfraktion im ersten Versuch	59

Tab. 32	Fettsäurezusammensetzung der Leberphosphatidylcholinfraktion im ersten Versuch	60
Tab. 33	Fettsäurezusammensetzung der Erythrozytenmembran	62

Abbildung

Nr.	Titel	Seite
Abb. 1	Kinetik der Oxidation der Lipoproteine geringer Dichte bei 234 nm	19

Abkürzungsverzeichnis

AIN	American Institute of Nutrition
aqua dest.	destilliertes Wasser
β -HMG-Co A- Reduktase	β -3-Hydroxy-3-methyl-glutary-Coenzym A-Reduktase
BSA	Bovines Serum Albumin
BSTFA	bis(Trimethylsilyl)trifluoroacetamid
Cu-Zn-SOD	Kupfer-Zink-haltige Superoxiddismutase
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DNA	Desoxyribonucleinsäure
δ	Plasmadichte
ΔE	Extinktionsänderung
EC	Enzym Nomenklatur (Enzyme Nomenclature)
EC-SOD	extrazelluläre Superoxiddismutase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAME	Fettsäurenmethylester (Fatty Acid Methyl Esters)
FID	Flammenionisationsdetektor
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GSH	Glutathion
GSH-Px	Glutathionperoxidase
GSSG	oxidiertes Glutathion
G-6-P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
Hb	Hämoglobin
Hb-Hp-Komplex	Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex
Hp	Haptoglobin
HDL	Lipoproteine hoher Dichte (High Density Lipoprotein)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
IE	Internationale Einheiten (1 IE Vitamin E= 1 mg DL- α - Tocopherylacetat= 0,67 mg RRR- α -Tocopherol)
KGW	Körpergewicht
LDL	Lipoproteine geringer Dichte (Low Density Lipoprotein)

LDH	Laktatdehydrogenase
MetHb	Methämoglobin
mEqO ₂	Milliäquivalente aktiver Sauerstoff
MDA	Malondialdehyd
Mn-SOD	Mangan-haltige Superoxiddismutase
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
MUFA	einfachungesättigte Fettsäuren (Monounsaturated Fatty Acids)
n-6-Fettsäuren	omega-6-Fettsäuren
n-3-Fettsäuren	omega-3-Fettsäuren
NaCl	Natriumchloridlösung
NAD ⁺	oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADH ⁺	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NADPH-Oxidase	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase
NADP ⁺	oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PH-GSH-Px	Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathionperoxidase
POZ	Peroxidzahl
P/S	mehrfachungesättigte/gesättigten Fettsäuren (Polyunsaturated/Saturated)
PUFA	mehrfachungesättigte Fettsäuren (Polyunsaturated Fatty Acids)
SFA	gesättigte Fettsäuren (Saturated Fatty Acids)
SIM	Selected Ion Monitoring
SOD	Superoxiddismutase
TBARS	Thiobarbitursäurereaktive Substanzen
TBA	Thiobarbitursäure
TEP	1,1,3,3- Tetraetoxypropan
TMB	3-,3`-,5-,5`-Tetramethylbenzidin
U	Unit
V _s	scheinbare Verdaulichkeit

VLDL	Lipoproteine sehr geringer Dichte (Very Low Density Lipoprotein)
7- β -OH- Cholesterol	7- β -Hydroxycholesterol

1. Einleitung

Freie Radikale sind sowohl exogenen, als auch endogenen Ursprungs. Sie entstehen endogen zum Beispiel bei physiologischen Stoffwechselfvorgängen, wie mitochondrialer Elektronentransport, aus phagozytierenden Zellen, bei Enzymoxidationen und Substratautoxidationen (GUTTERIDGE und HALLIWELL 1990, BAKER 1994, LECHLER 1996, GIROTTI 1998).

Freie Radikale können die Lipidperoxidation initiieren, indem sie von der alpha-Methylengruppe eines Fettsäuremoleküls ein Wasserstoffatom abstrahieren (MÖRSEL und MEUSEL 1990; FRANKEL 1991, GUTTERIDGE 1995, PORTER et al. 1995). Die daraus resultierenden Lipidhydroperoxide, Hydroperoxide und zyklischen Peroxide führen zu Störungen in der Membranfunktion, zu einer Verringerung der Fluidität der Membran, zur Inaktivierung von Membran-gebundenen Rezeptoren und zu zytopathologischen Prozessen (GUTTERIDGE und HALLIWELL 1990, GUTTERIDGE 1995).

Vitamin E, ein lipidlösliches Antioxidans, kann aufgrund der phenolischen Hydroxygruppe am aromatischen Chromanring des Moleküls mit organischen Peroxylradikalen reagieren und somit zu einem Kettenabbruch der Lipidperoxidation führen (BUTTRISS und DIPLOCK 1988, SIES 1989, TRABER et al. 1993, WANG und QUINN 1999). Bei dieser Reaktion entstehen unter anderem Tocopheroxyradikale (TRABER et al. 1993, SIES 1989), welche wiederum mittels Wasserstoffdonatoren (z.B. Ubiquinon, Coenzym Q) regeneriert werden (TRABER et al. 1993, WANG und QUINN 1999). Wenn das Tocopheroxyradikal nicht vollständig reduziert wird, kann es mit weiteren Peroxylradikalen reagieren, die daraus resultierenden Reaktionsprodukte sind unter anderem Tocopherone, Epoxytocopherone, Tocopherylchinon und Epoxychinone, sowie Radikale mit Dimer- und Trimerstruktur (GASSMANN et al. 1995).

Für den Menschen wird als Schätzwert für eine angemessene Zufuhr an Vitamin E von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE 2000, Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr) für Männer 14 mg RRR- α -Tocopherol/Tag und für Frauen 12 mg RRR- α -Tocopherol/Tag angegeben. Laut dem ERNÄHRUNGSBERICHT 2000 (DGE 2000) wird dieser Schätzwert für eine angemessene Zufuhr bei Männern mit einer durchschnittlichen Aufnahme von 12,7 mg RRR- α -Tocopherol/Tag und bei Frauen

mit einer durchschnittlichen Aufnahme von 11,5 mg RRR- α -Tocopherol/Tag nahezu erreicht. Jedoch ist die Popularität von über den Bedarf hinausgehenden Vitamin E-Supplementierungen in den letzten Jahren aufgrund der antioxidativen Eigenschaften des Vitamin E stark gestiegen. Es gibt Berichte in der Literatur, die darauf hindeuten, dass teilweise hohe Mengen (100-400 mg Vitamin E/Tag und mehr) an Vitamin E supplementiert werden (BENDICH und MACHLIN 1988).

Hohe Vitamin E-Dosierungen führten jedoch bei *in vitro*-Studien an mizellaren Suspensionen zu prooxidativen Effekten (MUKAI 1993, MUKAI, SAWADA et al. 1993, MUKAI, MORIMOTO et al. 1993). Die Ursache dieser prooxidativen Wirkung liegt in der Reaktion der Tocopheroxylradikale mit anderen Peroxylradikalen. Diese Reaktion führt zu einer Anhäufung von Hydroperoxiden mit konjugierter Dienstruktur (MUKAI 1993, MUKAI, SAWADA et al. 1993, MUKAI, MORIMOTO et al. 1993).

An isolierten Lipoproteinen geringer Dichte (Low Density Lipoprotein-LDL) konnte ebenfalls ein prooxidativer Effekt von hohen Vitamin E-Konzentrationen nachgewiesen werden (BOWRY et al. 1995, KONTUSH et al. 1996, THOMAS et al. 1996). Tocopheroxylradikale reagieren mit den mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Polyunsaturated Fatty Acids-PUFA) in den LDL (BOWRY et al. 1995, KONTUSH et al. 1996, THOMAS et al. 1996), was zu einer Akkumulation konjugierter Diene, einer erhöhten Bildung von Oxysterolen und einer Verringerung des Gehaltes an PUFA in der LDL-Fraktion führt (KONTUSH et al. 1996). Die prooxidative Wirkung der Tocopheroxylradikale war bei diesen *in vitro*-Studien sowohl von den Oxidationsbedingungen, als auch von der Konzentration der Co-Antioxidantien wie Ascorbat, Bilirubin und Ubichinon abhängig (BOWRY et al. 1995, KONTUSH et al. 1996).

SÜNDER et al. (1999) konnten bei einem Fütterungsversuch an Legehennen mit 20.000 Internationale Einheiten (IE) Vitamin E/kg Diät eine geringere oxidative Stabilität des Abdominalfettes im Vergleich zu niedrigeren verwendeten Vitamin E-Zulagen nachweisen. Als Ursache hierfür diskutieren die Autoren eine erhöhte Autoxidation der Fettsäuren durch prooxidative Wirkungen der hohen Vitamin E-Dosierungen.

Aufgrund dieser Befunde sollten im Rahmen dieser Arbeit Effekte von Vitamin E-Megadosierungen auf Parameter des antioxidativen Status und auf Parameter der

Lipidperoxidation untersucht werden, um mögliche prooxidative Wirkungen einer exzessiven Vitamin E-Zufuhr *in vivo* nachweisen zu können. Da Erythrozyten sehr empfindlich gegenüber oxidativem Streß sind, sollte weiterhin die Wirkung einer exzessiven Vitamin E-Zufuhr auf die Hämolyseempfindlichkeit der Erythrozyten, untersucht werden.

Da auch das Diätfett einen Einfluss auf oxidative Prozesse hat, wurden zwei verschiedene Diätfette gewählt. Mögliche prooxidative Wirkungen der hohen Vitamin E-Zulagen würden durch ein Diätfett, welches einen hohen Anteil an PUFA hat, verstärkt werden. Deshalb wurde Lachsöl als ein Diätfett gewählt, denn Lachsöl hat einen hohen Anteil an hochungesättigten Omega-3 (n-3)-PUFA, welche sehr oxidationsempfindlich sind (MALIS et al. 1990, ZSIGMOND et al. 1990, SAITO und NAKATSUGAWA 1994, CHIANG und TSAI 1995, VALK und HORNSTRA 2000). Außerdem wurde Schweineschmalz als ein Fett mit einem hohen Anteil an gesättigten Fettsäuren (Saturated Fatty Acids-SFA) und einem geringen Anteil an n-3-PUFA verwendet. Bei Verwendung von Schweineschmalz waren geringere oxidative Prozesse als bei Verwendung von Lachsöl zu erwarten.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau und erfaßte Parameter

In der vorliegenden Studie wurden zwei zweifaktorielle Versuchsmodelle mit 72 bzw. 60 männlichen Sprague-Dawley-Ratten (Fa. Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Den Tieren wurden semisynthetische Diäten mit 4 bzw. 3 verschiedenen Vitamin E-Konzentrationen und zwei verschiedenen Diätfetten verabreicht. Somit ergaben sich folgende Versuchsanordnungen (Tabelle 1):

Tab.1: Versuchsdesign des ersten Versuches

Diätfett	Lachsöl				Schweineschmalz			
Vitamin E [IE/kgDiät]	100	500	3.000	10.000	100	500	3.000	10.000
Gruppe	L100	L500	L3.000	L10.000	S100	S500	S3.000	S10.000

IE: Internationale Einheiten

Im zweiten Versuch sollte vor allem die Auswirkung hoher Vitamin E-Zulagen in der Diät auf den antioxidativen Status und die Hämolyse neigung der Erythrozyten untersucht werden. Die Versuchsanordnung war ähnlich wie im ersten Versuch (Tabelle 2).

Tab.2: Versuchsdesign des zweiten Versuches

Diätfett	Lachsöl			Schweineschmalz		
Vitamin E [IE/kg Diät]	100	1.000	10.000	100	1.000	10.000
Gruppe	L100	L1.000	L10.000	S100	S1.000	S10.000

IE: Internationale Einheiten

Es wurden sowohl die tägliche Futterraufnahme, als auch die wöchentliche Lebendmassezunahme der Ratten bestimmt.

Um den antioxidativen Status der Versuchstiere zu charakterisieren, wurden folgende Parameter bestimmt:

- Konzentration an α -Tocopherol im Plasma, in der Leber, im Fettgewebe, in den LDL und im zweiten Versuch in den Erythrozyten
- scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E
- Konzentration an Ascorbinsäure (Vitamin C) im Plasma
- Enzymaktivitäten der antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase (SOD) in der

Leber und in den Erythrozyten, Glutathionperoxidase (GSH-Px) in Plasma,
Leber und in den Erythrozyten, Katalase in der Leber und in den Erythrozyten
- Konzentration von Glutathion (GSH) in Leber und Erythrozyten
- Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) in den
Erythrozyten.

Als ein weiterer Parameter zur Beurteilung des antioxidativen Status in den LDL diene die Bestimmung der Oxidationsempfindlichkeit der LDL *in vitro* nach Zugabe von Kupferionen.

Als Marker der *in vitro*-Lipidperoxidation wurde die Konzentration an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) im Plasma, in der Leber und in den Erythrozyten und als ein *in vivo*-Parameter wurde die Konzentration des Oxysterols 7- β -Hydroxycholesterol (7- β -OH-Cholesterol) in der Leber ermittelt.

Die osmotische Hämolyseresistenz der Erythrozyten in hypotonen Kochsalzlösungen bzw. die Konzentration der Hämolysemarker freies Hämoglobin (Hb), die Bindungskapazität von Haptoglobin (Hp), sowie die Aktivität der sauren Phosphatase und der Laktatdehydrogenase (LDH) im Plasma dienten zur Beschreibung der *in vitro* bzw. *in vivo* Hämolyseempfindlichkeit der Erythrozyten.

Um eventuelle Veränderungen der Fluidität der Erythrozytenmembran beurteilen zu können, wurden weiterhin die Konzentration an Cholesterin und die Fettsäurezusammensetzung der Erythrozytenmembran analysiert.

Weiterhin wurde der Einfluss der verschiedenen Vitamin E-Konzentrationen in der Diät und der eingesetzten Diätfette auf Parameter des Lipidstoffwechsels untersucht. Als Parameter wurden die Konzentrationen an Triglyceriden und Cholesterin im Plasma, in den Lipoproteinfraktionen und in der Leber gemessen. Anhand der Konzentration an Triglyceriden im Kot wurde die scheinbare Verdaulichkeit der Triglyceride ermittelt.

Die Fettsäurezusammensetzung der Neutrallipid-, Phosphatidylethanolamin (PE)- und der Phosphatidylcholin (PC)-fraktion in der Leber diene außerdem der Beurteilung möglicher prooxidativer Wirkungen der verwendeten Vitamin E-Zulagen in Interaktion mit den eingesetzten Diätfetten.

Weiterhin wurden die Diäten charakterisiert. Zu diesem Zweck wurde die Peroxidzahl (POZ) in der Diät bestimmt. Die POZ diente zur Abschätzung einer möglichen Oxidation der Diätfette während der Herstellung der Diät. Außerdem wurden die Fettsäurezusammensetzung und α -Tocopherolkonzentrationen der verwendeten Diätfette und die α -Tocopherolkonzentrationen in den Diäten ermittelt.

2.2 Durchführung der Fütterungsversuche

2.2.1 Zusammensetzung der Diät

Die Zusammensetzung der semisynthetischen Diäten im Versuch 1 und 2 ist Tabelle 3 zu entnehmen. Die Zusammensetzungen der Mineralstoff- (Tabelle 5) und Vitaminzulagen (Tabelle 6) entsprachen den Empfehlungen des American Institute of Nutrition (AIN) ((Diättyp AIN 93-G) (REEVES et al. 1993)) für wachsende Nager (Tabelle 3).

Tab.3: Zusammensetzung der Rattendiäten

Komponente	Konzentration [g/kg Diät]
Stärke	398
Kasein	200
Saccharose	200
Fett¹	100
Cellulose	49,9-40
Vitamine²	20
DL-α-Tocopherylacetat	0,1-10
Mineralstoffe	40
DL-Methionin	2

¹ Lachsöl bzw. Schweineschmalz, ² Vitamin E freie Vormischung

Aufgrund der verschiedenen DL- α -Tocopherylacetat-Dosierungen variierte der Anteil des DL- α -Tocopherylacetat in der Diät je nach Diätgruppe zwischen 0,1 g/kg Diät und 10 g/kg Diät. Zum Ausgleich dieser Differenz wurde Cellulose verwendet. Der Cellulosegehalt variierte in den verwendeten Diäten je nach Diätgruppe zwischen 49,9 g/kg Diät und 40 g/kg Diät (Tabelle 4).

Tab. 4: Cellulose- und Vitamin E-Gehalte der verwendeten Diäten

Diätgruppe	L/S 100	L/S 500	L/S 1000	L/S 3.000	L/S10.000
Cellulose [g/kg Diät]	49,9	49,5	49	47	40
Vitamin E¹ [g/kg Diät]	0,1	0,5	1	3	10

¹Vitamin E wurde als DL- α -Tocopherylacetat zugelegt

Die Zusammensetzungen der Mineralstoff- bzw. Vitaminzulagen sind den Tabellen 5 bzw. 6 zu entnehmen.

Tab. 5: Zusammensetzung der Mineralstoffzulage

Komponente	Konzentration
Mengenelemente	[g/kg Diät]
Calciumcarbonat (36 % Calcium)	8,44
Dicalciumphosphat (17,5 % Phosphat, 22 % Calcium)	8,92
Kaliumchlorid (52,4 % Kalium, 47,2 % Chlorid)	6,87
Magnesiumoxid (50 % Magnesium)	1,014
Natriumcarbonat (27 % Natrium)	3,774
Spurenelemente	[mg/kg Diät]
Eisensulfat (30 % Eisen)	116
Zinkoxid (79 % Zink)	38
Manganoxid (62 % Mangan)	16
Kupfersulfat (25 % Kupfer)	24
Calciumjodat (62 % Jod)	0,32
Natriumselenit (45 % Selen)	0,33

Tab. 6: Zusammensetzung der Vitaminzulage

Komponente	Konzentration [pro kg Diät]
Vitamin A (5000 IE/g)	4000 IE
Vitamin D ₃ (5000 IE/g)	1000 IE
Vitamin K (510 mg/g)	0,75 mg
Thiamin (1000 mg/g)	5 mg
Riboflavin (800 mg/g)	6 mg
Pyridoxin (1000 mg/g)	6 mg
Biotin (20 mg/g)	0,2 mg
Pantothensäure (1000 mg/g)	15 mg
Nikotinsäure (990 mg/g)	30 mg
Vitamin B ₁₂ (1000 µg/g)	0,25 mg
Folsäure (1000 mg/g)	2 mg
Cholinchlorid	1000 mg

IE: Internationale Einheiten

Kasein (Nährkasein, Säurekasein, Meggle, Wasserburg/Inn, Deutschland), Saccharose (Raffinade Zucker, aro, Goldhand Vertrieb Düsseldorf, Deutschland), Cellulose (ARBOCEL, BWW 40, J. Rettenmaier u. Söhne, Rosenberg, Deutschland), Maisstärke (24 NA, Assi Domän, Deutschland) und die Mineralstoff- und Vitaminvormischung (Mineralstoffwerk Hohburg, Hohburg, Deutschland) wurden in einem Mischer zu einer Grundfuttermischung vermengt.

Vitamin E (DL- α -Tocopherylacetat, MERCK Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland) und die Futterfette Lachsöl (Caelo, Caesar und Lorentz GmbH, Hilden, Deutschland) und Schweineschmalz (Laru GmbH, Bottrop, Deutschland) wurden erst bei der Herstellung der Diäten zugefügt.

Die Diäten wurden wöchentlich frisch hergestellt, zur Trocknung lyophilisiert (Gefriertrocknung Gamma 2-20, Fa. Christ, Osterode, Deutschland) und bei 4°C gelagert.

2.2.2 Charakterisierung der Diäten

Entsprechend der Fettsäurezusammensetzung des Lachsöls besteht nach MUGGLI (1994) bei den Gruppen, deren Diät 10 % Lachsöl enthielt, ein Minimalbedarf an Vitamin E von ca. 52 IE Vitamin E/kg Diät. Aufgrund des geringeren Anteils an PUFA im Schweineschmalz betrug der Bedarf an Vitamin E bei den Gruppen, deren Diät Schweineschmalz enthielt, nach MUGGLI (1994) ca. 15 IE Vitamin E/kg Diät.

Die verschiedenen Vitamin E-Konzentrationen in den Diätfetten von 14,6 bzw. 13,1 IE Vitamin E/100g Diätfett (Lachsöl) und von 2,2 bzw. 1,6 IE Vitamin E/100g Diätfett (Schweineschmalz) (Tabelle 7) wurden bei der Zulage von DL- α -Tocopherylacetat zur Diät berücksichtigt. So wurden zum Beispiel im ersten Versuch zu den Diäten, die Lachsöl enthielten, 85,4 IE Vitamin E/kg Diät und zu den Diäten, die Schweineschmalz enthielten, 97,8 IE Vitamin E/kg Diät zugelegt, um eine Vitamin E-Konzentration von 100 IE Vitamin E/kg Diät in der Diät zu erreichen.

Tab. 7: Fettsäurezusammensetzung und Vitamin E-Konzentration der Futterfette im ersten und zweiten Versuch

Fettsäure [g/100g Fettsäuren]	Lachsöl		Schweineschmalz	
	1. Versuch	2. Versuch	1. Versuch	2. Versuch
C14:0	5,90	6,20	1,63	1,61
C16:0	13,4	14,7	25,2	25,7
C16:1	7,50	8,20	2,30	2,70
C18:0	2,60	3,10	14,9	15,4
C18:1 n-9	16,2	15,6	40,4	40,1
C18:2 n-6	2,20	2,30	10,0	9,61
C20:1	8,10	4,20	0,90	0,90
C20:2 n-6	0,06	0,07	0,45	0,47
C20:3 n-6	0,24	0,29	0,07	0,08
C20:4 n-6	0,60	1,32	0,10	0,11
C20:5 n-3	9,50	12,5	0,10	0,07
C22:4 n-6	0,10	0,20	0,10	0,07
C22:5 n-3	3,00	3,00	0,20	-
C22:6 n-3	8,60	9,90	0,04	-
α-Tocopherol [mg/100g Diätfett](analysiert) ¹	9,83	8,82	1,47	1,09
Vitamin E [IE/100g Diätfett](errechnet) ²	14,6	13,1	2,2	1,6

n-Omega, ¹ die Menge an analysiertem α -Tocopherol ist das native α -Tocopherol im Diätfett; ² die Menge an Vitamin E (α -Tocopherylacetat) wurde wie folgt errechnet: 1mg α -Tocopherol entspricht 1,49 IE

Die analysierten Konzentrationen an α -Tocopherol in den Diäten sind Tabelle 8 und Tabelle 9 zu entnehmen.

Tab. 8: Konzentrationen an α -Tocopherol in der Diät im ersten Versuch

Diätfett	Lachsöl				Schweineschmalz			
	100	500	3.000	10.000	100	500	3.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]								
α-Tocopherol [mg/kg Diät] (analysiert) ¹	76,4	314	1692	5783	65,7	243	2171	6379
Vitamin E [IE/kg Diät] (errechnet) ²	114	468	2521	8616	97,8	362	3234	9505

¹ die analysierte Menge an α -Tocopherol in der Diät setzte sich aus dem nativen α -Tocopherol aus dem Diätfett und dem zugesetzten DL- α -Tocopherylacetat zusammen; 1 mg α -Tocopherol entspricht 1 IE = 1 mg DL- α -Tocopherylacetat; ² die Menge an DL- α -Tocopherylacetat (Vitamin E) wurde errechnet (1mg α Tocopherol entspricht 1,49 mg DL- α -Tocopherylacetat=1,49 IE)

Tab. 9: Konzentrationen an α -Tocopherol in der Diät im zweiten Versuch

Diätfett	Lachsöl			Schweineschmalz		
	100	1.000	10.000	100	1.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]						
α-Tocopherol [mg/kg Diät] (analysiert) ¹	75,0	799	5686	67	598	5954
Vitamin E [IE/kg Diät] (errechnet) ²	112	1190	8472	99	891	8871

¹ die analysierte Menge an α -Tocopherol in der Diät setzte sich aus dem nativen α -Tocopherol aus dem Diätfett und dem zugesetzten DL- α -Tocopherylacetat zusammen; 1 mg α -Tocopherol entspricht 1 IE = 1 mg DL- α -Tocopherylacetat; ² die Menge an DL- α -Tocopherylacetat (Vitamin E) wurde errechnet (1mg α Tocopherol entspricht 1,49 mg DL- α -Tocopherylacetat= 1,49 IE)

Der Trockensubstanzgehalt der Diäten (Methode s. Kapitel 2.3.10.2) lag im ersten Versuch bei durchschnittlich 95 % und im zweiten Versuch bei durchschnittlich 93 %. Die POZ der Diäten in Milliäquivalente aktiver Sauerstoff (mEq O₂) pro kg Fett lagen im ersten Versuch bei den Lachsöldiäten bei 8,5 (Gruppe L 100), 8,9 (L 500), 8,4 (L 3.000) und 8,5 (L 10.000) bzw. im zweiten Versuch bei den Lachsöldiäten bei 9,5 (L 100), 9,3 (L 1.000) und 9,6 (L 10.000). Die POZ lagen bei den Schweineschmalzdiäten im ersten Versuch bei 3 (S 100), 2,8 (S 500), 2,9 (S 3.000) bzw. 3 (S 10.000) und im zweiten Versuch bei 2,5 (S 100), 2,4 (S 1.000) bzw. 2,5 (S 10.000). Die Ergebnisse zeigen, dass während der Diätherstellung keine nennenswerte Peroxidation stattgefunden hat, denn die POZ lagen in den frischen Diätfetten bei 4,2 (Lachsöl) bzw. 2,0 (Schweineschmalz).

2.2.3 Tiermaterial und Haltung der Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden in beiden Versuchen männliche Sprague-Dawley-Ratten (CD Stamm) verwendet. Die Tiere hatten zu Versuchsbeginn eine mittlere Lebendmasse von $55,9 \pm 2,5$ g im ersten und von $62,4 \pm 4,2$ g im zweiten Versuch. Die Haltung der Tiere erfolgte in Makrolonkäfigen mit Metallgitterabdeckung auf Einstreu in Versuchsterräumen des Instituts. Ein 12 Stunden Licht- und Dunkelrhythmus bei einer Umgebungstemperatur von durchschnittlich 22°C und einer durchschnittlichen Luftfeuchtigkeit von ca. 50-60 % wurden gewährleistet.

Im ersten Versuch wurden die Tiere in Gruppen zu je drei Tieren pro Käfig gehalten. Im zweiten Fütterungsversuch wurden die Tiere einzeln gehalten.

Im ersten Versuch wurden die Tiere ad libitum gefüttert. Im zweiten Fütterungsversuch wurden die Tiere restriktiv, circa 10 % unter der ad libitum Aufnahme des ersten Versuches, gefüttert. Wasser stand in beiden Versuchen ad libitum zur Verfügung.

Die Tiergewichte wurden im ersten Versuch wöchentlich, im zweiten Versuch 14-tägig protokolliert.

2.2.4 Gewinnung des Probenmaterials

Am 56. Versuchstag wurden die Tiere nach 12-stündiger Nüchterung unter Etherbetäubung dekapitiert.

Das Blut wurde in heparinisierten Monovetten (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) aufgefangen und das Plasma durch Zentrifugation bei 3.000 U/min, 10 min, 4°C gewonnen.

Die Erythrozyten wurden 3 mal mit 0,9 %-iger Natriumchloridlösung (NaCl) gewaschen und zusammen mit dem Plasma bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Für die Bestimmung der Vitamin C-Konzentration wurden 200 µl Plasma zwecks Stabilisierung des Vitamin C mit 200 µl 10 %-iger Metaphosphorsäure versetzt und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Unmittelbar nach der Plasmagewinnung wurden die Lipoproteinfraktionen gewonnen. Die Auftrennung der Lipoproteinfraktionen erfolgte aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte nach einer Methode von TIEDINK und KATAN (1989) mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ultrazentrifuge RC M 100 GX, Rotor S150-AT, SORVALL, Kendro Laboratory Products, Hanau Deutschland). Nach der Einstellung der Plasmadichten (δ) mit NaCl (0,195 M) und Natriumbromid (2,44 M) wurden die Lipoproteinfraktionen mittels Zentrifugation (900.000 g, 1,5 h, 4°C) getrennt und mit einer Pipette abgenommen. Zuerst wurde die Lipoproteinfraktion sehr geringer Dichte (Very Low Density Lipoprotein-VLDL) [$\delta < 1,006$ g/ml] abgetrennt und abgenommen, anschließend die LDL-Fraktion [$1,006 < \delta < 1,063$ g/ml]. Die restliche

Fraktion wurde als Lipoproteine hoher Dichte (High Density Lipoprotein-HDL) [$\delta > 1,063$ g/ml] gewonnen.

Weiterhin wurden Leber und abdominales Fettgewebe entnommen, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Analytik bei -20°C gelagert.

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Bestimmung der Konzentration an α -Tocopherol

Die Konzentration an α -Tocopherol wurde im Plasma, in der Leber, im Fettgewebe, in den LDL, in den Erythrozyten, in den Diäten, Diätfetten, sowie im Kot mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Methode (High Performance Liquid Chromatography–HPLC) nach BALZ et al. (1993) mit Modifikationen bestimmt.

Das Probenmaterial wurde mit 1 ml einer 1 %-igen Pyrogallollösung (in Ethanol, absolut) versetzt. Die Tocopherole wurden anschließend mit 150 μl einer gesättigter Natriumhydroxidlösung verseift und es erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 70°C .

Die Tocopherole wurden anschließend mit 2 ml n-Hexan extrahiert und an einer HPLC-Anlage (HP 1100, Hewlett Packard GmbH, Waldbronn, Deutschland) analysiert.

Die Trennung der Tocopherolisomere erfolgte an einer Li-Chrosorb Si 60 Säule (250 mm Länge*4 mm Innendurchmesser; 5 μm Partikelgröße) (MERCK Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland) mit einer 4*4 Si 60 Vorsäule (MERCK Eurolab GmbH). Das Laufmittel war Hexan: Dioxan (96:4; v/v) mit einer Flußrate von 1 ml/min. Die Detektion der Tocopherolisomere erfolgte an einem Fluoreszenzdetektor mit einer Excitationswellenlänge von 295 nm und einer Emissionswellenlänge von 330 nm.

Die Identifizierung der Tocopherolisomere und die Berechnung der α -Tocopherolgehalte der Proben erfolgte anhand externer Tocopherolstandards (SIGMA-ALDRICH, Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland).

2.3.2 Bestimmung der scheinbaren Verdaulichkeit von Vitamin E

Die Bestimmung der scheinbaren Vitamin E-Verdaulichkeit erfolgte im zweiten Versuch in der 4. und 8. Versuchswoche. Die scheinbare Verdaulichkeit (V_s) von Vitamin E wurde mit Hilfe einer Formel nach KIRCHGESSNER (1986) errechnet:

$$V_s [\%] = \frac{(\text{Aufnahme an Vitamin E} - \text{Ausscheidung an Vitamin E}) * 100}{\text{Aufnahme an Vitamin E}}$$

2.3.3 Bestimmung der Konzentration an Ascorbinsäure (Vitamin C)

Die Ascorbinsäurekonzentration im Plasma wurde mit einer HPLC-Methode nach ROSS (1994) mit Modifikationen bestimmt.

Durch Zugabe von Metaphosphorsäure zum Plasma kam es zu einer Ausfällung der Proteine, die durch Zentrifugation abgetrennt wurden. Im proteinfreiem Überstand wurde die Konzentration der Ascorbinsäure ermittelt.

Die Konzentration an Ascorbinsäure wurde an einer HPLC-Anlage (HP 1100, Hewlett Packard GmbH) analysiert. Die Trennung der Ascorbinsäure erfolgte an einer ODS 5 μm Säule (25 mm*0,46 mm) (MERCK Eurolab GmbH) mit einer RP 18 4*4 Vorsäule (MERCK Eurolab). Es wurde eine Gradientenelution mit zwei Eluenten durchgeführt. Eluent A bestand aus 8,41 g/l Myristylmethylammoniumbromid; 2g/l Natriumhydroxid; 0,2 g/l Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); 3,6 ml/l Essigsäure und 0,1 g/l Homocystein. Eluent B war Methanol. Die Flußrate betrug 0,5 ml/min. Es wurde folgendes Gradientenprogramm verwendet: 0-8 min 100% Eluent A, 9-18 min A/B (60/40 (v/v)), 19-40 min 100 % Eluent A. Die Detektion der Ascorbinsäure erfolgte mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 262 nm.

Die Identifizierung des Ascorbinsäurepeaks und die Berechnung der Konzentration an Ascorbinsäure erfolgte anhand eines externen Ascorbinsäurestandards (SIGMA-ALDRICH, Chemie GmbH).

2.3.4 Bestimmung der Enzymaktivitäten antioxidativer Enzyme und der Konzentration an Glutathion

2.3.4.1 Superoxiddismutase

Die Aktivität der cytosolischen Kupfer-Zink-SOD (Cu-Zn-SOD) im Leber- und Erythrozytencytosol wurde nach einer Methode von MARKLUND und MARKLUND (1974) mit Modifikationen bestimmt.

Das Prinzip der Methode beruht auf der Hemmung der Autoxidation von Pyrogallol in wäßriger Lösung durch die SOD. Die Zunahme des Oxidationsproduktes von Pyrogallol wird bei 420 nm spektralphotometrisch (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) erfaßt. Je größer die Zunahme des Oxidationsproduktes ist, umso geringer ist die Aktivität der SOD.

Es wurde ein 100% Wert und ein Probenwert je Probe ermittelt. Zur Bestimmung des 100% Wertes wurde zu 700 µl Tris-Succinat-Puffer (0,05 M) 25 µl destilliertes Wasser (aqua dest.) hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µl Pyrogallol (8mM) gestartet. Die Messung der Extinktionsänderung erfolgte bei 420 nm bei Raumtemperatur über 2 min. Zur Bestimmung des Probenwertes wurde der gleiche Testansatz wie für die Bestimmung des 100% Wertes verwendet. Anstatt aqua dest. wurde jedoch dem Testsystem 25 µl Probe zugesetzt.

Die Aktivität der SOD wurde in Units (U) pro Liter angegeben. Dabei ist 1 U als die Enzymmenge definiert, die zu einer 50%-igen Inhibierung der Autoxidation des Pyrogallols führt.

Die Berechnung der Aktivität der SOD erfolgte mittels dieser Formel:

$$\text{SOD [U/l]} = \frac{(\Delta E/\text{min (100 \% Wert)} - \Delta E/\text{min (Probe)}) * T * 2}{P * \Delta E/\text{min (100 \% Wert)}}$$

T: Testvolumen (750 µl)

P: Probenvolumen (25 µl)

$\Delta E/\text{min}$: Extinktionsänderung pro Minute

2.3.4.2 Glutathionperoxidase

Die Bestimmung der Aktivität der Selen-abhängigen GSH-Px in Plasma, Leber und Erythrozyten erfolgte nach einer Methode von PAGLIA und VALENTINE (1967) mit Modifikationen.

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass die GSH-Px das, dem Testansatz zugesetzte, organische Hydroperoxid tert-butyl-Hydroperoxid zu seinen Alkoholen abbaut. Als Reduktionsmittel dient GSH. Bei dieser Reaktion entsteht oxidiertes Glutathion (GSSG), welches über eine von der Glutathionreduktase katalysierten Reaktion, mit Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) als Coenzym, regeneriert wird. Der Verbrauch an NADPH wird photometrisch bei 340 nm erfaßt. Die Extinktionsabnahme ist proportional zur GSH-Px Aktivität.

Die Aktivität der GSH-Px wurde wie folgt analysiert: Zu 200 µl Glutathion-Reduktase-Lösung (5000 U/l) wurde 50 µl Glutathion-Lösung (40 mM), 50 µl Probe, 450 µl Pufferlösung (pH 7,4) und 220 µl Reinstwasser zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 10 min inkubiert. Anschließend wurde 10 µl NADPH-Lösung (20 mM in 0,1% (w/v) Natriumhydrogencarbonatlösung) zugegeben und der Ansatz nochmals für 2 min inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 20 µl tert-butyl-Hydroperoxid (15 mM) gestartet und die Extinktionsänderung bei 340 nm über 3 min verfolgt.

Die Enzymaktivität der GSH-Px wurde in U pro Liter angegeben, wobei 1 U als die Menge definiert ist, die 1 µmol NADPH pro Minute umsetzt.

Die Enzymaktivität der GSH-Px wurde mittels folgender Formel errechnet:

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

V: Ansatzvolumen (1 ml)

ϵ : Extinktionskoeffizient NADPH ($6,3 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

v: Probenvolumen (50 µl)

$\Delta E / \text{min}$: Extinktionsänderung pro Minute

2.3.4.3 Katalase

Die Aktivität der Katalase in Leber und Erythrozyten wurde nach einer Methode von AEBI (1986) bestimmt.

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass das Enzym Katalase den Abbau von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff katalysiert. Dieser Abbau des Wasserstoffperoxids kann bei einer Wellenlänge von 280 nm spektralphotometrisch verfolgt werden. Zu 500 µl Probenmaterial wurde deshalb 250 µl Wasserstoffperoxid als Substrat zugegeben und die Extinktionsänderung bei 280 nm spektralphotometrisch (Ultraspec 2000) verfolgt. Die Extinktionsänderung ($\Delta E/\text{Minute}$) ist ein Maß für die Aktivität der Katalase.

Die Aktivität der Katalase wurde in U pro Liter angegeben, wobei 1 U als die Enzymmenge definiert ist, die 1 µmol Wasserstoffperoxid pro Minute umsetzt.

Die Aktivität der Katalase wurde wie folgt berechnet:

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

V: Probenvolumen (500 µl)

v: Ansatzvolumen (250 µl)

ϵ : Wasserstoffperoxid ($0,036 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

$\Delta E/\text{min}$: Extinktionsänderung pro Minute

2.3.4.4 Glutathion

Der Gehalt an GSH wurde nach einer Methode von TIETZE (1969) mit Modifikationen bestimmt.

Bei dieser Methode reagiert GSH mit 5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure). Bei der Reaktion entsteht GSSG und 2-Nitro-5-Thiobenzoessäure. Dem Testsystem wird Glutathionreduktase zugesetzt, welche das GSSG wieder zu GSH reduziert. Die Bildung von 2-Nitro-5-Thiobenzoessäure wird spektralphotometrisch (Ultrospec 2000) bei 412 nm erfaßt.

Zu 700 µl einer NADPH-Pufferlösung (0,3 mM) wurden 100 µl DTNB-Lösung (6 mM) und 100 µl Probe bzw. Standard zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 4 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde gestartet, indem dem Testansatz 100 µl Glutathionreduktase-Lösung (6000 U/l) zugegeben wurde. Die Extinktionsänderung wurde bei 412 nm über 3 min verfolgt.

Die Berechnung der GSH Konzentration erfolgt mittels einer Kalibrationskurve mit verschiedenen GSH-Standardkonzentrationen (10 nmol; 5 nmol; 3 nmol; 2 nmol) (SIGMA-ALDRICH, Chemie GmbH).

2.3.4.5 Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Die Aktivität der G-6-P-DH wurde nach einer Methode nach DEUTSCH (1985) bestimmt.

Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass das Enzym G-6-P-DH dem Testsystem zugesetztes Glucose-6-Phosphat und oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP⁺) zu 6-Phosphogluconolacton und NADPH umsetzt. Der Gehalt an NADPH wird spektralphotometrisch bei 339 nm erfaßt und ist der Aktivität der G-6-P-DH proportional.

