

**Wirkung konjugierter Linolsäuren (CLA) auf den Lipidstoffwechsel
und auf die Bildung von Eicosanoiden von Hep G2-Zellkulturen
und am Modelltier Ratte**

Der Landwirtschaftlichen Fakultät
(Dekan: Prof. Dr.-Ing. P. Pickel)

der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

als

Dissertation

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

vorgelegt von

Diplom-Ökotrophologin
Nadine Slomma

geboren am 15.07.1976
in Querfurt

Gutachter: Prof. Dr. K. Eder
Prof. Dr. G. Stangl
Prof. Dr. G. Jahreis

Verteidigung am: 18.10.2004

Halle/Saale 2004

Inhaltsverzeichnis		Seite
Tabellen- und Abbildungsverzeichnis		
Abkürzungsverzeichnis		
1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	6
2.1	Studie zur Wirkung der konjugierten Linolsäure-Isomere cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA auf den Lipidstoffwechsel und auf die Bildung von Eicosanoiden von Hep G2-Zellkulturen	6
2.1.1	Verwendete Reagenzien	6
2.1.2	Hep G2-Zellkulturen	8
2.1.2.1	Kultivierung von Hep G2-Zellen	8
2.1.2.2	Bestimmung von Zellzahlen	8
2.1.2.3	Bestimmung der Lebensfähigkeit von Zellen	9
2.1.2.4	Morphologische Untersuchungen von Hep G2-Zellen	9
2.1.2.5	Gewinnung von Zellmikrosomen und Zellecytosol	10
2.1.2.6	Proteinbestimmung	10
2.1.3	Untersuchungen zum Einfluss von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA auf den Lipidstoffwechsel von Hep G2-Zellkulturen	11
2.1.3.1	Inkubation von Hep G2-Zellen mit cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA	11
2.1.3.2	Analytische Methoden	12
2.1.3.2.1	Extraktion von Gesamtlipiden	12
2.1.3.2.2	Trennung von Lipidfraktionen	13
2.1.3.2.3	Fettsäureanalytik	13
2.1.3.2.4	Bestimmung der mRNA-Konzentration von Δ^9 -, Δ^6 - und Δ^5 -Desaturasen	14
2.1.3.2.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA	14
2.1.3.2.4.2	cDNA-Synthese	15
2.1.3.2.4.3	real-time PCR	15
2.1.3.2.4.4	Agarosegel-Elektrophorese	17
2.1.3.2.4.5	Isolierung und Quantifizierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	18
2.1.3.2.5	Bestimmung von Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen	18
2.1.3.2.6	Bestimmung der Aktivität lipogener Enzyme	19
2.1.3.2.6.1	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	19
2.1.3.2.6.2	Fettsäure-Synthetase	20
2.1.4	Untersuchungen zum Einfluss von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA auf die Bildung von Eicosanoiden von Hep G2-Zellkulturen	20
2.1.4.1	Stimulierung von Hep G2-Zellen zur Eicosanoidbildung	20
2.1.4.2	Inkubation von Hep G2-Zellen zur Bestimmung der sPLA ₂ -Aktivität und der mRNA-Konzentration von Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2	21
2.1.4.3	Analytische Methoden	22
2.1.4.3.1	Bestimmung von Eicosanoidkonzentrationen	22