Zu 1 ml Testmedium (50mM Tris, 0,4 mM NADP⁺, 6,3 mM Magnesiumchlorid, 3,3mM Glucose-6-phosphat, 5mM Maleinimid) wurde 50 µl Probenmaterial zugegeben und nach einer 2 minütigen Inkubation die Extinktionsänderung über 2 min verfolgt.

Die Enzymaktivität der G-6-P-DH wurde in U pro Liter angegeben, wobei 1 U als die Menge definiert ist, die 1 µmol NADPH pro Minute umsetzt. Die Aktivität der G-6-P-DH wurde anhand folgender Formel errechnet:

$$\text{G-6-P-DH [U/l]} = \frac{V \cdot \Delta E}{v \cdot \epsilon}$$

V: Ansatzvolumen (1,05 ml)

v: Probenvolumen (50 µl)

ε: Extinktionskoeffizient NADPH ($6,3 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

ΔE/min: Extinktionsänderung pro Minute

2.3.5 Oxidationsempfindlichkeit der Lipoproteine geringer Dichte

Die *in vitro* Oxidation der LDL wurde nach einer Methode nach ESTERBAUER et al. (1989b) mit Modifikationen bestimmt. Als Parameter dienten die Lag-Time nach Kupfer-induzierter Oxidation der LDL und die maximale Konzentration an konjugierten Dienen.

Frisch gewonnenes LDL wurde 12 Stunden gegen Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline–PBS) dialysiert. Die Proteinkonzentration des LDL wurde mit PBS auf 0,05 mg/ml eingestellt. Anschließend wurde das LDL mittels 10 µl Kupfersulfat, mit einer Konzentration von 25 µmol, oxidiert und die Menge der daraus entstehenden Oxidationsprodukte (konjugierte Diene) bei 234 nm über 17 Stunden bei Raumtemperatur spektralphotometrisch (Spektro Fluor Plus, Fa. TeCan, Österreich) erfaßt.

Als Lag-Time wird der Zeitraum bezeichnet, bei dem noch keine Lipidperoxidation stattfindet.

Es wurde alle zwei Minuten die Extinktionsänderung bei 234 nm ermittelt und in einer Tabelle zusammen mit den entsprechenden Zeitpunkten dargestellt. Anhand dieser Werte wurde mittels folgender Formel die Extinktionsänderung bestimmt, in deren Zeitraum die Lag-Time lag:

$\text{Extinktion zum Zeitpunkt der Lag-Time} = \text{Min} + 0,05 * (\text{Max} - \text{Min})$ <p>Min: Minimum (Extinktion) Max: Maximum (Extinktion)</p>

Anhand dieser ermittelten Extinktion konnte dann in der Tabelle der entsprechende Zeitraum für die Lag-Time abgelesen werden.

Die Berechnung der maximalen Konzentration an konjugierten Dienen erfolgte nach dieser Formel:

$\text{maximale Konzentration an konjugierten Dienen } [\mu\text{mol/l}] = \frac{((\text{Max} - \text{Min}) / \epsilon_{234}) * 1.000.000}{\epsilon_{234}}$ <p>Min: Minimum (Extinktion) Max: Maximum (Extinktion) ϵ_{234}: Molarer Absorptionskoeffizient der konjugierten Diene ($29.500 \text{ l} * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$)</p>
--

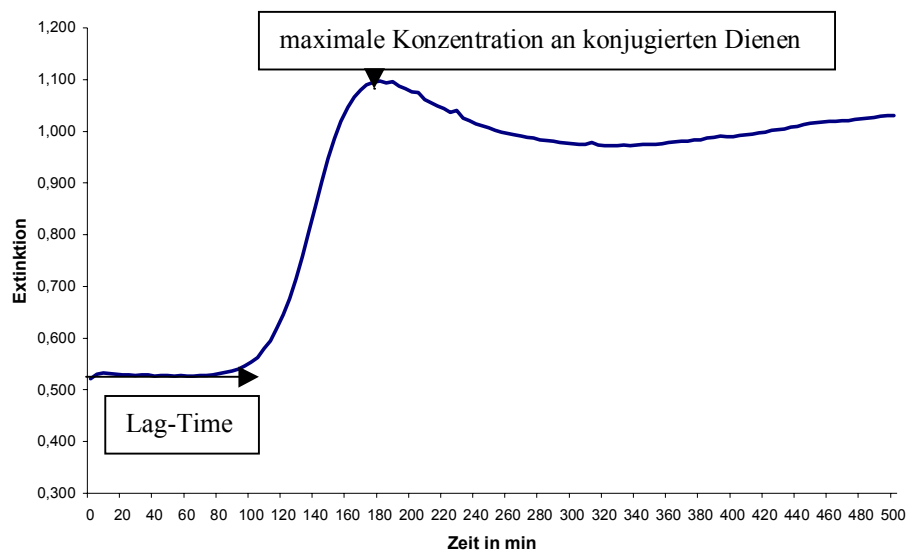


Abb. 1: Kinetik der Oxidation der Lipoproteine geringer Dichte bei 234 nm

2.3.6 Bestimmung der Marker der Lipidperoxidation

2.3.6.1 Konzentration an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen

Der Nachweis des sekundären Lipidperoxidationsproduktes Malondialdehyd (MDA) bzw. der TBARS erfolgte nach einer Methode modifiziert nach CONTI et al. (1991).

Das Prinzip des TBA-Testes beruht auf der Komplexbildung von zwei Molekülen Thiobarbitursäure (TBA) mit einem Molekül MDA unter Hitze bei einem saurem pH-Wert (HALLIWELL und GUTTERIDGE 1988). Dieser MDA-TBA-Komplex absorbiert Licht bei 542 nm. Diese Komplexbildung ist jedoch nicht für MDA spezifisch, denn auch andere Aldehyde, Zucker und Gallenpigmente können mit TBA reagieren (HALLIWELL und GUTTERIDGE 1988).

Zu 100 μ l Probe bzw. Standard wurde 750 μ l TBA-Reagenz zupipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 95°C über 60 Minuten. Danach wurden die TBARS mit 3 ml n-Butanol extrahiert und bei 542 nm spektralphotometrisch (Ultrospec 2000) bestimmt.

Der Gehalt an TBARS in der Probe wurde anhand einer Eichreihe mit 1,1,3,3-Tetraetoxypropan-Standard (TEP-Standard) (SIGMA-ALDRICH, Chemie GmbH) ermittelt.

2.3.6.2 Konzentration an 7- β -Hydroxycholesterol

Das Oxysterol 7- β -OH-Cholesterol wurde in Anlehnung an die Methode von MORI et al. (1996) bestimmt.

Nach der Extraktion der Gesamtlipide aus dem Probenmaterial (s. Kapitel 2.3.8.1) wurden diese mit 2 ml einer 1M methanolischen Kaliumhydroxidlösung über Nacht verseift. Anschließend wurde der unverseifbare Anteil mit 2 ml Diethylether für 3 Stunden extrahiert. Die Diethyletherphase, welche das 7- β -OH-Cholesterol enthält, wurde anschließend unter Stickstoff bis zur Trockene eingeeengt und danach mit 100 μ l Pyridin und 100 μ l bis(Trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) für 1 h bei 60°C derivatisiert.

Die Messung der Proben erfolgte an einer QP 500 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS Shimadzu Japan Manufacturing PTIY. LTD, Kiyoto, Japan) im SIM (Selected Ion Monitoring)-Modus. Die Trennung des 7- β -OH-Cholesterols erfolgte an einer 30 m langen DB-5 Fused Silica-Trennsäule (0,25 mm ID; 0,25 μ m Filmdicke) (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland). Als Trägergas wurde Helium mit einer Flußrate von 7,6 ml/min verwendet.

Die Peakidentifizierung erfolgte mittels des Vergleiches der Retentionszeiten und der Massenspektren mit denen von externen Standardsubstanzen. Die Kalibrierung erfolgte anhand eines internen Standards (5- α -Cholestane) (SIGMA-ALDRICH, Chemie GmbH).

2.3.7 Bestimmung der Hämolyse neigung der Erythrozyten *in vitro* und *in vivo*

2.3.7.1 Bestimmung der osmotischen Hämolyse resistenz der Erythrozyten

Um die Membranstabilität von Erythrozyten zu beurteilen, wurde deren Resistenz gegenüber hypotonen NaCl-Lösungen bestimmt. Dabei wurde eine Methode nach O'DELL et al. (1987) verwendet.

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass die Hämolyse der Erythrozyten in Abhängigkeit von der Konzentration der NaCl-Lösung und der Membranstabilität der Erythrozyten eintritt. Umso hypotoner die NaCl-Lösung und umso instabiler die Erythrozytenmembran ist, desto größer ist der Austritt von Hb in das Inkubationsmedium.

Zu 1,5 ml aqua dest. bzw. hypotonen NaCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentration (0,38 %, 0,405 %, 0,43 %, 0,455 %) wurde 15 µl frisch gewonnenes heparinisiertes Vollblut zupipettiert. Die Proben wurden vorsichtig geschwenkt und über 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 500 g für 10 min zentrifugiert (Biofuge, Heraeus). Die Hb-Konzentration im Überstand wurde bei 540 nm spektralphotometrisch (Ultrospec 2000) gemessen.

Es wird die Hämolyse der Erythrozyten im Verhältnis zur Totalhämolyse ermittelt. Deshalb wird die Absorption des Überstandes bei Verwendung von aqua dest. gleich 100 gesetzt und die NaCl-Konzentration von 0,9% gleich 0 gesetzt und somit die Absorptionswerte der anderen Ansätze als prozentuale Hämolyse errechnet.

2.3.7.2 Freies Hämoglobin im Plasma

Die Konzentration des freien Hb im Plasma wurde mit Hilfe eines Kits (Verfahren Nr. 527; SIGMA-ALDRICH, Chemie GmbH) gemessen.

Dieser Test beruht auf der katalytischen Wirkung des Hb auf die Oxidation von 3-,3`-,5-,5`-Tetramethylbenzidin (TMB) durch Wasserstoffperoxid. Dabei bildet sich ein grüner Farbstoff, die Menge des gebildeten Farbstoffes ist der Konzentration an Hb in der Probe proportional. Der Farbstoff wird bei 600 nm spektralphotometrisch (Ultrospec 2000) gemessen.

Die Berechnung der Konzentration an freiem Hämoglobin im Plasma erfolgte anhand dieser Formel:

Freies Hämoglobin [mg/dl]=	$\frac{E_{\text{Probe}} - E_{\text{Leerwert}}}{E_{\text{Standard}} - E_{\text{Leerwert}}} * 30$
E: Extinktion	

2.3.7.3 Laktatdehydrogenase im Plasma

Die Bestimmung der Aktivität der LDH im Plasma erfolgte mittels eines Test Kits (Ecoline 15; MERCK Eurolab GmbH).

Die LDH katalysiert die Reaktion von Pyruvat und reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid + Wasserstoff ($\text{NADH}+\text{H}^+$) zu Laktat und oxidiertem Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD^+). Die Geschwindigkeit der $\text{NADH}+\text{H}^+$ -Abnahme wird photometrisch bei 334 nm (Ultrospec 2000) bestimmt, sie ist der LDH-Aktivität im Probenmaterial direkt proportional.

Die Berechnung der Aktivität der LDH erfolgte mittels folgender Formel:

$\text{LDH [U/l]} = \frac{\Delta E/\text{min} \cdot F}{\Delta E/\text{min}}$ <p>F (bei 334 nm): 8252 $\Delta E/\text{min}$: Extinktionsänderung pro Minute</p>

2.3.7.4 Saure Phosphatase im Plasma

Die Bestimmung der Aktivität der sauren Phosphatase erfolgte mittels eines Test Kits (Merckotest 3305; MERCK Eurolab GmbH).

Das Substrat p-Nitrophenylphosphat wird durch die Wirkung der sauren Phosphatase in p-Nitrophenol und Phosphorsäure gespalten. Durch Zugabe von Natriumhydroxid wird die Reaktion unterbrochen und das freigesetzte Nitrophenol in ein gelb gefärbtes Anion überführt. Dieses Anion lässt sich photometrisch bei 405 nm (Ultrospec 2000) bestimmen. Die Menge des pro Zeiteinheit freigesetzten p-Nitrophenols ist der Aktivität der sauren Phosphatase direkt proportional.

Die Enzymaktivität der sauren Phosphatase wurde mittels folgender Formel berechnet:

$\text{saure Phosphatase [U/l]} = E_p \cdot 101$ <p>E_p: Extinktion der Probe</p>
--

2.3.7.5 Bindungskapazität des Haptoglobins

Die Bestimmung der Konzentration an Hp (Molekulargewicht Hp: 86.000-400.000 Dalton) im Plasma erfolgte indirekt über die Ermittlung der Hp-Bindungskapazität nach einer Methode von DELANGHE et al. (2000) mit Modifikationen.

Um die Hp-Bindungskapazität zu bestimmen, wurde 300 µl Probenmaterial mit 300 µl Hb (Konzentration 20 mg Hb/dl) versetzt. Der bei dieser Reaktion entstehende Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex (Hb-Hp-Komplex) wurde mit einer HPLC Anlage (HP1100, Hewlett Packard GmbH) analysiert. Der Komplex wurde an einer GF 250-Säule (250 mm Länge; 4,6 mm Innendurchmesser; Zorbax Bio Series, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland) mit einer Diol-Vorsäule 9,4*15 (Zorbax, Agilent Technologies) abgetrennt und mit einem UV-Detektor bei 418 nm gemessen. Als mobile Phase diente 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat (pH 7,2) mit einer Flußrate von 0,9 ml/min. Zur Kalibrierung wurde ein Hb-Standard verwendet. Dieser Hb-Standard wurde durch Ultrazentrifugation der hämolysierten Erythrozyten (Ultrazentrifuge RC M 100 GX, Rotor S-150 AT) bei 20.000 g über 20 min gewonnen. Die Hb-Konzentration wurde mit einem Test-Kit (Reaktionslösung für Hämoglobin-Bestimmung, 1.09405. MERCK Eurolab GmbH) ermittelt.

Die Identifizierung des Hb-Hp-Komplexes erfolgte mittels eines Hp-Standards (MERCK Eurolab GmbH). Die Berechnung der Bindungskapazität des Hp in g gebundenes Hb pro Liter Plasma erfolgte mittels Kalibrierung des Hb-Hp-Komplexes mit dem selbst hergestelltem Hb-Standard.

2.3.8 Bestimmung von Parametern des Lipidstoffwechsels

2.3.8.1 Extraktion der Gesamtlipide

Die Gesamtlipide wurden aus den Geweben mittels Hexan:Isopropanol-Gemisch (3:2) nach HARA und RADIN (1978), modifiziert nach EDER und KIRCHGESSNER (1994) extrahiert. Zu diesem Zweck wurde dem Probenmaterial 4 ml Hexan:Isopropanol-Gemisch (3:2) zugesetzt. Die Lipide wurden dann im Schüttelinkubator (Model G 25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey, U.S.A.) bei Raumtemperatur über 18 Stunden extrahiert.

2.3.8.2 Analytik der Fettsäuren

Nach der Extraktion der Gesamtlipide (s. Kapitel 2.3.8.1) erfolgte eine Methylierung der Fettsäuren mit Trimethylsulfoniumhydroxid nach BUTTE (1983).

Die Auftrennung der Fettsäurenmethylester (Fatty Acid Methyl Esters-FAME) erfolgte an einem Gaschromatographen (HP 5890, Hewlett Packard, Taufkirchen, Deutschland) ausgerüstet mit einem automatischen Injektionssystem und einer 30 m langen FFAP-Fused-Silica-Trennsäule mit 0,53 mm Innendurchmesser (Macherey und Nagel).

Als Trägergas wurde Helium mit einer Flußrate von 5,4 ml/min verwendet. Die Detektion der FAME erfolgte mit einem Flammenionisationsdetektor (FID).

Die Identifikation der FAME erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten mit den Retentionszeiten identischer Standards. Die FAME wurden mittels internem Standard (Pentadecansäuremethylester) (SIGMA-ALDRICH GmbH) quantifiziert.

2.3.8.3 Bestimmung der Konzentration an Triglyceriden und an Cholesterin

Die Konzentration der Triglyceride und von Cholesterin im Plasma, in der LDL-, HDL- und VLDL-Fraktion, in der Leber und im Kot und die Konzentration an Cholesterin in den Erythrozyten wurden mittels Test Kits (ECOLINE 25, MERCK Eurolab GmbH) bestimmt.

Die Konzentration an Triglyceriden und Cholesterin in der Leber und im Kot wurde in den Gesamtextrakten ermittelt (Extraktion der Gesamtlipide s. 2.3.8.1). Die Konzentration an Cholesterin in den Erythrozyten wurden ebenfalls im Gesamtextrakt ermittelt (Extraktion der Gesamtlipide s. 2.3.8.1).

Nach der Extraktion der Gesamtlipide wurde ein Aliquot der Extrakte in einer Vakuumzentrifuge (Fa. Jouan, Frankreich) eingeeengt, mit 20 µl Triton X 100: Chloroform (1:1) versetzt und anschließend wieder eingeeengt. Danach wurde die Konzentration an Triglyceriden und Cholesterin in den Geweben mittels Test Kits (ECOLINE 25, MERCK Eurolab GmbH) analysiert.

Bei der Bestimmung der Konzentration der Triglyceride werden die Triglyceride durch Lipasen zu Glycerin und freien Fettsäuren hydrolysiert und das Glycerin weiter umgesetzt. Bei der Umsetzungsreaktion entsteht Wasserstoffperoxid welches in einer Peroxidase-katalysierten Reaktion zu einem farbigen Chinominin reagiert. Dieses Chinominin wird bei 500 nm spektralphotometrisch (Ultrospec 2000) ermittelt.

Bei der Bestimmung der Konzentration an Cholesterin wird das Cholesterin und seine Ester durch Detergentien freigesetzt und durch Cholinesterasen hydrolysiert. Bei einer anschließenden enzymatischen Oxidation entsteht Wasserstoffperoxid, welches zu einem farbigen Chinominin umgesetzt wird. Das Chinominin wird spektralphotometrisch bei 500 nm (Ultrospec 2000) gemessen.

Die Berechnung der Konzentration an Triglyceriden und Cholesterin erfolgte anhand folgender Formel:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = E_P \cdot \frac{\text{Konzentration}_{\text{Standard}}}{\text{Extinktion}_{\text{Standard}}}$$

E_P : Extinktion Probe

Die scheinbare Verdaulichkeit der Triglyceride wurde, wie die scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E, nach einer Formel nach KIRCHGESSNER (1986) errechnet (s. 2.3.2).

2.3.8.4 Trennung der Phospholipide

Die Phospholipidfraktionen wurden aus den Gesamtlipiden mittels Festphasenextraktion (LC-Si Säule, 3 ml, Supelclean, Supelco, Bellefonte, PA, U.S.A) nach einer Methode von SUZUKI et al. (1997) mit Modifikationen separiert.

Ein Aliquot der Extrakte wurde unter Stickstoff eingedampft. Die Neutrallipidfraktion wurde in 200 μl Aceton aufgenommen, auf die Festphasensäulchen aufgetragen und mit 2*2 ml Hexan:Isopropanol (80+20;v/v) eluiert. Die polaren Lipide wurden mit Chloroform:Methanol (2:1;v/v) extrahiert und auf die Festphasensäulchen aufgetragen. Die PE-Fraktion wurde mit 2*2 ml Chloroform:Methanol (2:1;v/v) eluiert, die PC-Fraktion mittels 3*2 ml Methanol.

Die Fettsäurezusammensetzung der Phospholipidfraktionen in der Leber wurden nach BUTTE (1983) (s. Kapitel 2.3.8.2) analysiert.

2.3.9 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt in Plasma, Lebercytosol und –homogenat, sowie im Erythrozytencytosol wurde als Bezugsgröße für verschiedene Meßwerte verwendet. Dazu wurde eine Methode zur Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951) mit Modifikationen angewendet.

Die Grundlage dieser Proteinbestimmungsmethode ist neben einer Biuret-Reaktion, die auf einer Kupferkomplexsalzbildung beruht, die Molybdänblau-Reaktion (RÖMMP-CHEMIELEXIKON 1985). Molybdän, welches als Folin-Reagenz dem Testsystem zugesetzt wird, reduziert durch die Tyrosin-, Tryptophan-, Cystein- und Histidinreste des Proteins zum kolloidalen Mischoxid. Die Reaktionsprodukte sind bei 540 nm spektralphotometrisch (Ultrospec 2000) meßbar.

Es wurden 0,2 ml Proteinlösung (Standard bzw. Probe) mit 0,2 ml Lösung A/B (Lösung A besteht aus Kalium-Natrium-Tartrat* 4 Wasser und Kupfersulfat*5 Wasser; Lösung B besteht aus Natriumcarbonat) für 10 min inkubiert. Anschließend wurde dem Testsystem 0,8 ml Folinlösung zugesetzt und es erfolgte eine Inkubation bei 55°C für 5 min. Die Extinktion wurde nach Abkühlung der Proben bei 650 nm erfaßt.

Die Berechnung der Proteinkonzentration in der Probe erfolgte anhand einer Eichreihe mit Bovinem Serum Albumin (BSA)-Standard (SIGMA-ALDRICH, Chemie GmbH).

2.3.10 Charakterisierung der Diäten

2.3.10.1 Bestimmung der Peroxidzahl

Die POZ bezeichnet die Menge an erfaßbarem aktiven Sauerstoff, die in 1 kg Probe enthalten ist. Sie wird in mEQO₂ je kg Probe angegeben. Die POZ in den eingesetzten Diätfetten und Diäten wurde nach einer Methode nach WHEELER (1932; wie in DGF-Einheitsmethoden 2001 angegeben) bestimmt.

Um die POZ in der Diät zu bestimmen, wurde zuerst das Fett aus den Diäten mit 30 ml Hexan:Isopropanol (3:2) extrahiert und anschließend bis zur Trockene eingeeengt. Im Diätfett wurde die POZ direkt bestimmt. Nach dem Lösen einer definierten Menge Fettprobe in 30 ml Eisessig/Chloroform (3+2) wurden dem Testsystem Jodidionen in Form von 4 ml Kaliumjodid zugesetzt. Die in der Probe vorhandenen Peroxide oxidieren die Jodidionen zu Jodmolekülen. Die gebildete Jodmenge wurde mit Natriumthiosulfat rücktitriert.

Die Menge der zur Titration, des freigesetzten Jods, benötigten Natriumthiosulfatlösung wird zur Berechnung der Konzentration der Peroxide verwendet.

Die POZ wurde mit folgender Formel berechnet:

$\text{POZ [mEQ O}_2\text{/kg Fett]} = \frac{(a-b) \cdot N \cdot 1000}{\text{Probe (g)}}$ <p>a: Verbrauch an Natriumthiosulfat (ml) Probe b: Verbrauch an Natriumthiosulfat (ml) Blindwert N: Normalität Natriumthiosulfatlösung</p>
--

2.3.10.2 Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes

Der Trockensubstanzgehalt der Proben wurde nach einer Methode von NAUMANN und BASSLER (1976) (VDLUFA-Methode) im „Wäge-Trocknungsverfahren“ bei 105°C, 3 Stunden ermittelt.

2.3.11 Statistische Auswertung und Ergebnisdarstellung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm MINITAB (Release 13, Minitab Ltd. USA).

Die Daten wurden mit Hilfe zweifaktorieller Varianzanalyse ausgewertet. Klassifikationsfaktoren waren die Vitamin E-Konzentration in der Diät, die Art des Diätfettes, sowie die Interaktion dieser Faktoren.

Die Signifikanz der Einflussfaktoren wurde mit dem F-Test ermittelt. Der multiple Mittelwertsvergleich erfolgte mit dem Fisher-Test.

Die Mittelwerte der verschiedenen Behandlungsgruppen sind mit den dazugehörigen Standardabweichungen im Ergebnisteil aufgeführt. In den Tabellen wurden die signifikanten Unterschiede der Mittelwerte und die Signifikanz der Einflussfaktoren Fett, Vitamin E und Fett*Vitamin E gekennzeichnet. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ als signifikant festgelegt.

Die Werte der Parameter Konzentration an Vitamin E in der Leber und der Konzentration an Vitamin E im Kot wurden, aufgrund der sehr unterschiedlichen Standardabweichungen zwischen den Behandlungsgruppen, vor dem multiplen Mittelwertsvergleich logarithmiert. In den Tabellen wurde die nicht logarithmierten Werte aufgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss der Vitamin E-Konzentrationen der Diät und der Art der Diätfette auf Futteraufnahme und Lebendmassezunahme der Tiere

Die Lebendmassezunahme und die Futteraufnahme der Tiere war im ersten Versuch unabhängig von der Vitamin E-Konzentration in der Diät und von der Art des eingesetzten Diätfettes (Tabelle 10).

Da die Tiere im zweiten Versuch restriktiv gefüttert wurden, war die durchschnittliche tägliche Futteraufnahme im Versuchszeitraum bei allen Gruppen identisch und lag bei 17,9 g pro Tier und Tag (Tabelle 11). Auch im zweiten Versuch war die Lebendmassezunahme unabhängig von der Art des Diätfettes und von der Vitamin E-Konzentration in der Diät.

3.2 Charakterisierung des antioxidativen Schutzsystems

Um das antioxidative Schutzsystem der Versuchstiere zu charakterisieren, wurde die Konzentration an α -Tocopherol in verschiedenen Geweben, die Konzentration an Vitamin C im Plasma und die Aktivität verschiedener antioxidativer Enzyme in der Leber und im Erythrozytencytosol bestimmt. Weiterhin wurde die Lag-Time der LDL nach Kupfer induzierter Oxidation bestimmt.

3.2.1 Einfluss der Vitamin E-Konzentrationen der Diät und der Art der Diätfette auf die Konzentration an α -Tocopherol in verschiedenen Geweben

Zur Bestimmung des Vitamin E-Status wurden die Konzentrationen an α -Tocopherol im Plasma, in den LDL, in der Leber, im Abdominalfett und in den Erythrozyten bestimmt (Tabellen 12 und 13).

Die Konzentration des α -Tocopherols in den Geweben war von der Höhe der Vitamin E-Zufuhr und von der Art des Diätfettes abhängig. Teilweise ergaben sich auch Interaktionen zwischen diesen Faktoren.

Tab. 10: Lebendmassezunahme und Futteraufnahme der Tiere im ersten Versuch

Diätfett	Lachsöl				Schweineschmalz			
	100	500	3.000	10.000	100	500	3.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]								
Lebendmasse Tag 1[g]	60,1 ± 1,4	59,1 ± 0,4	58,6 ± 0,4	57,9 ± 0,3	59,2 ± 0,2	58,3 ± 0,7	54,5 ± 6,1	58,2 ± 1,1
Lebendmasse Tag 56 [g]	446 ± 5	469 ± 17	455 ± 7	451 ± 6	436 ± 9	432 ± 10	436 ± 12	434 ± 25
Mittlere Lebendmassezunahme [g/Tag]	6,89±0,11	7,31 ± 0,28	7,08 ± 0,79	7,02 ± 0,88	6,72 ± 1,33	6,67 ± 2,31	6,81 ± 3,11	6,71±0,21
Mittlere Futteraufnahme [g/Tier/Tag]	18,7±0,2	19,1 ± 0,5	19,2 ± 0,3	18,9 ± 0,3	18,9 ± 0,4	18,9 ± 0,5	19,0 ± 0,8	18,7±0,2

IE: Internationale Einheiten

Tab. 11: Lebendmassezunahme der Tiere im zweiten Versuch

Diätfett	Lachsöl			Schweineschmalz		
	100	1.000	10.000	100	1.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]						
Lebendmasse Tag 1[g]	62,4 ± 4,2	61,7 ± 4,2	61,2 ± 4,2	61,0 ± 4,3	60,0 ± 4,4	59,4 ± 4,5
Lebendmasse Tag 56 [g]	361 ± 15	369 ± 14	362 ± 6	369 ± 17	372 ± 10	367 ± 12
Mittlere Lebendmassezunahme [g/Tag]	5,49 ± 0,25	5,48 ± 0,26	5,52 ± 0,11	5,66 ± 0,27	5,68 ± 0,27	5,63 ± 0,18

IE: Internationale Einheiten

Bei Fütterung von Schweineschmalz waren die Konzentrationen an α -Tocopherol in allen untersuchten Geweben in beiden Versuchen generell höher als bei Fütterung von Lachsöl.

Eine Steigerung der Vitamin E-Konzentration in der Diät führte in allen untersuchten Geweben zu einem Anstieg der Konzentration an α -Tocopherol. Jedoch war das Ausmaß des Konzentrationsanstieges in den einzelnen Geweben unterschiedlich. Durch eine Steigerung der Vitamin E-Konzentration von 100 auf 10.000 IE Vitamin E/kg Diät stiegen die Konzentrationen des α -Tocopherols in der Leber im ersten Versuch um den Faktor 10 (Lachsöl) bzw. 13 (Schweineschmalz) an und im zweiten Versuch um den Faktor 8,9 (Lachsöl) bzw. 8,7 (Schweineschmalz) an.

Im Plasma und in der LDL-Fraktion führte eine 100-fache Steigerung der Konzentration an Vitamin E (von 100 auf 10.000 IE Vitamin E/kg Diät) unabhängig von der Art des Diätfettes in beiden Versuchen hingegen lediglich zu einer Verdopplung der Konzentration an α -Tocopherol. Die Konzentration an α -Tocopherol in den Erythrozyten im zweiten Versuch stieg, bei einer Steigerung der Vitamin E-Konzentration von 100 auf 10.000 IE Vitamin E/kg Diät, lediglich um den Faktor 1,6 (Lachsöl) bzw. 1,4 (Schweineschmalz) an. Im Fettgewebe war der Anstieg der α -Tocopherolkonzentration bei Fütterung von Lachsöl (Faktor 5,5 im ersten Versuch, Faktor 4,2 im zweiten Versuch) sogar stärker als bei Fütterung von Schweineschmalz (Faktor 3,4 im ersten Versuch, Faktor 2,6 im zweiten Versuch).

Tab. 12: α -Tocopherolkonzentrationen verschiedener Gewebe im ersten Versuch

Diätfett	Lachsöl				Schweineschmalz			
	100	500	3.000	10.000	100	500	3.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]								
LDL [nmol/ml] ^{1,2}	8,79 ± 3,61 ^c	10,7 ± 3,8 ^{bc}	11,9 ± 2,8 ^{bc}	15,9 ± 4,9 ^b	13,5 ± 3,9 ^{bc}	17,3 ± 10 ^b	22,4 ± 9,7 ^a	25,5 ± 13,3 ^a
Plasma [nmol/ml] ^{1,2}	13,9 ± 3,7 ^c	22,6 ± 6,7 ^{bc}	23,6 ± 6,4 ^{bc}	30,1 ± 5,9 ^b	29,9 ± 6,1 ^b	38,6 ± 8,4 ^{ab}	50,1 ± 2,2 ^a	58,9 ± 17,6 ^a
Leber [nmol/g] ^{1,2,3}	74,6 ± 24,8 ^g	202 ± 56 ^e	215 ± 36 ^e	756 ± 189 ^c	138 ± 39 ^f	396 ± 73 ^d	1235 ± 171 ^b	1807 ± 284 ^a
Fettgewebe [nmol/g] ^{1,2}	104 ± 24 ^d	134 ± 41 ^{cd}	235 ± 57 ^c	575 ± 70 ^a	173 ± 35 ^c	193 ± 38 ^c	318 ± 45 ^b	588 ± 46 ^a

a,b,c,d,e,f,g: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich mit Fisher-Test ($p < 0,05$), 1,2,3: Signifikanz der Faktoren ($p < 0,05$): 1-Fett, 2-Vitamin E, 3-Fett*Vitamin E; IE: Internationale Einheiten, LDL: Lipoproteine geringer Dichte (Low Density Lipoprotein)

Tab. 13: α -Tocopherolkonzentrationen verschiedener Gewebe im zweiten Versuch

Diätfett	Lachsöl			Schweineschmalz		
	100	1.000	10.000	100	1.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]						
LDL [nmol/ml] ^{1,2,3}	10,6 ± 2,4 ^d	15,6 ± 5,8 ^c	17,8 ± 6,3 ^c	15,8 ± 3,2 ^c	23,2 ± 7,5 ^b	33,2 ± 8,3 ^a
Plasma [nmol/ml] ^{1,2,3}	17,5 ± 8,4 ^c	24,4 ± 8,9 ^{bc}	31,6 ± 7,5 ^b	26,8 ± 7,8 ^b	33,2 ± 9,2 ^b	58,5 ± 7,4 ^a
Erythrozyten [nmol/ml] ^{1,2}	5,70 ± 1,81 ^c	8,60 ± 2,32 ^b	9,20 ± 2,31 ^b	8,90 ± 1,61 ^b	10,2 ± 2,9 ^{ab}	12,3 ± 2,9 ^a
Leber [nmol/g] ^{1,2}	94,6 ± 10,8 ^d	368 ± 12 ^c	846 ± 85 ^b	148 ± 45 ^d	479 ± 21 ^c	1288 ± 157 ^a
Fettgewebe [nmol/g] ^{1,2,3}	55,7 ± 12,5 ^d	120 ± 56 ^c	235 ± 88 ^{ab}	123 ± 38 ^c	186 ± 47 ^b	324 ± 124 ^a

a,b,c,d: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich mit Fisher-Test ($p < 0,05$), 1,2,3: Signifikanz der Faktoren ($p < 0,05$): 1-Fett, 2-Vitamin E, 3-Fett*Vitamin; IE: Internationale Einheiten, LDL: Lipoproteine geringer Dichte (Low Density Lipoprotein)

3.2.2 Einfluss der Vitamin E-Konzentrationen der Diät und der Art der Diätfette auf die Konzentration an α -Tocopherol im Kot und die scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E

Mit steigender Vitamin E-Zulage in der Diät stieg auch die Konzentration an α -Tocopherol im Kot unabhängig vom eingesetzten Diätfett signifikant an (Tabelle 14). Im Kot der Tiere, deren Diät 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, war die Konzentration an α -Tocopherol um das 200-fache höher als im Kot der Tiere, deren Diät 100 IE Vitamin E/kg Diät enthielt.

Die scheinbare Verdaulichkeit lag zwischen 70-90 %. Auf die scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E hatte nur die Vitamin E-Konzentration in der Diät einen signifikanten Einfluss, nicht jedoch die Art des eingesetzten Diätfettes (Tabelle 14).

Bei den Gruppen, die mit der Diät 10.000 IE Vitamin E/kg Diät erhielten, war die scheinbare Verdaulichkeit niedriger als bei den Gruppen, deren Diät 100 IE Vitamin E/kg Diät enthielt. Zwischen den Gruppen, deren Diäten 1.000 bzw. 100 IE Vitamin E/kg Diät enthielten, bestanden keine signifikanten Unterschiede in der scheinbaren Verdaulichkeit von Vitamin E.

Tab. 14: α -Tocopherolkonzentration im Kot und scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E im zweiten Versuch

Diätfett	Lachsöl			Schweineschmalz		
	100	1.000	10.000	100	1.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]						
α-Tocopherolkonzentration im Kot [$\mu\text{mol/g}$ Kot]						
4. Woche ¹	0,22 \pm 0,09 ^c	2,69 \pm 0,16 ^b	44,9 \pm 2,2 ^a	0,25 \pm 0,10 ^c	1,59 \pm 0,37 ^b	39,6 \pm 9,5 ^a
8. Woche ¹	0,17 \pm 0,04 ^c	1,98 \pm 0,33 ^b	39,1 \pm 1,3 ^a	0,22 \pm 0,04 ^c	1,10 \pm 0,17 ^b	33,5 \pm 10,9 ^a
scheinbare Verdaulichkeit [%]						
4. Woche ¹	86,3 \pm 6,5 ^a	83,7 \pm 7,2 ^a	73,4 \pm 12,7 ^b	83,8 \pm 6,0 ^a	89,5 \pm 2,5 ^a	73,8 \pm 6,3 ^b
8. Woche ¹	89,5 \pm 9,0 ^a	88,2 \pm 3,7 ^a	74,6 \pm 17,2 ^b	82,4 \pm 4,3 ^{ab}	91,6 \pm 1,8 ^a	74,8 \pm 7,5 ^b

a,b,c: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich mit Fisher-Test ($p < 0,05$), 1: Signifikanz der Faktoren ($p < 0,05$): 1-Vitamin E, IE: Internationale Einheiten

3.2.3 Einfluss der Vitamin E-Konzentrationen der Diät und der Art der Diätfette auf die Konzentration an Ascorbinsäure (Vitamin C) im Plasma

Die Konzentration an Ascorbinsäure im Plasma wurde signifikant durch die Art des eingesetzten Diätfettes und durch die Höhe der Vitamin E-Zufuhr beeinflusst (Tabelle 15).

Bei den Tieren, deren Diät Schweineschmalz enthielt, war die Konzentration an Ascorbinsäure im Plasma höher als bei den Tieren, deren Diät Lachsöl enthielt. Bei beiden eingesetzten Diätfetten bestanden zwischen den Gruppen, deren Diäten 100 bzw. 1.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielten, keine Unterschiede in der Konzentration an Ascorbinsäure im Plasma. Bei den Gruppen, deren Diäten 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielten, war die Konzentration der Ascorbinsäure im Plasma hingegen nominal um 10 % (Schweineschmalz) bzw. 20 % (Lachsöl) höher als bei den Tieren, deren Diät 100 IE Vitamin E/kg Diät enthielt.

3.2.4 Einfluss der Vitamin E-Konzentrationen der Diät und der Art der Diätfette auf die Enzyme des antioxidativen Schutzsystems und auf die Konzentration an Glutathion

Weitere Parameter zur Charakterisierung des antioxidativen Schutzsystems waren die Aktivität der antioxidativen Enzyme SOD und Katalase in der Leber und in den Erythrozyten, die Aktivität der GSH-Px in Plasma, Leber und Erythrozyten, die Aktivität der G-6-P-DH in den Erythrozyten, sowie die Konzentration an GSH in der Leber und in den Erythrozyten.

3.2.4.1 Aktivität der Enzyme Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase in der Leber

Die Aktivitäten der antioxidativen Enzyme SOD, GSH-Px und Katalase in der Leber wurden im unterschiedlichen Maße durch die Konzentrationen an Vitamin E in der Diät und durch die Art des Diätfettes beeinflusst (Tabelle 16).

Tab. 15: Ascorbinsäure-Konzentration im Plasma im zweiten Versuch

Diätfett	Lachsöl			Schweineschmalz		
Vitamin E [IE/kg Diät]	100	1.000	10.000	100	1.000	10.000
Ascorbinsäure [nmol/ml]^{1,2}	47,4 ± 14,3 ^b	44,6 ± 12,1 ^b	57,7 ± 8,1 ^{ab}	64,1 ± 13,2 ^a	63,7 ± 7,7 ^a	70,6 ± 15,2 ^a

a,b: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich mit Fisher-Test (p<0,05), 1,2: Signifikanz der Faktoren (p<0,05): 1-Fett, 2-Vitamin E; IE: Internationale Einheiten

Tab. 16: Aktivität antioxidativer Enzyme und Konzentration von Glutathion in der Leber und Aktivität der Glutathionperoxidase im Plasma im ersten Versuch

Diätfett	Lachsöl				Schweineschmalz			
Vitamin E [IE/kg Diät]	100	500	3.000	10.000	100	500	3.000	10.000
Aktivität antioxidativer Enzyme in der Leber [U/mg Protein]								
SOD²	78,8 ± 30,6 ^a	61,3 ± 30,8 ^{ab}	45,8 ± 16,5 ^b	40,5 ± 15,9 ^b	61,8 ± 15,9 ^{ab}	65,4 ± 21,4 ^a	65,6 ± 18,4 ^a	43,1 ± 12,9 ^b
GSH-Px^{2,3}	0,56 ± 0,11 ^a	0,36 ± 0,15 ^b	0,41 ± 0,06 ^b	0,61 ± 0,17 ^a	0,52 ± 0,11 ^{ab}	0,58 ± 0,12 ^a	0,59 ± 0,17 ^a	0,60 ± 0,09 ^a
Katalase²	512 ± 135 ^{ab}	413 ± 154 ^b	520 ± 60 ^{ab}	554 ± 100 ^a	459 ± 52 ^{ab}	435 ± 95 ^b	540 ± 125 ^{ab}	490 ± 44 ^{ab}
Konzentration von GSH [µmol/g Leber]								
GSH^{1,2,3}	6,33 ± 0,71 ^a	6,85 ± 1,42 ^a	4,61 ± 1,18 ^{bc}	5,32 ± 1,19 ^b	3,83 ± 1,29 ^c	3,89 ± 1,06 ^c	3,78 ± 0,88 ^c	3,82 ± 0,61 ^c
Aktivität antioxidativer Enzyme im Plasma [U/mg Protein]								
GSH-Px	0,17 ± 0,06	0,21 ± 0,050	0,22 ± 0,08	0,22 ± 0,08	0,18 ± 0,07	0,22 ± 0,05	0,19 ± 0,07	0,22 ± 0,07

a,b,c: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich mit Fisher-Test (p<0,05), 1,2,3: Signifikanz der Faktoren (p<0,05): 1-Fett, 2-Vitamin E, 3-Fett*Vitamin E; IE: Internationale Einheiten; GSH-Px: Glutathionperoxidase; SOD: Superoxiddismutase; GSH: Glutathion; U: 1 µmol umgesetztes Substrat pro Minute

Die Aktivität der SOD in der Leber wurde durch den Faktor Vitamin E-Konzentration in der Diät beeinflusst.

Die Aktivität der SOD war bei den Tieren, deren Diät Lachsöl und 3.000 bzw. 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, signifikant um 42 % bzw. 49 % geringer als bei den Tieren, deren Diät Lachsöl und 100 IE Vitamin E/kg Diät enthielt. Bei den Gruppen, deren Diäten Lachsöl und 100 bzw. 500 IE Vitamin E/kg Diät enthielten, bestanden keine Unterschiede in der Aktivität der SOD.

Auch bei den Tieren, deren Diät Schweineschmalz und 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, war die Aktivität der SOD signifikant um ca. 35 % geringer als bei den Gruppen, deren Diät Schweineschmalz und 500 bzw. 3.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt. Zwischen den Gruppen, deren Diäten Schweineschmalz und 100, 500 bzw. 3.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielten, bestanden keine Unterschiede in der Aktivität der SOD in der Leber.

Die Aktivität der GSH-Px in der Leber wurde durch den Faktor Vitamin E-Konzentration in der Diät beeinflusst. Außerdem bestand eine Interaktion der Faktoren Art des Diätfettes und Vitamin E-Konzentration in der Diät.

Bei den Gruppen, deren Diäten 500 bzw. 3.000 IE Vitamin E/kg Diät und Lachsöl enthielten, war die Aktivität der GSH-Px geringer als bei den Gruppen, deren Diät 100 bzw. 10.000 IE Vitamin E/kg Diät und Lachsöl enthielt. Zwischen den Gruppen, deren Diäten 100 bzw. 10.000 IE Vitamin E/kg Diät und Lachsöl enthielten, bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität der GSH-Px.

Bei Fütterung von Schweineschmalz als Diätfett hatten die verschiedenen Vitamin E-Konzentrationen in der Diät keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der GSH-Px.

Die Aktivität der Katalase wurde durch den Faktor Vitamin E-Konzentration der Diät beeinflusst.

Bei den Tieren, deren Diät Lachsöl und 500 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, war die Aktivität der Katalase um ca. 26 % geringer als bei den Tieren, deren Diät Lachsöl und 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt. Zwischen den Gruppen, deren Diäten Lachsöl und 100, 3.000 bzw. 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielten, bestanden keine Unterschiede in der Aktivität der Katalase.

Bei den Tieren, deren Diät Schweineschmalz enthielt, hatten die verschiedenen Vitamin E-Konzentrationen in der Diät keinen Effekt auf die Aktivität der Katalase.

3.2.4.2 Konzentration an Glutathion in der Leber

Die Konzentration an GSH in der Leber war von der Art des eingesetzten Diätfettes abhängig (Tabelle 16). Außerdem bestand eine Interaktion der Faktoren Art des Diätfettes und Vitamin E-Konzentration in der Diät. Die Vitamin E-Konzentrationen in der Diät hatten nur bei den Gruppen, deren Diät Lachsöl enthielt, einen signifikanten Einfluss auf die Konzentration an GSH.

Bei den Ratten, die Lachsöl als Diätfett erhielten, war die Konzentrationen an GSH in der Leber höher als bei den Ratten, die Schweineschmalz als Diätfett erhielten.

Bei den Gruppen, deren Diät Lachsöl und 3.000 bzw. 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, war die Konzentration an GSH signifikant um ca. 20-30 % geringer als bei den Gruppen, deren Diät Lachsöl als Diätfett und 100 bzw. 500 IE Vitamin E/kg Diät enthielt. Zwischen den Vitamin E-Zulagestufen 100 und 500 IE Vitamin E/kg Diät bzw. zwischen 3.000 und 10.000 IE Vitamin E/kg Diät bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration an GSH.

Die Konzentration an GSH wurde bei den Gruppen, die Schweineschmalz mit der Diät erhielten, nicht durch die verschiedenen Vitamin E-Zulagen mit der Diät beeinflusst.

3.2.4.3 Aktivität der Glutathionperoxidase im Plasma

Auf die Aktivität der GSH-Px im Plasma hatte weder die Art des eingesetzten Diätfettes, noch die Vitamin E-Konzentration in der Diät einen signifikanten Einfluss (Tabelle 16).

3.2.4.4 Aktivität der antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase im Erythrozytencytosol

Bei den Aktivitäten der antioxidativen Enzyme SOD, GSH-Px und Katalase im Erythrozytencytosol bestand eine Interaktion der Faktoren Vitamin E-Konzentration in der Diät und Art der eingesetzten Diätfette (Tabelle 17).

Bei den Ratten, deren Diät Lachsöl als Diätfett enthielt, sank die Aktivität der SOD bei einer Steigerung der Vitamin E-Zufuhr von 100 auf 10.000 IE Vitamin E/kg Diät signifikant um ca. 33 % ab.

Im Gegensatz dazu war bei den Gruppen, die Schweineschmalz als Diätfett erhielten, die Aktivität der SOD unabhängig von der Vitamin E-Konzentration in der Diät.

Auch die Aktivität der GSH-Px war bei den Tieren, deren Diät Lachsöl als Diätfett und 1.000 bzw. 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, ca. 42 % bzw. 60 % niedriger als bei den Tieren, deren Diät Lachsöl und 100 IE Vitamin E/kg Diät enthielt.

Jedoch hatten die verschiedenen Vitamin E-Konzentrationen in der Diät bei den Gruppen, die Schweineschmalz als Diätfett erhielten, keine signifikanten Effekte auf die Aktivität der GSH-Px im Erythrozytencytosol.

Die Aktivität der Katalase war bei den Gruppen, deren Diät Lachsöl und 1.000 bzw. 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, ca. 51 % bzw. 70 % geringer als bei der Gruppe, deren Diät 100 IE Vitamin E/kg Diät enthielt.

Im Gegensatz dazu hatten die verschiedenen Vitamin E-Konzentrationen bei den Gruppen, deren Diät Schweineschmalz enthielt, keinen Effekt auf die Aktivität der Katalase.

3.2.4.5 Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase im Erythrozytencytosol

Sowohl die Art des eingesetzten Diätfettes, als auch die Vitamin E-Konzentration in der Diät hatte einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der G-6-P-DH im Erythrozytencytosol (Tabelle 17).

Bei der Gruppe, deren Diät Lachsöl und 100 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, war die Aktivität der G-6-P-DH im Erythrozytencytosol am höchsten. Sie sank jedoch mit steigender Vitamin E-Zulage in der Diät signifikant um ca. 39 % ab.

Im Gegensatz dazu hatten die Vitamin E-Konzentrationen in der Diät bei den Gruppen, die Schweineschmalz als Diätfett enthielten, keine signifikanten Effekte auf die Aktivität der G-6-P-DH.

3.2.4.6 Konzentration an Glutathion im Erythrozytencytosol

Die Konzentration an GSH im Erythrozytencytosol wurde signifikant durch die Art des Diätfettes und durch die Vitamin E-Konzentration in der Diät beeinflusst. Außerdem bestand eine Interaktion der Faktoren Art des Diätfettes und Vitamin E-Konzentration in der Diät (Tabelle 17).

Die Konzentration an GSH war insgesamt bei den Tieren, deren Diät Schweineschmalz enthielt, höher als bei den Tieren, deren Diät Lachsöl enthielt.

Bei den Gruppen, deren Diät Schweineschmalz enthielt, war die Konzentration an GSH bei der Gruppe, deren Diät 1.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, ca. 30 % höher als bei den Gruppen, deren Diät 100 bzw. 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielten. Zwischen den Ratten, die mit der Diät 100 bzw. 10.000 IE Vitamin E/kg Diät erhielten, bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration an GSH im Erythrozytencytosol.

Bei den Gruppen, die Lachsöl als Diätfett und 10.000 IE Vitamin E/kg Diät erhielten, war die Konzentration an GSH um ca. 35 % geringer als bei den Gruppen, die Lachsöl und 100 bzw. 1.000 IE Vitamin E/kg Diät erhielten. Zwischen den Gruppen, deren Diät Lachsöl und 1.000 bzw. 100 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration an GSH.

Tab. 17: Aktivität antioxidativer Enzyme und Konzentration von Glutathion im Erythrozytencytosol

Diätfett	Lachsöl			Schweineschmalz		
	100	1.000	10.000	100	1.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]						
Aktivität antioxidativer Enzyme [U/mg Protein]						
SOD ³	5,29 ± 1,47 ^a	4,52 ± 1,62 ^{ab}	3,59 ± 0,76 ^b	5,67 ± 1,27 ^a	4,78 ± 1,29 ^{ab}	6,08 ± 1,55 ^a
GSH-Px ³	1,32 ± 0,52 ^a	0,77 ± 0,33 ^b	0,55 ± 0,08 ^b	0,82 ± 0,24 ^{ab}	0,94 ± 0,53 ^{ab}	0,98 ± 0,39 ^{ab}
Katalase ³	273 ± 96 ^a	133 ± 69 ^b	82,7 ± 25,6 ^b	88,2 ± 28,7 ^b	153 ± 99 ^b	165 ± 97 ^b
G-6-P-DH ^{1,2}	17,7 ± 6,7 ^a	12,0 ± 4,7 ^b	10,8 ± 4,0 ^b	9,95 ± 4,75 ^b	9,72 ± 3,61 ^b	8,54 ± 3,76 ^b
Konzentration an GSH [µmol/g Protein]						
GSH ^{1,2,3}	9,30 ± 2,81 ^b	9,92 ± 2,75 ^b	6,20 ± 1,39 ^c	10,8 ± 2,7 ^b	14,4 ± 3,0 ^a	11,4 ± 2,7 ^{ab}

a,b,c: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test ($p < 0,05$), 1,2,3: Signifikanz der Faktoren ($p < 0,05$): 1-Fett, 2-Vitamin E, 3-Fett*Vitamin E; IE: Internationale Einheiten; GSH-Px: Glutathionperoxidase; SOD: Superoxiddismutase; G-6-P-DH: Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase; GSH: Glutathion, U: 1µmol umgesetztes Substrat pro Minute

3.2.5 Lag-Time und maximale Konzentration an konjugierten Dienen nach Kupfer-induzierter Oxidation der Lipoproteine geringer Dichte

Die Lag-Time nach Kupfer-induzierter Oxidation der LDL-Fraktion wurde in beiden Versuchen durch die Art des eingesetzten Diätfettes beeinflusst (Tabellen 18 und 19).

In beiden Versuchen war bei den Gruppen, deren Diät Schweineschmalz enthielt, die Lag-Time um das 2 bis 3-fache länger, als bei den Gruppen, deren Diät Lachsöl enthielt.

Im ersten Versuch war die Lag-Time des LDL bei den Gruppen, deren Diät Schweineschmalz und 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, ca. 20 % kürzer als bei den Gruppen, deren Diät Schweineschmalz und 500 bzw. 3.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt (Tabelle 18). Zwischen den Gruppen, deren Diät Schweineschmalz und 100, 500 bzw. 3.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, bestanden keine Unterschiede in der Lag-Time.

Bei den Ratten, deren Diät Lachsöl enthielt, hatten die verschiedenen Vitamin E-Konzentrationen in der Diät keinen Effekt auf die Lag-Time der LDL.

Im zweiten Versuch hatte die Höhe der Vitamin E-Zufuhr keinen Einfluss auf die Lag-Time der LDL (Tabelle 19).

Die maximale Konzentration an konjugierten Dienen in der LDL-Fraktion wurde in beiden Versuchen weder durch die Art des verwendeten Diätfettes, noch durch die Vitamin E-Konzentration in der Diät beeinflusst (Tabelle 18, Tabelle 19).

Tab. 18: Lag-Time und maximale Konzentration der konjugierten Diene nach Kupfer-induzierter Oxidation der Lipoproteine geringer Dichte im ersten Versuch

Diätfett	Lachsöl				Schweineschmalz			
	100	500	3.000	10.000	100	500	3.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]								
Kupfer-induzierten Oxidation des LDL								
Lag-Time [min] ¹	28,6 ± 8,8 ^c	27,4 ± 6,7 ^c	27,6 ± 7,1 ^c	18,9 ± 7,7 ^c	55,7 ± 11,7 ^{ab}	68,4 ± 10,7 ^a	65,3 ± 21,9 ^a	52,4 ± 13,4 ^b
maximale Konzentration an konjugierten Dienem [µmol/g Protein]								
Diene	0,26 ± 0,13	0,30 ± 0,16	0,27 ± 0,11	0,27 ± 0,12	0,34 ± 0,14	0,28 ± 0,14	0,30 ± 0,07	0,34 ± 0,13

a,b,c: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich mit Fisher-Test ($p < 0,05$), 1,2,3: Signifikanz der Faktoren ($p < 0,05$): 1-Fett, 2-Vitamin E, 3-Fett*Vitamin E; IE: Internationale Einheiten; LDL: Lipoproteine geringer Dichte (Low Density Lipoprotein)

Tab. 19: Lag-Time und maximale Konzentration der konjugierten Diene nach Kupfer-induzierter Oxidation der Lipoproteine geringer Dichte im zweiten Versuch

Diätfett	Lachsöl			Schweineschmalz		
	100	1.000	10.000	100	1.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]						
Kupfer-induzierten Oxidation des LDL						
Lag-Time [min] ¹	15,8 ± 9,8 ^b	17,5 ± 5,1 ^b	14,4 ± 5,9 ^b	46,4 ± 18,5 ^a	49,9 ± 9,7 ^a	50,7 ± 12,8 ^a
maximale Konzentration an konjugierten Dienem [µmol/g Protein]						
Diene	0,24 ± 0,07	0,23 ± 0,07	0,24 ± 0,08	0,25 ± 0,07	0,20 ± 0,09	0,19 ± 0,06

a,b: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich mit ANOVA-Fisher-Test ($p < 0,05$), 1: Signifikanz der Faktoren ($p < 0,05$): 1-Fett; IE: Internationale Einheiten; LDL: Lipoproteine geringer Dichte (Low Density Lipoprotein)

3.3 Einfluss der Vitamin E-Konzentrationen der Diät und der Art der Diätfette auf Marker der Lipidperoxidation

Als Marker der Lipidperoxidation wurde die Konzentration an TBARS in verschiedenen Geweben, sowie die Konzentration an 7- β -OH-Cholesterol in der Leber bestimmt.

3.3.1 Konzentration an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen im Plasma

Die Art des eingesetzten Diätfettes und die Vitamin E-Konzentration in der Diät hatte einen signifikanten Einfluss auf die Konzentration an TBARS im Plasma (Tabelle 20). Außerdem bestand eine Interaktion der Faktoren Vitamin E-Konzentration in der Diät und Art des Diätfettes.

Im Plasma der Tiere, deren Diät Schweineschmalz enthielt, war die Konzentration an TBARS niedriger als im Plasma der Tiere, deren Diät Lachsöl enthielt.

Bei Fütterung von Schweineschmalz hatten jedoch die verschiedenen Vitamin E-Konzentrationen in der Diät keinen Effekt auf die Konzentration an TBARS im Plasma.

Bei Fütterung von Lachsöl hingegen führte eine Steigerung der Vitamin E-Zufuhr von 100 IE Vitamin E/kg Diät auf 500, 3.000 bzw. 10.000 IE Vitamin E/kg Diät zu einer ca. um die Hälfte niedrigeren Konzentration an TBARS im Plasma.

3.3.2 Konzentration an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen in der Leber

Entsprechend zweifaktorieller Varianzanalyse hatte die Art des eingesetzten Diätfettes und die Vitamin E-Konzentration in der Diät einen signifikanten Einfluss auf die Konzentration an TBARS in der Leber (Tabelle 21).

Insgesamt war die Konzentration an TBARS in der Leber der Ratten, deren Diät Lachsöl enthielt, höher als in der Leber der Ratten, die mit der Diät Schweineschmalz erhielten.

Die Konzentration an TBARS war in der Leber der Ratten, deren Diät Lachsöl und 100 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, am höchsten. Die Konzentration an TBARS sank bei den Gruppen, die Lachsöl mit der Diät erhielten, mit zunehmender Vitamin E-Konzentration in der Diät um ca. 30 % ab.

Bei den Tieren, deren Diät Schweineschmalz enthielt, hatten die verschiedenen Vitamin E-Konzentrationen in der Diät keinen Effekt auf die Konzentration an TBARS in der Leber.

3.3.3 Konzentration an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen im Erythrozyten-cytosol

Die Konzentration der TBARS im Erythrozyten-cytosol wurde entsprechend ANOVA weder durch das eingesetzte Diätfett, noch durch die Vitamin E-Konzentration in der Diät signifikant beeinflusst (Tabelle 21).

Jedoch war die Konzentration der TBARS bei den Ratten, deren Diät Lachsöl und 100 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, nominal höher im Vergleich zu den Ratten, deren Diäten Lachsöl und 1.000 bzw. 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielten. Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant.

Bei Fütterung von Schweineschmalz als Diätfett war die Konzentration an TBARS unabhängig von der Höhe der Vitamin E-Zufuhr.

3.3.4 Konzentration an 7- β -Hydroxycholesterol in der Leber

Sowohl der Faktor Diätfett, als auch die Vitamin E-Konzentration in der Diät hatten einen signifikanten Effekt auf die Konzentration an 7- β -OH-Cholesterol in der Leber (Tabelle 21).

Bei den Gruppen, deren Diät Lachsöl als Diätfett enthielt, war die Konzentration an 7- β -OH-Cholesterol in der Leber höher als bei den Gruppen, deren Diät Schweineschmalz als Diätfett enthielt.

Bei beiden eingesetzten Diätfetten war die Konzentration an 7- β -OH-Cholesterol bei den Gruppen, deren Diät 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, um ca. 50 % niedriger als bei den Gruppen, deren Diät 100 bzw. 1.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt.

Tab. 20: Konzentration an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen im Plasma im ersten Versuch

Diätfett	Lachsöl				Schweineschmalz			
	100	500	3.000	10.000	100	500	3.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]								
Konzentration an TBARS [nmol/l]								
TBARS ^{1,2,3}	2,33 ± 0,51 ^a	1,19 ± 0,53 ^b	1,01 ± 0,36 ^b	1,00 ± 0,38 ^b	0,58 ± 0,24 ^c	0,51 ± 0,14 ^c	0,41 ± 0,12 ^c	0,49 ± 0,11 ^c

a,b,c: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich mit Fisher-Test ($p < 0,05$), 1,2,3: Signifikanz der Faktoren ($p < 0,05$): 1-Fett, 2-Vitamin E, 3-Fett*Vitamin E; IE: Internationale Einheiten; TBARS: Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen

Tab. 21: Konzentration an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen in der Leber und in den Erythrozyten und an 7- β -Hydroxy-cholesterol in der Leber im zweiten Versuch

Diätfett	Lachsöl			Schweineschmalz		
	100	1.000	10.000	100	1.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]						
Konzentration an TBARS [nmol/g Protein]						
TBARS (Erythrozyten)	43,4 ± 13,9	31,4 ± 10,3	32,0 ± 7,6	37,9 ± 11,5	39,8 ± 18,3	36,7 ± 10,3
TBARS (Leber) ^{1,2}	12,9 ± 1,6 ^a	11,5 ± 1,4 ^{ab}	10,8 ± 1,4 ^b	10,3 ± 1,5 ^b	10,7 ± 1,5 ^b	9,8 ± 0,8 ^b
Konzentration an 7-β-OH-Cholesterol [μg/g Leber]						
7-β-OH-Cholesterol ^{1,2}	2,04 ± 0,64 ^a	1,68 ± 0,59 ^a	0,94 ± 0,52 ^b	0,94 ± 0,41 ^b	1,02 ± 0,29 ^b	0,47 ± 0,16 ^c

a,b,c: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich mit Fisher-Test ($p < 0,05$), 1,2: Signifikanz der Faktoren ($p < 0,05$): 1-Fett, 2-Vitamin E; IE: Internationale Einheiten; TBARS: Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen, 7- β -OH-Cholesterol: 7- β -Hydroxy-Cholesterol

3.4 Einfluss der Vitamin E-Konzentrationen der Diät und der Art der Diätfette auf die Hämolyse neigung der Erythrozyten

Als Parameter zur Charakterisierung der Hämolyse neigung der Erythrozyten dienten sowohl die *in vitro*-Hämolyse neigung der Erythrozyten in hypotonen Kochsalzlösungen, als auch die Konzentration an freiem Hb und die Hp-Bindungs kapazität, sowie die Aktivität der LDH und der sauren Phosphatase im Plasma.

3.4.1 Hämolyse neigung der Erythrozyten in hypotonen Kochsalzlösungen

Bei der Hämolyse neigung der Erythrozyten bestand bei einer NaCl-Konzentration von 0,38 % eine Interaktion des Faktors Vitamin E-Konzentration in der Diät und der Art des Diätfettes (Tabelle 22).

Bei den anderen verwendeten NaCl-Konzentrationen konnte aufgrund der hohen Standardabweichung die Signifikanz dieser Faktoren nicht statistisch gesichert werden. Tendentiell ($p < 0,15$) bestanden Interaktionen der Faktoren Diätfett und Vitamin E-Konzentration in der Diät.

Bei einer NaCl-Konzentration von 0,38 % war der Anteil der hämolysierten Erythrozyten bei den Gruppen, deren Diät Schweineschmalz enthielt, höher als bei den Gruppen, deren Diät Lachsöl enthielt.

Bei den Gruppen, deren Diät Lachsöl enthielt, führte eine Zunahme der Vitamin E-Konzentration in der Diät bei allen verwendeten NaCl-Konzentrationen in der Regel zu einem signifikanten Anstieg der hämolysierten Erythrozyten.

Im Gegensatz dazu hatten die verschiedenen Vitamin E-Konzentrationen bei den Gruppen, deren Diät Schweineschmalz als Diätfett enthielt, bei allen verwendeten NaCl-Konzentrationen keinen Effekt auf den Anteil an hämolysierten Erythrozyten.

Tab. 22: Hämolyseresistenz der Erythrozyten in hypotonen Natriumchloridlösungen im ersten Versuch

Diätfett	Lachsöl				Schweineschmalz			
	100	500	3.000	10.000	100	500	3.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]								
Anteil der hämolysierten Erythrozyten [%]								
NaCl 0,38 % ¹	62,9 ± 25,8 ^b	68,3 ± 14,9 ^b	73,4 ± 22,2 ^{ab}	89,4 ± 12,8 ^a	83,3 ± 17,3 ^a	87,0 ± 15,9 ^a	80,3 ± 14,0 ^a	83,6 ± 10,0 ^a
NaCl 0,405 %	54,4 ± 26,7 ^b	58,4 ± 16,9 ^{ab}	62,9 ± 20,2 ^{ab}	74,1 ± 19,5 ^a	63,7 ± 21,5 ^a	68,0 ± 14,4 ^a	63,1 ± 18,4 ^a	68,1 ± 9,5 ^a
NaCl 0,43 %	24,9 ± 20,8 ^b	29,3 ± 15,2 ^b	26,3 ± 12,8 ^b	43,3 ± 20,6 ^a	25,9 ± 10,1 ^b	30,5 ± 22,4 ^b	27,3 ± 22,8 ^b	36,5 ± 10,2 ^{ab}
NaCl 0,455 %	11,5 ± 10,4 ^b	14,4 ± 7,1 ^b	16,9 ± 11,6 ^{ab}	27,8 ± 22,6 ^a	11,4 ± 9,8 ^b	13,0 ± 6,5 ^b	9,81 ± 11,0 ^b	14,5 ± 7,2 ^b

a,b: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich mit Fisher-Test ($p < 0,05$), 1: Signifikanz der Faktoren ($p < 0,05$): 1- Fett*Vitamin E; IE: Internationale Einheiten; NaCl: Natriumchloridlösung

Tab. 23: Konzentration der Hämolysemarker im Plasma im zweiten Versuch

Diätfett	Lachsöl			Schweineschmalz		
	100	1.000	10.000	100	1.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]						
freies Hb [mg/dl Plasma] ^{1,2}	25,4 ± 14,7 ^a	13,6 ± 6,0 ^b	25,9 ± 14,6 ^a	17,9 ± 8,1 ^{ab}	12,7 ± 2,6 ^b	12,2 ± 5,4 ^b
saure Phosphatase [U/g Protein] ³	0,47 ± 0,17 ^b	0,66 ± 0,20 ^a	0,76 ± 0,16 ^a	0,63 ± 0,19 ^a	0,49 ± 0,14 ^b	0,49 ± 0,10 ^b
LDH [U/g Protein] ³	4,20 ± 1,09 ^b	6,89 ± 2,48 ^a	6,17 ± 1,39 ^a	6,19 ± 1,00 ^a	5,61 ± 2,10 ^{ab}	5,32 ± 1,89 ^{ab}
Hp-Bindungskapazität [g gebundenes Hb/l Plasma] ¹	7,81 ± 1,24 ^c	6,89 ± 1,33 ^c	7,74 ± 0,89 ^c	9,90 ± 1,92 ^{ab}	9,68 ± 1,80 ^b	11,5 ± 2,2 ^a

a,b,c: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich mit Fisher-Test ($p < 0,05$), 1,2,3: Signifikanz der Faktoren ($p < 0,05$): 1-Fett, 2-Vitamin E, 3-Fett*Vitamin E; IE: Internationale Einheiten; Hb: Hämoglobin; LDH: Laktatdehydrogenase; Hp: Haptoglobin, U: 1 μ mol umgesetzt Substrat pro Minute

3.4.2 Konzentration der Hämolysemarker im Plasma

Die Konzentration der Hämolysemarker freies Hb, die Aktivität der sauren Phosphatase und der LDH sowie die Hp-Bindungskapazität waren im unterschiedlichen Maße von den Faktoren Diätfett und Konzentration an Vitamin E in der Diät abhängig (Tabelle 23).

Die Konzentration an freiem Hb im Plasma wurde sowohl durch die Art des Diätfettes, als auch durch die Vitamin E-Konzentration in der Diät beeinflusst.

Die Konzentration an freiem Hb war im Plasma der Ratten, deren Diät Lachsöl enthielt, höher als im Plasma der Tiere, deren Diät Schweineschmalz enthielt.

Zwischen den Gruppen, deren Diät Lachsöl und 100 bzw. 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, bestand kein Unterschied in der Konzentration an freiem Hb im Plasma.

Jedoch war bei den Gruppen, deren Diät 1.000 IE Vitamin E/kg Diät und Lachsöl enthielt, die Konzentration an freiem Hb um ca. 48 % niedriger als bei den Gruppen deren Diät 100 bzw. 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt.

Bei den Tieren, die Schweineschmalz als Diätfett erhielten, hatten die Vitamin E-Konzentrationen keinen signifikanten Effekt auf die Konzentration an freiem Hb. Die Konzentration an freiem Hb sank jedoch nominal mit zunehmender Vitamin E-Konzentration in der Diät ab.

Bei der Aktivität der sauren Phosphatase bestand eine Interaktion der Faktoren Art des Diätfettes und der Vitamin E-Konzentration in der Diät.

Eine Steigerung der Vitamin E-Zufuhr von 100 auf 10.000 IE Vitamin E/kg Diät führte bei den Tieren, deren Diät Lachsöl enthielt, zu einem Anstieg der Aktivität der sauren Phosphatase im Plasma um ca. 61 %.

Im Gegensatz dazu führte eine Steigerung der Vitamin E-Konzentration in der Diät bei den Tieren, die Schweineschmalz als Diätfett erhielten, zu einem Absinken der Aktivität der sauren Phosphatase um ca. 30 %.

Bei der Aktivität der LDH bestand ebenfalls eine Interaktion des Faktors Diätfett und der Vitamin E-Konzentration in der Diät.

Eine Steigerung der Vitamin E-Konzentration von 100 IE Vitamin E/kg Diät auf 1.000 bzw. 10.000 IE Vitamin E/kg Diät führte bei den Gruppen, deren Diät Lachsöl enthielt, zu einer signifikant um ca. 50 % höheren Aktivität der LDH.

Bei Verwendung von Schweineschmalz als Diätfett hatten die verschiedenen Vitamin E-Konzentrationen in der Diät keinen signifikanten Effekt auf die Aktivität der LDH.

Die Bindungskapazität des Hp im Plasma wurde lediglich von der Art des eingesetzten Diätfettes beeinflusst.

Die Bindungskapazität des Hp war bei den Ratten, die Lachsöl als Diätfett erhielten, niedriger als bei den Tieren, die Schweineschmalz als Diätfett erhielten.

Die verschiedenen Vitamin E-Konzentrationen in der Diät hatten bei den Gruppen, die mit der Diät Lachsöl erhielten, keinen Effekt auf die Bindungskapazität des Hp.

Jedoch war bei der Gruppe, deren Diät Schweineschmalz und 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, die Bindungskapazität des Hp signifikant um ca. 20 % höher, als bei der Gruppe, deren Diäten Schweineschmalz und 1.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielten.

3.5 Einfluss der Vitamin E-Konzentrationen der Diät und der Art der Diätfette auf Parameter des Lipidstoffwechsels

Als Parameter zur Charakterisierung des Lipidstoffwechsels wurden die Konzentrationen an Triglyceriden und Cholesterin im Plasma, in den Lipoproteinfraktionen und in der Leber, sowie die Fettsäurezusammensetzung der Phospholipidfraktionen der Leber, als auch die Fettsäurezusammensetzung der Erythrozytenmembran und die Konzentration an Cholesterin in der Erythrozytenmembran untersucht.

3.5.1 Konzentration an Triglyceriden in verschiedenen Geweben

In beiden Versuchen hatte die Art des eingesetzten Diätfettes einen signifikanten Einfluss auf die Konzentration der Triglyceride im Plasma und in den Lipoproteinfraktionen (Tabellen 24 und 25).

Die Ratten, deren Diät Schweineschmalz enthielt, hatten generell signifikant bzw. nominal höhere Konzentrationen an Triglyceriden im Plasma, in der VLDL-, HDL- und LDL-Fraktion, als die Ratten, deren Diät Lachsöl als Diätfett enthielt.

Die Vitamin E-Konzentrationen hatten in beiden Versuchen bei beiden verwendeten Diätfetten keine gerichteten Effekte auf die Konzentration der Triglyceride im Plasma, in der VLDL-, HDL und LDL-Fraktion.

In beiden Versuchen hatten weder die eingesetzten Diätfette, noch die verschiedenen Vitamin E-Konzentrationen in der Diät einen signifikanten Einfluss auf die Konzentration der Triglyceride in der Leber. Lediglich im zweiten Versuch nahm, bei hohen Vitamin E-Konzentrationen in der Diät, die Konzentration der Triglyceride in der Leber der Gruppen, deren Diät Lachsöl enthielt, ab.

3.5.2 Konzentration an Cholesterin in verschiedenen Geweben

Die Konzentration an Cholesterin im Plasma, in der VLDL-, LDL- und in der HDL-Fraktion wurde in beiden Versuchen signifikant durch die Art des Diätfettes beeinflusst (Tabellen 26 und 27).

Die Tiere, deren Diät Schweineschmalz enthielt, hatten in beiden Versuchen signifikant bzw. nominal höhere Konzentrationen an Cholesterin im Plasma und in den Lipoproteinfraktionen als die Tiere, deren Diät Lachsöl enthielt. Die Vitamin E-Konzentrationen in der Diät hatten in beiden Versuchen keine gerichteten Effekte auf die Konzentration an Cholesterin in den Lipoproteinfraktionen und im Plasma.

Die Konzentration an Cholesterin in der Leber wurde in beiden Versuchen entsprechend ANOVA weder durch die Art des Diätfettes, noch durch die Vitamin E-Konzentration beeinflusst.

Tab. 24: Konzentration der Triglyceride im Plasma, in den Lipoproteinfraktionen und in der Leber im ersten Versuch

Diätfett	Lachsöl				Schweineschmalz				
	Vitamin E	100	500	3.000	10.000	100	500	3.000	10.000
[IE/kg Diät]									
Plasma [mmol/l] ¹	0,39 ± 0,12 ^c	0,55 ± 0,09 ^c	0,60 ± 0,16 ^{bc}	0,52 ± 0,12 ^c	0,90 ± 0,39 ^b	0,88 ± 0,29 ^b	0,85 ± 0,18 ^b	1,16 ± 0,45 ^a	
VLDL [mmol/l] ¹	0,10 ± 0,04 ^c	0,21 ± 0,08 ^{bc}	0,22 ± 0,06 ^{bc}	0,17 ± 0,04 ^c	0,32 ± 0,08 ^b	0,31 ± 0,15 ^b	0,41 ± 0,13 ^a	0,46 ± 0,18 ^a	
HDL [mmol/l] ¹	0,06 ± 0,01 ^b	0,07 ± 0,02 ^b	0,07 ± 0,02 ^b	0,07 ± 0,01 ^b	0,06 ± 0,02 ^b	0,09 ± 0,02 ^a	0,09 ± 0,02 ^a	0,07 ± 0,01 ^b	
LDL [mmol/l] ¹	0,16 ± 0,13 ^b	0,16 ± 0,08 ^b	0,20 ± 0,11 ^b	0,20 ± 0,14 ^b	0,38 ± 0,32 ^a	0,34 ± 0,26 ^{ab}	0,22 ± 0,14 ^b	0,48 ± 0,23 ^a	
Leber [mmol/g]	16,4 ± 4,8	17,4 ± 4,4	17,9 ± 4,8	19,1 ± 5,4	20,6 ± 2,7	18,6 ± 2,6	19,9 ± 4,1	17,9 ± 3,2	

a,b,c: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich mit Fisher-Test ($p < 0,05$), 1: Signifikanz der Faktoren ($p < 0,05$): 1-Fett; IE: Internationale Einheiten; VLDL: Lipoproteine sehr geringer Dichte (Very Low Density Lipoprotein), HDL: Lipoproteine hoher Dichte (High Density Lipoprotein), LDL: Lipoproteine geringer Dichte (Low Density Lipoprotein)

Tab. 25: Konzentration der Triglyceride im Plasma, in den Lipoproteinfraktionen und in der Leber im zweiten Versuch

Diätfett	Lachsöl			Schweineschmalz		
	Vitamin E [IE/kg Diät]	100	1.000	10.000	100	1.000
Plasma [mmol/l] ^{1,2}	0,55 ± 0,11 ^c	0,53 ± 0,12 ^c	0,50 ± 0,12 ^c	0,94 ± 0,26 ^a	0,79 ± 0,16 ^b	0,81 ± 0,11 ^{ab}
VLDL [mmol/l] ¹	0,33 ± 0,17 ^{ab}	0,33 ± 0,13 ^{ab}	0,22 ± 0,14 ^b	0,47 ± 0,21 ^a	0,34 ± 0,18 ^{ab}	0,36 ± 0,14 ^{ab}
HDL [mmol/l] ^{1,2}	0,03 ± 0,01 ^b	0,01 ± 0,01 ^d	0,02 ± 0,01 ^c	0,04 ± 0,01 ^{ab}	0,05 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,01 ^b
LDL [mmol/l] ¹	0,18 ± 0,05 ^{bc}	0,17 ± 0,07 ^{bc}	0,13 ± 0,06 ^c	0,26 ± 0,08 ^a	0,21 ± 0,07 ^b	0,29 ± 0,06 ^a
Leber [mmol/g]	18,8 ± 8,6 ^{ab}	12,7 ± 4,6 ^b	11,1 ± 3,0 ^b	20,2 ± 6,0 ^a	13,6 ± 7,7 ^{ab}	15,6 ± 11,4 ^{ab}

a,b,c,d: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich mit Fisher-Test ($p < 0,05$), 1,2: Signifikanz der Faktoren ($p < 0,05$): 1-Fett, 2-Vitamin E; IE: Internationale Einheiten, VLDL: Lipoproteine sehr geringer Dichte (Very Low Density Lipoprotein), HDL: Lipoproteine hoher Dichte (High Density Lipoprotein), LDL: Lipoproteine geringer Dichte (Low Density Lipoprotein)

Tab. 26: Konzentration an Cholesterin im Plasma, in den Lipoproteinfraktionen und in der Leber im ersten Versuch

Diätfett	Lachsöl				Schweineschmalz			
	100	500	3.000	10.000	100	500	3.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]								
Plasma [mmol/l] ¹	1,38 ± 0,18 ^c	1,51 ± 0,38 ^c	1,51 ± 0,38 ^c	1,32 ± 0,29 ^c	2,08 ± 0,45 ^b	2,14 ± 0,44 ^b	2,55 ± 0,31 ^a	2,18 ± 0,34 ^b
VLDL [mmol/l] ¹	0,07 ± 0,03 ^b	0,12 ± 0,06 ^{ab}	0,07 ± 0,04 ^b	0,07 ± 0,03 ^b	0,13 ± 0,07 ^{ab}	0,16 ± 0,07 ^a	0,12 ± 0,08 ^{ab}	0,11 ± 0,06 ^b
HDL [mmol/l] ¹	0,59 ± 0,15 ^b	0,64 ± 0,22 ^b	0,71 ± 0,25 ^b	0,59 ± 0,09 ^b	1,08 ± 0,21 ^a	1,23 ± 0,37 ^a	1,22 ± 0,32 ^a	1,11 ± 0,22 ^a
LDL [mmol/l] ¹	0,72 ± 0,35 ^b	0,77 ± 0,18 ^{ab}	0,71 ± 0,25 ^b	0,68 ± 0,27 ^b	0,98 ± 0,42 ^a	0,87 ± 0,58 ^a	1,17 ± 0,37 ^a	0,98 ± 0,47 ^a
Leber [mmol/g]	9,30 ± 1,42	11,3 ± 3,8	9,83 ± 0,89	9,24 ± 1,41	9,06 ± 2,31	9,11 ± 1,52	9,08 ± 2,38	8,00 ± 2,31

a,b,c: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich mit Fisher-Test ($p < 0,05$), 1: Signifikanz der Faktoren ($p < 0,05$): 1-Fett; IE: Internationale Einheiten, VLDL: Lipoproteine sehr geringer Dichte (Very Low Density Lipoprotein), HDL: Lipoproteine hoher Dichte (High Density Lipoprotein), LDL: Lipoproteine geringer Dichte (Low Density Lipoprotein)

Tab. 27: Konzentration an Cholesterin im Plasma, in den Lipoproteinfraktionen und in der Leber im zweiten Versuch

Diätfett	Lachsöl			Schweineschmalz		
	100	1.000	10.000	100	1.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]						
Plasma [mmol/l] ¹	0,94 ± 0,18 ^b	0,99 ± 0,14 ^b	0,97 ± 0,23 ^b	2,11 ± 0,15 ^a	2,05 ± 0,19 ^a	1,98 ± 0,17 ^a
VLDL [mmol/l] ¹	0,14 ± 0,03 ^a	0,13 ± 0,07 ^a	0,14 ± 0,03 ^a	0,16 ± 0,12 ^a	0,17 ± 0,10 ^a	0,08 ± 0,03 ^b
HDL [mmol/l] ¹	0,51 ± 0,13 ^b	0,51 ± 0,09 ^b	0,46 ± 0,09 ^b	1,02 ± 0,15 ^a	0,94 ± 0,19 ^a	0,95 ± 0,14 ^a
LDL [mmol/l] ¹	0,33 ± 0,11 ^b	0,43 ± 0,10 ^b	0,47 ± 0,13 ^b	0,99 ± 0,13 ^a	0,98 ± 1,10 ^a	1,01 ± 0,15 ^a
Leber [mmol/g]	12,7 ± 2,4 ^a	11,9 ± 3,1 ^{ab}	9,21 ± 2,18 ^b	10,1 ± 3,4 ^{ab}	11,1 ± 4,4 ^{ab}	9,90 ± 3,31 ^{ab}

a,b: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich mit Fisher-Test ($p < 0,05$), 1: Signifikanz der Faktoren ($p < 0,05$): 1-Fett; IE: Internationale Einheiten; VLDL: Lipoproteine sehr geringer Dichte (Very Low Density Lipoprotein), HDL: Lipoproteine hoher Dichte (High Density Lipoprotein), LDL: Lipoproteine geringer Dichte (Low Density Lipoprotein)

3.5.3 Konzentration an Cholesterin in der Erythrozytenmembran

Entsprechend zweifaktorieller Varianzanalyse hatte weder die Art des Diätfettes, noch die Vitamin E-Konzentration in der Diät einen Einfluss auf die Konzentration an Cholesterin in der Erythrozytenmembran.