2.1.4.3.2	Bestimmung der sPLA ₂ -Aktivität	23
2.1.4.3.3	Bestimmung der mRNA-Konzentration von Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2	24
2.1.4.3.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA	24
2.1.4.3.3.2	cDNA-Synthese	24
2.1.4.3.3.3	real-time PCR	25
2.2	Studie zur Wirkung eines Gemisches konjugierter Linolsäuren (cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA) auf den Lipidstoffwechsel und auf die Bildung von Eicosanoiden am Modelltier Ratte	26
2.2.1	Verwendete Reagenzien	26
2.2.2	Versuchsdesign	26
2.2.3	Haltung und Fütterung der Ratten	27
2.2.4	Zusammensetzung der Diäten	28
2.2.5	Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials	31
2.2.5.1	Gewinnung von Plasma und Entnahme der Leber	31
2.2.5.2	Gewinnung von Lebermikrosomen und Lebercytosol	31
2.2.5.3	Proteinbestimmung	32
2.2.6	Untersuchungen zum Einfluss des CLA-Gemisches auf den Lipidstoffwechsel von Ratten	32
2.2.6.1	Extraktion von Gesamtlipiden aus der Leber	32
2.2.6.2	Trennung von Lipidfraktionen aus der Leber	33
2.2.6.3	Fettsäureanalytik	33
2.2.6.4	Bestimmung von Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in Leber und Plasma	33
2.2.6.5	Bestimmung der mRNA-Konzentration von Δ^9 -, Δ^6 - und Δ^5 -Desaturasen der Leber	33
2.2.6.5.1	Isolierung von Gesamt-RNA	33
2.2.6.5.2	cDNA-Synthese	34
2.2.6.5.3	real-time PCR	34
2.2.6.6	Bestimmung der Aktivität lipogener Enzyme in der Leber	35
2.2.6.6.1	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	35
2.2.6.6.2	Fettsäure-Synthetase	35
2.2.7	Untersuchungen zum Einfluss des CLA-Gemisches auf die Bildung von Eicosanoiden in Ratten	35
2.2.7.1	Bestimmung von Eicosanoidkonzentrationen in Leber und Plasma	35
2.2.7.2	Bestimmung der sPLA ₂ -Aktivität in Leber und Plasma	36
2.2.7.3	Bestimmung der mRNA-Konzentration von Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2 der Leber	36
2.2.7.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA	36
2.2.7.3.2	cDNA-Synthese	36
2.2.7.3.3	real-time PCR	36
2.3	Statistische Auswertung der Ergebnisse	38

3	Ergebnisse	39
3.1	Studie zur Wirkung der konjugierten Linolsäure-Isomere cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA auf den Lipidstoffwechsel und auf die Bildung von Eicosanoiden von Hep G2-Zellkulturen	39
3.1.1	Hep G2-Zellkulturen	39
3.1.1.1	Zellwachstum und Lebensfähigkeit	39
3.1.1.2	Proteingehalt	39
3.1.1.3	Morphologie	40
3.1.2	Einfluss von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA auf den Lipidstoffwechsel von Hep G2-Zellkulturen	40
3.1.2.1	Anteile der CLA-Isomere in Lipide und Lipidfraktionen	40
3.1.2.2	Fettsäurezusammensetzung von Gesamtlipiden	44
3.1.2.3	Fettsäurezusammensetzung von Lipidfraktionen	45
3.1.2.4	mRNA-Konzentration von $\Delta 9$ -, $\Delta 6$ - und $\Delta 5$ -Desaturasen	47
3.1.2.5	Konzentration von Triglyceriden und Cholesterin	57
3.1.2.6	Aktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Fettsäure-Synthetase	57
3.1.3	Einfluss von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA auf die Bildung von Eicosanoiden von Hep G2-Zellkulturen	58
3.1.3.1	Eicosanoidkonzentrationen	58
3.1.3.2	sPLA ₂ -Aktivität	59
3.1.3.3	mRNA-Konzentration von Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2	59
3.2	Studie zur Wirkung eines Gemisches konjugierter Linolsäuren (cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA) auf den Lipidstoffwechsel und auf die Bildung von Eicosanoiden am Modelltier Ratte	62
3.2.1	Lebendmassezunahme und Futteraufnahme	62
3.2.2	Lebergewicht	62
3.2.3	Einfluss des CLA-Gemisches auf den Lipidstoffwechsel von Ratten	63
3.2.3.1	Anteile der im CLA-Gemisch enthaltenen CLA-Isomere an den Gesamtfettsäuren der Lipide und Lipidfraktionen in der Leber	63
3.2.3.2	Fettsäurezusammensetzung von Gesamtlipiden in der Leber	63
3.2.3.3	Fettsäurezusammensetzung von Lipidfraktionen in der Leber	64
3.2.3.4	mRNA-Konzentration von $\Delta 9$ -, $\Delta 6$ - und $\Delta 5$ -Desaturasen in der Leber	67
3.2.3.5	Konzentration von Triglyceriden und Cholesterin in Leber und Plasma	74
3.2.3.6	Aktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Fettsäure-Synthetase in der Leber	74
3.2.4	Einfluss des CLA-Gemisches auf die Bildung von Eicosanoiden in Ratten	75
3.2.4.1	Eicosanoidkonzentrationen in Leber und Plasma	75
3.2.4.2	sPLA ₂ -Aktivität in Leber und Plasma	75
3.2.4.3	mRNA-Konzentration von Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2 in der Leber	77