Die Konzentration an Cholesterin in der Erythrozytenmembran lag bei allen Diätgruppen bei durchschnittlich 2,7 $\mu\text{mol/ml}$ Erythrozyten.

3.5.4 Konzentration an Triglyceriden im Kot und scheinbare Verdaulichkeit der Triglyceride

Entsprechend ANOVA hatten weder die Art des Diätfettes, noch die Konzentration an Vitamin E einen Einfluss auf die Konzentration an Triglyceriden im Kot und die scheinbare Verdaulichkeit der Triglyceride (Tabellen 28 und 29).

Im ersten Versuch war die Konzentration an Triglyceriden und Cholesterin im Kot in der 8. Versuchswoche höher als in der 4. Versuchswoche. Im zweiten Versuch trat dieser Effekt nicht auf.

Auf die scheinbare Verdaulichkeit der Triglyceride hatten weder die Konzentration an Vitamin E in der Diät, noch die Art des eingesetzten Diätfettes einen Einfluss. Die Verdaulichkeit der Triglyceride war in beiden Versuchen bei beiden Diätfetten sehr hoch und lag im Mittel bei ca. 99,7 %.

3.5.5 Konzentration an Cholesterin im Kot

Weder die Art des Diätfettes, noch die Vitamin E-Konzentration in der Diät hatte einen Einfluss auf die Konzentration an Cholesterin im Kot (Tabellen 28 und 29).

Lediglich im ersten Versuch war die Konzentration an Cholesterin im Kot in beiden Versuchswochen bei den Tieren, deren Diät Lachsöl und 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, höher als bei den Tieren, deren Diät Lachsöl und 100, 500 bzw. 3.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt. Dieser Effekt trat bei Verwendung von Schweineschmalz nicht auf.

Tab. 28: Konzentration an Triglyceriden und Cholesterin im Kot und scheinbare Verdaulichkeit der Triglyceride im ersten Versuch

Diätfett	Lachsöl				Schweineschmalz			
	100	500	3.000	10.000	100	500	3.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]								
Triglyceridkonzentration im Kot [µmol/g]								
Woche 4	2,62 ± 0,50	2,51 ± 0,26	3,20 ± 0,71	2,21 ± 0,25	2,62 ± 0,38	2,90 ± 0,41	3,11 ± 0,11	2,92 ± 0,15
Woche 8	3,81 ± 1,51	3,51 ± 0,40	3,50 ± 1,22	3,82 ± 0,51	4,31 ± 2,71	3,52 ± 1,20	3,73 ± 0,41	4,61 ± 1,91
Triglyceridverdaulichkeit [%]								
Woche 4	99,8 ± 0,1	99,8 ± 0,1	99,7 ± 0,1	99,7 ± 0,1	99,6 ± 0,3	99,7 ± 0,1	99,7 ± 0,1	99,6 ± 0,2
Woche 8	99,7 ± 0,1	99,7 ± 0,1	99,7 ± 0,1	99,7 ± 0,1	99,4 ± 0,3	99,7 ± 0,1	99,6 ± 0,1	99,6 ± 0,2
Cholesterinkonzentration im Kot [µmol/g]								
Woche 4	2,83 ± 0,3 ^b	2,17 ± 0,26 ^c	2,46 ± 0,14 ^c	3,82 ± 0,36 ^a	3,57 ± 0,27 ^{a,b}	2,69 ± 0,4 ^b	2,74 ± 0,46 ^b	3,04 ± 0,22 ^b
Woche 8	4,11 ± 1,1 ^b	3,55 ± 0,09 ^b	3,52 ± 0,57 ^b	5,41 ± 0,84 ^a	4,00 ± 0,23 ^b	3,87 ± 1,21 ^b	3,43 ± 0,55 ^b	3,87 ± 0,43 ^b

a,b,c: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich mit Fisher-Test (p<0,05), IE: Internationale Einheiten

Tab. 29: Konzentration an Triglyceriden und Cholesterin im Kot und scheinbare Verdaulichkeit der Triglyceride im zweiten Versuch

Diätfett	Lachsöl			Schweineschmalz		
	100	1.000	10.000	100	1.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]						
Triglyceridkonzentration im Kot [µmol/g]						
Woche 4	1,40 ± 0,90	1,51 ± 0,62	2,10 ± 0,91	1,20 ± 0,51	1,50 ± 0,93	1,92 ± 1,81
Woche 8	1,04 ± 0,81	1,40 ± 0,93	1,30 ± 0,89	1,60 ± 1,00	1,10 ± 0,61	2,41 ± 1,21
Triglyceridverdaulichkeit [%]						
Woche 4	99,9 ± 0,1	99,9 ± 0,1	99,8 ± 0,1	99,9 ± 0,1	99,9 ± 0,1	99,8 ± 0,1
Woche 8	99,9 ± 0,1	99,9 ± 0,1	99,9 ± 0,1	99,8 ± 0,1	99,9 ± 0,1	99,8 ± 0,1
Cholesterinkonzentration im Kot [µmol/g]						
Woche 4	8,00 ± 1,70	8,21 ± 3,20	7,72 ± 1,48	8,40 ± 2,21	8,51 ± 2,81	7,81 ± 1,10
Woche 8	8,51 ± 3,11 ^{a,b}	6,93 ± 1,14 ^b	8,00 ± 1,11 ^b	10,8 ± 1,7 ^a	10,2 ± 2,9 ^{a,b}	6,11 ± 1,71 ^b

a,b: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertsvergleich mit Fisher-Test (p<0,05), IE: Internationale Einheiten

Im zweiten Versuch hatten die Vitamin E-Konzentrationen in der Diät in beiden Versuchswochen bei beiden eingesetzten Diätfetten keine gerichteten Effekte auf die Konzentration an Cholesterin im Kot.

3.5.6 Fettsäurezusammensetzung der Neutrallipid-, Phosphatidylethanolamin- und Phosphatidylcholinfraktion der Leberphospholipide

Die Art des eingesetzten Diätfettes hatte signifikante Effekte auf die Fettsäurezusammensetzung der Neutrallipid-, PE- und PC-Fraktion in der Leber (Tabellen 30, 31 und 32). Jedoch hatten die Vitamin E-Konzentrationen in der Diät generell keine gerichteten Effekte auf die Fettsäurezusammensetzung dieser Phospholipidfraktionen in der Leber.

In der Neutrallipidfraktion der Tiere, die Schweineschmalz als Diätfett erhielten, waren die Gewichtsprozentage der SFA, der einfach ungesättigten Fettsäuren (Monounsaturated Fatty Acids-MUFA), der Omega-6-PUFA (n-6) und der Quotient von Omega-6-PUFA/Omega-3-PUFA ($n-6\text{-PUFA}/n-3\text{-PUFA}$) höher als bei den Tieren, die Lachsöl als Diätfett erhielten.

Im Gegensatz dazu hatten die Tiere, deren Diät Lachsöl enthielt, in der Neutrallipidfraktion der Leber höhere Gewichtsprozentage an Gesamt-PUFA und an n-3-PUFA als die Tiere, denen Schweineschmalz als Diätfett gegeben wurde.

In der PE-Fraktion der Leber hatten die Tiere, die Lachsöl als Diätfett erhielten, höhere Gewichtsprozentage an n-3-PUFA und an Gesamt-PUFA als die Tiere, deren Diät Schweineschmalz enthielt. Bei Fütterung von Schweineschmalz waren die Gewichtsprozentage an n-6-PUFA und MUFA und der Quotient von n-6-PUFA/n-3-PUFA höher als bei Fütterung von Lachsöl.

Im Gegensatz zur Neutrallipidfraktion wurden die Gewichtsprozentage der SFA nicht durch die eingesetzten Diätfette beeinflusst.

In der PC-Fraktion der Leber waren bei Verwendung von Schweineschmalz als Diätfett die Gewichtsprozentage an n-6-PUFA der Quotient von n-6-PUFA/n-3-PUFA, sowie die Gewichtsprozentage an Gesamt-PUFA höher als bei Verwendung von Lachsöl als Diätfett.

Die Gruppen, deren Diät Lachsöl als Diätfett enthielt, hatten höhere Gewichtsprozentage an MUFA und n-3-PUFA als die Gruppen, deren Diät Schweineschmalz enthielt. Im Gegensatz zur Neutrallipidfraktion wurden die Gewichtsprozentage der SFA in der PC-Fraktion nicht durch die Art der eingesetzten Diätfette beeinflusst.

Tab. 30: Fettsäurezusammensetzung der Neutrallipidfraktion in der Leber im ersten Versuch

Diätfett	Lachsöl				Schweineschmalz			
	100	500	3.000	10.000	100	500	3.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]								
Gewichtsprozent [g/100 g Fettsäuren]								
Σ SFA ¹	27,7 ± 1,5 ^b	28,1 ± 2,2 ^b	29,2 ± 3,2 ^{ab}	30,2 ± 2,7 ^{ab}	32,1 ± 2,7 ^a	28,5 ± 2,3 ^b	29,2 ± 3,8 ^{ab}	32,8 ± 3,5 ^a
C14:0 ^{1,2,3}	0,90 ± 0,10 ^b	0,90 ± 0,70 ^b	0,84 ± 0,13 ^c	1,12 ± 0,46 ^a	0,78 ± 0,12 ^c	0,65 ± 0,08 ^d	0,96 ± 0,22 ^b	0,91 ± 0,21 ^b
C16:0 ^{1,2,3}	22,8 ± 1,7 ^c	23,7 ± 1,7 ^c	24,2 ± 2,3 ^c	25,7 ± 2,3 ^b	27,2 ± 3,9 ^b	22,8 ± 1,9 ^c	25,3 ± 4,1 ^b	29,3 ± 3,5 ^a
C18:0 ³	4,03 ± 0,90 ^b	3,52 ± 1,20 ^b	3,21 ± 1,32 ^b	3,31 ± 0,79 ^b	4,12 ± 1,49 ^{ab}	5,02 ± 0,97 ^a	2,90 ± 0,70 ^c	2,60 ± 0,36 ^c
Σ MUFA ¹	31,2 ± 2,2 ^b	32,6 ± 1,1 ^b	33,1 ± 5,3 ^b	29,9 ± 2,3 ^b	45,7 ± 4,6 ^a	42,6 ± 3,8 ^a	45,3 ± 2,7 ^a	44,7 ± 1,1 ^a
C16:1 ¹	6,00 ± 0,91 ^b	6,98 ± 1,41 ^a	6,51 ± 1,34 ^b	5,89 ± 1,11 ^c	5,01 ± 0,72 ^f	5,38 ± 1,23 ^e	5,81 ± 1,01 ^d	5,64 ± 1,82 ^d
C18:1 n-9 ¹	26,9 ± 2,6 ^b	27,7 ± 1,7 ^b	28,8 ± 5,6 ^b	26,5 ± 2,1 ^b	44,0 ± 6,4 ^a	40,5 ± 4,9 ^a	42,9 ± 5,4 ^a	44,2 ± 1,0 ^a
C18:1 n-7 ^{1,2}	2,60 ± 1,03 ^b	3,42 ± 1,19 ^a	2,98 ± 0,85 ^a	2,82 ± 0,39 ^{ab}	1,39 ± 2,19 ^c	1,84 ± 2,05 ^b	2,15 ± 2,87 ^b	2,32 ± 1,05 ^b
C20:1 ^{1,2,3}	1,70 ± 0,26 ^a	1,42 ± 0,14 ^b	1,33 ± 0,24 ^b	1,47 ± 0,34 ^b	0,22 ± 0,05 ^c	0,23 ± 0,05 ^c	0,25 ± 0,06 ^c	0,29 ± 0,08 ^c
Σ PUFA ¹	27,9 ± 1,6 ^a	25,8 ± 3,9 ^a	24,9 ± 2,7 ^a	25,9 ± 3,8 ^a	12,3 ± 3,9 ^c	16,4 ± 3,3 ^b	12,5 ± 2,9 ^c	11,5 ± 3,5 ^c
Σ n-6-PUFA ^{1,2,3}	8,95 ± 2,01 ^c	7,02 ± 1,85 ^c	7,13 ± 2,71 ^c	6,09 ± 0,89 ^d	15,4 ± 6,4 ^b	21,9 ± 4,8 ^a	14,3 ± 3,6 ^b	13,0 ± 3,9 ^b
C18:2 n-6 ¹	4,91 ± 0,72 ^b	4,32 ± 0,69 ^b	4,28 ± 0,65 ^b	4,41 ± 0,66 ^b	6,64 ± 0,88 ^a	6,77 ± 1,72 ^a	7,93 ± 1,51 ^a	7,69 ± 2,46 ^a
C20:2 n-6 ¹	0,11 ± 0,06 ^c	0,08 ± 0,04 ^c	0,06 ± 0,03 ^c	0,07 ± 0,03 ^c	0,51 ± 0,22 ^b	0,64 ± 0,11 ^a	0,63 ± 0,42 ^a	0,46 ± 0,16 ^b
C20:3 n-6 ¹	0,35 ± 0,11 ^a	0,31 ± 0,12 ^a	0,30 ± 0,17 ^a	0,41 ± 0,54 ^a	0,19 ± 0,20 ^b	0,21 ± 0,06 ^b	0,13 ± 0,06 ^c	0,11 ± 0,03 ^c
C20:4 n-6 ^{1,2,3}	1,78 ± 0,61 ^d	1,16 ± 0,75 ^e	1,25 ± 1,11 ^e	0,71 ± 0,16 ^e	4,01 ± 2,99 ^b	6,63 ± 1,34 ^a	2,81 ± 1,34 ^c	2,38 ± 0,77 ^c
C22:4 n-6 ¹	0,06 ± 0,01 ^b	0,06 ± 0,01 ^b	0,06 ± 0,01 ^b	0,08 ± 0,01 ^b	0,14 ± 0,04 ^a	0,19 ± 0,07 ^a	0,15 ± 0,09 ^a	0,17 ± 0,05 ^a
Σ n-3-PUFA ¹	20,6 ± 1,1 ^a	19,9 ± 3,6 ^a	19,1 ± 1,6 ^b	20,4 ± 3,2 ^a	0,79 ± 0,41 ^d	1,45 ± 0,28 ^c	0,87 ± 0,45 ^d	0,69 ± 0,20 ^d
C20:5 n-3 ¹	5,31 ± 0,70 ^a	5,25 ± 0,87 ^a	4,64 ± 1,01 ^b	4,98 ± 1,11 ^b	0,14 ± 0,04 ^c	0,16 ± 0,04 ^c	0,18 ± 0,12 ^c	0,12 ± 0,06 ^c
C22:5 n-3 ^{1,3}	4,58 ± 0,48 ^a	4,34 ± 0,78 ^a	4,11 ± 0,53 ^a	4,87 ± 0,66 ^a	0,13 ± 0,06 ^b	0,22 ± 0,05 ^b	0,19 ± 0,13 ^b	0,09 ± 0,03 ^c
C22:6 n-3 ¹	10,8 ± 0,9 ^a	10,3 ± 2,4 ^a	10,3 ± 1,7 ^a	10,6 ± 1,7 ^a	0,56 ± 0,36 ^c	1,06 ± 0,24 ^b	0,55 ± 0,21 ^c	0,48 ± 0,16 ^c
n-6-PUFA/n-3-PUFA ¹	0,44 ± 0,11 ^d	0,36 ± 0,11 ^d	0,37 ± 0,13 ^d	0,30 ± 0,03 ^d	20,6 ± 4,8 ^a	15,2 ± 1,5 ^c	18,3 ± 4,8 ^b	18,8 ± 2,6 ^b
PUFA/SFA ¹	1,00 ± 0,09 ^a	0,93 ± 0,23 ^b	0,86 ± 0,09 ^c	0,87 ± 0,19 ^c	0,39 ± 0,17 ^e	0,58 ± 0,14 ^d	0,44 ± 0,18 ^e	0,36 ± 0,12 ^e

a,b,c,d,e,f: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test ($p < 0,05$), 1,2,3: Signifikanz der Faktoren ($p < 0,05$): 1-Fett, 2-Vitamin E, 3-Fett*Vitamin E, IE: Internationale Einheiten; SFA: gesättigte Fettsäuren (saturated fatty acids), MUFA: einfachungesättigte Fettsäuren (monounsaturated fatty acids), PUFA: mehrfachungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids); n-6: Omega-6-PUFA; n-3: Omega-3-PUFA

Tab. 31: Fettsäurezusammensetzung der Leberphosphatidylethanolaminfraktion im ersten Versuch

Diätfett	Lachsöl				Schweineschmalz			
	100	500	3.000	10.000	100	500	3.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]								
Gewichtsprozent [g/100 g Fettsäuren]								
ΣSFA	37,7 ± 4,8 ^a	35,1 ± 1,7 ^b	35,7 ± 4,4 ^b	35,9 ± 1,5 ^b	35,4 ± 1,3 ^b	34,3 ± 3,3 ^b	35,1 ± 1,7 ^b	35,2 ± 1,8 ^b
C14:0 ^{1,3}	0,81 ± 0,28 ^b	0,79 ± 0,18 ^b	0,63 ± 0,18 ^c	0,67 ± 0,19 ^c	0,74 ± 0,17 ^b	0,95 ± 0,14 ^a	0,98 ± 0,29 ^a	0,67 ± 0,22 ^c
C16:0	18,4 ± 2,1 ^b	19,7 ± 2,1 ^b	20,3 ± 2,3 ^b	21,2 ± 1,7 ^b	21,5 ± 1,8 ^b	24,2 ± 2,8 ^a	21,6 ± 2,6 ^b	19,9 ± 3,3 ^b
C18:0 ^{1,2}	16,6 ± 2,7 ^a	14,6 ± 2,6 ^b	14,8 ± 4,1 ^b	14,1 ± 1,4 ^b	13,2 ± 3,9 ^b	9,16 ± 1,1 ^c	12,4 ± 3,7 ^b	14,5 ± 2,0 ^b
ΣMUFA ^{1,2}	21,7 ± 6,4 ^c	22,5 ± 4,4 ^c	20,4 ± 6,4 ^c	20,6 ± 2,5 ^c	30,2 ± 6,2 ^b	37,0 ± 3,9 ^a	31,2 ± 6,7 ^b	25,7 ± 4,6 ^b
C16:1 ²	4,12 ± 0,88 ^b	5,01 ± 1,36 ^a	4,34 ± 1,41 ^b	4,37 ± 0,65 ^b	4,11 ± 1,11 ^b	5,90 ± 1,69 ^a	4,30 ± 0,68 ^b	3,21 ± 0,69 ^b
C18:1n-9 ^{1,2,3}	12,3 ± 4,7 ^c	12,7 ± 2,9 ^c	11,6 ± 4,1 ^c	11,6 ± 1,9 ^c	23,1 ± 6,1 ^a	27,8 ± 2,5 ^a	22,6 ± 4,9 ^a	18,1 ± 3,0 ^b
C18:1 n-7	3,85 ± 0,36	3,97 ± 0,71	3,64 ± 1,13	3,86 ± 0,25	3,49 ± 0,53	3,63 ± 1,01	4,11 ± 0,59	3,68 ± 0,46
C20:1 ^{1,2}	1,04 ± 0,16 ^a	0,86 ± 0,11 ^b	0,82 ± 0,15 ^b	0,85 ± 0,14 ^b	0,25 ± 0,09 ^c	0,17 ± 0,04 ^c	0,20 ± 0,07 ^c	0,15 ± 0,01 ^c
ΣPUFA ^{1,2}	34,3 ± 8,1 ^a	35,5 ± 3,9 ^a	36,4 ± 2,9 ^a	36,9 ± 3,3 ^a	28,2 ± 5,9 ^b	21,4 ± 5,2 ^c	27,6 ± 5,3 ^b	31,5 ± 4,9 ^{ab}
Σn-6-PUFA ^{1,2}	10,7 ± 4,1 ^c	9,86 ± 2,00 ^c	11,4 ± 2,7 ^c	10,7 ± 0,8 ^c	21,3 ± 3,9 ^b	17,1 ± 4,1 ^b	21,8 ± 3,9 ^b	24,5 ± 4,1 ^a
C18:2 n-6 ^{1,2}	5,54 ± 1,00 ^b	4,72 ± 0,77 ^b	5,25 ± 1,13 ^b	5,37 ± 0,57 ^b	7,46 ± 0,55 ^a	6,94 ± 2,03 ^a	8,91 ± 1,51 ^a	8,71 ± 1,49 ^a
C20:2 n-6 ¹	0,14 ± 0,04 ^d	0,11 ± 0,02 ^d	0,12 ± 0,03 ^d	0,13 ± 0,03 ^d	0,51 ± 0,15 ^b	0,42 ± 0,29 ^c	0,57 ± 0,07 ^b	0,65 ± 0,13 ^a
C20:3 n-6 ^{1,2}	0,92 ± 0,28 ^a	0,67 ± 0,16 ^b	0,79 ± 0,19 ^b	0,71 ± 0,06 ^b	0,55 ± 0,13 ^c	0,33 ± 0,15 ^d	0,49 ± 0,18 ^c	0,63 ± 0,10 ^b
C20:4 n-6 ^{1,2,3}	5,29 ± 1,00 ^c	4,37 ± 1,23 ^c	4,66 ± 1,57 ^c	4,49 ± 0,53 ^c	12,8 ± 3,4 ^b	9,44 ± 2,61 ^b	11,9 ± 3,7 ^b	14,6 ± 2,7 ^a
C22:4 n-6 ^{1,2}	0,16 ± 0,07 ^c	0,16 ± 0,11 ^c	0,07 ± 0,01 ^d	0,09 ± 0,05 ^d	0,40 ± 0,06 ^a	0,28 ± 0,01 ^b	0,29 ± 0,02 ^b	0,34 ± 0,07 ^b
Σn-3-PUFA	23,4 ± 4,8 ^a	25,5 ± 2,7 ^a	24,9 ± 1,9 ^a	26,1 ± 3,2 ^a	6,63 ± 1,85 ^b	4,16 ± 1,25 ^b	5,57 ± 1,26 ^b	6,61 ± 1,24 ^b
C20:5 n-3 ¹	5,67 ± 0,61 ^b	6,04 ± 1,60 ^{ab}	6,52 ± 1,23 ^a	6,31 ± 0,48 ^a	0,37 ± 0,18 ^c	0,32 ± 0,07 ^c	0,33 ± 0,11 ^c	0,21 ± 0,03 ^c
C22:5 n-3 ¹	3,39 ± 0,62 ^a	3,31 ± 0,45 ^a	3,26 ± 0,49 ^a	3,62 ± 0,33 ^a	0,35 ± 0,11 ^c	0,27 ± 0,03 ^c	0,45 ± 0,16 ^b	0,59 ± 0,16 ^b
C22:6 n-3 ¹	15,3 ± 2,4 ^a	16,2 ± 1,8 ^a	15,1 ± 1,3 ^a	16,2 ± 2,7 ^a	5,91 ± 1,89 ^b	4,14 ± 0,60 ^c	4,93 ± 0,63 ^{bc}	6,01 ± 1,06 ^b
n-6-PUFA/n-3-PUFA ^{1,2,3}	0,49 ± 0,11 ^b	0,39 ± 0,07 ^b	0,46 ± 0,12 ^b	0,42 ± 0,07 ^b	3,35 ± 0,64 ^a	4,33 ± 0,94 ^a	3,97 ± 0,42 ^a	3,74 ± 0,63 ^a
PUFA/SFA ¹	1,27 ± 0,80 ^b	0,99 ± 0,13 ^c	0,99 ± 0,15 ^c	0,98 ± 0,14 ^c	1,30 ± 0,24 ^b	1,78 ± 0,85 ^a	1,31 ± 0,25 ^b	1,15 ± 0,29 ^b

a,b,c,d: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test ($p < 0,05$), 1,2,3: Signifikanz der Faktoren ($p < 0,05$): 1-Fett, 2-Vitamin E, 3-Fett*Vitamin E; IE: Internationale Einheiten; SFA: gesättigte Fettsäuren (saturated fatty acids), MUFA: einfachungesättigte Fettsäuren (monounsaturated fatty acids), PUFA: mehrfachungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids), n-3: Omega-3-PUFA, n-6: Omega-6-PUFA

Tab. 32: Fettsäurenzusammensetzung der Leberphosphatidylcholinfraktion im ersten Versuch

Diätfett	Lachsöl				Schweineschmalz			
	100	500	3.000	10.000	100	500	3.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]								
Gewichtsprozent [g/100 g Fettsäuren]								
ΣSFA	47,6 ± 3,8 ^a	48,8 ± 5,1 ^a	44,2 ± 6,7 ^b	46,3 ± 1,7 ^a	50,3 ± 7,2 ^a	45,5 ± 4,6 ^b	45,9 ± 2,2 ^b	44,6 ± 1,0 ^b
C14:0 ^{2,3}	0,33 ± 0,03 ^b	0,32 ± 0,05 ^b	0,35 ± 0,17 ^b	0,30 ± 0,05 ^b	0,27 ± 0,07 ^c	0,21 ± 0,03 ^c	0,43 ± 0,11 ^a	0,47 ± 0,13 ^a
C16:0 ^{1,2}	24,9 ± 2,1 ^a	25,9 ± 2,9 ^a	24,1 ± 1,2 ^a	23,8 ± 0,9 ^a	21,9 ± 4,2 ^b	19,60 ± 2,1 ^b	20,0 ± 0,9 ^b	18,3 ± 1,2 ^b
C18:0 ^{1,2}	22,3 ± 2,1 ^c	22,6 ± 3,7 ^c	21,9 ± 3,0 ^c	22,2 ± 2,2 ^c	31,0 ± 7,0 ^a	25,7 ± 2,7 ^b	25,5 ± 1,9 ^b	25,8 ± 1,3 ^b
ΣMUFA ^{1,2}	12,3 ± 2,6 ^{a,b}	14,5 ± 1,8 ^a	16,1 ± 9,1 ^a	11,9 ± 1,3 ^b	10,1 ± 1,7 ^{b,c}	9,14 ± 2,62 ^c	11,4 ± 1,9 ^b	8,63 ± 2,21 ^c
C16:1 ¹	1,99 ± 0,28 ^a	2,22 ± 0,39 ^a	2,47 ± 1,48 ^a	1,89 ± 0,27 ^a	0,82 ± 0,53 ^b	1,07 ± 0,22 ^b	1,17 ± 0,13 ^b	1,02 ± 0,18 ^b
C18:1 n-9 ¹	7,43 ± 2,10 ^b	8,31 ± 1,22 ^a	7,91 ± 0,79 ^a	7,10 ± 0,79 ^b	6,97 ± 0,97 ^b	6,64 ± 0,75 ^b	7,65 ± 1,58 ^a	5,66 ± 1,48 ^c
C18:1 n-7 ^{1,2}	2,83 ± 0,24 ^a	3,17 ± 1,05 ^a	2,65 ± 0,61 ^{ab}	2,21 ± 0,31 ^b	2,15 ± 0,46 ^b	2,11 ± 0,46 ^b	2,50 ± 0,31 ^b	2,08 ± 0,43 ^b
C20:1 ^{1,2,3}	0,79 ± 0,14 ^a	0,78 ± 0,17 ^a	0,64 ± 0,08 ^b	0,62 ± 0,11 ^b	0,14 ± 0,04 ^c	0,14 ± 0,03 ^c	0,14 ± 0,05 ^c	0,12 ± 0,03 ^d
ΣPUFA ^{1,2}	33,0 ± 3,4 ^b	31,8 ± 6,4 ^b	35,2 ± 4,3 ^b	37,5 ± 1,1 ^a	32,3 ± 7,5 ^b	39,1 ± 6,4 ^a	37,4 ± 3,1 ^a	40,1 ± 1,8 ^a
Σn-6-PUFA ¹	14,7 ± 1,6 ^d	13,6 ± 2,1 ^d	13,8 ± 3,7 ^d	14,4 ± 0,1 ^d	28,4 ± 6,1 ^c	31,7 ± 5,2 ^b	31,7 ± 2,4 ^b	34,4 ± 1,6 ^a
C18:2 n-6 ³	4,63 ± 1,03 ^c	4,10 ± 0,47 ^d	4,11 ± 0,75 ^d	3,65 ± 0,47 ^e	3,98 ± 0,55 ^d	4,12 ± 0,86 ^d	5,10 ± 0,86 ^a	4,81 ± 0,87 ^b
C20:2 n-6 ^{1,2,3}	0,18 ± 0,03 ^d	0,16 ± 0,02 ^d	0,14 ± 0,03 ^d	0,15 ± 0,02 ^d	0,72 ± 0,14 ^c	0,74 ± 0,11 ^c	0,86 ± 0,12 ^b	1,25 ± 0,22 ^a
C20:3 n-6 ^{1,3}	1,14 ± 0,18 ^a	1,10 ± 0,17 ^a	1,04 ± 0,33 ^b	1,07 ± 0,11 ^{ab}	0,43 ± 0,15 ^f	0,53 ± 0,19 ^e	0,62 ± 0,14 ^d	0,75 ± 0,11 ^c
C20:4 n-6 ¹	8,91 ± 0,87 ^c	8,26 ± 1,66 ^c	8,47 ± 2,89 ^c	9,56 ± 0,41 ^c	23,7 ± 5,9 ^b	26,3 ± 4,6 ^{ab}	25,1 ± 2,8 ^b	27,5 ± 1,4 ^a
C22:4 n-6 ¹	0,08 ± 0,03 ^c	0,07 ± 0,01 ^c	0,07 ± 0,01 ^c	0,08 ± 0,02 ^c	0,26 ± 0,11 ^a	0,31 ± 0,03 ^a	0,22 ± 0,02 ^b	0,28 ± 0,04 ^a
Σn-3-PUFA ^{1,2}	18,3 ± 3,0 ^c	18,1 ± 5,1 ^c	21,4 ± 2,6 ^b	22,9 ± 1,3 ^a	3,63 ± 2,65 ^f	7,34 ± 1,46 ^d	5,52 ± 1,18 ^e	5,56 ± 0,32 ^e
C20:5 n-3 ¹	6,31 ± 1,12 ^a	6,20 ± 1,57 ^a	6,89 ± 1,88 ^a	6,71 ± 0,72 ^a	0,35 ± 0,32 ^b	0,32 ± 0,54 ^b	0,25 ± 0,14 ^c	0,14 ± 0,03 ^c
C22:5 n-3 ¹	1,96 ± 0,55 ^b	1,87 ± 0,57 ^b	2,61 ± 0,97 ^a	2,84 ± 0,41 ^a	0,41 ± 0,14 ^c	0,38 ± 0,04 ^c	0,52 ± 0,12 ^c	0,34 ± 0,01 ^c
C22:6 n-3 ^{1,2,3}	10,2 ± 2,0 ^b	10,1 ± 3,6 ^b	11,9 ± 1,8 ^b	13,4 ± 1,1 ^a	5,91 ± 0,49 ^c	6,24 ± 1,32 ^c	5,09 ± 1,07 ^d	5,37 ± 0,41 ^d
n-6-PUFA/n-3-PUFA ^{1,3}	0,83 ± 0,17 ^e	0,79 ± 0,22 ^e	0,66 ± 0,21 ^{ef}	0,63 ± 0,06 ^f	5,13 ± 1,98 ^c	4,37 ± 0,52 ^d	5,93 ± 1,07 ^b	6,20 ± 0,36 ^a
PUFA/SFA ²	1,46 ± 0,27 ^{ab}	1,63 ± 0,53 ^a	1,27 ± 0,23 ^b	1,24 ± 0,07 ^b	1,79 ± 0,79 ^a	1,23 ± 0,47 ^b	1,23 ± 0,14 ^b	1,12 ± 0,07 ^b

a,b,c,d,e,f: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test ($p < 0,05$), 1,2,3: Signifikanz der Faktoren ($p < 0,05$): 1-Fett, 2-Vitamin E, 3-Fett*Vitamin E; IE: Internationale Einheiten; SFA: gesättigte Fettsäuren (saturated fatty acids); MUFA: einfachungesättigte Fettsäuren (monounsaturated fatty acids), PUFA: mehrfachungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids); n-3: Omega-3-PUFA, n6: Omega-6-PUFA

3.5.7 Fettsäurezusammensetzung der Erythrozytenmembran

Die Fettsäurezusammensetzung der Erythrozytenmembran wurde durch die eingesetzten Diätfette beeinflusst (Tabelle 33). Der Faktor Vitamin E-Konzentration in der Diät hatte keine gerichteten Effekte auf die Fettsäurezusammensetzung der Erythrozytenmembran.

Bei den Gruppen, deren Diät Schweineschmalz enthielt, war die Summe der n-6-PUFA und der Quotient von n-6-PUFA/n-3-PUFA größer als bei den Gruppen, deren Diät Lachsöl enthielt.

Die Fütterung von Lachsöl als Diätfett hatte einen höheren Anteil an SFA und n-3-PUFA in der Erythrozytenmembran zur Folge.

Die Gewichtsprozentage der MUFA und PUFA und der Quotient von PUFA/SFA in der Erythrozytenmembran wurden nicht durch die verwendeten Diätfette beeinflusst.

Tab. 33: Fettsäurezusammensetzung der Erythrozytenmembran

Diätfett	Lachsöl			Schweineschmalz		
	100	1.000	10.000	100	1.000	10.000
Vitamin E [IE/kg Diät]						
Gewichtsprozent [g/100 g Fettsäuren]						
ΣSFA ¹	40,8 ± 5,6 ^a	43,5 ± 2,6 ^a	40,7 ± 3,9 ^a	38,5 ± 3,6 ^{ab}	36,8 ± 3,2 ^b	38,5 ± 3,7 ^{ab}
C14:0	1,29 ± 0,42 ^a	0,82 ± 0,14 ^b	1,11 ± 0,33 ^a	0,85 ± 0,36 ^b	1,29 ± 0,72 ^a	1,17 ± 0,53 ^a
C16:0 ^{1,3}	35,6 ± 2,5 ^a	35,7 ± 1,1 ^a	24,2 ± 3,0 ^c	29,1 ± 2,3 ^b	30,1 ± 0,6 ^b	30,8 ± 1,2 ^b
C18:0 ^{1,3}	13,2 ± 1,6 ^b	13,4 ± 0,9 ^b	14,9 ± 4,7 ^b	18,1 ± 4,1 ^a	15,6 ± 1,4 ^{ab}	15,8 ± 1,1 ^{ab}
ΣMUFA	13,8 ± 2,7	15,1 ± 1,2	13,3 ± 1,2	14,1 ± 4,1	13,6 ± 2,4	13,2 ± 1,2
C16:1 ^{1,2}	2,10 ± 0,51 ^a	1,69 ± 0,22 ^a	1,47 ± 0,28 ^a	1,34 ± 1,41 ^{ab}	1,27 ± 1,05 ^{ab}	0,95 ± 0,29 ^b
C18:1 n-9 ¹	9,00 ± 1,49 ^b	9,90 ± 0,90 ^{ab}	8,91 ± 0,79 ^b	11,3 ± 2,8 ^a	11,3 ± 1,6 ^a	10,9 ± 1,2 ^a
C18:1 n-7 ^{1,3}	4,12 ± 0,29 ^a	3,79 ± 0,12 ^{ab}	4,29 ± 0,79 ^a	3,60 ± 0,80 ^b	3,39 ± 0,38 ^b	3,20 ± 0,30 ^b
C20:1 ¹	0,60 ± 0,19 ^a	0,71 ± 0,11 ^a	0,72 ± 0,12 ^a	0,41 ± 0,30 ^b	0,50 ± 0,20 ^{ab}	0,40 ± 0,20 ^b
ΣPUFA	32,1 ± 1,3	34,4 ± 0,9	32,3 ± 4,3	33,5 ± 4,9	33,9 ± 3,1	35,1 ± 2,9
Σn-6-PUFA ¹	11,1 ± 1,5 ^b	13,3 ± 0,7 ^b	12,2 ± 1,7 ^b	26,5 ± 5,0 ^a	25,8 ± 3,4 ^a	26,8 ± 3,6 ^a
C18:2 n-6 ^{1,2,3}	3,40 ± 0,31 ^c	3,51 ± 0,29 ^c	3,29 ± 0,20 ^c	7,20 ± 0,80 ^b	7,40 ± 0,71 ^b	8,11 ± 0,60 ^a
C20:3 n-6 ^{1,3}	0,59 ± 0,20 ^b	0,50 ± 0,05 ^b	0,60 ± 0,11 ^b	0,70 ± 0,13 ^b	0,90 ± 0,12 ^a	0,70 ± 0,09 ^b
C20:4 n-6 ¹	8,00 ± 1,00 ^b	9,50 ± 0,61 ^b	9,50 ± 1,50 ^b	21,5 ± 4,4 ^a	21,2 ± 2,9 ^a	20,8 ± 2,7 ^a
C22:4 n-6 ¹	0,35 ± 0,01 ^b	0,19 ± 0,02 ^b	0,21 ± 0,11 ^b	1,39 ± 0,42 ^a	1,59 ± 0,34 ^a	1,43 ± 0,29 ^a
Σn-3-PUFA ^{1,2,3}	16,8 ± 2,6 ^b	19,7 ± 1,3 ^a	17,4 ± 3,3 ^b	2,60 ± 0,49 ^c	2,71 ± 0,39 ^c	2,79 ± 0,49 ^c
C20:5 n-3 ^{1,2,3}	9,10 ± 1,43 ^b	10,7 ± 0,7 ^a	9,20 ± 1,70 ^b	0,69 ± 0,50 ^c	0,47 ± 0,27 ^c	0,46 ± 0,15 ^c
C22:5 n-3 ^{1,2,3}	2,50 ± 0,80 ^b	3,40 ± 0,46 ^a	3,11 ± 0,59 ^a	0,62 ± 0,22 ^c	0,71 ± 0,11 ^c	0,82 ± 0,21 ^c
C22:6 n-3 ¹	5,10 ± 0,66 ^a	5,61 ± 0,61 ^a	5,10 ± 1,10 ^a	1,42 ± 0,49 ^b	1,22 ± 0,24 ^b	1,54 ± 0,36 ^b
n-6-PUFA/n-3-PUFA ¹	0,67 ± 0,07 ^b	0,68 ± 0,05 ^b	0,71 ± 0,05 ^b	10,7 ± 3,0 ^a	9,81 ± 2,15 ^a	9,86 ± 2,51 ^a
PUFA/SFA ¹	0,80 ± 0,11 ^b	0,79 ± 0,06 ^b	0,80 ± 0,13 ^b	0,88 ± 0,14 ^{ab}	0,93 ± 0,11 ^a	0,92 ± 0,10 ^a

a,b,c: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test ($p < 0,05$), 1,2,3: Signifikanz der Faktoren ($p < 0,05$): 1-Fett, 2-Vitamin E, 3-Fett*Vitamin E; IE: Internationale Einheiten; SFA: gesättigte Fettsäuren (saturated fatty acids), MUFA: einfachungesättigte Fettsäuren (monounsaturated fatty acids), PUFA: mehrfachungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids), n-3: Omega-3-PUFA, n6: Omega-6-PUFA

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wirkung hoher Vitamin E-Zulagen auf Parameter des antioxidativen Schutzsystems und auf Parameter der Lipidperoxidation von Ratten untersucht werden. Anhand dieser Parameter sollte geprüft werden, ob prooxidative Effekte sehr hoher Vitamin E-Dosierungen *in vivo* auftreten können.

Da mögliche prooxidative Wirkungen hoher Vitamin E-Zulagen durch ein Diätfett, welches einen hohen Anteil an PUFA hat, verstärkt werden wurde Lachsöl als ein Diätfett gewählt. Lachsöl hat einen hohen Anteil an n-3-PUFA, welche sehr oxidationsempfindlich sind (MALIS et al. 1990, ZSIGMOND et al. 1990, SAITO und NAKATSUGAWA 1994, CHIANG und TSAI 1995, VALK und HORNSTRA 2000). Als weiteres Diätfett wurde Schweineschmalz als ein Fett mit einem hohen Anteil an SFA verwendet. Bei Verwendung von Schweineschmalz ist eine geringere oxidative Belastung als bei Verwendung von Lachsöl zu erwarten.

Als Versuchstiere dienten wachsende männliche Sprague-Dawley-Ratten.

Die eingesetzten Vitamin E-Konzentrationen betragen im ersten Versuch 100, 500, 3.000 und 10.000 IE Vitamin E/kg Diät und im zweiten Versuch 100, 1.000 und 10.000 IE Vitamin E/kg Diät.

Die niedrigsten verwendeten Vitamin E-Konzentrationen von 100 IE Vitamin E/kg Diät deckten den Mindestbedarf an Vitamin E von beiden Diätgruppen. Dieser Mindestbedarf an Vitamin E wurde entsprechend der Fettsäurezusammensetzung der Diätfette nach MUGGLI (1994) errechnet und betrug für die Gruppen, die mit der Diät Schweineschmalz erhielten, ca. 15 IE Vitamin E/kg Diät und für die Gruppen, deren Diät Lachsöl enthielt, ca. 52 IE Vitamin E/kg Diät.

In toxikologischen Studien an Ratten wurde als höchste getestete Vitamin E-Dosierung ohne toxische Effekte ca. 7,5 g Vitamin E/kg Körpergewicht (KGW) angegeben (KAPPUS und DIPLOCK 1992). Da die Tiere bei den verwendeten Vitamin E-Zulagen von 10.000 IE Vitamin E/kg Diät ca. 0,8 g Vitamin E/kg KGW¹ täglich aufnehmen, können toxische Effekte durch die hohen Vitamin E-Zulagen ausgeschlossen werden.

¹ bei der Berechnung wurde von einer durchschnittlichen Futtermittelaufnahme von 20g/Tag/Tier und einem durchschnittlichen Gewicht der Tiere von 250 g ausgegangen

Vitamin E wurde als DL- α -Tocopherylacetat zugelegt, da es stabiler als α -Tocopherol ist.

4.1 Futteraufnahme und Gewichtsentwicklung der Tiere

Um einen Einfluss der verwendeten Vitamin E-Konzentrationen und der Diätfette auf die Futteraufnahme zu untersuchen, wurden die Tiere im ersten Versuch ad libitum gefüttert.

Zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen konnten keine Unterschiede in der Futteraufnahme und auch nicht in der Gewichtsentwicklung der Ratten nachgewiesen werden. Bei Fütterungsversuchen mit Meerschweinchen (BARJA et al. 1991) und bei Fütterungsversuchen mit Ratten (CHIANG und TSAI 1995) beeinflussten hohe Vitamin E-Zulagen ebenfalls nicht die Futteraufnahme und auch nicht die Gewichtsentwicklung der Tiere. Sogar eine Vitamin E-Zulage von 25.000 IE Vitamin E/kg Diät hatte in einer Studie von YANG und DESAI (1977) keinen Einfluss auf die Futteraufnahme und die Gewichtsentwicklung männlicher Sprague-Dawley-Ratten.

Im zweiten Versuch wurden die Tiere restriktiv gefüttert. Auch im zweiten Versuch gab es keine Unterschiede in der Gewichtsentwicklung zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen.

4.2 Charakterisierung des antioxidativen Schutzsystems

4.2.1 Vitamin E-Status und –Stoffwechsel

Die Konzentration an α -Tocopherol in verschiedenen Geweben diente in der eigenen Studie zum einen der Beschreibung des Vitamin E-Status und zum anderen der Charakterisierung des antioxidativen Schutzsystems der Ratten.

Generell war die Konzentration an α -Tocopherol in den untersuchten Geweben bei den Tieren, deren Diät Schweineschmalz enthielt, höher als bei den Tieren, deren Diät Lachsöl als Diätfett enthielt. Die Zufuhr von Lachsöl führt zur Inkorporierung von n-3-PUFA in die Membran (NALBONE et al. 1989, MALIS et al. 1990, ZSIGMOND et

al. 1990, PADMANABHAN et al. 1993, KIRCHGESSNER et al. 1994, SAITO und NAKATSUGAWA 1994, SEN et al. 1997). Aufgrund der hohen Sensitivität der n-3-PUFA für Peroxidationsprozesse entsteht deshalb bei Gabe von n-3-PUFA-reichen Diätfetten ein erhöhter postabsorptiver Vitamin E-Verbrauch (NALBONE et al. 1989, MALIS et al. 1990, EDER und KIRCHGESSNER 1994, GUTTERIDGE 1995, VALK und HORNSTRA 2000).

Weiterhin kommt es im Intestinaltrakt zu Interaktionen zwischen Vitamin E und den PUFA (IBRAHIM et al. 1997). Als Ursachen dieser Interaktionen werden folgende Möglichkeiten diskutiert: die PUFA verbessern die Löslichkeit des Vitamins in der Mizelle, somit wird der Trennungskoeffizient zwischen Mizelle und Zellmembran verschoben. Weiterhin ist es möglich, dass die PUFA die Mizelle vergrößern und somit die Diffusionsrate zur Zellmembran verzögern. Außerdem können die PUFA die negativen Ladungen auf der Mizellenoberfläche vermehren und deshalb die Diffusion zur negativ geladenen Zellmembran erschweren (ELMADFA und LEITZMANN 1990).

In der vorliegenden Studie stieg erwartungsgemäß die Konzentration an α -Tocopherol in den untersuchten Geweben mit zunehmender Vitamin E-Konzentration in der Diät an. Das Ausmaß des Konzentrationsanstieges variierte jedoch in den verschiedenen Geweben. Wie zu erwarten war, wurden sowohl die höchsten Konzentrationen an α -Tocopherol, als auch die höchsten Konzentrationsanstiege in Leber und Fettgewebe gemessen. Es ist bekannt, dass sich α -Tocopherol aufgrund seines lipophilen Charakters bevorzugt in lipidreichen Geweben wie dem Abdominalfett anreichert (TOMASSI und SILANO 1996, WANG und QUINN 1999). Die Leber ist das Hauptspeicher- und Kontrollorgan im Vitamin E-Stoffwechsel (BURTON 1990, TRABER et al. 1993, CADENAS et al. 1995, MUTAKU et al. 1998, WANG und QUINN 1999). In der Leber befindet sich sogar ein 30 kDa und ein 14,2 kDa Bindungsprotein für α -Tocopherol (CHOW 1989, TRABER et al. 1993, DUTTA-ROY et al. 1993, HUANG und SHAW 1994, GARROW et al. 2000).

Sowohl die Konzentration an α -Tocopherol, als auch der Konzentrationsanstieg an α -Tocopherol im Plasma, in den LDL und in den Erythrozyten war deutlich geringer als im Leber- und Fettgewebe. Die Haupttransportfraktion für Vitamin E im Plasma ist die

LDL-Fraktion (WANG und QUINN 1999). Nach der Resorption der Tocopherole im Darm werden die fettlöslichen Vitamine in Chylomikronen inkorporiert. Anschließend gelangt das α -Tocopherol über Chylomikronen-Remnants in die Leber und wird dort in VLDL inkorporiert. Das VLDL wird wiederum in den Blutkreislauf sezerniert. Dort findet ein rascher Austausch des α -Tocopherol zwischen den Lipoproteinfraktionen VLDL, LDL und HDL statt (BURTON 1990, BIESALSKI und GRIMM 1999).

Zwischen dem Plasma und den Erythrozyten findet ebenfalls ein dynamischer Austausch an α -Tocopherol statt. Die Konzentration an α -Tocopherol in den Erythrozyten korreliert somit mit dem Plasmaspiegel, ist jedoch deutlich geringer als im Plasma (LEHMANN 1981, CHOW 1989). In der vorliegenden Studie war die Konzentration an α -Tocopherol im Plasma ca. um das dreifache höher als in den Erythrozyten. In einer Studie von LEHMANN (1981) war die Konzentration an α -Tocopherol bei unterschiedlichen Vitamin E-Zulagestufen ebenfalls um das doppelte bis dreifache höher als in den Erythrozyten.

Als Parameter des Vitamin E-Stoffwechsels wurde die scheinbare Verdaulichkeit von α -Tocopherol bestimmt. Die Ausscheidung des Vitamin E erfolgt hauptsächlich fäkal als Tocopherylquinon, Tocopheryhydroquinon und deren Polymerisationsprodukte (ELMADFA und LEITZMANN 1990, TRABER und SIES 1996, GASSMANN 1997, ESTERBAUER und HAYN 1997). Die endogenen Verluste an Vitamin E über die Galle sind sehr gering, so dass die im Kot nachweisbaren Mengen an α -Tocopherol aus unvollständiger Absorption, aus Zellabschilferung und aus der Sekretion von Mukosazellen stammen (ESTERBAUER und HAYN 1997).

Im vorliegenden Versuch wurde die scheinbare Verdaulichkeit von α -Tocopherol in der 4. und 8. Versuchswoche bestimmt.

Zwischen den beiden verwendeten Diätfetten bestanden keine Unterschiede in der scheinbaren Verdaulichkeit von α -Tocopherol. Die Konzentration an α -Tocopherol im Kot nahm mit steigender Vitamin E-Dosierung in der Diät zu. Die scheinbare Verdaulichkeit sank demzufolge mit steigender Vitamin E-Zulage ab. Sie lag bei den Tieren, deren Diät 100 IE Vitamin E/kg Diät enthielt bei ca. 86 %. LIUZZI et al. (1998) fanden bei wachsenden Ratten bei einer Zulage an Vitamin E entsprechend den

Bedarfsempfehlungen des AIN von 27 IE Vitamin E/kg Diät eine scheinbare Verdaulichkeit von Vitamin E von ca. 90%.

Jedoch war die scheinbare Verdaulichkeit in der vorliegenden Studie mit 70%, bei einer Vitamin E-Konzentration von 10.000 IE Vitamin E/kg Diät, sehr hoch und lag somit deutlich über den in der Literatur angegebenen Werten. So fanden SCHMANDKE et al. (1969) beim Menschen bei einer Dosierung von 2.000 mg α -Tocopherol/kg Diät (entspricht ca. 2980 IE Vitamin E/kg Diät)² eine Absorptionsrate von 55,2%. Von ELMADFA und LEITZMANN (1990) und ESTERBAUER und HAYN (1997) wird die im Mittel absorbierte Menge an Vitamin E beim Menschen mit 30% angegeben. Bei höheren Vitamin E-Zulagen wurde die Absorptionsrate von Vitamin E bei Ratten mit 20-25 % angegeben (RAJARAM et al. 1974).

4.2.2 Konzentration an Ascorbinsäure (Vitamin C) im Plasma

Im vorliegenden Versuch wurde Vitamin C als weiterer Parameter zur Charakterisierung des antioxidativen Schutzsystems bestimmt.

Als Vitamin C definiert man Verbindungen des mit dem Übergang von zwei Elektronen verbundenen Redoxsystems L-Ascorbinsäure, Semidehydroascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure (MAIANI et al. 1993, GASSMANN 1998). Vitamin C ist ein hochwirksames wasserlösliches Antioxidans und reagiert direkt mit Superoxidanionen, Hydroxylradikalen und Lipidhydroperoxiden (BUETTNER 1993, LIU und LEE 1998).

In vitro regeneriert die Ascorbinsäure das α -Tocopherol, indem sie das α -Tocopheroxylradikal reduziert (NIKI 1988, VATASSERY et al. 1989, HALPNER et al. 1998). *In vivo*-Studien führten jedoch zu unterschiedlichen und teilweise widersprüchlichen Ergebnissen. Der „Vitamin E Spareffekt“ von Vitamin C konnte von einigen Autoren nachgewiesen werden (JACOB et al. 1988, LIU und LEE 1998) während andere Autoren diesen Effekt in Studien an Meerschweinchen widerlegt haben (DILLARD et al. 1984, BURTON et al. 1990).

² 1 mg α -Tocopherol entspricht 1,49 IE Vitamin E

Die Ratte verfügt, im Gegensatz zum Menschen, über das Enzym L-Gulonsäure-gamma-lacton-Oxidase und ist somit in der Lage, Vitamin C zu synthetisieren (GASSMANN 1998). Die Ascorbat-Eigensynthese der Ratte wird von PAULING (1986) mit 26-58 mg Vitamin C/kg KGW pro Tag angegeben.

In den eigenen Versuchen war die Konzentration an Ascorbinsäure im Plasma bei den Gruppen, deren Diät Schweineschmalz enthielt, signifikant höher als bei den Gruppen, deren Diät Lachsöl enthielt. Aufgrund der hohen Oxidationssensitivität der n-3-PUFA im Lachsöl entsteht ein höherer endogener Vitamin C-Verbrauch (SAITO und NAKATSUGAWA 1994, MOISON und VAN BEIJERSBERGEN 2001).

Bemerkenswert war, dass die Konzentration an Ascorbinsäure im Plasma der Gruppen, deren Diät 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, um ca. 22 % (Lachsöl) bzw. 10 % (Schweineschmalz) höher war als bei den Gruppen, deren Diät 100 bzw. 1.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt. Dieses Ergebnis widerlegt die Hypothese eines prooxidativen Effektes der hohen Vitamin E-Dosierungen, da bei oxidativem Streß ein Absinken der Konzentration an Vitamin C in den Geweben zu erwarten wäre. So beschreiben LIU und LEE (1998) bei Fütterung von oxidierten Fetten an Meerschweinchen ein Absinken der Vitamin C-Konzentration im Plasma.

4.2.3 Aktivität antioxidativer Enzyme in der Leber bzw. im Plasma

Die Enzymaktivitäten der SOD, der GSH-Px und der Katalase geben Hinweise über das antioxidative Schutzsystem der Ratten, sowie über mögliche prooxidative Effekte der verwendeten Diäten.

Superoxiddismutase

Die SOD (EC 1.15.1.1.) katalysiert die Dismutationsreaktion der Superoxidanionenradikale zu Wasserstoffperoxid (WEISINGER und FRIDOVICH 1973, DE ROSA et al. 1980, MARKLUND 1984, ZIDENBERG-CHERR et al. 1983, HUU et al. 1984). In der Säugetierleber findet man sowohl eine Mangan-haltige SOD (Mn-SOD) mit einem Molekulargewicht von 80.000 Dalton, die in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist, als auch eine cytosolische Cu-Zn-SOD mit einem Molekulargewicht von 32.000 Dalton (DE ROSA et al. 1980, ZIDENBERG-CHERR et al. 1983). Neben diesen beiden Formen existiert noch eine extrazelluläre SOD (EC-

SOD). Die Kupfer-Zink-haltige EC-SOD, ein tetrameres Glykoprotein, wurde in Säugetierspezies nachgewiesen (MARKLUND 1984, HALLIWELL und GUTTERIDGE 1988).

In den eigenen Untersuchungen wurde nur die cytosolische Cu-Zn-SOD in der Leber erfaßt.

Die Diätfette hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der SOD. Daraus läßt sich schlußfolgern, dass in der eigenen Studie die verschiedenen Vitamin E-Zulagen ausreichend waren, um den oxidativen Effekt des verwendeten Lachsöls zu kompensieren. Bei Mäusen, die Fischöl und 1.000 IE Vitamin E/kg Diät erhielten, fanden IBRAHIM et al. (1997) eine geringere Aktivität der SOD in der Leber als bei Mäusen, die Schweineschmalz als Diätfett erhielten. Mögliche Ursachen für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen dieser Studie und den eigenen Ergebnissen können in der verwendeten Spezies (Ratte vs. Maus), in der Versuchsdauer (8 Wochen vs. 4 Wochen) und in der Zusammensetzung der Diät (10 % Fischöl vs. 8 % Fischöl) begründet sein.

In der vorliegenden Studie war bei beiden eingesetzten Diätfetten die Aktivität der SOD bei den Tieren, deren Diät 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, um 49 % (Lachsöl) bzw. um 31 % (Schweineschmalz) geringer als bei den Tieren, deren Diät 100 IE Vitamin E/ kg Diät enthielt. Eine exzessive Zufuhr an exogenen Antioxidantien kann zu einer Supremierung von endogenen Antioxidantien führen (BARJA et al. 1994), denn Vitamin E kann die Bildung von Superoxidanionenradikalen vermindern (MEHTA et al. 1999). In humanen Endothelzellen der Koronararterien konnte eine Downregulation der SOD-codierenden Gene durch Vitamin E nachgewiesen werden (MEHTA und LI 2001).

Der Einfluss von Vitamin E auf die Aktivität der SOD wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Bei Verwendung von Fischöl als Diätfett und hohen Vitamin E-Zulagen von 1.000 IE Vitamin E/kg Diät konnte ebenfalls am Modelltier Affe (KAASGAARD et al. 1992) und am Modelltier Maus (IBRAHIM et al. 1997) eine geringere Aktivität der SOD als bei den Kontrollgruppen nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu fanden PULLA-REDDY und LOKESH (1994), sowie SUAREZ et al. (1999) bei Ratten, denen Fischöl und eine höhere Dosierung an Vitamin E

verabreicht wurde, eine höhere Aktivität der hepatischen SOD als bei den Ratten, die Fischöl und eine niedrige Vitamin E-Dosierung erhielten.

Oxidativer Streß kann ebenfalls ein Absinken der Aktivität der SOD hervorrufen (SARKAR et al. 1995, IBRAHIM et al. 1997, KINALSKI et al. 1999, GULTEKIN et al. 2001).

Glutathionperoxidase

Die GSH-Px (EC 1.11.1.9.), ein selenhaltiges Enzym, reduziert Wasserstoffperoxid und organische Hydroperoxide zu Wasser bzw. organischen Hydroxyverbindungen. GSH ist bei dieser Reaktion der Wasserstoffdonator (O`BRIEN 1988, WENDEL und JAESCHKE 1988, THOMAS et al. 1990, SALLMANN et al. 1991). Die GSH-PX ist im Cytosol und in der mitochondrialen Matrix lokalisiert (O`BRIEN 1988, BIESALSKI und FRANK 1995). Neben der „klassischen“ GSH-Px gibt es noch eine gastrointestinale Form, eine glykolytierte Form im Plasma und die membranassoziierte Phospholipid-Hydroperoxid-GSH-Px (PHGSH-Px) (TAKAHASHI et al. 1987, URSINI 1988, CHU et al. 1993, URSINI et al. 1995). Weiterhin existiert noch eine selenunabhängige GSH-Px, die kein Wasserstoffperoxid abbaut. Dieses Enzym ist jedoch im Plasma und in der Leber von Huhn, Kalb und Ratte nicht vorhanden (SCHOLZ et al. 1981).

In der vorliegenden Studie wurde die Aktivität der selenabhängigen GSH-Px im Plasma und im Lebercytosol untersucht.

Die eingesetzten Diätfette beeinflussten nicht die Aktivität der GSH-Px in der Leber. Auch die Aktivität der GSH-Px im Plasma wurde nicht durch die Art der eingesetzten Diätfette beeinflusst. In einem Versuch von ATALAY et al. (2000) führte Fischöl als Diätfett bei einer Vitamin E-Zulage von 500 mg α -Tocopherol/kg KGW/Tag im Gegensatz zu Sojaöl als Diätfett zu einer Erhöhung der Aktivität der GSH-Px in der Leber der Ratte. Die Aktivitätserhöhung des Enzyms kompensiert den oxidativen Effekt des Fischöls (ATALAY et al. 2000). Man kann jedoch davon ausgehen, dass in der eigenen Studie dieser prooxidative Effekt des Lachsöls durch die hohen Vitamin E-Zulagen mit der Diät ausreichend kompensiert wurde.

Zwischen den Gruppen, deren Diät 10.000 IE Vitamin E/kg Diät bzw. 100 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, bestanden bei beiden eingesetzten Diätfetten keine Unterschiede in der Aktivität der GSH-Px im Plasma bzw. in der Leber. In Studien an

Meerschweinchen (CADENAS et al. 1995, ROJAS et al. 1996) zeigte sich ebenfalls kein Effekt höherer Vitamin E-Zulagen (1.500 IE Vitamin E/kg Diät) auf die Aktivität der hepatischen GSH-Px.

Katalase

Die Katalase (EC 1.11.1.6.) hat eine hohe Substratspezifität für Wasserstoffperoxid und ist in der Lage, 10^6 Moleküle Substrat pro Sekunde abzubauen. Das Enzym ist in den Peroxisomen der Zelle lokalisiert (CHANCE et al. 1979, WEISS und KUMAR 1988, BIESALSKI und FRANK 1995). Das aktive Zentrum der Katalase ist Fe^{3+} Protoporphyrin (CHANCE et al. 1979). Alle 4 Untereinheiten des Moleküls werden mittels NADPH stabilisiert, um das Enzym vor der oxidierenden Wirkung des Substrats zu schützen (GAETANI et al. 1989).

In der eigenen Studie konnten zwischen den beiden eingesetzten Diätfetten keine Unterschiede in der Aktivität der Katalase nachgewiesen werden. Man kann wiederum davon ausgehen, dass die eingesetzten Vitamin E-Zulagen ausreichend waren, um den prooxidativen Effekt des Lachsöls zu kompensieren. Am Modelltier Maus wurde ein ähnlicher Befund nachgewiesen (IBRAHIM et al. 1997).

Zwischen den Ratten, deren Diät 10.000 IE Vitamin E/kg Diät bzw. 100 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, bestanden ebenfalls bei beiden eingesetzten Diätfetten keine Unterschiede in der Aktivität der Katalase. Es ist bekannt, dass die Aktivität der Katalase eng mit oxidativem Streß korreliert (DE CRAEMER et al. 1994, ATALAY et al. 2000). Bei induziertem oxidativen Streß konnte eine verringerte Aktivität der Katalase in Rattenerthrozyten nachgewiesen werden (TRIVEDI et al. 1997).

Der Einfluss von oxidativem Streß auf die Aktivität antioxidativer Enzyme wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert. In verschiedenen Studien führte oxidativer Streß zu einer Aktivitätserhöhung der antioxidativen Enzyme (AJIT und DARAD 1988, BOADI et al. 1991, ATALAY et al. 2000). Im Gegensatz dazu konnten andere Studien bei oxidativem Streß eine abnehmende Aktivität der antioxidativen Enzyme nachweisen (SARKAR et al. 1995, KINALSKI et al. 1999, GULTEKIN et al. 2001).

In der vorliegenden Studie war lediglich die Aktivität der SOD bei den Tieren, deren Diät 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, geringer als bei den Kontrollgruppen (100 IE Vitamin E/kg Diät). Zwischen den Tieren, die mit der Diät 10.000 IE Vitamin E/kg Diät erhielten, und den Tieren, welche 100 IE Vitamin E/kg Diät erhielten, bestanden keine Unterschiede in der Aktivität der GSH-Px bzw. der Katalase. Somit ergeben die Ergebnisse der Enzymaktivitäten der antioxidativen Enzyme in der Leber bzw. im Plasma keinen direkten Hinweis auf eine prooxidative Wirkung der hohen Vitamin E-Zulagen.

4.2.4 Konzentration an Glutathion in der Leber

Die Konzentration an GSH ist ein weiterer Parameter zur Charakterisierung des antioxidativen Schutzsystems in der Leber.

GSH ist ein schwefelhaltiges Tripeptid, welches endogen aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin in der Leber mit Hilfe der Enzyme γ -Glutamylcystein-Synthetase und GSH-Synthetase synthetisiert wird (WENDEL und JAESCHKE 1988, BRAY und TAYLOR 1993, MEISTER 1994, MALMEZAT et al. 2000). GSH ist das Substrat für die GSH-Px. Bei der Reduktion der Hydroperoxide wird das GSH oxidiert und es entsteht GSSG, welches mit Hilfe der NADPH-abhängigen Glutathionreduktase wieder zu GSH regeneriert wird (BRAY und TAYLOR 1993, MEISTER 1994, KINALSKI et al. 1999, MALMEZAT et al. 2000). GSH kann auch direkt mit freien Radikalen reagieren und ist weiterhin befähigt, das Tocopheryloxylradikal zu reduzieren und somit Vitamin E zu regenerieren (BURTON 1990, BRAY und TAYLOR 1993, PALAMANDA und KEHRER 1993, MEISTER 1994, KINALSKI et al. 1999).

In den eigenen Versuchen hatten die Diätfette einen signifikanten Einfluss auf die Konzentration an GSH in der Leber. Die Konzentration an GSH war bei den Tieren, deren Diät Lachsöl enthielt, höher als bei den Tieren, deren Diät Schweineschmalz enthielt. Die höhere Konzentration an GSH ist eine Folge der Adaptation an den durch das Fischöl induzierten oxidativen Streß (IBRAHIM et al. 1997). Der oxidative Streß wird durch den hohen Gehalt an oxidationssensitiven n-3-PUFA, die sich bei Fütterung von Fischöl in den Geweben anreichern, ausgelöst. Weiterhin induziert

Fischöl die peroxisomale β -Oxidation, deren Reaktionsprodukt unter anderem Wasserstoffperoxid ist (ATALAY et al. 2000), welches den oxidativen Effekt des Lachsöls intensiviert. Im Gegensatz dazu fanden SAITO und NAKATSUGAWA (1994) an Ratten bei Fütterung von Lachsöl eine geringere Konzentration an GSH als bei Fütterung von Schweineschmalz.

In der vorliegenden Studie hatten die Vitamin E-Zulagen in der Diät nur auf die GSH-Konzentration der Gruppen einen Einfluss, deren Diät Lachsöl enthielt. Bei den Tieren, deren Diät 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, war die Konzentration an GSH um 15 % geringer als bei den Gruppen, deren Diät 100 IE Vitamin E/kg Diät enthielt. Die hohen Vitamin E-Supplementierungen könnten zu einer reduzierten Synthese an GSH und somit zu einer „GSH-Sparwirkung“ führen (CHO und CHOI 1994). Weiterhin führt auch oxidativer Stress, infolge eines höheren Verbrauchs an GSH, zu einer geringeren Konzentration an GSH (KUMAR und DARAD 1988, SARKAR et al. 1995, KINALSKI et al. 1999, ALEJNIK et al. 1999).

Da im vorliegenden Versuch jedoch kein Effekt der verwendeten hohen Vitamin E-Zulagen auf die Aktivität der GSH-Px vorlag, kann man davon ausgehen, dass die geringere Konzentration an GSH nicht auf einen prooxidativen Effekt der hohen Vitamin E-Zulagen in der Diät, sondern auf den von CHO und CHOI (1994) erwähnten „Spareffekt“ zurückzuführen ist.

4.2.5 Lag-Time nach Kupfer-induzierter Oxidation der Lipoproteine geringer Dichte und maximale Konzentration an konjugierten Dienen

Im vorliegenden Versuch wurde die *in vitro*-Oxidationsempfindlichkeit der LDL nach Kupfer-induzierter Oxidation betrachtet. Die Lag-Time und die maximale Konzentration an konjugierten Dienen wurden als Parameter zur Charakterisierung des antioxidativen Schutzsystems ermittelt. Die Lag-Time ermöglicht außerdem eine Beurteilung der Empfindlichkeit der LDL gegenüber *in vitro*-Lipidperoxidationsprozessen.

Bei der Lipidperoxidation werden die PUFA in den LDL abgebaut und es bilden sich Lipidhydroperoxide mit konjugierten Doppelbindungen (konjugierte Diene) und Aldehyde (DIEBER-ROTHENEDER et al. 1991). Die in den LDL gebildeten

Peroxidationsprodukte können mit den Aminosäureseitenketten des Apoprotein B im LDL reagieren und somit neue Epitope von LDL bilden (PANIANGVATI et al. 1995, TRABER und SIES 1996). Dieses oxidativ modifizierte LDL fördert auf unterschiedliche Weise atherosklerotische Prozesse. Die oxidative Modifizierung des LDL am Apo B 100 Protein erhöht die LDL Aufnahme durch Makrophagen und kann zur Bildung von atherosklerotischen Plaques führen (ESTERBAUER et al. 1992, STEINBRECHER et al. 1997). Weiterhin hat oxidiertes LDL chemotaktische und cytotoxische Eigenschaften (STEINBERG et al. 1989).

Die Oxidation der LDL findet in drei Phasen statt: In der ersten, der sogenannten Lag-Phase oder Lag-Time, werden die endogenen Antioxidantien in den LDL verbraucht und es findet noch keine oder nur eine geringe Lipidperoxidation statt. Die Lag-Time ist somit zum einem ein Maß für die „Versorgung“ der LDL mit lipophilen Antioxidantien und gibt zum anderem Aufschluß über die Empfindlichkeit der LDL gegenüber der *in vitro*-Lipidperoxidation.

Nachdem die endogenen lipophilen Antioxidantien verbraucht wurden, steigt in der Propagationsphase der Gehalt an Lipidhydroperoxiden mit konjugierter Dienstruktur in den LDL stark an. In der dritten sogenannten Dekompensationsphase sinkt der Gehalt an konjugierten Dienen (ESTERBAUER et al. 1989 b, ESTERBAUER et al. 1993).

In der eigenen Studie wurde die Lag-Time der LDL durch die Art der eingesetzten Diätfette beeinflusst. Bei Verwendung von Schweineschmalz als Diätfett war die Lag-Time der LDL nach Kupfer-induzierter Oxidation ca. doppelt so lang wie bei Verwendung von Lachsöl. Die Verwendung von Fischöl als Diätfett führt zu einer erhöhten Einlagerung von oxidationsempfindlichen n-3-PUFA in die LDL und somit zu einer erhöhten Empfindlichkeit der LDL gegenüber der Lipidperoxidation (HARATS et al. 1991, SUZUKAWA et al. 1995, RAMIREZ et al. 1998). Bei Fütterung von Fischöl an Ratten konnte neben der erhöhten *in vitro*-Oxidationsempfindlichkeit der LDL auch eine gesteigerte Konzentration an TBARS in den LDL und im Plasma nachgewiesen werden (SUZUKAWA et al. 1995).

Der Effekt von Fischöl auf die Lag-Time der LDL ist jedoch dosisabhängig. In einer Humanstudie von HIGGINS et al. (2000) führte eine geringe Zufuhr an Fischöl von 0,9 g/Tag zu keiner Steigerung der Oxidationsempfindlichkeit der LDL.

Die Vitamin E-Konzentrationen in der Diät hatten keinen signifikanten Effekt auf die Lag-Time. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass in der eigenen Studie bereits eine Vitamin E-Zulage von 100 IE Vitamin E/kg Diät ausreichte, um die LDL vor erhöhter Lipidperoxidation durch die Verwendung von hochungesättigten Fettsäuren zu schützen. Es ist bekannt, dass die Vitamin E-Konzentration in den LDL positiv mit der Lag-Time korreliert (DIEBER-ROTHENEDER et al. 1991, BAKALOVA et al. 1996, KONTUSH et al. 1996). In einem Fütterungsversuch von KEANEY et al. (1994) an Kaninchen resultierte aus einer Erhöhung der Vitamin E-Zulage von 1.000 IE Vitamin E/kg Diät auf 10.000 IE Vitamin E/kg Diät eine deutlich verlängerte Lag-Time.

Die maximale Konzentration an konjugierten Dienen wurde in der vorliegenden Studie weder durch die verschiedenen Diätfette noch durch die verschiedenen Vitamin E-Konzentrationen in der Diät beeinflusst. Es wäre jedoch zu erwarten gewesen, dass bei Verwendung von Lachsöl höhere Konzentrationen an konjugierten Dienen nachweisbar sind. Man kann wiederum davon ausgehen, dass die Vitamin E-Konzentrationen von 100 IE Vitamin E/kg Diät bereits ausreichend waren, um die LDL vor der erhöhten Lipidperoxidation bei Verwendung von Lachsöl zu schützen.

Die eigenen Resultate ergaben keinen Hinweis auf einen prooxidativen Effekt der hohen Vitamin E-Zulagen auf die LDL-Fraktion.

4.3 Parameter der Lipidperoxidation

Die Bestimmung von Parametern der Lipidperoxidation *in vivo* erweist sich als schwierig. Zum einen ist die Anreicherung von Markern der Lipidperoxidation im Blut gering, denn die *in vivo*-Lipidperoxidation findet nur in begrenzten Abschnitten in der Zelle statt (ESTERBAUER 1996). Weiterhin werden viele der Lipidperoxidationsprodukte schnell detoxifiziert und metabolisiert, so dass erhöhte Konzentrationen an Lipidperoxidationsprodukten oft nur für kurze Zeit und erst nach starker oxidativer Belastung im Organismus vorkommen. So enthalten die Zellen und Körperflüssigkeiten von gesunden Individuen oft nur sehr geringe Konzentrationen an Lipidperoxidationsprodukten. Aufgrund dieser Fakten ist es schwierig, geeignete Parameter zur Bestimmung der Lipidperoxidation zu finden (ESTERBAUER 1996). In

der eigenen Studie wurde als ein *in vitro* Parameter der Lipidperoxidation die Konzentration an TBARS in Leber und Plasma verwendet. Als ein *in vivo* Parameter der Lipidperoxidation diente die Konzentration an 7- β -OH-Cholesterol in der Leber.

4.3.1 Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen in Leber und Plasma

Im vorliegenden Versuch wurde die Konzentration an MDA mittels des TBA-Testes in Leber und Plasma als ein *in vitro*-Parameter der Lipidperoxidation gemessen.

Eines der wesentlichen Produkte, die als TBARS gemessen werden, ist das MDA, welches als ein sekundäres Lipidperoxidationsprodukt bei der Defragmentation von PUFA mit mehr als 2 oder 3 Doppelbindungen entsteht (DRAPER et al. 1986, DAVIES und GOLDBERG 1987, MÖRSEL und MEUSEL 1990, DIAZ-VELEZ et al. 1996). Aufgrund seiner hohen Reaktivität kann MDA mit Proteinen, Nukleinsäuren, Phospholipiden und der DNA reagieren (SUMMERFIELD und TAPPEL 1984, DRAPER et al. 1986, DRAPER et al. 1988).

Die Bestimmung der TBARS wird in der Literatur jedoch sehr kontrovers diskutiert. So werden die meisten Aldehyde, die mit dem Test ermittelt werden, erst während des Reaktionsansatzes gebildet (DRAPER et al. 1986, GUTTERIDGE und HALLIWELL 1990, TATUM et al. 1990). Außerdem ist die Methode relativ unspezifisch, da auch Gallenpigmente, Aminosäuren und Kohlenhydrate im Plasma mit der TBA reagieren und Chromogene bilden können (GUTTERIDGE und HALLIWELL 1990, ESTERBAUER 1996). Die TBARS sind somit lediglich ein Indikator für die Peroxidationsneigung von Gewebeproben *in vitro* unter den gegebenen Bedingungen des TBA-Testes (BUCKINGHAM 1985, STANGL et al. 2000).

In den eigenen Untersuchungen war die Konzentration an TBARS im Plasma der Tiere, deren Diät Lachsöl enthielt, erwartungsgemäß signifikant höher als im Plasma der Tiere, deren Diät Schweineschmalz enthielt. In der Gruppe, deren Diät Lachsöl und 100 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, war auch die Konzentration an TBARS in der Leber am höchsten. Diese erhöhte Konzentration an TBARS ist ein Hinweis auf eine erhöhte Sensitivität der hepatischen Lipidstrukturen gegenüber peroxidativen

Prozessen (STANGL et al. 2000). Es konnte bereits mehrfach in Fütterungsversuchen an Mäusen bzw. Ratten nachgewiesen werden, dass der Einsatz von Fischöl als Diätfett zu erhöhten Konzentrationen an TBARS in verschiedenen Geweben führt (DRAPER et al. 1986, SAITO und NAKATSUGAWA 1994, SUZUKAWA et al. 1995, IBRAHIM et al. 1997, STANGL et al. 2000). Die Ursache liegt in der erhöhten Bildung von MDA aufgrund der hohen Peroxidationsneigung der n-3-PUFA aus dem Fischöl (KINALSKI et al. 1999). Man kann jedoch davon ausgehen, dass die Induktion der peroxidativen Prozesse von der Dosierung des Fischöls abhängig ist. In einer Studie von ANDO et al. (2000) am Modelltier Ratte führte eine Zulage von 50 g Fischöl/kg Diät nicht zu einer Induzierung der Bildung von TBARS.

Wie zu erwarten, war die Konzentration an TBARS bei den Tieren, deren Diät Lachsöl und 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, im Plasma um ca. 57% und in der Leber um ca. 30 % geringer als bei den Ratten, die 100 IE Vitamin E/kg Diät erhielten. Hohe Vitamin E Zulagen reduzieren bei Fütterung von Lachsöl aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung die Bildung von TBARS (BUCKINGHAM 1985, HARATS et al. 1991, IBRAHIM et al. 1997, SUAREZ et al. 1999, GULTEKIN et al. 2001).