4	Diskussion	78
4.1	Zellwachstum und Lebensfähigkeit von Hep G2-Zellkulturen	78
4.2	Morphologie von Hep G2-Zellkulturen	78
4.3	Futteraufnahme und Gewichtsentwicklung von Ratten	79
4.4	Lebergewicht von Ratten	80
4.5	Einfluss konjugierter Linolsäuren (cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA) auf den Lipidstoffwechsel von Hep G2-Zellkulturen und der Rattenleber	80
4.5.1	Cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA in Lipiden und Lipidfraktionen	80
4.5.2	Δ 9-Desaturierung von gesättigten Fettsäuren, SFA und MUFA in Lipiden und Lipidfraktionen	82
4.5.3	Desaturierung von Linolsäure und α -Linolensäure, (n-6)- und (n-3)-PUFA in Lipiden und Lipidfraktionen	84
4.5.4	Aktivität lipogener Enzyme und Konzentration an Triglyceriden	89
4.6	Einfluss konjugierter Linolsäuren (cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA) auf die Bildung von Eicosanoiden von Hep G2-Zellkulturen und der Rattenleber	90
5	Zusammenfassung	94
6	Literaturverzeichnis	100

Tabellenverzeichnis	Seite
Tab. 1: Versuchsdesign	27
Tab. 2: Zusammensetzung der Diäten	29
Tab. 3: Supplementierung der Diät mit Mineralstoffen	30
Tab. 4: Supplementierung der Diät mit Vitaminen	30
Tab. 5: Fettsäurezusammensetzung der Versuchsfette	31
Tab. 6: Zellwachstum, Lebensfähigkeit, Proteingehalt und Länge von Hep G2-Zellen nach 24ständiger Inkubation mit 10µmol/l und 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 10µmol/l und 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA im Zellmedium	39
Tab. 7: Prozentualer Anteil der CLA-Isomere des Zellmediums in Gesamtlipide von Hep G2-Zellen nach 0,5- und 24ständiger Inkubation mit 10µmol/l und 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 10µmol/l und 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA	40
Tab. 8: Prozentualer Anteil der CLA-Isomere des Zellmediums in Lipidfraktionen von Hep G2-Zellen nach 24ständiger Inkubation mit 25µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA und jeweils 25µmol/l Linolsäure/α-Linolensäure oder jeweils 25µmol/l Arachidonsäure/Eicosapentaensäure	43
Tab. 9: Fettsäurezusammensetzung in Gesamtlipiden von Hep G2-Zellen nach 0,5ständiger Inkubation mit 10µmol/l und 100µmol/l cis-9, trans-11 CLA oder 10µmol/l und 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA im Zellmedium	48
Tab. 10: Fettsäurezusammensetzung in Gesamtlipiden von Hep G2-Zellen nach 24ständiger Inkubation mit 10µmol/l und 100µmol/l cis-9, trans-11 CLA oder 10µmol/l und 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA im Zellmedium	49
Tab. 11: Fettsäurezusammensetzung in Lipidfraktionen von Hep G2-Zellen nach 24ständiger Inkubation mit 25µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA im Zellmedium	50
Tab. 12: Fettsäurezusammensetzung in Lipidfraktionen von Hep G2-Zellen nach 24ständiger Inkubation mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA im Zellmedium	51
Tab. 13: (n-6)-PUFA und Quotienten von (n-6)-Fettsäuren in Phospholipidfraktionen von Hep G2-Zellen nach 24ständiger Inkubation mit 25µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA und 25µmol/l Linolsäure im Zellmedium	52