Bei Fütterung von Schweineschmalz als Diätfett hatten jedoch die Vitamin E-Konzentrationen in der Diät keine signifikanten Effekte auf die Konzentration an TBARS. Die Ursache liegt darin, dass Schweineschmalz weniger oxidationssensitiv ist und somit bei Verwendung von Schweineschmalz als Diätfett geringere Mengen an TBARS gebildet werden (IBRAHIM et al. 1997).

Bei oxidativem Streß wurde ein Konzentrationsanstieg der TBARS in verschiedenen Geweben nachgewiesen (STEIN et al. 1996, STANGL et al. 2000). Im vorliegenden Versuch verringerten jedoch die hohen Vitamin E-Zulagen sogar die Bildung von TBARS. Somit deuten die Ergebnisse der TBARS in Leber und Plasma dieser Studie nicht auf einen prooxidativen Effekt der hohen Vitamin E-Zulagen hin.

4.3.2 Konzentration an 7- β -Hydroxycholesterol in der Leber

Als ein *in vivo*-Marker der Lipidperoxidation wurde in der vorliegenden Studie die Konzentration des Oxysterols 7- β -OH-Cholesterol in der Leber untersucht.

Oxysterole werden durch die Cholesterinoxidation enzymatisch über das P-450-System der Leber und nichtenzymatisch durch freie Radikale gebildet (BREUER und BJÖRKHEM 1995, LINSEISEN und WOLFRAM 1998). Das Cholesterinmolekül wird an der Position C4 oder C7 oxidativ modifiziert. Durch die Abstraktion eines Wasserstoffmoleküls an der Position C7 entstehen die epimeren Hydroperoxide 7- α -OH-Cholesterol und 7- β -OH-Cholesterol (PANIANGVATI et al. 1995, CARUSO et al. 1996). Das Epimer 7- β -OH-Cholesterol wird als bevorzugter Marker für die Lipidperoxidation verwendet, denn der überwiegende Teil des 7- β -OH-Cholesterol ist nichtenzymatischen Ursprungs und entstammt somit direkt der Lipidperoxidation (SALONEN et al. 1997). Weiterhin konnte in der Ratte 7- β -OH-Cholesterol endogen durch oxidativen Streß erzeugt werden (BREUER und BJÖRKHEM 1995).

In der eigenen Studie wurde die Konzentration an 7- β -OH-Cholesterol signifikant durch die Art des verwendeten Diätfettes beeinflusst. Die Ratten, deren Diät Lachsöl enthielt, hatten höhere Konzentrationen an 7- β -OH-Cholesterol in der Leber als die Ratten, deren Diät Schweineschmalz enthielt. Die Anreicherung von PUFA in den Geweben, welche auf die Fütterung von Fischöl zurückzuführen ist, führt zu einer erhöhten Oxidationsempfindlichkeit der Lipide (HU et al. 1989, CHO und CHOI 1994). *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass in Membranlipiden die Peroxidation von PUFA zu einer oxidativen Bildung von Oxysterolen führt (TERAO et al. 1985, SEVANIEN und MC LEOD 1987).

Weiterhin hatten in der eigenen Studie die Vitamin E-Zulagen mit der Diät einen signifikanten Effekt auf die Konzentration an 7- β -OH-Cholesterol. Bei beiden Diätfetten führte eine Erhöhung der Vitamin E-Konzentration auf 10.000 IE Vitamin E/kg Diät zu einer um 54 % (Lachsöl) bzw. um 50 % (Schweineschmalz) geringeren Konzentration an 7- β -OH-Cholesterol.

An Zellkulturen konnte festgestellt werden dass der oxidative Streß, welcher durch Oxysterole induziert wird, durch α -Tocopherol vermindert werden kann (WILSON et al. 1997, CANTWELL und DEVERY 1998, MC CLUSKEY et al. 1999). In einer Humanstudie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass durch eine Supplementierung mit Antioxidantien (α -Tocopherol und Carotinoiden) die Bildung von Oxysterolen in den LDL verringert wurde (LINSEISEN et al. 1998, DGE INFO 5/99). Im Gegensatz

dazu fanden ZHOU et al. (1995) keinen Effekt von α -Tocopherol auf die Bildung von Oxysterolen *in vitro*.

In der vorliegenden Studie ergibt der Marker der *in vivo* Lipidperoxidation 7- β -OH-Cholesterol keinen Hinweis auf einen prooxidativen Effekt der hohen Vitamin E-Zulagen. Die hohen Vitamin E-Konzentrationen verringerten sogar die prooxidativen Effekte des Lachsöls.

4.3.3 Fettsäurezusammensetzung der Neutrallipid-, Phosphatidylethanolamin- und Phosphatidylcholinfraktion der Leber

In der eigenen Studie diente die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung der Leberphospholipidfraktionen zur Abschätzung möglicher prooxidativer Effekte der hohen Vitamin E-Zulagen.

Vitamin E moduliert die Struktur biologischer Membranen, indem es die Peroxidation von ungesättigten Fettsäureresten der Membranphospholipide hemmt und somit zum Schutz der Membranfluidität und der Membranfunktion beiträgt (GIASUDDIN und DIPLOCK 1981, KAPPUS und DIPLOCK 1992, VALK und HORNSTRA 2000). Außerdem hat Vitamin E membranstabilisierende Effekte aufgrund physikochemischer Interaktionen der α -Tocopherolseitenketten mit den Phospholipidfettsäureseitenketten (GIASUDDIN und DIPLOCK 1981, BUETTNER 1993, WANG und QUINN 1999).

Wie zu erwarten war, wurde im vorliegenden Versuch die Fettsäurezusammensetzung der Phospholipidfraktionen signifikant durch die Art der eingesetzten Diätfette beeinflusst. Die Fütterung von Lachsöl führte zu höheren Gewichtsprozenten an n-3-PUFA, geringeren Gewichtsprozenten an n-6-PUFA und demzufolge zu einem geringeren Quotienten von n-6-PUFA/n-3-PUFA als die Fütterung von Schweineschmalz. Bei Fütterung von Fischöl werden die n-6-PUFA in hepatischen Phospholipiden durch n-3-PUFA ersetzt (IRITANI et al. 1988, MALIS et al. 1990, YEO und HOLUB 1990, CHRISTIANSEN et al. 1991, DAGNELIE et al. 1993, NIOT et al. 1994, SAITO und NAKATSUGAWA 1994, SEN et al. 1997). Da die Fettsäurezusammensetzung der Membranen sehr sensitiv gegenüber diätetischer Manipulation (ZSIGMOND et al. 1990) ist, wird bevorzugt Docosahexaensäure in die

Membranen eingelagert (NIOT et al. 1994). Docosahexaensäure (C22:6 n-3) kommt in der vorliegenden Studie im Lachsöl in einer Konzentration von ca. 9g/100g Fettsäuren vor.

Die Vitamin E-Konzentrationen in der Diät hatten im vorliegenden Versuch keine gerichteten Effekte auf die Fettsäurezusammensetzung der Phospholipidfraktionen der Leber. Die Gewichtsprozentage der Gesamt-PUFA und die Gewichtsprozentage der Arachidonsäure (C20:4) und der Docosahexaensäure (C22:6), die sehr sensitiv gegenüber Lipidperoxidationsprozessen sind (SAITO und NAKATSUGAWA 1994, ZANETTI und CATALA 2000), wurden durch die verschiedenen Vitamin E-Zulagen in der Diät nicht beeinflusst. An Rattenlebermitochondrien (MAY und MC CAY 1968) und an Rattenerthrozyten (KAMEDA et al. 1985) konnte gezeigt werden, dass induzierter oxidativer Stress zu einem Verlust an Arachidonsäure führt. Auch für die Gesamt-PUFA konnte bei oxidativen Prozessen ein Verlust an PUFA in den Membranen nachgewiesen werden (KONTUSH et al. 1996). Da diese beschriebenen Prozesse in der eigenen Studie nicht nachgewiesen werden konnten, liegt ausgehend von der Fettsäurezusammensetzung der Leberphospholipide kein Hinweis auf prooxidative Wirkungen der hohen Vitamin E-Zulagen vor.

4.4 Einfluss der Vitamin E-Zulagen und der Diätfette auf die Hämolyse neigung der Erythrozyten

Erythrozyten sind aufgrund des hohen Sauerstoffgehalts und des hohen Anteils an Hb besonders empfindlich gegenüber oxidativem Stress. Hb stellt, mit einem Anteil von 95 % am löslichen Protein in den Erythrozyten, ein Haupttarget für oxidativen Stress dar (DAVIES 1988). In humanen Erythrozyten werden täglich etwa 3 % des gesamten Hb zu Methämoglobin (MetHb) oxidiert (BARTOSZ 1990). Bei dieser Reaktion entstehen neben Superoxidanionenradikalen reversible und irreversible Hemichrome (JAROLIM et al. 1990, GIULIVI et al. 1994). Die Superoxidanionenradikale reagieren zu Wasserstoffperoxid und reaktiven Hydroxylradikalen, wobei das Eisen in den Erythrozyten als Katalysator wirkt (HALLIWELL 1994, GIULIVI et al. 1994). Die irreversiblen Hemichrome bilden sogenannte „Heinz-Körper“, binden an die Erythrozytenmembran und führen unter anderem zur Lipidperoxidation, zur Beeinflussung von Membraninteraktionen und zu

einer gesteigerten Hämolyse (JACOB et al. 1968, PAYNTER und MARTIN 1980, FLYNN et al. 1983, REINHART et al. 1986, JAROLIM et al. 1990). Die Erythrozyten werden weiterhin aus dem Plasma mit freien Radikalen konfrontiert (BARTOSZ 1990). Im Plasma entstandene Superoxidanionenradikale und Wasserstoffperoxid können die Erythrozytenmembran durch Anionenkanäle passieren (HALLIWELL und GUTTERIDGE 1988, GUTTERIDGE und HALLIWELL 1990) Somit dienen die Erythrozyten als „Auffangbecken“ für freie Radikale aus dem Plasma. Aufgrund der genannten Mechanismen haben Erythrozyten eine hohe antioxidative Kapazität (HALLIWELL und GUTTERIDGE 1988, GUTTERIDGE und HALLIWELL 1990, GIULIVI et al. 1994).

Das wichtigste lipidlösliche kettenbrechende Antioxidans in der Erythrozytenmembran ist α -Tocopherol (BURTON et al. 1983). Das α -Tocopherol kann die Erythrozyten effektiv vor der, durch die Autoxidation des Hämoglobins induzierten, Peroxidation schützen (PAYNTER und MARTIN 1980, CHIU et al. 1997). Die Erythrozytenmembran besitzt spezifische Bindungsstellen für α -Tocopherol (WALLAT 1986, TOMASSI und SILANO 1996). Das α -Tocopherol ist in sogenannten Clustern in der hydrophoben Zone der Lipiddoppelschicht der Erythrozytenmembran lokalisiert (BONINA et al. 1996). Durch die physiko-chemischen Interaktionen zwischen den Phytylseitenketten des α -Tocopherol mit den Fettsäureseitenketten der PUFA der Phospholipide wirkt α -Tocopherol außerdem membranstabilisierend (DIPLOCK und LUCY 1973, PATERSON et al. 1994).

Weiterhin ist α -Tocopherol über die δ -Aminolävulinsäuredehydratase an der Regulation der Hämoglobinbiosynthese beteiligt (WANG und QUINN 1999). Die hämatologische Manifestation eines Vitamin E-Mangels äußert sich in hämolytischen Anämien und in einer gestörten Erythropoese, wobei beim Menschen und bei der Ratte die Anämie dominiert (PATERSON et al. 1994).

4.4.1 Osmotische Hämolyseresistenz der Erythrozyten in hypotonen Kochsalzlösungen

Die Messung der Hb-Freisetzung in hypotonen NaCl-Lösungen (osmotischer Hämolysetest) ist ein sensibler, aber unspezifischer Parameter für die Beurteilung

der Stabilität der Erythrozytenmembran (BUCKINGHAM 1985, EDER und KIRCHGESSNER 1997). Der osmotische Hämolysetest wird weiterhin als ein funktioneller Marker zur Beurteilung des Vitamin E-Status herangezogen (ELMADFA und LEITZMANN 1990, MORISSEY und SHEEHY 1990, KAPPUS und DIPLOCK 1992). So führt ein Vitamin E-Mangel in zahlreichen Studien zu einer erhöhten Hämolyseempfindlichkeit der Erythrozyten (PAYNTER und MARTIN 1980, VAN-ZOEREN-GROBEN et al. 1998, SCHINELLA et al. 1999).

In der eigenen Studie bestand hinsichtlich der osmotischen Hämolyseresistenz der Erythrozyten eine deutliche Interaktion der Faktoren Diätfett und Vitamin E-Dosierung in der Diät. Diese Interaktion konnte jedoch, aufgrund der hohen Standardabweichungen, nicht für alle NaCl-Konzentrationen statistisch gesichert werden.

Bei gleichzeitiger Fütterung von Lachsöl und einer Vitamin E-Zulage von 10.000 IE Vitamin E/kg Diät stieg der Anteil der hämolysierten Erythrozyten um 42 % (0,38 % NaCl), um 36 % (0,405 % NaCl), um 73 % (0,43 % NaCl) und sogar um 142 % (0,455 % NaCl) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Lachsöl, 100 IE Vitamin E/kg Diät). Im Gegensatz dazu führte eine hohe Vitamin E-Zulage bei gleichzeitiger Fütterung von Schweineschmalz zu keiner gesteigerten *in vitro*-Hämolyse.

Es ist bekannt, dass die Erythrozytenmembran bei Gabe von Lachsöl sehr sensitiv gegenüber der Vitamin E-Zulage mit der Diät ist (SUAREZ et al. 1999). Möglicherweise ist diese erhöhte Sensitivität der Erythrozytenmembran bei Gabe von Lachsöl eine Ursache für die erhöhte Hämolyse neigung der Erythrozyten bei gleichzeitiger Verwendung von sehr hohen Vitamin E-Konzentrationen. KEN et al. (1998) fanden an isolierten Rattenerthrozyten nach Gabe von Lachsöl und gleichzeitigem induziertem oxidativen Streß durch Eisen ebenfalls eine verminderte Hämolyseresistenz. Die verminderte Hämolyseresistenz hat ihre Ursache in der Anreicherung von oxidationssensitiven hochungesättigten Fettsäuren in der Erythrozytenmembran bei Gabe von Lachsöl (HAGVE et al. 1993, KIRCHGESSNER et al. 1994, PALOZZA et al. 1996).

Eine Korrelation zwischen hohen PUFA/SFA-Quotienten und erhöhter Hämolyse neigung der Erythrozyten wurde von ELMADFA und HAMMER (1982) erwähnt. In der eigenen Studie betrug der PUFA/SFA-Quotient des Lachsöls 1,1; der PUFA/SFA-Quotient des Schweineschmalz betrug jedoch lediglich 0,27.

Bei einer Studie an Ratten mit 25.000 IE Vitamin E/kg Diät und gleichzeitiger Verwendung von 10 % Weizenkeimöl konnte jedoch, im Gegensatz zu der eigenen Studie, keine erhöhte Hämolyseerhöhung der Erythrozyten nachgewiesen werden (YANG und DESAI 1977). Die Ursache für die Diskrepanz der eigenen Ergebnisse mit dieser Studie liegt möglicherweise in der Art des verwendeten Diätfettes (10 % Lachsöl vs. 10 % Weizenkeimöl) und in der Dauer des Versuches (2 Monate vs. 16 Monate). Weizenkeimöl und Lachsöl unterscheiden sich stark in ihren Fettsäurenspektren (n-3-PUFA-reiches Lachsöl vs. n-6-PUFA-reiches Weizenkeimöl).

Eine geringe Zufuhr an Fischöl (6 g/Tag) hatte in einer Humanstudie, bei einer bedarfsdeckenden Zufuhr an Vitamin E, keine erhöhte Hämolyseerhöhung der Erythrozyten zur Folge (MABILE et al. 2001). Diese Dosierung entspricht einer Aufnahme an Lachsöl von lediglich 0,1 g/kg KGW, während in der eigenen Studie die Tiere 8 g Lachsöl/kg KGW aufnahmen.

Die eigenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die gleichzeitige Verwendung von Lachsöl und sehr hohen Vitamin E-Zulagen die Hämolyseerhöhung der Erythrozyten erhöht. Da jedoch die osmotische Hämolyseerhöhung *in vitro* ein unspezifischer Parameter ist, wurde weiterhin die Hämolyse *in vivo* mittels der Hämolysemarker im Plasma untersucht.

4.4.2 Hämolysemarker im Plasma

Im vorliegenden Versuch wurden zur Charakterisierung der Hämolyseerhöhung *in vivo* die Konzentration an freiem Hb, die Aktivität der sauren Phosphatase und der LDH sowie die Hp-Bindungskapazität im Plasma ermittelt.

Bei der Hämolyse kommt es zum erhöhten Austritt von freiem Hb, der sauren Phosphatase und der LDH aus den Erythrozyten in das Plasma (KRAUS et al. 1997). Das Enzym LDH ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym. LDH ist jedoch in die anaerobe Glykolyse involviert, welche den Erythrozyten zur Energiegewinnung dient, und ist deshalb als Hämolysemarker geeignet (KOOLMANN und RÖHM 1998).

Freies Hb und Hp sind aufgrund des Katabolismus des Hb, welches aus defekten Erythrozyten herausdiffundiert, als Hämolysemarker geeignet (EBERLE et al. 1996).

Hp bindet im Plasma zirkulierendes Hb. Der Hp-Hb-Komplex wird von den Leberzellen absorbiert und vom retikuloendothelialen System abgebaut (SALONEN et al. 1996, VITTORI et al. 1999, DELANGHE et al. 2000). Somit wird der Körper einerseits vor Hb-Verlusten geschützt und andererseits verringert Hp die katalytische Wirkung des Hb und schützt somit auch vor der Hb-induzierten Lipidperoxidation (GUTTERIDGE und HALLIWELL 1990, THOMAS 1992).

In der vorliegenden Studie war der Einfluss der Vitamin E-Konzentrationen auf die Hämolysemarker im Plasma abhängig von der Art des Diätfettes.

Bei Gabe von Lachsöl als Diätfett und einer Vitamin E-Konzentration von 10.000 IE Vitamin E/kg Diät stieg sowohl die Aktivität der LDH (+48 %), als auch die Aktivität der sauren Phosphatase (+62 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Lachsöl, 100 IE Vitamin E/kg Diät) an. Diese Aktivitätszunahme der sauren Phosphatase und der LDH deuten darauf hin, dass die sehr hohen Vitamin E-Zulagen von 10.000 IE Vitamin E/kg Diät bei gleichzeitiger Verwendung von Lachsöl die Hämolyse neigung der Erythrozyten *in vivo* erhöhen. In einer Studie von EBERLE et al. (1996) führte induzierter oxidativer Streß zu einem Anstieg der Aktivität der LDH und zu einer erhöhten Hämolyse neigung der Erythrozyten.

Im Gegensatz dazu sank bei den Gruppen, deren Diät Schweineschmalz enthielt, die Aktivität der LDH und der sauren Phosphatase im Plasma bei einer Vitamin E-Zulage von 10.000 IE Vitamin E/kg Diät im Vergleich zur Kontrollgruppe (Schweineschmalz, 100 IE Vitamin E/kg Diät) deutlich um 23% bzw. um 32 % ab. Diese Ergebnisse deuten auf eine verminderte Hämolyse neigung der Erythrozyten bei Verwendung von Schweineschmalz und hohen Vitamin E-Zulagen hin. In Studien von JAKOBSEN et al. (1995) an Broilerküken und ILAVAZHAGAN et al. (2001) an Ratten führte eine Zufuhr an Vitamin E von 500 IE Vitamin E/kg Diät bzw. 60 IE Vitamin E/Tag zu einer geringeren Aktivität der LDH und somit zu einer geringeren Hämolyse.

In der vorliegenden Studie wurde die Konzentration an freiem Hb und die Hp-Bindungskapazität lediglich durch die Art des eingesetzten Diätfettes beeinflusst. Bei den Ratten, deren Diät Lachsöl enthielt, war die Konzentration an freiem Hb im Plasma höher und die Hp-Bindungskapazität niedriger, als bei den Ratten, deren Diät Schweineschmalz enthielt. EBERLE et al. (1996) geben an, dass bei einer erhöhten

Hämolyse bei Ratten die Hp-Konzentration im Plasma sinkt und die Konzentration an freiem Hb im Plasma steigt. Auch VITTORI et al. (1999) stellten bei induzierter Hämolyse ein Absinken der Hp-Konzentration im Plasma fest. Somit deuten die Ergebnisse der eigenen Studie auf eine erhöhte *in vivo* Hämolyse bei Verwendung von Lachsöl als Diätfett hin.

In der eigenen Studie bestanden bei den Lachsölgruppen keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration an freiem Hb und in der Hp-Bindungskapazität zwischen den Vitamin E-Zulagestufen 100 bzw. 10.000 IE Vitamin E/kg Diät.

Im Gegensatz dazu führte die gleichzeitige Fütterung von Schweineschmalz und einer Vitamin E-Zulage von 10.000 IE Vitamin E/kg Diät zu einem nominalen Absinken der Konzentration an freiem Hb und zu einem signifikanten Anstieg der Hp-Bindungskapazität im Vergleich zur Kontrollgruppe (Schweineschmalz, 100 IE Vitamin E/kg Diät). Dieses Ergebnis läßt wiederum folgern, dass bei Verwendung von Schweineschmalz als Diätfett die hohen Vitamin E-Zulagen eine verringerte Hämolyseempfindlichkeit der Erythrozyten zur Folge hatten.

Die hohen Vitamin E-Konzentrationen hatten bei den Lachsölgruppen keinen Effekt auf die Konzentration an freiem Hb und auf die Hp-Bindungskapazität im Plasma. Jedoch war die Aktivität der LDH und der sauren Phosphatase im Plasma bei gleichzeitiger Zufuhr von hohen Vitamin E-Zulagen und Lachsöl erhöht.

Eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis liegt darin, dass die hohen Vitamin E-Zulagen in Verbindung mit Lachsöl zu einer veränderten Membranpermeabilität, welche zum Beispiel durch eine erhöhte Bildung von „Heinz Körpern“ ausgelöst wurde, und somit zu einem erhöhten Austritt von LDH und der sauren Phosphatase in das Plasma geführt haben.

Weiterhin ist noch anzumerken, dass die Hämolysemarker nicht nur bei hämolytischen Prozessen in veränderter Konzentration im Plasma auftreten können. So ist Haptoglobin auch ein Akute-Phase-Protein und kann somit auch bei entzündlichen Prozessen in veränderter Konzentration vorliegen (KRAUS et al. 1997). Erhöhte Konzentrationen an LDH können zum Beispiel auch bei Skelettmuskelerkrankungen auftreten (BUDDECKE 1994).

Somit kann man nicht generell von einer erhöhten *in vivo*-Hämolyse neigung bei Verwendung von hohen Vitamin E-Zulagen und Lachsöl sprechen.

4.4.3 Aktivität antioxidativer Enzyme und Konzentration an Glutathion im Erythrozytencytosol

Um die Ursachen der erhöhten Hämolyse neigung der Erythrozyten *in vitro* und die erhöhte Aktivität der *in vivo* Hämolyse marker saure Phosphatase und LDH bei gleichzeitiger Fütterung von Lachsöl und hohen Vitamin E-Zulagen zu untersuchen, wurde sowohl die Aktivität der antioxidativen Enzyme SOD, Katalase und GSH-Px, als auch die Aktivität der G-6-P-DH und die Konzentration an GSH im Erythrozytencytosol untersucht.

Das Enzym G-6-P-DH (EC 1.1.1.49) ist ein Enzym des Hexosemonophosphatweges, welcher in cytosolischen Kompartimenten lokalisiert ist. Dieser Stoffwechselweg produziert NADPH (NINFALI et al. 1991). Dieses NADPH wiederum dient zum einem der Stabilisierung der Katalase (GAETANI et al. 1989) und weiterhin der Regeneration von GSH aus GSSG mittels der Glutathionreduktase (MEISTER 1994, MALMEZAT et al. 2000).

In den Erythrozyten werden die bei der Autoxidation des Hb entstehenden Superoxidanionenradikale mit Hilfe der SOD zu Wasserstoffperoxid abgebaut (HALLIWELL 1984, GIULIVI et al. 1994). Das Wasserstoffperoxid wird wiederum mittels der Enzyme Katalase und GSH-Px abgebaut (GIULIVI et al. 1994, GAETANI et al. 1989).

In der vorliegenden Studie wurde die Aktivität der antioxidativen Enzyme durch die Interaktion der Faktoren Diätfett und Vitamin E-Konzentration in der Diät beeinflusst. Generell waren die Enzymaktivitäten bei der Gruppe, deren Diät Lachsöl und 100 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, am höchsten. Die hohe Aktivität der antioxidativen Enzyme kompensiert den oxidativen Effekt des Lachsöls (OLIVIERI et al. 1988, ATALAY et al. 2000). So konnten an Ratten bei Fütterung von Fischöl, im Vergleich zur Fütterung von Diätfetten mit einem geringeren Anteil an n-3-PUFA, höhere hepatische Konzentrationen der antioxidativen Enzyme Katalase, GSH-Px und SOD nachgewiesen werden (PULLA-REDDY und LOKESH 1994). Bei einer Studie an Mäusen (VENKATRAMAN et al. 1994) konnte gezeigt werden, dass die Fütterung von Fischöl die Messenger-Ribonucleinsäure (mRNA)-Konzentration der hepatischen antioxidativen Enzyme Katalase, SOD und GSH-Px erhöht.

In den Lachsölgruppen führte eine Zulage von 10.000 IE Vitamin E/kg Diät zu einem Abfall der Aktivität der Katalase um 70 %, der GSH-Px um 59 % und der SOD um 33 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (Lachsöl, 100 IE Vitamin E/kg Diät). Auch die Aktivität der G-6-P-DH und die Konzentration an GSH war bei Fütterung von Lachsöl und 10.000 IE Vitamin E/kg Diät um 39 % bzw. um 34 % geringer als bei der Kontrollgruppe (Lachsöl, 100 IE Vitamin E/kg Diät).

In der vorliegenden Studie hatte jedoch die Fütterung von Schweineschmalz und hohen Vitamin E-Zulagen keine signifikanten Effekte auf die Aktivität sämtlicher untersuchter antioxidativer Enzyme und keinen Einfluss auf die Aktivität der G-6-P-DH, sowie auf die Konzentration an GSH. Man kann somit davon ausgehen, dass sowohl die verringerte Aktivität der antioxidativen Enzyme, als auch die erhöhte Hämolyse neigung der Erythrozyten bei hohen Vitamin E-Zulagen in einem engen Zusammenhang mit der Gabe von Lachsöl steht.

Es konnte nachgewiesen werden, dass Fischöl als Diätfett oxidativen Streß bei Ratten induziert (KUEI et al. 2000) und die Sensitivität von Erythrozyten gegenüber oxidativem Streß erhöht (KEN et al. 1998, OARADA et al. 2000).

Es konnte jedoch auch mehrfach nachgewiesen werden, dass bei induziertem oxidativen Streß, welcher im vorliegenden Versuch durch die oxidationssensitiven n-3-PUFA ausgelöst und möglicherweise durch die hohen Vitamin E-Zulagen verstärkt wurde, die Aktivität antioxidativer Enzyme in den Erythrozyten absinkt (SARKAR et al. 1995, KINALSKI et al. 1999, VIDYA et al. 2000, GULTEKIN et al. 2001). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass bei induziertem oxidativen Streß die Konzentration an GSH in den Erythrozyten abnimmt (SARKAR et al. 1997, RATHORE et al. 2000).

Die exzessive Zufuhr an Vitamin E kann möglicherweise dazu führen, dass sich die regulatorischen Prozesse des antioxidativen Schutzsystems umkehren und somit zu einer Supremierung der Komponenten des antioxidativen Schutzsystems führen (CADENAS et al. 1995). Möglicherweise hemmen in der vorliegenden Studie die hohen Vitamin E-Zulagen in Anwesenheit von Fischöl die Induzierung der Genexpression der antioxidativen Enzyme. An kultivierten Muskelzellen der Rattenaorta konnte eine Downregulation der Genexpression der SOD bei einer Langzeitinkubation mit Vitamin E nachgewiesen werden (PIN et al. 1999).

An Monozyten konnte gezeigt werden, dass α -Tocopherol die Phosphorylierung und Translokation der cytosolischen Untereinheit $p^{47\text{ phox}}$ der NADPH-Oxidase hemmt. Beide Prozesse sind jedoch notwendig, um die NADPH-Oxidase in ihre aktive Form zu überführen. Da die NADPH-Oxidase in Monozyten die Bildung von Superoxidanionenradikalen aus molekularem Sauerstoff induziert, hemmt somit α -Tocopherol die Bildung von Superoxidanionenradikalen (CACHIA et al. 1998, MEYDANI et al. 2001). Auch in humanen Endothelzellen der Koronararterien wurde die Upregulation der Expression der SOD-mRNA und des SOD Proteins bei hohen Vitamin E-Zulagen blockiert (MEHTA und LI 2001). Diese Mechanismen sind möglicherweise die Ursache für die verminderte Aktivität der SOD in den Erythrozyten bei gleichzeitiger Verwendung von Lachsöl und 10.000 IE Vitamin E/kg Diät in der eigenen Studie. Es ist jedoch anzumerken, dass der reife Erythrozyt keinen Zellkern besitzt (THEWS et al. 1991) und somit eine Beeinflussung der Genexpression antioxidativer Enzyme im reifen Erythrozyten durch Lachsöl und Vitamin E nicht möglich ist.

Somit könnten Lachsöl und Vitamin E lediglich während der Erythropoese einen Effekt auf die Genexpression antioxidativer Enzyme in den kernhaltigen Vorstufen der Erythrozyten (Proerythroblasten und Makroblasten) (THEWS et al. 1991) auslösen. Diese These ist jedoch rein spekulativ und würde genauere Untersuchungen erfordern.

Eine geringere Aktivität der Erythrozyten-SOD führt dazu, dass weniger Wasserstoffperoxid produziert wird. Demzufolge wird theoretisch auch weniger Katalase und GSH-Px benötigt, um das Wasserstoffperoxid abzubauen. Weiterhin führt die geringere Aktivität der G-6-P-DH dazu, dass weniger NADPH für die Stabilisierung der Katalase und für die Regeneration von GSH mittels Glutathionreduktase zur Verfügung steht (SARKAR et al. 1995). Ein verringerter intrazellulärer Pool an GSH führt wiederum zu einem Absinken der Aktivität der GSH-Px (GIULIVI et al. 1994). Bei Vitamin E-defizitären Ratten, bei Ratten mit Cadmium-Intoxikation und bei Ratten, die oxidativem Streß durch Hypoxie ausgesetzt wurden, führte eine verringerte G-6-P-DH Aktivität zu einer geringeren Aktivität der GSH-Px und zu einer geringeren Konzentration an GSH (NINFALI et al. 1991, SARKAR et al. 1995, ILAVAZHAGAN et al. 2001). Auch ein genetischer Defekt, welcher eine verringerte Konzentration der G-6-P-DH zur Folge hat, führt zu geringeren NADPH-

Konzentrationen (GAETANI et al. 1989). Außerdem scheint das NADPH aus dem Hexosemonophosphatweg für die Regeneration der Tocopheroxyradikale notwendig zu sein (KAGAN et al. 1990).

Aufgrund der verringerten Enzymaktivitäten ist es möglich, dass sich reaktive Sauerstoffspezies in den Erythrozyten anreichern. Zusätzlich können Radikale aus dem Plasma die Erythrozytenmembran durch Anionenkanäle passieren (CHANCE et al. 1979, GUTTERIDGE und HALLIWELL 1990). Es konnte an Ratten gezeigt werden, dass reaktive Sauerstoffspezies wiederum die Aktivität der SOD verringern (SCHINELLA et al. 1999).

Eine verringerte Aktivität der Katalase und eine geringe Konzentration an GSH führt zur Bildung von MetHb und somit zu einer erhöhten Hämolyseempfindlichkeit der Erythrozyten (EATON et al. 1971, GILUIVI et al. 1994). SUTTON et al. (1976) konnten nachweisen, dass bei Abwesenheit der Enzyme Katalase und SOD eine bis zu 4 mal höhere MetHb-Bildung stattfindet, als bei „normalen“ Enzymaktivitäten. Eine geringe Konzentration an GSH kann weiterhin zu strukturellen Läsionen der Membranproteine der Erythrozyten führen (KURATA et al. 1994), welche wiederum zu einem Austritt von Hb, LDH und saure Phosphatase ins Plasma führen kann (KRAUS et al. 1997). Bei einem genetischen Defekt für G-6-P-DH besteht eine erhöhte Sensitivität der Erythrozyten gegenüber Lipidperoxidation (TARLOV und KELLERMEYER 1961, CLEMENS et al. 1985, LUZZATTO und MEHTA 1990).

In der vorliegenden Studie kann man somit davon ausgehen, dass die verringerten Enzymaktivitäten der antioxidativen Enzyme und die verringerte Konzentration an GSH eine Ursache für die erhöhte Hämolyse neigung der Erythrozyten bei gleichzeitiger Gabe von Lachsöl und hohen Vitamin E-Zulagen sind. Man kann daraus die Hypothese ableiten, dass dieser verminderte antioxidative Status der Erythrozyten zu Lipidperoxidation und Proteindegradationen geführt hat.

4.4.4 Konzentration an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen im Erythrozyten-cytosol

Als ein eher unspezifischer, aber häufig verwendeter Parameter der Lipidperoxidation in den Erythrozyten wurde in der vorliegenden Studie die Konzentration an TBARS im Erythrozyten-cytosol bestimmt.

Die Konzentration an TBARS im Erythrozytencytosol war bei der Gruppe, deren Diät Lachsöl und 100 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, am höchsten.

Durch den hohen Anteil an n-3-PUFA im Lachsöl werden in der Erythrozytenmembran oxidationsempfindliche hochungesättigte Fettsäuren angereichert (MEAD 1980, PALOZZA et al. 1996), während bei Verwendung von Schweineschmalz ein deutlich geringerer Anteil an diesen hochungesättigten Fettsäuren nachgewiesen werden konnte. Durch die veränderte Membranfettsäurezusammensetzung verändert sich auch die Empfindlichkeit der Erythrozyten gegenüber oxidativem Streß (PALOZZA et al. 1996), so dass die Konzentration an TBARS bei Gabe von Schweineschmalz geringer war, als bei Gabe von Lachsöl.

Erwartungsgemäß sank in der vorliegenden Studie die Konzentration an TBARS bei den Tieren, deren Diät Lachsöl und 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, im Vergleich zur Kontrollgruppe nominal ab. Es konnte bereits mehrfach bei Fischölsupplementierten Ratten gezeigt werden, dass aufgrund der antioxidativen Eigenschaften des Vitamin E die Konzentration an TBARS bei Zulage von Vitamin E in den Geweben abnimmt (KEN et al. 1998, SUAREZ et al. 1999, GULTEKIN et al. 2001).

Die Konzentration an TBARS im Erythrozytencytosol war bei den Gruppen, die mit der Diät Schweineschmalz erhielten, unabhängig von der Vitamin E-Zufuhr.

Die eigenen Ergebnisse bezüglich der Konzentration an TBARS stehen zunächst in Diskrepanz zu der Hypothese, dass die gesunkene Enzymaktivität in den Erythrozyten, aufgrund von Lachsölfütterung und hohen Vitamin E-Dosierungen, zu einer erhöhten Lipidperoxidation in den Erythrozyten führt. Mögliche Ursachen für diese Diskrepanz liegen zum einen im TBA-Test. Es ist bekannt, dass die TBARS lediglich ein Indikator für die Peroxidationsneigung von Geweben *in vitro* unter Bedingungen des jeweiligen TBA-Testes sind (BUCKINGHAM 1985, STANGL et al. 2000). Die mit dem TBA-Test erfaßten Aldehyde sind weiterhin lediglich nur eines von vielen Produkten der Lipidperoxidation. MDA kann außerdem mit den Aminosäureseitenketten der Proteine Schiff'sche Basen bilden. Diese Reaktion kann dazu führen, dass das gebundene MDA nicht mit erfaßt wird und somit kann das Ausmaß der Lipidperoxidation unterschätzt werden (DAVIES und GOLDBERG 1987). Es ist jedoch schwierig, andere Marker der Lipidperoxidation oder sogar freie

Radikale direkt zu bestimmen. Freie Radikale sind sehr kurzlebig und kommen nur in geringer Konzentration in den Geweben vor (HALLIWELL et al. 1992). Weiterhin ist noch anzumerken, dass oxidative Schäden an Erythrozyten auch zu Proteindegradationen führen können, welche eine intrazelluläre Akkumulation von „Heinz-Körpern“ und somit eine erhöhte Hämolyse zur Folge haben (PAYNTER und MARTIN 1980, FLYNN et al. 1983, REINHART et al. 1986, JAROLIM et al. 1990). Mit dem TBA-Test werden jedoch mögliche Proteindegradationen nicht erfaßt.

Aus den genannten Gründen schließt das Ergebnis der TBARS nicht zwingend aus, dass es bei Fütterung von hohen Vitamin E-Zulagen und Lachsöl, aufgrund der gesunkenen Enzymaktivitäten in den Erythrozyten, zu einer vermehrten Anreicherung von reaktiven Sauerstoffspezies und somit zu erhöhter Lipidperoxidation und Proteindegradation gekommen ist.

4.4.5 Fettsäurezusammensetzung der Erythrozytenmembran

Eine weitere mögliche Ursache für die erhöhte Hämolyse neigung ist eine verringerte Fluidität der Erythrozytenmembran (KAMEDA et al. 1985, YANAGAWA et al. 1999). Um mögliche Veränderungen der Fluidität der Membran zu beurteilen, wurde die Konzentration an Cholesterin in der Erythrozytenmembran und die Fettsäurezusammensetzung der Erythrozytenmembran bestimmt. Die Fluidität der Membran ist unter anderem von deren Fettsäurezusammensetzung abhängig. Mit steigender Anzahl an ungesättigten Fettsäuren steigt die Fluidität der Membran, da die Doppelbindungen der PUFA Veränderungen in der semikristallinen Membranstruktur verursachen (KOOLMAN und RÖHM 1998).

Cholesterin senkt die Membranfluidität und die Permeabilität für polare Stoffe (SILBERNAGEL und DESPOPOULUS 2001). Cholesterin behindert *in vitro* die cis-trans-Isomerisierungen an den Doppelbindungen und führt somit zu einer engeren Packung der Acylketten (TATJIMA und GEHRSFELD 1978, STILWELL et al. 1994). Dieser sogenannte „condensing effect“ führt zu der Verringerung der Membranpermeabilität (DEMEL et al. 1972). Eine verringerte Konzentration an Cholesterin würde zu einer Disorganisation in der Lipiddoppelschicht führen (MAY und MC CAY 1968).

Es ist bekannt, dass die Fettsäurezusammensetzung der Erythrozytenmembran von der Fettsäurezusammensetzung des eingesetzten Diätfettes abhängig ist. In der eigenen Studie waren bei den Gruppen, deren Diät Lachsöl enthielt, die Gewichtsprozentage an n-3-PUFA höher und die Gewichtsprozentage an n-6-PUFA niedriger und demzufolge der Quotient von n-6-PUFA/n-3-PUFA geringer, als bei den Gruppen, deren Diät Schweineschmalz enthielt. Es ist bekannt, dass bei Fütterung von Fischöl die Konzentration an n-3-PUFA in der Erythrozytenmembran steigt (HAGVE et al. 1993).