Tab. 14:	(n-3)-PUFA und Quotienten von (n-3)-Fettsäuren in Phospholipidfraktionen von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 25µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA und 25µmol/l α-Linolensäure im Zellmedium	53
Tab. 15:	(n-6)-PUFA und Quotienten von (n-6)-Fettsäuren in Phospholipidfraktionen von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 25µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA und 25 µmol/l Arachidonsäure im Zellmedium	54
Tab. 16:	(n-3)-PUFA und Quotienten von (n-3)-Fettsäuren in Phospholipidfraktionen von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 25µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA und 25µmol/l Eicosapentaensäure im Zellmedium	55
Tab. 17:	Relative mRNA-Konzentration von Δ9-, Δ6- und Δ5-Desaturasen von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 10µmol/l und 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 10µmol/l und 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA im Zellmedium	56
Tab. 18:	Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in Hep G2-Zellen und im Zellmedium nach 24stündiger Inkubation mit 100µmol/l cis-9, trans-11 CLA oder 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA und in HBSS nach zusätzlich 1stündiger Inkubation	57
Tab. 19:	Aktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Fettsäure-Synthetase im Cytosol von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA	58
Tab. 20:	Konzentration an 6-keto-PGF _{1α} , TXB ₂ , PGF _{2α} im Überstand (HBSS) von Hep G2-Zellen nach 0,5stündiger Inkubation mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA im Zellmedium und Stimulation mit 10µmol/l Ca ²⁺ -Ionophore und/oder 25µmol/l Arachidonsäure	60
Tab. 21:	Konzentration an 6-keto-PGF _{1α} , TXB ₂ , PGF _{2α} , PGE ₂ im Überstand (HBSS) von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA im Zellmedium und Stimulation mit 10µmol/l Ca ²⁺ -Ionophore und/oder 25µmol/l Arachidonsäure	61
Tab. 22:	sPLA ₂ -Aktivität im Überstand (HBSS) und in Mikrosomen von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 100µmol/l cis-9, trans-11 CLA oder 100µmol/l trans-10, cis-12 CLA	59
Tab. 23:	Lebendmassezunahme und Futteraufnahme von Ratten während 1. und 2. Fütterungsperiode	62

Tab. 24:	Anteile von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA an den Gesamtfettsäuren der Gesamtlipide und Lipidfraktionen in der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ	63
Tab. 25:	Fettsäurezusammensetzung von Gesamtlipiden in der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, vor und nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ	68
Tab. 26:	Fettsäurezusammensetzung von Neutrallipiden in der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, vor und nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ	69
Tab. 27:	Fettsäurezusammensetzung von Phosphatidylcholin in der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, vor und nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ	70
Tab. 28:	Fettsäurezusammensetzung von Phosphatidylethanolamin in der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, vor und nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ	71
Tab. 29:	Quotienten und Summen von (n-3)- und (n-6)-Fettsäuren in Phosphatidylcholin der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, vor und nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ	72
Tab. 30:	Quotienten und Summen von (n-3)- und (n-6)-Fettsäuren in Phosphatidylethanolamin der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, vor und nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ	73
Tab. 31:	Relative mRNA-Konzentration der $\Delta 9$ -, $\Delta 6$ - und $\Delta 5$ -Desaturasen in der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ	67
Tab. 32:	Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen im Plasma und in der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ	74
Tab. 33:	Aktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Fettsäure-Synthetase im Lebercytosol von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ	75
Tab. 34:	Konzentration an 6-keto-PGF _{1α} , TXB ₂ , PGF _{2α} , PGE ₂ und sPLA ₂ -Aktivität im Plasma von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ	76

Tab. 35: Konzentration an 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, PGF_{2α}, PGE₂, sPLA₂-Aktivität 76
und relative mRNA-Konzentration von Cyclooxygenase-1 in der Leber
von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten,
nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ

Abbildungsverzeichnis	Seite
Abb. 1: Strukturen von Linolsäure, cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA.	1
Abb. 2: Desaturations- und Elongationsprozesse von (n-6)- und (n-3)-Fettsäuren.	2
Abb. 3: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen einer Hep G2-Zellkultur bei 200-facher Vergrößerung A: Hep G2-Zellen (Kontrolle) B: Hep G2-Zellen 24h inkubiert mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA C: Hep G2-Zellen 24h inkubiert mit 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA D: Hep G2-Zellen 24h inkubiert mit 10µmol/l cis-9,trans-11 CLA E: Hep G2-Zellen 24h inkubiert mit 10µmol/l trans-10,cis-12 CLA.	42

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AIN	American Institute of Nutrition
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
C	Kohlenstoff-Atom
C14:0	Myristinsäure
C15:0	Pentadecansäure
C16:0	Palmitinsäure
C18:0	Stearinsäure
C16:1 (n-7)	Palmitoleinsäure
C18:1 (n-9)	Ölsäure
C18:2 (n-6)	Linolsäure
C18:3 (n-3)	α -Linolensäure
C20:3 (n-6)	Dihomo- γ -Linolensäure
C20:4 (n-6)	Arachidonsäure
C20:5 (n-3)	Eicosapentaensäure
C22:5 (n-6)	Docosapentaensäure
C22:6 (n-3)	Docosahexaensäure
ca.	circa
cDNA	copy Desoxyribonucleinsäure
CLA	konjugierte Linolsäure(n) (conjugated linoleic acid)
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
COX	Cyclooxygenase(n)
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiotreitol
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
EC	Klassifizierung für Enzyme (enzyme classification)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzymimmunassay
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FAME	Fettsäuremethylester
FFAP	Free-Fatty-Acid-Phase
FID	Flammenionisationsdetektor
FKS	Fötale Kälberserum
FsS	Fettsäure-Synthetase
fwd	forward
g	Gramm
g	Fallbeschleunigung $g = 9,81 \text{ ms}^{-2}$
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase

GC	Gaschromatograph
G6PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
HBSS	Hank's bilanzierte Salzlösung (Hank's Balanced Salt Solution)
HÖ-SBÖ	hochölsäurehaltiges Sonnenblumenöl
ID	Innendurchmesser
IE	Internationale Einheiten
Ig	Immunglobuline
kg	Kilogramm
6-keto-PGF _{1α}	6-keto-Prostaglandin F _{1α}
l	Liter
LÖ	Leinöl
m	Meter
M	Mol
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure (Messenger-RNA)
MUFA	einfach ungesättigte Fettsäuren (monounsaturated fatty acids)
MW	Mittelwert
µg	Microgramm
µl	Microliter
µm	Micrometer
µmol	Micromol
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NL	Neutrallipide
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chainreaction)
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
pg	Picogramm
PG	Prostaglandin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PGI ₂	Prostacyclin
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids)
rev	reverse
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde (n)
SBÖ	Sonnenblumenöl
SD	Standardabweichung
SFA	gesättigte Fettsäuren (saturated fatty acids)
sPLA ₂	sekretorische Phospholipase A ₂
Tab.	Tabelle

TBE	Tris-Borat-EDTA
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TX	Thromboxan
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TXB ₂	Thromboxan B ₂
U	Units
u.a.	unter anderen
UV	ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
VLDL	very low density lipoprotein

1 Einleitung

Konjugierte Linolsäuren (engl.: conjugated linoleic acid, CLA) sind Isomere der Linolsäure, deren Doppelbindungen in konjugierter Form vorliegen und an mehreren Positionen (9,11 oder 10,12 oder 11,13 oder 8,10) in cis- oder trans- Konfiguration vorkommen. In Abbildung 1 sind, neben der Linolsäure, die CLA-Isomere cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA dargestellt.

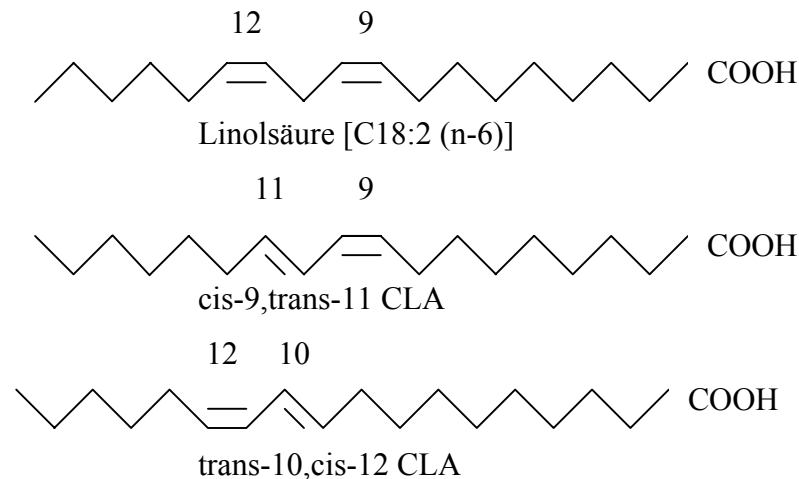


Abb. 1: Strukturen von Linolsäure, cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA.