Die Vitamin E-Zulagen mit der Diät hatten jedoch keine gerichteten Effekte auf die Fettsäurezusammensetzung der Erythrozytenmembran. Die Gewichtsprozentage der Gesamt-PUFA und die Gewichtsprozentage der Arachidonsäure (C20:4) und der Docosahexaensäure (C22:6), welche sehr sensitiv gegenüber Lipidperoxidationsprozessen sind (SAITO und NAKATSUGAWA 1994, ZANETTI und CATALA 2000), wurden nicht durch die verschiedenen Vitamin E-Zulagen mit der Diät beeinflusst. Eine reduzierte Fluidität der Membran würde jedoch mit einem verringerten Anteil an PUFA und einem höheren Anteil an SFA einhergehen (KEDDAD et al. 1996). Induzierter oxidativer Stress führt in Studien von MAY und MC CAY (1968), RICE-EVANS und HOCHSTEIN (1981) und KAMEDA et al. (1985) zu einer geringeren Konzentration an Arachidonsäure in den Erythrozyten und somit zu einer verringerten Membranfluidität, sowie zu einer erhöhten Hämolyse.

Weder die Art des eingesetzten Diätfettes, noch die verschiedenen Vitamin E-Konzentrationen hatten einen Einfluss auf die Konzentration an Cholesterin in der Erythrozytenmembran.

Ausgehend von den eigenen Ergebnissen und den Literaturberichten läßt sich schlußfolgern, dass die Vitamin E-Zulagen keinen Effekt auf die Lipidzusammensetzung und die Cholesterinkonzentration in der Erythrozytenmembran und somit wahrscheinlich auch nicht auf die Fluidität der Membran hatten. Es ergab sich somit kein Hinweis, dass die Ursache für die erhöhte Hämolyse bei Fütterung von Lachsöl und hohen Vitamin E-Zulagen in einer veränderten Fluidität lag.

4.5 Parameter des Lipidstoffwechsels

4.5.1 Konzentration an Triglyceriden und Cholesterin im Plasma, in den Lipoproteinfraktionen und in der Leber

Sowohl im ersten, als auch im zweiten Fütterungsversuch war die Konzentration an Triglyceriden im Plasma und in den Lipoproteinfraktionen bei den Ratten, deren Diät Lachsöl enthielt, geringer als bei den Ratten, deren Diät Schweineschmalz enthielt. Die Konzentration an Triglyceriden in der Leber war nur im ersten Versuch bei den Gruppen, die mit der Diät Lachsöl erhielten, nominal geringer als bei den Gruppen, deren Diät Schweineschmalz enthielt. Der hypotriglyceridämische Effekt von Fischöl wurde in zahlreichen Studien beschrieben (NESTEL et al. 1984, ZSIGMOND et al. 1990, MEYDANI et al. 1991, NAIR et al. 1993, NIOT et al. 1994, SONG et al. 2000). Es ist bekannt, dass Fischöl hepatische lipogene Enzyme wie Fettsäure-Synthase und Acetyl-Coenzym A-Carboxylase hemmt (HARRIS et al. 1983, NIOT et al. 1994, YEO und HOLUB 1990, EDER und KIRCHGESSNER 1998, IKEDA et al. 1998, HIROKO et al. 1999) und die Verfügbarkeit der Fettsäuren für die Lipidsynthese in der Leber vermindert (WILLUMSEN et al. 1993). Deshalb wird die hepatische Sekretion von VLDL inhibiert (HEROLD und KINSELLA 1986, YEO und HOLUB 1990, MEYDANI et al. 1991, VIDGREN et al. 1997). Weiterhin stimuliert Fischöl die hepatische peroxisomale β -Oxidation (SANDERS et al. 1985, YEO und HOLUB 1990, CHEN et al. 1993, TAKASHI et al. 2000).

Die Konzentrationen an Cholesterin waren im ersten Versuch und im zweiten Versuch im Plasma, in der LDL und in der HDL-Fraktion bei den Gruppen, deren Diät Lachsöl enthielt, niedriger als bei den Gruppen, die Schweineschmalz erhielten.

Auch der „Cholesterinsenkende Effekt“ des Fischöls wurde in zahlreichen Studien beschrieben (ZSIGMOND et al. 1990, MEYDANI et al. 1991, CHIANG und TSAI 1995, FREMONT et al. 1995). Zum einen hemmt Fischöl die VLDL-Synthese in der Leber und zum anderen reduziert Fischöl die Aktivität des Enzyms β -3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzym A-Reduktase (β -HMG-CoA-Reduktase) (CHIANG und TSAI 1995, SUGANO et al. 1997), welches in die Cholesterinbiosynthese involviert ist.

Die Vitamin E-Zulagen hatten in beiden Versuchen keine gerichteten Effekte auf die Konzentration an Triglyceriden und an Cholesterin in den Geweben.

Der Einfluss hoher Vitamin E-Dosierungen auf die Konzentration an Triglyceriden und Cholesterin wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert. So konnte in einer Studie bei einer Vitamin E-Zulage von 500 mg Vitamin E/kg Diät an Ratten ein Effekt auf die Konzentration an Triglyceriden in der Leber nachgewiesen werden (LEVANDER et al. 1973). In verschiedenen Humanstudien ist die Konzentration an Triglyceriden (SCHWARTZ und RUTHERFORD 1981, KAPPUS und DIPLOCK 1992) bzw. an Cholesterin (HOWARD et al. 1982, KAPPUS und DIPLOCK 1992) bei hohen Vitamin E-Zulagen gestiegen. Andere Humanstudien wiederum zeigen keine Effekte hoher Vitamin E-Zulagen auf die Konzentration an Triglyceriden bzw. Cholesterin im Plasma und in den Lipoproteinfraktionen (TSAI et al. 1978, BIERENBAUM et al. 1985, HATAM und KAYDEN 1981).

Sowohl die Konzentrationen an Triglyceriden und Cholesterin im Kot, als auch die scheinbare Verdaulichkeit der Triglyceride wurden weder durch die eingesetzten Diätfette noch durch die verschiedenen Vitamin E-Zulagen mit der Diät beeinflusst.

Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass lediglich die verwendeten Diätfette einen gesicherten Einfluss auf die Konzentration an Triglyceriden und Cholesterin in den verschiedenen Geweben hatten, nicht jedoch die unterschiedlichen Vitamin E-Zulagen.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, Wirkungen hoher Vitamin E-Zulagen auf Parameter des antioxidativen Schutzsystems und der Lipidperoxidation zu untersuchen. Anhand dieser Parameter sollten mögliche prooxidative Wirkungen einer exzessiven Vitamin E-Zufuhr *in vivo* geprüft werden.

Zu diesem Zweck wurden zwei zwei-faktorielle Fütterungsversuche mit männlichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Die Tiere erhielten mit der Diät zwei verschiedene Diätfette (Lachsöl bzw. Schweineschmalz) und verschiedene Vitamin E-Zulagen (100, 500, 1.000, 3.000, 10.000 IE Vitamin E/kg Diät).

Die Ergebnisse der eigenen Studie und zahlreiche Literaturberichte lassen diese Folgerungen zu:

Aufgrund der gemessenen Aktivitäten verschiedener antioxidativer Enzyme in der Leber, der Empfindlichkeit der LDL gegenüber Kupfer-induzierter Oxidation, der Parameter der Lipidperoxidation und der Fettsäurezusammensetzung der Leberphospholipidfraktionen konnten keine direkten prooxidativen Effekte der hohen Vitamin E-Zulagen nachgewiesen werden.

Die Hämolyse neigung der Erythrozyten *in vitro* und die Aktivität der Hämolyse marker LDH und saure Phosphatase war bei Gabe hoher Vitamin E-Zulagen erhöht, jedoch ausschließlich bei Verwendung von Lachsöl als Diätfett. Die Ursache der erhöhten Hämolyse neigung der Erythrozyten bei Verwendung von Lachsöl und hohen Vitamin E-Zulagen scheint nicht eine direkte prooxidative Wirkung des Vitamin E zu sein. Aufgrund der ermittelten Resultate ist es eher wahrscheinlich, dass die erhöhte Hämolyse neigung in einer verminderten Aktivität der antioxidativen Enzyme, der G-6-P-DH und in einer verringerten Konzentration an GSH im Erythrozytencytosol begründet ist. Aufgrund dieses verringerten antioxidativen Status ist es möglich, dass sich reaktive Sauerstoffspezies in den Erythrozyten anreichern und das vermehrt MetHb in den Erythrozyten gebildet wird.

Somit kann man zusammenfassend ableiten, dass die verwendeten Vitamin E Megadosierungen anhand der gemessenen Parameter in der vorliegenden Studie

keine prooxidativen Effekte *in vivo* hervorgerufen haben. Die Hämolyse neigung der Erythrozyten wurde jedoch sekundär, über eine Modifizierung der antioxidativen Enzyme der Erythrozyten bei Zulage hoher Vitamin E-Dosierungen und n-3-PUFA-reichen Diätfetten, erhöht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie können nicht direkt auf den Menschen übertragen werden. Es läßt sich jedoch schlussfolgern, dass sehr hohe Dosierungen an Vitamin E negative Wirkungen auf das antioxidative Schutzsystem der Erythrozyten haben können und das hohe Vitamin E-Dosierungen, vor allem in Verbindung mit hochungesättigten Diätfetten, nicht unkontrolliert supplementiert werden sollten.

Aus der behandelten Thematik ergibt sich die interessante Fragestellung, welche genauen molekularen Mechanismen der verminderten Enzymaktivität der antioxidativen Enzyme in den Erythrozyten zugrunde liegen und ob die hohen Vitamin E-Zulagen in Verbindung mit Lachsöl die Genexpression der antioxidativen Enzyme während der Erythropoese in den kernhaltigen Vorläuferzellen der Erythrozyten beeinflussen.

6. Zusammenfassung

Bei *in vitro*-Studien an mizellaren Suspensionen und an isolierten Lipoproteinen geringer Dichte (Low Density Lipoprotein-LDL) konnten prooxidative Wirkungen von hohen Vitamin E-Dosierungen nachgewiesen werden (MUKAI et al. 1993, Lipids 28 (8), 747-752). Als Ursache dieses prooxidativen Effektes wurde die Reaktion der Tocopheryloxylradikale mit anderen Peroxylradikalen diskutiert. Eine Studie an Legehennen deutet sogar auf einen prooxidativen Effekt von hohen Vitamin E-Zulagen *in vivo* hin (SÜNDER et al. 1999, Arch Anim Nutr 52, 185-194).

Ausgehend von diesen Befunden sollte in dieser Studie die Wirkung einer exzessiven Vitamin E-Zufuhr auf Parameter des antioxidativen Schutzsystems und auf Parameter der Lipidperoxidation von Ratten untersucht werden. Anhand dieser Parameter sollten mögliche prooxidative Wirkungen der hohen Vitamin E-Zulagen *in vivo* geprüft werden.

Zu diesem Zweck wurden zwei zwei-faktorielle Fütterungsversuche mit männlichen Ratten durchgeführt. Im ersten Versuch erhielten 8 Versuchsgruppen und im zweiten Versuch 6 Versuchsgruppen mit einer semisynthetischen Diät 4 verschiedene (100, 500, 3.000, 10.000 IE Vitamin E/kg Diät) bzw. 3 verschiedene Vitamin E-Dosierungen (100, 1.000, 10.000 IE Vitamin E/kg Diät) über einen Zeitraum von 56 Tagen. Die Diäten enthielten als Diätfett Lachsöl (100 g/kg Diät) bzw. Schweineschmalz (100 g/kg Diät).

Es wurden Parameter des antioxidativen Schutzsystems, die Hämolyse neigung der Erythrozyten *in vitro* und *in vivo*, Parameter der Lipidperoxidation und Parameter des Lipidstoffwechsels untersucht.

Die durchgeführten Untersuchungen lieferten folgende Ergebnisse:

Sowohl die Gewichtsentwicklung als auch die Futteraufnahme der Ratten waren unabhängig von den Vitamin E-Dosierungen und den eingesetzten Diätfetten.

Die Untersuchungen der Parameter des antioxidativen Schutzsystems ergaben folgende Resultate:

Die Konzentration an Vitamin E in den Geweben stieg mit zunehmender Vitamin E-Dosierung in der Diät an. Bei den Gruppen, deren Diät Lachsöl enthielt, war die Konzentration an Vitamin E in den Geweben niedriger als bei den Gruppen, deren Diät Schweineschmalz enthielt. Die Konzentration an Vitamin E im Kot nahm ebenfalls mit steigender Vitamin E-Konzentration in der Diät zu. Die scheinbare Verdaulichkeit sank bei den hohen Vitamin E-Zulagen ab.

Die Konzentration an Vitamin C im Plasma war bei den Gruppen, deren Diät Schweineschmalz enthielt, höher als bei den Gruppen, deren Diät Lachsöl enthielt. Bei beiden eingesetzten Diätfetten nahm die Konzentration an Vitamin C im Plasma bei Gabe von hohen Vitamin E-Dosierungen zu.

Die Aktivität der Superoxiddismutase in der Leber sank bei der Gabe von hohen Vitamin E-Zulagen ab. Die hohen Vitamin E-Konzentrationen hatten jedoch, bei beiden eingesetzten Diätfetten, keinen Effekt auf die Aktivität der antioxidativen Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase und auf die Konzentration an Glutathion in der Leber bzw. im Plasma.

Die Oxidationsempfindlichkeit der LDL nach Kupfer-induzierter Oxidation wurde ebenfalls nicht durch die verschiedenen Vitamin E-Dosierungen beeinflusst.

Die Parameter des antioxidativen Schutzsystems ergaben keinen Hinweis auf einen prooxidativen Effekt der hohen Vitamin E-Dosierungen.

Die Untersuchungen der Parameter der Lipidperoxidation lieferten folgende Ergebnisse:

Die Konzentration an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) und die Konzentration an 7- β -Hydroxycholesterol sank nominal bzw. signifikant bei den Behandlungsgruppen, die hohe Vitamin E-Zulagen erhielten, ab.

Die Parameter der Lipidperoxidation deuten somit nicht auf einen prooxidativen Effekt der hohen Vitamin E-Zulagen hin.

Die Fettsäurezusammensetzung der Leberphospholipide wurde ebenfalls nicht durch die verschiedenen Vitamin E-Zulagen beeinflusst und ergibt somit auch keinen Hinweis auf einen prooxidativen Effekt der hohen Vitamin E-Zulagen.

Die Untersuchungen der Hämolyse neigung der Erythrozyten und der antioxidativen Enzyme der Erythrozyten ergaben folgende Resultate:

Die *in vitro*-Hämolyse neigung der Erythrozyten und die Aktivität der *in vivo*-Hämolyse marker Laktatdehydrogenase und saure Phosphatase im Plasma nahm bei den Gruppen, deren Diät Lachsöl und 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, signifikant gegenüber den anderen Behandlungsgruppen zu.

Der antioxidative Status der Erythrozyten war bei den Ratten, deren Diät Lachsöl und 10.000 IE Vitamin E/kg Diät enthielt, gegenüber den anderen Behandlungsgruppen vermindert.

Die Untersuchung von Parametern zur Charakterisierung der Fluidität der Erythrozytenmembran lieferten folgende Resultate:

Die hohen Vitamin E-Zulagen hatten keine Effekte auf die Fettsäurenzusammensetzung und die Konzentration an Cholesterin in der Erythrozytenmembran.

Die Untersuchung der Parameter des Lipidstoffwechsels hatte folgendes Ergebnis:

Die hohen Vitamin E-Zulagen hatten weiterhin keine gerichteten Effekte auf Parameter des Lipidstoffwechsels.

Aus den Ergebnissen läßt sich schlußfolgern, dass in der eigenen Studie die hohen Vitamin E-Zulagen keine direkten prooxidativen Effekte hervorgerufen haben. Bemerkenswert war jedoch, dass in der eigenen Studie die hohen Vitamin E-Zulagen die Hämolyse neigung der Erythrozyten *in vitro* und die Aktivität der *in vivo* Hämolyse marker saure Phosphatase und Laktatdehydrogenase erhöht haben. Dieser Effekt trat jedoch nur bei gleichzeitiger Verwendung von Lachsöl auf. Die erhöhte Hämolyse neigung der Erythrozyten dürfte eine sekundäre Folge der verminderten Aktivität der antioxidativen Enzyme in den Erythrozyten, bei gleichzeitiger Verwendung von hohen Vitamin E-Zulagen und Lachsöl, sein. Diese verminderte Aktivität der antioxidativen Enzyme kann zu einer Anreicherung von reaktiven Sauerstoffspezies und zu einer erhöhten Bildung von Met-Hämoglobin in den Erythrozyten führen.

6. Summary

Tocopherol at high concentrations can develop a prooxidant activity in micellar dispersions and in isolated low density lipoprotein (LDL) (MUKAI et al., 1993, Lipids 28 (8), 747-752). The hydrogen abstraction from tocopherol produces a tocopheroxyl radical which combines with another peroxy radical. An investigation with laying hens showed that extremely high dosages of vitamin E may act as a prooxidant even *in vivo* (SÜNDER et al., 1999, Arch Anim Nutr 52, 185-194). This study was carried out to investigate effects of high dietary vitamin E concentrations on parameters of the oxidative defence system and on parameters of the lipid peroxidation in rats fed different types of fat. This parameters investigate possible prooxidative effects of high dosages of vitamin E.

In the first experiment eight groups and in the second experiment six groups of male Sprague-Dawley rats were fed semisynthetic diets containing 10% of salmon oil or lard and different concentrations of DL-alpha-tocopheryl-acetate in 4 (100, 500, 3.000, 10.000 IE Vitamin E/kg diet) and 3 levels (100, 1.000, 10.000 IE Vitamin E/kg diet) respectively, for a period of 56 days.

The concentrations of vitamin E in different tissues, parameters of the oxidative defence system, parameters of the lipid peroxidation and parameters of the lipid metabolism were determined.

From these investigations the following results were obtained:

Feed intake and body weight gain were not influenced by the dietary vitamin E level.

From the investigations of the oxidative defence system the following results were obtained:

The increase of tocopherol concentrations in different tissues by high dietary vitamin E was higher in the groups fed lard than in the groups fed salmon oil. The concentration of tocopherol in the faeces increased by high dietary vitamin E levels and the apparent digestibility of vitamin E decreased by high dietary vitamin E levels.

The vitamin C concentration in plasma was higher in the groups fed lard, than in the groups fed salmon oil. Feeding very high levels of vitamin E increased the vitamin C concentration in plasma in both fat groups.

The activity of superoxide dismutase in liver decreased in rats fed high dietary levels of vitamin E. The activity of glutathione peroxidase in plasma and liver and the activity of catalase in liver were not influenced by the dietary vitamin E level.

The susceptibility of LDL to *in vitro*-induced oxidation was not influenced by the dietary vitamin E level.

According to the parameters determined, there was no evidence of a direct prooxidative effect of high dietary vitamin E concentrations.

From the investigations of the parameters of the lipid peroxidation following results were obtained:

Feeding high concentrations of vitamin E decreased the concentration of thiobarbituric acid substances (TBARS) in plasma and liver and the concentration of 7- β -hydroxy-cholesterol in liver.

According to the parameters determined, there was no evidence of a direct prooxidative effect of high dietary vitamin E concentrations.

The fatty acid composition of liver phospholipids were not influenced by the dietary vitamin E level.

From the investigations of the parameters of hemolysis following results were obtained:

Feeding high levels of vitamin E increased the *in vitro*-osmotic fragility of erythrocytes in rats fed salmon oil, but not in rats fed lard. Feeding high dietary vitamin E levels increased the activity of *in vivo* hemolysis parameters acid phosphatase and lactate dehydrogenase. The activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase and the concentration of glutathione in erythrocytes decreased in rats fed salmon oil by very high vitamin E concentrations.

From the investigations from the parameters of the fluidity of the erythrocyte membrane following results were obtained:

The fatty acid composition and the concentration of cholesterol of the erythrocyte membrane was not influenced by high dietary vitamin E levels.

From the investigations of the parameters of lipid metabolism following results were obtained:

The parameters of the lipid metabolism were not influenced by high dietary vitamin E levels.

In conclusion, there was no evidence of a direct prooxidative effect of high dietary vitamin E concentrations. However, feeding diets with high concentrations of vitamin E increased *in vitro* and *in vivo* hemolysis, particularly by feeding salmon oil. The increased *in vitro* and *in vivo* hemolysis could be induced by decreased activities of antioxidative enzymes in erythrocytes. This lowered activities of antioxidative enzymes could lead to increased levels of reactive oxygen species and of met-hemoglobin in erythrocytes.

Literaturverzeichnis

- Aebi, H. E., 1986: Catalase in: Bergmeyer, H. U (Ed.): Methods of enzymatic analysis, 3. Edition, Band 3, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 273-286
- Ajit, D.K.; Darad, R., 1988: Physiological antioxidants and antioxidative enzymes in vitamin E-deficient rats, Toxicol Letters 44, 47-54
- Aleynik, S.I.; Leo, A.M.; Aleynik, M.K.; Lieber, C.S., 1999: Alcohol induced pancreatic oxidative stress: protection by phospholipid repletion, Free Radic Biol Med 26, 5/6, 609-619
- Ando, K.; Nagata, K.; Yoshida, R.; Kikugawa, K.; Suzuki, M., 2000: Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on lipid peroxidation of rat organs Lipids 35, 401-407
- Atalay, M.; Laaksonen, D.E.; Khanna, S.; Kaliste-Korhonen, E.; Hänninen, O.; Sen, C.K., 2000: Vitamin E regulates changes in tissue antioxidants induced by fish oil and acute exercise, Med Sci Sports Exerc 32(3), 601-607
- Bakalova, R. A.; Goudev, A.R.; Zhelev, Zh.; Nachev, Ch.; Ribarov, S.R., 1996: Oxidation of low density lipoprotein leads to disturbance of their binding with α -tocopherol, Gen Physiol Biophys 15, 163-175
- Baker, M. S.; 1994: Free radicals and connective tissue damage in: C.A. Rice-Evans and R.H. Burdon (Ed.): Free Radical damage and its control, Elsevier Science B.V.S., 301-317
- Balz, M.; Schulte, E.; Thier, H.-P., 1993: Simultaneous determination of alpha-tocopherol-acetate, tocopherols and tocotrienols by HPLC with fluorescence detection in foods, Fat Sci Technol 95 (6), 215-220

- Barja, G.; Cadenas, S.; Rojas, C.; Perez-Campo, R.; Lopez-Torres, M.; Prat, J.; Pamplona, R., 1991: Effect of dietary vitamin E levels on fatty acid profiles and nonenzymatic lipid peroxidation in the guinea pig liver
Lipids 31 (9), 963-970
- Barja, G.; Lopez-Torres, M.; Perez-Campo, R.; Rojas, C.; Cadenas, S.; Prat, J.; Pamplona, R., 1994: Dietary vitamin C decreases endogenous protein oxidative damage, malondialdehyde, and lipid peroxidation and maintains fatty acid unsaturation in the guinea pig liver, *Free Radic Biol Med* 17 (2), 105-115
- Bartosz, G., 1990: Erythrocyte membrane changes during aging in vivo
in: Harris J.R. (Ed.): *Blood cell biochemistry*, 1. Erythroid cells, Plenum Press, New York, 45-79
- Bendich, A.; Machlin, L.J., 1988: Safety of oral intake of vitamin E
Am J Clin Nutr, 48, 612-619
- Bierenbaum, M.L.; Noonan, F.J.; Machlin, L.J.; Machlin, S.; Stier, A.; Watson, P.B., Naso, A.M.; Fleischman, A.I., 1985: The effect of supplemental vitamin E on serum parameters in diabetics, post coronary and normal subjects, *Nutr Res Int* 31 (6), 1171-1180
- Biesalski, H.K.; Frank, J., 1995: Antioxidanzien in der Ernährung und ihre Bedeutung für die anti-/prooxidative Balance im Immunsystem, *Immun. Infekt.* 23 (5), 166-173
- Biesalski, H.K.; Grimm, P., 1999: Vitamin E: Chemie und Metabolismus in: Biesalski, Grimm (Hgb.): *Taschenatlas der Ernährung*,; Thieme Verlag Stuttgart 1999, 148
- Boadi, W.Y.; Thaire, L.; Kerem, D.; Yannai, S., 1991: Effects of dietary factors on antioxidant enzymes in rats exposed to hyperbaric oxygen, *Vet Hum Toxicol* 33 (2), 105-109

- Bonina, F.; Lanza, M.; Montenegro, I.; Salerno, L.; Smeriglio, P. ; Trombetta, D.; Saija, A., 1996: Transport of alpha-tocopherol and its derivatives through erythrocyte membranes, *Pharm Res* 13 (9), 1343-1347
- Bowry, V.W.; Mohr, D., Cleary, J., Stocker, R., 1995: Prevention of tocopherol-mediated peroxidation in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein, *J Biol Chem* 270 (11), 5756-5763
- Bray, T.M.; Taylor, C.G., 1993: Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress *Can J Physiol Pharmacol*, 71, 746-751
- Breuer, O.; Björkhem, I., 1995: Use of an $^{18}\text{O}_2$ inhalation technique and mass isotopomer distribution analysis to study oxygenation of cholesterol in rat, *J Biol Chem* 270 (35), 20278-20284
- Buckingham, K.W., 1985: Effect of dietary polyunsaturated/saturated fatty acid ratio and dietary vitamin E on lipid peroxidation in the rat, *J Nutr* 115, 1425-1435
- Buddecke, E., 1994: *Grundriß der Biochemie*, 9. Auflage, Walter de Gruyter-Verlag Berlin, 32
- Buettner, G. R., 1993: The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate, *Arch Biochem Biophys* 300 (2), 535-543
- Burton, G.W.; Joyce, A.; Ingold, K.U., 1983: Is Vitamin E the only lipid soluble, chain breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys* 221(1), 281-290
- Burton, G. W., 1990: Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability, *Annu. Rev. Nutr.* 10, 357-382

- Burton, G.W.; Wronska, U.; Stone, L.; Foster, D.O.; Ingold, K.U., 1990: Biocinetics of dietary RRR- α -tocopherol in the male guinea pig at three dietary levels of vitamin C and two levels of vitamin E. Evidence that vitamin C does not „spares“ vitamin E in vivo, *Lipids* 25 (4), 199-210
- Butte, W., 1983: Rapid method for the determination of fatty acid profiles from fats and oils using trimethylsulfoniumhydroxide for transesterification, *J Chrom* 261, 142-145
- Butriss, J.L.; Diplock, A.T., 1988: The relationship between α -tocopherol and phospholipid fatty acids in rat liver subcellular membrane fractions, *Bioch Biophys Acta* 962, 81-90
- Cachia, O.; Benna, J.E.; Pedruzzi, E.; Decomps, B.; Gougerot-Pocidola, M.A.; Leger, C.L., 1998: Alpha tocopherol inhibits the respiratory bursts in human monocytes: attenuation of p47(phox) membrane translocation and phosphorylation, *J Biol Chem* 273, 32801-32807
- Cadenas, S.; Rojas, C.; Perez-Campo, R.; Lopez-Torres, M.; Barja, G., 1995: Vitamin E protects guinea pig liver from lipid peroxidation without depressing levels of antioxidants, *Int J Biochem Cell Biol* 27 (11), 1175-1181
- Cantwell, H.; Devery, R., 1998: The response of the antioxidant defense system in rat hepatocytes challenged with oxysterols is modified by Covi-ox, *Cell Biol Toxicol* 14, 401-409
- Caruso, D.; Rasetti, M.F.; Angelis, L.De; Galli, G., 1996: Identification of 3 β -hydroxy-5 α -cholest-6-ene-5-hydroperoxide in human oxidized LDL, *Chem Phys Lipids* 79, 181-186
- Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A., 1979: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol Rev* 59 (3), 527-605

- Chen, L.-C.; Boissonneault, G.; Hayek, M.G.; Chow, C.K., 1993: Dietary fat effect on hepatic lipid peroxidation and enzymes of H₂O₂ metabolism and NADPH generation, *Lipids* 28 (7), 657-662
- Chiang, M.-T.; Tsai, M.-L., 1995: Effect of fish oil on plasma lipoproteins, liver glucose-6-phosphat dehydrogenase and glucose-6-phosphatase in rats, *Int J Vit Nutr Res* 65, 276-282
- Chiu, D.T.; Huang, T.Y.; Hung, I.J.; Wei, J.S.; Liu, T.Z.; Stern, A., 1997: Hemin-induced membrane sulfhydryl oxidation: possible involvement of thiyl radicals, *Free Radic Res* 27 (1), 55-62
- Cho, S.H.; Choi, Y.S., 1994: Lipid peroxidation and antioxidant status is affected by different vitamin E levels when feeding fish oil, *Lipids* 29, 47-52
- Chow, C.K., 1989: Vitamin E in plasma, erythrocytes and erythrocyte membranes *Biolog Synth Membr*, 445-451
- Christiansen, E.N.; Lund, J.S.; Rortveit, T.; Rustan, A.C., 1991: Effect of dietary n-3 and n-6 fatty acids on fatty acid desaturation in rat liver, *Biochim Biophys Acta* 1082, 57-62
- Chu, F.-F.; Doroshov, J.H.; Esworthy, R.S., 1993: Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione-peroxidase, GSH-Px-GI, *J Biol Chem* 268, 2571-2576
- Clemens, M.R.; Einsele, H.; Waller, H.D., 1985: The fatty acid composition of red cells deficient in glucose-6-phosphate-dehydrogenase and their susceptibility to lipid peroxidation, *Klin Wochenschr* 63 (13), 578-582
- Conti, M.; Morand, P.C.; Levillain, P.; Lemonnier, A., 1991: Improved fluorimetric determination of malondialdehyde, *Clin Chem* 37, 1273-1275

- Dagnelie, P. C.; Bell, J. D.; Cox, J.; Menon, D.K.; Sarnetoni, J.; Coutts, G. A.; Williams, S.R., 1993: Effects of fish oil on phospholipid metabolism in human and rat liver studied by ^{31}P NMR spectroscopy in vivo and in vitro, NMR in Biomed 6, 157-162
- Davies, K.J.; Goldberg, A., 1987: Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes, J Biol Chem 262 (17), 8220-8226
- Davies, K. J. A., 1988: Proteolytic systems as secondary antioxidant defense in: Chow (Ed.): Cellular antioxidant defense mechanism, Vol. 2, CRC Press, Boca Raton, S. 25-67
- De Craemer, D.; Vamecq, J.; Roels, F.; Vallee, M.; Pauwels, M.; Van-den-Branden, C., 1994: Peroxisomes in liver, heart, and kidney of mice fed a commercial fish oil preparation: original data and review on peroxisomal changes induced by high-fat diets, J Lipid Res 35, 1241-1250
- Delanghe, J.; Allcock, K.; Langlois, M.; Claeys, L.; De Buyzere, M., 2000: Fast determination of haptoglobine phenotype and calculation of hemoglobin binding capacity using high pressure gel permeation chromatography, Clin Chim Acta 291, 43-51
- De Rosa, G.; Keen, C.L.; Leach, R.M.; Hurley, L.S., 1980: Regulation of superoxide dismutase activity by dietary manganese, J Nutr 110, 795-804
- Demel, R.A.; Bruckdorfer, K.R.; Van Deenen, L.M., 1972: The effect of sterol structure on the permeability of liposomes to glucose, glycerol and Rb^+ , Biochim Biophys Acta 255, 321-330
- Deutsch, J., 1985: Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in: Bergmeyer, H. U. (Ed.): Methods of Enzymatic analysis, 3. Ed., VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, 190-197

Deutsche Gesellschaft für Ernährung, 2000: Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, 1. Auflage, Umschau/Braus Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, S. 87

Deutsche Gesellschaft für Ernährung, 2000: Ernährungsbericht 2000, Druckerei Heinrich GmbH, Frankfurt/Main, S. 46-47

DGE Info 5/99: Beteiligung von Cholesterinoxidationsprodukten an der Arteriosklerose-Entstehung, Forschung, Klinik und Praxis 67-68

Diaz-Vales, C.R.; Garcia-Castineiras, S.; Mendoza-Ramos, E.; Hernandez-Lopez, E. 1996: Increased malondialdehyde in peripheral blood of patients with congestive heart failure; Am Heart J 131 (1), 146-152

Dieber-Rotheneder, M.; Puhl, H.; Waeg, G.; Striegl, G.; Esterbauer, H., 1991: Effect of oral supplementation with D- α -tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation, J Lipid Res 32, 1325-1332

Dillard, C.J.; Downey, J.E.; Tappel, A.L., 1984: Effects of antioxidants on lipid peroxidation in iron-loaded rats, Lipids 19 (2), 127-133

Diplock, A.T.; Lucy, J.A., 1973: The biochemical modes of action of vitamin E and selenium: A hypothesis, FEBS Lett 29, 205-210

Draper, H.H.; Mc Girr, L.G.; Hadley, M., 1986: The metabolism of malondialdehyde, Lipids 21 (4), 305-307

Draper, H.H.; Dhanakotti, S.N.; Hadley, M.; Piche, L. A., 1988: Malondialdehyde in biological systems in: Chow (Ed.): Cellular antioxidant defence mechanism, Vol. 2, CRC Press, Boca Raton, 97-110

- Dutta-Roy, A.K.; Leishman, D.J.; Gordon, M.; Campbell, F.M.; Duthie, G.G., 1993: Identification of a low molecular mass (14,2 kDa) alpha-tocopherol-binding protein in the cytosol of rat liver and heart, *Biochem Biophys Res Commun*, 196 (3), 1108-1112
- Eaton, J.W.; Boraas, M.; Etkin, N.L., 1971: Catalase activity and red cell metabolism, *Adv Exp Med Biol* 28, 121-126
- Eberle, J.; Diebold, J.; Reichlmayr-Lais, A.M.; Kirchgessner, M., 1996: Untersuchungen zur Knochenmarksmorphologie und zu verschiedenen Hämolysemarkern bei wachsenden Ratten bei alimentären Bleimangel, *Z Ernährungsw* 35, 332-340
- 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 (10), 1917-1926
- Eder, K.; Kirchgessner, M., 1997: The effect of a moderately oxidized soybean oil on lipid peroxidation in rat low-density lipoproteins at low and high dietary vitamin E levels, *J Anim Physiol Anim Nutr* 78, 230-243
- Eder, K.; Kirchgessner, M., 1998: The effect of dietary vitamin E supply and a moderately oxidized oil on activities of hepatic lipogenic enzymes in rat, *Lipids* 33 (3), 277-283
- Elmadfa, I.; Hammer, I., 1982: Welche Folgen haben unterschiedliche P/S Quotienten auf die Stabilität der Erythrozytenmembran?, *Ernährungs-Umschau* 29 (7), 224
- Elmadfa, I.; Leitzmann C., 1990: Vitamin E (Tocopherole) in: Elmadfa, Leitzmann (Hrsg.) *Ernährung des Menschen*, 2. Aufl., Eugen Ulmer Verlag Stuttgart, 260

- Esterbauer, H.; Stiegl, G.; Puhl, H.; Rotheneder, M., 1989 b: Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein, *Free Radic Res Commun* 6, 67-75
- Esterbauer, H.; Gebicki, J.; Puhl, H.; Jürgens, G., 1992: The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL, *Free Radic Biol Med* 13, 341-390
- Esterbauer, H.; Puhl, H.; Waeg, G.; Krebs, A.; Dieber-Rotheneder, M., 1993: The role of vitamin E in lipoprotein oxidation in: Packer, L.; Fuchs, J. (Ed.): *Vitamin E in Health and Disease* Marcel Dekker Inc. 1993; 649-671
- Esterbauer, H., 1996: Estimation of peroxidative damage, *Path Biol* 44 (1), 25-28
- Esterbauer, H.; Hayn, M., 1997 in: Biesalski, H.K.; Schrezenmeir, J.; Weber, P.; Weiß, H., (Hrsg.): *Vitamine, Physiologie, Pathophysiologie, Therapie*, Thieme Verlag Stuttgart, 41-58
- Flynn, T.P.; Allen, D.W.; Johnson, G.J.; White, J.G., 1983: Oxidant damage of the lipids and proteins of the erythrocyte membranes in unstable hemoglobin disease, *J Clin Invest* 71, 1215-1220
- Frankel, E.N., 1991: Review: Recent advances in lipid oxidation, *J Sci Agric* 54, 495-511
- Fremont, L.; Gozzelino, M.; Hojjat, T., 1995: Effects of moderate fat intake with different n-3-fatty acid sources and n6/n3 ratios on serum and structural lipids in rats, *Reprod Nutr Dev* 35 (5), 503-515
- Gaetani, G.F.; Galiano, S.; Canepa, L.; Ferraris, A.M.; Kirkman, H.N., 1989: Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes, *Blood* 73, 334-339

- Garrow, J.S.; James, W.P.T.; Ralph, A., 2000: Vitamin E (Tocopherols) in: Garrow, James, Ralph (Ed.): Human Nutrition and Diatetics;, 10.th edition, Churchill-Livingstone, Toronto, 229-237
- Gassmann, B.; Schultz, M.; Leist, M.; Brigelius-Flohe, R., 1995: Vitamin E-Stoffwechsel und –Bedarf, Ernährungs-Umschau 42 (3), 80-87
- Gassmann, B., 1997: Vitamin E, Ernährungs-Umschau 44 (2), 63-66
- Gassmann, B., 1998: Vitamin C, Ernährungs-Umschau 45 (8), 294-297
- Giasuddin, A.S.M.; Diplock, A.T., 1981: The influence of vitamin E on membrane lipids of mouse fibroblasts in culture, Arch Biochem Biophys 210 (1), 348-362
- Girotti, A.W., 1998: Lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological systems, J Lipid Res 39, 1529-1542
- Giulivi, C.; Hochstein, P.; Davies, K.J.A., 1994: Hydrogen peroxide production by red blood cells, Free Radic Biol Med 16, 123-129
- Gultekin, F.; Delibas, N.; Yasar, S.; Kilinc, I., 2001: In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats, Arch Toxicol 75, 88-96
- Gutteridge, J.M.C.; Halliwell, B., 1990: The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems, Trends in Biochem Scien, 15, 129-135
- Gutteridge, J.M.C., 1995: Peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, Clin Chem 41 (12), 1819-1828
- Hagve, T.A.; Lie, O.; Gronn, M., 1993: The effect of dietary n-3 fatty acids on osmotic fragility and membrane fluidity of human erythrocytes, Scand J Clin Lab Invest Suppl 215, 75-84

- Halliwell, B., 1984: Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy, *The Lancet* 23, 1396-1397
- Halliwell, J.M.C.; Gutteridge, B., 1988: The antioxidant proteins and extracellular fluids in : Chow (Ed.): *Cellular antioxidant defense mechanism*, Vol. 2, CRC Press, Boca Raton
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C., Cross, C.E., 1992: Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now?, *J Lab Clin Med* 119, 598-620
- Halliwell, B., 1994: Free radicals and antioxidants: a personal view, *Nutr Rev* 52 (8), 253-265
- Halpner, A. D.; Handelman, G.; Harris, J.M.; Belmont, C. A.; Blumberg, J. B., 1998: Protection by vitamin C of loss of vitamin E in cultured rat hepatocytes, *Arch Biochem Biophys* 359 (2), 305-309
- Hara, A.; Radin , N.S, 1978.: Lipid extraction of tissues with a low toxicity solvent *Anal Biochem* 90 (1), 420-426
- Harats, D.; Dabach, Y.; Hollander, G.; Ben-Naim, M.; Schwartz, R.; Berry, E.M.; Stein, O.; Stein, Y., 1991: Fish oil ingestion in smokers and nonsmokers enhances peroxidation of plasma lipoproteins, *Atherosclerosis* 90, 127-139
- Harris, W.S.; Connor, W.E.; McMurry, M.P., 1983: The comparative reductions of the plasma lipids and lipoproteins by dietary polyunsaturated fats: salmon oil versus vegetable oil, *Metabolism* 32 (2), 179-184
- Hatam, L.J.; Kayden, H.J., 1981: The failure of α -tocopherol supplementation to alter the distribution of lipoprotein cholesterol in normal and hyperlipoproteinemic persons, *Am J Clin Pathol* 76, 122-126