CLA entstehen entweder durch Biohydrierung der Linolsäure mittels anaerober Bakterien (*Butyrivibrio fibrisolvens*) im Pansen von Wiederkäuern (KEPLER ET AL. 1966), durch Bildung aus trans-Vaccensäure mittels Δ^9 -Desaturase in den Milchdrüsen laktierender Kühe (GRINARI ET AL. 2000) oder bei der katalytischen Hydrierung von Ölen (FRITSCHKE AND STEINHART 1998). Cis-9,trans-11 CLA kommt natürlicherweise zu einem Anteil von 80 bis 90 % der Gesamtisomere in Milchfett, Milchprodukten und Fleisch von Wiederkäuern vor, während andere CLA-Isomere Minorkomponenten darstellen (FRITSCHKE AND STEINHART 1998, IP ET AL. 1994).

Das Interesse an Wirkungen von CLA hat in den letzten 10 Jahren drastisch zugenommen, da Ergebnisse von Zellkultur- und Tierstudien auf den möglichen gesundheitlichen Nutzen dieser natürlich vorkommenden Substanzen hindeuten. Insbesondere seit HA ET AL. (1987) erstmals anticancerogene Wirkung der CLA nachweisen konnten, wurden der CLA antiatherogene (NICOLosi ET AL. 1997, LEE ET AL. 1994), antidiabetogene (HOUSEKNECHT ET AL. 1998) und antiadipöse (DELANY ET AL. 1999, PARK ET AL. 1997) Eigenschaften zugesprochen.

CLA unterscheiden sich in einigen ihrer Eigenschaften von denen der Linolsäure (PARIZA ET AL. 2000, KRITCHEVSKY 2000). So beeinflussen CLA u.a. den Lipidstoffwechsel. Verschiedene Autorengruppen stellten in Tier- und Zellkulturstudien fest, dass cis-9,trans-11 CLA die aktive Form der CLA ist (IP ET AL. 1991, HA ET AL. 1990). In darauffolgenden

Studien gab es Hinweise darauf, dass trans-10,cis-12 CLA aktiv Vorgänge im Lipidstoffwechsel beeinflusst (SEBEDIO ET AL. 2001, PARK ET AL. 2000, BRETILLON ET AL. 1999). Studien zeigten, dass CLA die $\Delta 9$ -Desaturierung von gesättigten Fettsäuren (engl.: saturated fatty acids, SFA) hemmt und die Anteile der einfach-ungesättigten Fettsäuren (engl.: monounsaturated fatty acids, MUFA) in den Zelllipiden verringert (BRETILLON ET AL. 1999, LEE ET AL. 1998). Bislang fehlen detaillierte Erkenntnisse über die Wirkung einzelner CLA-Isomere auf die $\Delta 9$ -Desaturierung von SFA.

Beobachtungen deuten darauf hin, dass CLA die Desaturierung von Linolsäure und α -Linolensäure auf unterschiedliche Art und Weise beeinflusst. Aus verschiedenen Studien geht hervor, dass die Konzentration an Arachidonsäure in den Gewebelipiden von Tieren nach Fütterung mit CLA verringert war (SIMON ET AL. 2000, STANGL 2000A, BANNI ET AL. 1999, LIU AND BELURY 1998). Im Gegensatz zur Arachidonsäure, waren die Konzentrationen an langkettigen (n-3)-mehrfach ungesättigten Fettsäuren (engl.: polyunsaturated fatty acids, PUFA), Docosapentaensäure [C22:5 (n-3)] und Docosahexaensäure [C22:6 (n-3)], welche aus α -Linolensäure desaturiert und elongiert werden, in Ratten nach Fütterung mit CLA erhöht (SEBEDIO ET AL. 2001, STANGL 2000A). Linol- und α -Linolensäure werden im Organismus in C20- und C22-PUFA desaturiert und elongiert (Abbildung 2).