- Herold, P.M.; Kinsella, J.E., 1986: Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease: a comparison of findings from animal and human feeding trials, *Am J Clin Nutr*, 43, 566-589
- Higgins, S.; Mc Carthy, S.N.; Corridan, B.M.; Roche, H.M., 2000: Measurement of free cholesterol and cholesteryl linoleate hydroperoxide in copper-oxidised low density lipoprotein in healthy volunteers supplemented with a low dose of n-3 polyunsaturated fatty acids, *Nutr Res* 20 (8), 1091-1102
- Hiroko, Y.; Mawatari, M.; Ikuo, I.; Katsumi, I.; Akira, S.; Hiroaki, T., 1999: Effect of dietary seal and fish oils on triacylglycerol metabolism in rats, *J Nutr Sci Vitaminol*, 45 (4), 411-421
- Howard, D.R.; Rundell, C.A.; Batsakis, J.G., 1982: Vitamin E and serum lipids, *Am J Clin Pathol* 77, 243-244
- Hu, M.-L.; Frankel, E.N.; Leibovitz, B.E.; Tappel, A.L., 1989: Effect of dietary lipids and vitamin E on in vitro lipid peroxidation in rat liver and kidney homogenates *J Nutr* 119, 1574-1582
- Huang, C.-J.; Shaw, H.-M., 1994: Tissue vitamin E status is compromised by dietary protein insufficiency in young growing rats, *J Nutr* 124, 571-579
- Huu, T.P.; Marquetty, C.; Pasquier, C.; Hakim, J., 1984: Luminol assay for microdetermination of superoxide dismutase activity: its application to human fetal blood, *Anal Biochem* 142, 467-472
- Ibrahim, W.; Lee, U.-S.; Yeh, C.-C.; Szabo, J.; Bruckner, G.; Chow, C.K., 1997: Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver: effects of dietary lipid, vitamin E and iron, *J Nutr* 127, 1401-1406

- Ikeda, I.; Cha, J.Y.; Yanagita, T.; Nakatani, N.; Oogami, K.; Imaizumi, K.; Yazawa, K., 1998: Effects of dietary alpha-linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on hepatic lipogenesis and beta-oxidation in rats *Biosci Biotechnol Biochem* 62 (4), 675-680
- Ilavazhagan, G.; Bansal, A.; Prasad, D.; Thomas, P.; Sharma, S.K.; Kain, A.; Kumar, D.; Selvamurthy, W., 2001: Effect of vitamin E supplementation on hypoxia induced oxidative damage in male albino rats, *Aviat Space Environ Med* 72 (10), 899-903
- Iritani, N.; Fukuda, H.; Matsumura, Y.; 1988: Effects of corn oil-supplemented diets on phospholipid fatty acid composition of rat liver nuclei, *Biochim Biophys Acta* 963, 224-230
- Jacob, H.S.; Brain, M.C.; Dacie, J.V., 1968: Altered sulfhydryl reactivity of hemoglobin and red blood cell membranes in congenital Heinz body hemolytic anaemia, *J Clin Invest* 47, 2664-2677
- Jacob, R. A.; Otrodev, C.L.; Russel, R.; Munro, H.N.; Hartz, S.C.; Mc Gandy, R. B.; Morrow, F.; Sadowski, J.A., 1988: Vitamin C status and nutrient interactions in a healthy elderly population, *Am J Clin Nutr* 48 (6), 1436-1442
- Jakobsen, K.; Engberg, R.M.; Andersen, J.O.; Jensen, S.K.; Lauridsen, C.; Sorensen, P.; Henckel, P.; Bertelsen, G.; Skibsted, L.H.; Jensen, C., 1995: Supplementation of broiler diets with all-rac-alpha- or a mixture of natural source RRR-alpha,-gamma,-delta-tocopherylacetate. 1. effect on vitamin E status of broiler in vivo and at slaughter, *Poult Sci* 74 (12), 1984-1994
- Jarolim, P.; Lahav, M.; Liu, S.-C.; Palek, J., 1990: Effect of hemoglobin oxidation products on the stability of red cell membrane skeletons and the associations of skeletal proteins: Correlation with a release of hemin, *Blood* 76 (10), 2125-2131

- Kaasgard, S.G.; Holmer, G.; Hoy, C.E.; Behrens, W.A.; Berae-Rogers, J.L., 1992: Effect of dietary linseed oil and marine oil on lipid peroxidation in monkey liver in vivo and in vitro, *Lipids* 27, 740-745
- Kagan, V.E.; Servinova, E.A.; Packer, L., 1990: Recycling and antioxidant activity of tocopherol homologs of differing hydrocarbon chain lengths in liver microsomes, *Arch Biochem Biophys*, 282, 221-225
- Kameda, K.; Imai, M.; Senjo, M., 1985: The effect of vitamin E deficiency on some erythrocyte membrane properties, *J Nutr Sci Vitaminol* 31, 481-490
- Kappus, H.; Diplock, A.T., 1992: Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report, *Free Radic Biol Med*, 13, 55-74
- Keaney, J.F.; Gaziano, J.M.; Xu, A.; Frei, B.; Curran-Celentano, J.; Shwaery, G.T.; Loscalzo, J.; Vita, J. A., 1994: Low dose α -Tocopherol improves and high doses α -Tocopherol worsens endothelial vasodilator function in cholesterol-fed rabbits, *J Clin Investig* 93, 844-851
- Keddad, K.; Therond, P.; Motta, C.; Baussan, C.; Legrand, A., 1996: Alterations in erythrocyte membrane fluidity and fatty acid composition in glycogen storage disease *Biochem Biophys Acta* 1315 (1), 61-65
- Ken, A.; Kunihide, N.; Masatoshi, B.; Kiyomi, K.; Terue, K.; Kyoko, H.; Masao, S., 1998: Effect of n-3 fatty acid supplementation on lipid peroxidation and protein aggregation in rat erythrocyte membranes, *Lipids* 33 (5), 505-512
- Kinalski, M.; Sledziewski, A.; Telejko, B.; Zarzycki, W.; Kinalska, I., 1999: Antioxidant therapy and streptozotocin-induced diabetes in pregnant rats, *Acta Diabetol*, 36, 113-117
- Kirchgessner, M., 1986; *Tierenahrung, Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis*, 7. Auflage, DLG Verlag, Frankfurt, 30-39

- Kirchgessner, M.; Stangl, G.I.; Reichlmayr-Lais, A.M.; Eder, K., 1994: The effects of dietary oils on the fatty acid composition and osmotic fragility of rat erythrocytes, *Z Ernährungswissenschaft* 33, 146-158
- Koolman, J.; Röhm, K.-H., 1998: Taschenatlas der Biochemie, 2. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, 270
- Kontush, A.; Finckh, B.; Karten, B.; Kohlschütter, A.; Beisiegel, U., 1996: Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein, *J Lipid Res* 37, 1436-1448
- Kraus, A.; Roth H.P.; Kirchgessner, M., 1997: Supplementation with vitamin C, vitamin E or β -carotene influences osmotic fragility and oxidative damage of erythrocytes of zinc deficient rats, *J Nutr* 127 (7), 1290-1296
- Kuei, L.C.; Chyn, O.C.; LI, L.K.; Yuh, L.J.; Lung, L.W., Wen, C.H., 2000: Suppression of altered hepatic foci development by a high fish oil diet compared with a high corn oil diet in rats, *Nutr Canc* 38 (1), 50-59
- Kumar De, A.; Darad, R., 1988: Physiological antioxidants and antioxidative enzymes in vitamin E-deficient rats, *Toxicol Letters* 44, 47-54
- Kurata, M.; Suzuki, M.; Haruta, K.; Takeda, K., 1994: Relationship between erythrocyte deformability and glutathione under oxidative stress, *Comp Biochem Physiol* 107A (1); 7-12
- Lechler, T., 1996: Reaktive Sauerstoffformen und –verbindungen, *Ernährungs-Umschau* 43 (11), 423-426
- Lehmann, J., 1981: Comparative sensitivities of tocopherol levels of platelets, red blood cells, and plasma for estimating vitamin E nutritional status in the rat *Am J Clin Nutr* 34, 2104-2110

- Levander, O.A.; Morris, V.C.; Higgs, D.J.; Varma, R.N., 1973: Nutritional inter-relationships among vitamin E, selenium, antioxidants and ethyl alcohol in the rat, *J Nutr* 103, 536-542
- Linseisen, J.; Hoffmann, J.; Riedl, J.; Wolfram, G., 1998: Effect of a single dose of antioxidant mixture (vitamin E, carotinoids) on the formation of cholesterol oxidation products after ex vivo LDL oxidation in humans, *Eur J Med Res*, 3 (1-2), 5-12
- Linseisen, J.; Wolfram, G., 1998: Origin, metabolism, and adverse health effects of cholesterol oxidation products, *Fett/Lipids*, 6, 211-218
- Liu, J.-F.; Lee, Y.-W., 1998: Vitamin C supplementation restores the impaired vitamin E status of guinea pigs fed oxidized frying oil, *J Nutr* 128, 116-122
- Liuzzi, J.P.; Cioccia, A.M.; Hevia, P., 1998: In well-fed young rats, lactose-induced chronic diarrhea reduces the apparent absorption of vitamins A and E and affects preferentially vitamin E status, *J Nutr* 128, 2467-2472
- Lowry, O.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J., 1951: Protein measurement with folin phenol reagent, *J Biol Chem* 193, 265-275
- Luzzatto, L.; Mehta, A., 1990: Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency in: Scriver C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D (Eds.): *The metabolic basis of inherited disease* (Ed. 6), NY, McGraw-Hill, p 2237
- Mabile, M.L.; Pilot, A.; Boulet, L.; Fortin, L.J.; Doyle, N.; Rodriguez, C.; Davignon, J.; Blache, D.; Lussier-Cacan, S., 2001: Moderate intake of n-3-fatty acids is associated with stable erythrocyte resistance to oxidative stress in hypertriglyceridemic subjects, *Am J Clin Nutr* 74 (4), 449-456

- Maiani, G.; Azzini, E.; Ferro-Luzzi, A., 1993: Vitamin C, *Int J Vit Nutr Res*, 63, 289-295
- Malis, C.D.; Weber, P.C.; Leaf, A.; Bonventre, J.V., 1990: Incorporation of marine lipids into mitochondrial membranes increases susceptibility to damage by calcium and reactive oxygen species: evidence for enhanced activation of phospholipase A2 in mitochondria enriched with n-3 fatty acids, *Proc Natl Acad Sci* 87, 8845-8849
- Malmezat, T.; Breuille, D.; Capitan, P.; Mirand, P.P., Obled, C., 2000: Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats, *J Nutr* 130, 1239-1246
- Marklund, S.; Marklund, G., 1974: Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase *Eur J Biochem*, 47, 469-474
- Marklund, S.L., 1984: Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species, *Biochem J* 222, 649-655
- May, H.E.; Mc Cay P.B., 1968: Reduced triphosphopyridin nucleotide oxidase-catalyzed alteration of membran phospholipids I. Nature of lipid metabolism, *J Biol Chem* 243, 2288-2295
- Mc Clusky, S.; Hall, M.; Stanton, C.; Devery, R., 1999: Alpha-tocopherol inhibits oxidative stress induced by cholestanetriol and 25-hydroxycholesterol in porcine ovarian granulosa cells, *Molec Cell Biochem* 194 (1-2), 217-225
- Mead, J.F., 1980: Membrane lipid peroxidation and its prevention, *J Am Oil Chem Soc* 57, 393-397
- Mehta, J.; Li, D.; Mehta, J.L., 1999: Vitamin C and E prolong time to arterial thrombosis in rats, *J Nutr* 129, 109-112

- Mehta, J.L.; Li, D., 2001: Epinephrine upregulates superoxide dismutase in human coronary artery endothelial cells, *Free Radic Biol Med* 30 (2), 148-153
- Meister, A., 1994: Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals, *J Biol Chem* 269 (13), 9397-9400
- Meydani, M.; Natiello, F.; Goldin, B.; Free, N.; Woods, M.; Schaefer, E.; Blumberg, J.B.; Gorbach, S.L., 1991: Effect of long-term fish oil supplementation on vitamin E status and lipid peroxidation in women, *J Nutr* 121, 484-491
- Meydani, S.N.; Claycombe, K.J.; Sacristan, C., 2001: Vitamin E and Gene Expression in: Moustaid-Moussa, N., Berdanier, C.D. (Ed.): *Nutrient-Gene Interactions in Health and Disease*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 2001, 398
- Moison, R.M.; Van Beijersbergen, G.M., 2001: Dietary eicosapentaenoic acid prevents systemic immunosuppression in mice induced by radiation *Radiat Res* 156 (1), 36-44
- Mori, T. A.; Croft, K. D.; Puddey, I. B.; Beilin, L. J. , 1996: Analysis of native and oxidized LDL oxysterols using GC-MS with selective ion monitoring *Redox Report* 2 (1), 25-34
- Morrissey, P.A.; Sheehy, P.J.A., 1990: Optimal nutrition: vitamin E, *Proc Nutr Soc* 58 (2), 459-469
- Mörssel, T.; Meusel, D., 1990: Fortschrittsbericht Lipidperoxidation 2. Mitt. sekundäre Reaktionen, *Die Nahrung* 34 (1), 13-27
- Muggli, R.; 1994: Vitamin E-Bedarf bei Zufuhr von Polyenfettsäuren, *Fat Sci Technol.*, 96 (1), 17-19

- Mukai, K.; 1993: Synthesis and kinetic study of antioxidant and prooxidant actions of vitamin E derivatives in: Packer, L. Fuchs, J. (Ed.): Vitamin E in Health and Disease, Marcel Dekker Inc., 97-119
- Mukai, K.; Sawada, K.; Kohno, Y.; Terao, J., 1993: Kinetic study of the prooxidant effect of tocopherol. Hydrogen abstraction from lipid hydroperoxides by tocopheroxyls in solution, *Lipids* 28 (8), 747-752
- Mukai, K.; Morimoto, H.; Okauchi, Y.; Nagaoka, S., 1993: Kinetic study of reactions between tocopheroxyl radicals and fatty acids, *Lipids* 28 (8), 753-756
- Mutaku, J.F.; Many, M.C.; Colin, I.; Deneff, J.F.; van den Hove, M.F., 1998: Antigoitrogenic effect of combined supplementation with dl- α -tocopherol, ascorbic acid and β -carotene and of dl- α -tocopherol alone in the rat *J Endocrinol* 156, 551-561
- Nair, P.P.; Judd, J.T.; Berlin, E.; Taylor, P.R.; Shami, S.; Sainz, E.; Bhagavan, H.N. 1993: Dietary fish oil-induced changes in the distribution of α -tocopherol, retinol and β -carotene in plasma, red blood cells, and platelets: modulation by vitamin E, *Am J Clin Nutr* 58, 98-102
- Nalbone, G.; Leonardi, J.; Termine, E.; Portugal, H.; Lechene, P.; Pauli, A.-M.; Lafont, H., 1989: Effects of fish oil, corn oil and lard diets on lipid peroxidation status and glutathione peroxidase activities in rat heart, *Lipids* 24 (3), 179-186
- Naumann, C.; Bassler, R., 1976: Methodenbuch Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln, mit 1. Ergänzungslieferung (1983), 2. Ergänzungslieferung (1988), 3. Ergänzungslieferung (1993) und 4. Ergänzungslieferung (1997), VDLUFA-Verlag Darmstadt
- Nestel, P.J.; Connor, W.E.; Reardon, M.F.; Connor, S.; Wong, S.; Boston, R., 1984: Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man, *J Clin Invest* 74, 82-89

- Niki, E., 1988: Synergistic inhibition of oxidation by vitamin E and vitamin C in: Chow (Ed.) cellular antioxidant defense mechanism, Vol. 2, CRC Press, Boca Raton, 111-122
- Ninfali, P.; Cuppini, C.; Cuppini, R.; Rapa, S.; Baronciani, L., 1991: Glucose-6-phosphate-dehydrogenase activity in dorsal root ganglia of vitamin E-deficient rats, *Ann Nutr Metab* 35, 174-180
- Niot, I.; Gresti, J.; Boichot, J.; Sempore, G.; Durand, G.; Bezard, J.; Clouet, P., 1994: Effect of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on lipid-metabolizing enzymes in obese rat liver, *Lipids* 29 (7), 481-489
- Oarada, M.; Furukawa, H.; Majima, T.; Miyazawa, T., 2000: Fish oil diet affects on oxidative senescence of red blood cells linked to degeneration of spleen cells in mice, *Biochem Biophys Acta* 1487 (1), 1-14
- O'Brien, P.J., 1988: The fate and reactivity of lipid peroxides in: Chan, C.K. (Ed.): Cellular antioxidant defense mechanisms, Vol. 1, CRC Press, Inc., Boca Raton, 73-87
- O'Dell, B.L.; Browning, J. D.; Reeves, P. G., 1987: Zinc deficiency increases the osmotic fragility of rat erythrocytes, *J Nutr* 117, 1883-1889
- Olivieri, O.; Negri, M.; De Gironcoli, M., 1988: Effects of dietary fish oil on malondialdehyde production and glutathione-peroxidase activity in hyperlipidaemic patients, *Scand J Clin Lab Invest* 48, 659-665
- Padmanabhan, P.; Judd, J.T.; Berlin, E.; Taylor, P.R.; Shamin, S.; Sainz, E.; Bhagavan, H.N., 1993: Dietary fish oil-induced changes in the distribution of α -tocopherol, retinol, and β -carotene in plasma, red blood cells, and platelets: modulation by vitamin E, *Am J Clin Nutr* 58, 98-102

- Paglia, D. E.; Valentine, W.N., 1967: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *J Lab Clin Med* 70 (1), 158-169
- Palamanda, J.R.; Kehrer, J.P., 1993: Involvement of vitamin E and protein thiols in the inhibition of microsomal lipid peroxidation by glutathione, *Lipids* 28 (5), 427-431
- Palozza, P.; Sgarlata, E.; Luberto, C.; Piccioni, E.; Anti, M.; Marra, G.; Armelao, F.; Franceschelli, P.; Bartoli, G.M., 1996: n-3 fatty acids induce oxidative modifications in human erythrocytes depending on dose and duration of dietary supplementation, *Am J Clin Nutr* 64, 297-304
- Paniangvati, P.; King, A.J.; Jones, A.D.; German, B.G., 1995: Cholesterol oxides in foods of animal origin, *J Food Sci* 60 (6), 1159-1173
- Paterson, P.G.; Gorecki, K.J.; Card, R.T., 1994: Vitamin E deficiency and erythrocyte deformability in the rat, *J Nutr Biochem* 5, 298-302
- Pauling, L. (Ed.), 1986: *How to live longer and feel better*, W.H. Freeman and Company, New York, 76-77
- Paynter, D.I.; Martin, G.B., 1980: Investigations into combined dietary deficiencies of copper, selenium and vitamin E in the rat, *Biol Trace Element Res* 2, 175-191
- Pin, H.W.; Paul, C.; Jen, C.Y.; Ming, C.C.; Sen, L.S.; Tai, C.W.; Tang, C.J., 1999: Changes of superoxide dismutase in cultured rat aortic smooth muscle cells (A7r5) by an incubation of vitamin E, *Pharmacol Basel* 59 (5), 278-282
- Porter, N.A.; Caldwell, S.E.; Mills, K.A., 1995: Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids, *Lipids* 30 (4), 277- 290

- Pulla-Reddy, A.C.; Lokesh, B.R., 1994: Alterations of lipid peroxides in rat liver by dietary n-3 fatty acids: modulation of antioxidant enzymes by curcumin, eugenol and vitamin E, *J Nutr Biochem* 5, 181-188
- Rajaram, O.V.; Fatterpaker, P.; Sreenivasan, A., 1974: Involvement of binding lipoproteins in the absorption and transport of α -tocopherol in the rat *Biochem J* 140, 509-516
- Ramirez, T.M.C.; Aguilera, C.M.; Quiles, J.L.; Gil, A., 1998: Influence of dietary lipids on lipoprotein composition and LDL Cu²⁺ induced oxidation in rabbits with experimental atherosclerosis, *Biofactors* 8 (1-2), 79-85
- Rathore, N.; Kale, M.; John, S.; Bhatnagar, D., 2000: Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in isoproterenol induced oxidative stress in rat erythrocytes, *Indian J Physiol Pharmacol* 44 (2), 161-166
- Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C., 1993b: 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
- Reinhart, W.H.; Sung, L.A.; Chien, S., 1986: Quantitative relationship between Heinz body formation and red blood cell deformability, *Blood* 68, 1376-1384
- Rice-Evans, C.; Hochstein, P., 1981: Alterations in erythrocyte membrane fluidity by phenylhydrazine-induced peroxidation of lipids, *Biochem Biophys Res Commun* 100, 1537-1542
- Rojas, C.; Cadenas, S.; Lopez-Torres, M.; Perez-Campo, R.; Barja, G., 1996: Increase in heart glutathione redox ratio and total antioxidant capacity and decrease in lipid peroxidation after vitamin E dietary supplementation in guinea pigs, *Free Radic Biol Med* 21 (7), 907-915

- RÖMMP Chemielexikon, 1985: Falbe, J., Regitz, M. (Ed.), Bd. 3, Thieme Verlag Stuttgart, 1238
- Ross, M. A., 1994: Determination of ascorbic acid and uric acid in plasma by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr B* 654, 197-200
- Saito, M.; Nakatsugawa, K., 1994: Increased susceptibility of liver to lipid peroxidation after ingestion of a high fish oil diet, *Int J Vit Nutr Res* 64, 144-151
- Sallmann, H.-P.; Fuhrmann, H.; Molnar, S.; Stegmanns, T., 1991: Zur endogenen Lipidperoxidation bei diätetischer Belastung des Masthuhns, *Fat Sci Technol* 93 (12), 457-462
- Salonen, M.; Hirvonen, J.; Pyörälä, S.; Sankari, S.; Sandholm, M., 1996: Quantitative determination of bovine serum haptoglobin in experimentally induced *Escherichia coli* mastitis, *Res Vet Sci* 60, 88-91
- Salonen, J.T.; Nyssönen, K. Salonen, R., Porkkala-Sarataho, E., Tuomainen, T.-P., 1997: Lipoprotein oxidation and progression of carotid atherosclerosis *Circulation* 95, 840-845
- Sanders, T.A.; Sullivan, D.R.; Reeve, J.; Thompson, G.R.; 1985: Triglyceride lowering effect of marine polyunsaturates in patients with hypertriglyceridemia, *Atherosclerosis* 5, 459-465
- Sarkar, S.; Yadav, P.; Trivedi, R.; Bansal, A.K.; Bhatnagar, D., 1995: Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of antioxidant system in rat tissues *J Trace Elem Med Biol* 9, 144-149
- Sarkar, S.; Yadav, P.; Bhatnagar, D., 1997: Cadmium induced lipid peroxidation and the antioxidant system in rat erythrocytes: the role of antioxidants, *J Trace Elem Med Biol* 11 (1), 8-13

- Schinella, G.R.; Marin, M.C.; de Tacconi, A.M.J.; de Buschiazzo, P.M.; Tournier, H.A., 1999: Antioxidant defense system and lipid peroxidation in lactating rats: Effect of dietary vitamin E during gestation and lactation, *Nutr Res* 19 (5), 795-803
- Scholz, R.W.; Cook, L.S.; Todhunter, D.A., 1981: Distribution of selenium-dependent and nonselenium-dependent glutathione peroxidase activity in tissues of young cattle, *Am J Vet Res* 42 (10), 1724-1728
- Schmandke, H.; Sima, C.; Maune, R., 1969: Die Absorbierung über Alphatocopherol beim Menschen, *Int Z Vitaminforsch* 39, 296
- Schwartz, P.L.; Rutherford, I.M., 1981: The effect of tocopherol on high density lipoprotein cholesterol, *Am J Clin Pathol* 76, 843-844
- Sen, C.K.; Atalay, M.; Agren, J.; Laaksonen, D.E.; Roy, S.; Hänninen, O., 1997: Fish oil and vitamin E supplementation in oxidative stress at rest and after physical exercise, *J Appl Physiol* 83 (1), 189-195
- Sevanian, A.; McLeod, L.L., 1987: Cholesterol autoxidation in phospholipid membrane bilayers, *Lipids* 22, 627-636
- Sies, H., 1989: Relationship between free radicals and vitamins: an overview in: *Elevated dosages of vitamins*, Walter, P.; Stähelin, H.; Brubacher, G. (Eds.), Hans Huber Publishers, Toronto, 215-223
- Silbernagel, S.; Despopoulos, A., 2001: Grundlagen der Zellphysiologie in: *Taschenatlas der Physiologie*, 5. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, 14
- Song, J.H.; Fujimoto, K.; Miyazawa, T., 2000: Polyunsaturate (n-3) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid-containing oils, *J Nutr* 130 (12), 3028-3030

- Stangl, G.I.; Nöstelbacher, K.; Eder, K.; Kirchgessner, M., 2000: Chronic vitamin E inadequacy and thermally treated oils affect the synthesis of hepatic metallothionein isoforms, *Eur J Nutr* 39, 112-120
- Stein, O.; Dabach, Y.; Hollander, G.; Halperin, G.; Thiery, J.; Stein, Y., 1996: Relative resistance of the hamster to aortic atherosclerosis in spite of prolonged vitamin E deficiency and dietary hypercholesterolaemia. Putative effect of increased HDL?, *Biochem Biophys Acta* 1299 (2), 216-222
- Steinberg, D.; Parthasarathy, S.; Carew, T.E.; Khoo, J.C.; Witztum, J.L., 1989: Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity, *N Engl J Med* 320, 915-924
- Steinbrecher, U.P.; Lougheed, M.; Kwan, W.C.; Dirks, M., 1997: Recognition of oxidized low density lipoprotein by the scavenger receptor of macrophages results from derivatization of apolipoprotein B by products of fatty acid peroxidation, *J Biol Chem* 264, 15216-15223
- Stillwell, W.; Ehringer, W.D.; Dumaund, A.C.; Wassall, S.R., 1994: Cholesterol condensation of alpha-linolenic and gamma-linolenic acid-containing phosphatidylcholine monolayers and bilayers, *Biochim Biophys Acta* 1214, 131-136
- Suarez, A.; Ramirez-Tortosa, M.; Gil, A.; Faus, M.-J., 1999: Addition of vitamin E to long chain polyunsaturated fatty acid-enriched diets protects neonatal tissue lipids against peroxidation in rats, *Eur J Nutr* 38, 169-176
- Sugano, M.; Makino, N.; Yanaga, T., 1997: Effect of dietary omega-3 eicosapentaenoic acid supplements on cholesteryl ester transfer from HDL in cholesterol fed rabbits, *Biochem Biophys Acta* 1346, 14-24

- Summerfield, F.W.; Tappel, A.L., 1984: Effects of dietary polyunsaturated fats and vitamin E on aging and peroxidative damage to DNA, Arch Biochem Biophys 233 (2), 408-416
- Sünder, A.; Halle, I.; Flachowsky, G., 1999: Vitamin E hypervitaminosis in laying hens, Arch Anim Nutr 52, 185-194
- Sutton, H.C.; Roberts, P.B.; Winterbourn, C., 1976: The rate of reaction of superoxide radical ion with oxyhemoglobin and methemoglobin, Biochem J 155, 503-510
- Suzuki, E.; Sano, A.; Kuriki, T.; Miki, T., 1997: Improved separation and determination of phospholipids in animal tissues employing solid phase extraction, Biol Pharm Bull 20 (4), 299-303
- Suzukawa, M.; Abbey, M.; Howe, P.R.C.; Nestel, P.J., 1995: Effects of fish oil fatty acids on low density lipoprotein size, oxidizability, and uptake by macrophages J Lipid Res 36, 473-484
- Takashi, I.; Hideyuki, K.; Lakshmiktyamma, A.; Rouyer, I.E.; Yoko, T.; Toshifumi, A., Takashi, H.; Michinao, M., 2000: Comparative effects of perilla and fish oils on the activity and gene expression of fatty acid oxidation enzymes in rat liver Biochim Biophys Acta 1485 (1), 23-35
- Takahashi, K.; Avissar, N.; Whitin, J.; Cohen, H., 1987: Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme, Arch Biochem Biophys, 256, 677-686
- Tarlov, A.R.; Kellermeyer, R.W., 1961: The hemolytic effect of primaquine 11 decreased catalase activity in primaquine sensitive erythrocytes J Lab Clin Med 58, 204

- Tatjima, K.; Gehrsfeld, N.L., 1978: Equilibrium studies of lecithin-cholesterol interactions. II phase relations in surface films: analysis of the „condensing“ effect of cholesterol, *Biophys J* 22 (3), 489-500
- Tatum, V.L.; Changchit, C.; Chow, C.K., 1990: Measurement of malondialdehyde by high performance liquid chromatography with fluorescence detection *Lipids* 25(4), 226-229
- Terao, J.; Sugino, K.; Matsushita, S., 1985: Fe²⁺ and ascorbic acid induced oxidation of cholesterol in phosphatidylcholine liposomes and its inhibition by alpha-tocopherol, *J Nutr Sci Vitaminol* 31, 499-508
- Thews, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P., 1991: Erythropoese in: *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 88
- Thomas, J.P.; Maiorino, M.; Ursini, F.; Girotti, A.W., 1990: Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation, *J Biol Chem* 265, 454-461
- Thomas, L., 1992: *Labor und Diagnose*, Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg, 4. Auflage, 156-159
- Thomas, S.R.; Neuzil, J.; Stocker, R., 1996: Cosupplementation with coenzyme Q prevents the prooxidant effect of α -tocopherol and increases the resistance of LDL to transition metal-dependent oxidation initiation, *Art Thromb Vasc Biol* 16, 687-696
- Tiedink, C.; Katan, H., 1989: Variability in lipoprotein concentrations in serum after prolonged storage at -20 degrees C, *Clin Chim Acta* 180 (2), 147-155
- Tietze, F., 1969: Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues, *Anal Biochem* 27, 502-522

- Tomassi, G.; Silano, V., 1996: An assessment of the safety of tocopherols as food additives, *Fd Chem Toxic* 24 (10/11), 1051-1061
- Traber, M.G.; Cohn, W.; Muller, D.P.R., 1993: Absorption, transport and delivery to tissues In: Packer, L.; Fuchs, J. (Ed.) *Vitamin E in Health and Disease*, Marcel Dekker Inc., 1993; 35-51
- Traber, M.G.; Sies, H., 1996: Vitamin E in humans: demand and delivery *Annu Rev Nutr* 16, 321-347
- Trivedi, R.; John, S.; Kale, M.; Rathore, N.; Bhatnagar, D., 1997: Lipid peroxidative damage on lead exposure and alterations in antioxidant system in rat erythrocytes: Role of Vitamin E, *Trace Elem Electrol* 14 (4), 177-180
- Tsai, A.C.; Kelley, J.J.; Peng, B.; Cook, N., 1978: Study on the effect of megavitamin E supplementation in man, *Am J Clin Nutr* 31, 831-837
- Ursini, F., 1988: The phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: a peroxidation inhibition enzyme in: Chow (Ed.): *Cellular antioxidant defense mechanism*, Vol. 2, CRC Press, Boca Raton, 25-67
- Ursini, F.; Maiorino, M.; Brigelius-Flohe, R.; Aumann, K.D.; Roveri, A.; Schomburg, D.; Flohe, L., 1995: Diversity of glutathione peroxidases in: Packer L. (Ed.): *Methods in enzymology*, 252, Academic Press, San Diego, 38-52
- Varda, Z.; Ron, K.; Asher, O., 2001: Vitamins C and E improves rat embryonic antioxidant defense mechanism in diabetic culture medium, *Teratology*, 64 (1), 33-44
- Valk, E.J.; Hornstra, G., 2000: Relationship between vitamin E requirement and polyunsaturated fatty acid intake in man: a review, *Int J Vitam Nutr Res* 70 (2), S. 31-42

- Vatassery, G.T.; Smith, W.E.; Quach, H.T., 1989: Ascorbic acid, glutathione and synthetic antioxidants prevent the oxidation of vitamin E in platelets
Lipids 24 (12), 1043-1047
- Van-Zoeren-Groben, D.; Jacobs, N.J.; Houdkamp, E.; Lindeman, J.H.; Drejer, D.F.; Berger, H.M., 1998: Vitamin E status in preterm infants: assessment by plasma and erythrocyte vitamin E-lipid ratios and hemolysis tests, *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 26 (1), 73-79
- Venkatraman, J.T.; Chandrasekar, B.; Kim, J.D.; Fernandes, G., 1994: Effects of n-3 and n-6 fatty acids on the activities and expression of hepatic antioxidant enzymes in autoimmune-prone NZB*NZW F1 mice, *Lipids* 29 (8), 561-568
- Vidgren, H.M.; Agren, J.J.; Schwab, U.; Rissanen, T.; Hanninen, O.; Uusitupa, M.I., 1997: Incorporation of n-3 fatty acids into plasma lipid fractions and erythrocyte membranes and platelets during dietary supplementation with fish, fish oil and docosahexaenoic acid-rich oil among healthy young man, *Lipids* 32, 697-705
- Vidya, L.; Malini, M. M.; Varalakshmi, P., 2000: Effect of pentacyclic triterpenes on oxalate-induced changes in rat erythrocytes, *Pharmacol Res* 42 (4), 313-316
- Vittori, D.; Nesse, A.; Perez, G.; Garbossa, G., 1999: Morphologic and functional alterations of erythroid cells induced by long-term ingestion of aluminium
J Inorg Biochem 76, 113-120
- Wallat, S., 1986: Zur biologischen Wirksamkeit von Vitamin E, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 88, 485-490
- Wang, X.; Quinn, P.J.; 1999: Vitamin E and its function in membranes, *Progr Lipid Res*, 38, 309-336

- Weisinger, R.A.; Fridovich, I., 1973: Superoxide Dismutase, *J Biol Chem*, 248 (10), 3582-3592
- Weiss, J.F.; Kumar, K.S., 1988: Antioxidant mechanisms in radiation injury and radioprotection in: Chan C.K. (Ed.): Cellular antioxidant defense mechanisms. Vol. 2, CRC Press, Inc. Boca Raton, 163-189
- Wendel, A.; Jaeschke, H., 1988: Influences of selenium deficiency and glutathione status on liver metabolism in: Chan, C.K. (Ed.): Cellular antioxidant defense mechanisms, Vol. 2, CRC Press, Inc. Boca Raton, 133-147
- Wheeler (1932) in DGF-Einheitmethoden C-VI 6a (84), Deutsche Einheitmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen, Band 1, 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2001
- Wilson, A.M.; Sisk, R.M.; O'Brien, N.M., 1997: Modulation of cholestan-3-beta, 5-alpha, 6-beta-triol toxicity by butylated hydroxytoluene, alpha-tocopherol and beta-carotene in newborn rat kidney cells in vitro, *Br J Nutr* 78, 479-492
- Willumsen, N.; Skorve, J.; Hexeberg, S.; Rustan, A.C.; Berge, R.K., 1993: The hypotriglyceridemic effect of eicosapentaenoic acid in rats is reflected in increased mitochondrial fatty acid oxidation followed by diminished lipogenesis, *Lipids* 28 (8), 683-690
- Yanagawa, K.; Takeda, H.; Egashira, T.; Sakai, K.; Takasaki, M.; Matsumiya, T., 1999: Age-related changes in alpha-tocopherol dynamics with relation to lipid hydroperoxide content and fluidity of rat erythrocyte membrane, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 54 (9), B 379-B383
- Yang, N.Y.J.; Desai, I. D., 1977: Effect of high levels of dietary vitamin E on hematological indices and biochemical parameters in rats, *J Nutr* 107, 1410-1417

Yeo, Y. K.; Holub, B., 1990: Influence of dietary fish oil on the relative synthesis of triacylglycerol and phospholipids in rat liver in vivo, *Lipids* 25 (12), 811-814

Zanetti, R.; Catala, A., 2000: Changes in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids during lipid-peroxidation of mitochondria obtained from rat liver and several brain regions: effect of alpha-tocopherol, *Prostagl Leukot Essent Fatty Acids* 62 (6), 379-385

Zhou, O.; Wasowicz, E.; Kummerow, F.A., 1995: Failure of vitamin E to protect cultured human arterial smooth muscle cells against oxysterol-induced cytotoxicity, *J Am Coll Nutr* 14, 169-175

Zidenberg-Cherr, S.; Keen, C.L.; Lönnerdal, B.; Hurley, L.S., 1983: Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation in the rat: developmental correlations affected by manganese deficiency, *J Nutr* 113, 2498-2504

Zsigmond, E.; Parrish, C.; Fong, B.; Angel, A., 1990: Changes in dietary lipid saturation modify fatty acid composition and high-density-lipoprotein binding of adipocyte plasma membrane, *Am J Clin Nutr* 52, 110-119

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name, Vorname: Flader, Diana
Geburtsdatum: 7. März 1976
Geburtsort: Nordhausen
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1982-1990 Polytechnische Oberschule „Albert Kuntz“
Nordhausen
1990-1994 Staatliches Herder Gymnasium Nordhausen
Abschluß: Abitur

Studium:

1994-1999 Friedrich-Schiller-Universität Jena
Studium der Ernährungswissenschaften
Abschluß: Diplom Trophologe
seit Oktober 1999 Doktorand am Institut für Ernährungswissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Erklärung

Die Unterzeichnende versichert hiermit an Eides Statt, daß sie selbständige Verfasserin der eingereichten Dissertation: „Wirkungen exzessiver Vitamin E-Aufnahme auf den antioxidativen Status und auf die Hämolyseempfindlichkeit der Erythrozyten bei unterschiedlichen Diätfetten am Modelltier Ratte“ ist und daß sie sie nicht bereits für eine Promotion oder ähnliche Zwecke eingereicht hat. Alle hierzu benutzten wissenschaftlichen Arbeiten und Hilfsmittel sind genau und vollständig angegeben worden.

Halle, den 26.06.2002

.....
Diana Flader

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K. Eder für die Überlassung des Themas, die Gewährung der Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Ernährungswissenschaften und für die hilfreichen Hinweise für die Durchführung und Aufbereitung meiner Versuche und bei der Erstellung meiner Dissertation bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin Frau Dr. C. Brandsch für die Unterstützung bei der Durchführung der Fütterungsversuche, bei experimentellen Fragestellungen und bei der Anfertigung der Dissertation. Weiterhin möchte ich Herrn Dr. F. Hirche für seine umfangreiche Unterstützung in analytischen Fragestellungen.

Weiterhin möchte ich Frau Kaiser, Frau Schibelius-Aßmann, Frau Fuhrmann und Frau Leibelt für ihre Unterstützung danken.

Mein Dank gilt weiterhin sämtlichen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Ernährungswissenschaften für die gewährte Unterstützung und für die freundliche Aufnahme am Institut.

Desweiteren bedanke ich mich bei der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt für die Gewährung des Stipendiums.