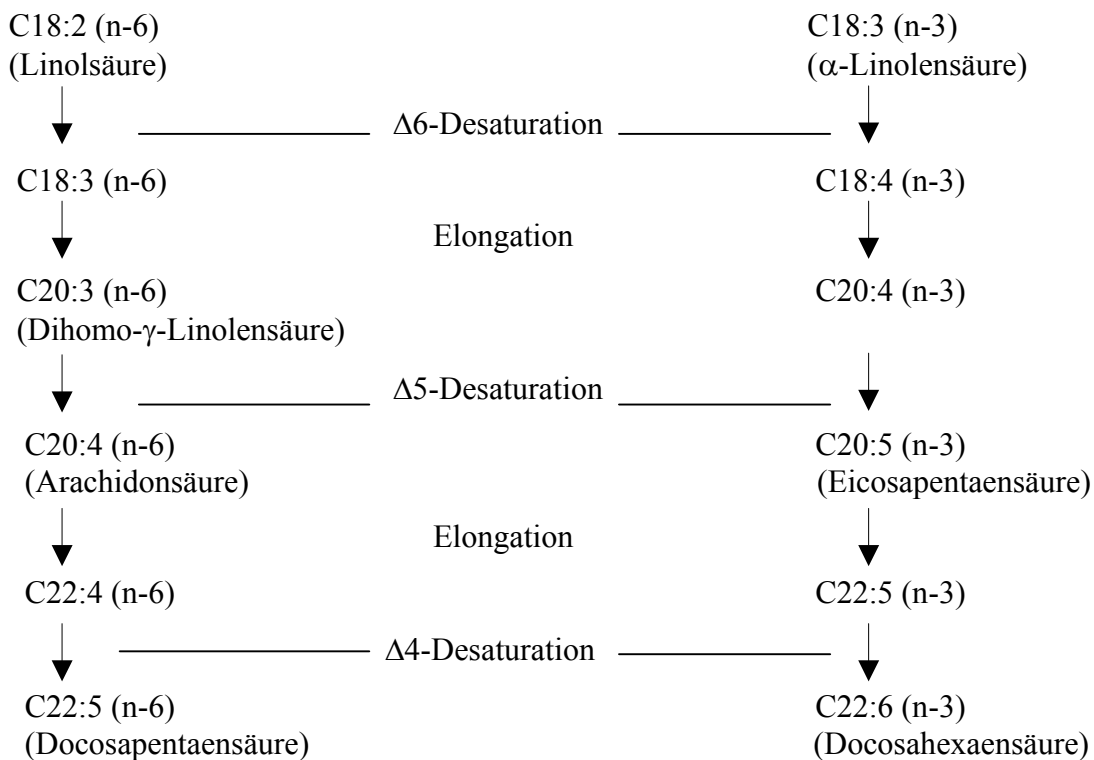


Abb. 2: Desaturations- und Elongationsprozesse von (n-6)- und (n-3)-Fettsäuren.

Die Verfügbarkeit von C20- und C22-PUFA ist v.a. von der Desaturierung der Linolsäure und α -Linolensäure durch die $\Delta 6$ -Desaturase abhängig (SPRECHER 1981). Desaturierungsprodukte dieser beiden Fettsäuren sind wichtige Bestandteile biologischer Membranlipide und nehmen Einfluss auf Membraneigenschaften (STUBBS AND SMITH 1984). Detaillierte Informationen über die Wirkung einzelner CLA-Isomere auf die Desaturierung von Linol- und α -Linolensäure liegen bisher nicht vor.

C20-PUFA, insbesondere Arachidonsäure, sind Vorläufer der Eicosanoide (HIGGS ET AL. 1986). Als Bestandteil von Membranphospholipiden, werden sie durch Phospholipasen A₂ (PLA₂, EC 3.1.1.4) freigesetzt und stehen als Substrat für Cyclooxygenasen (COX, EC 1.14.99.1) und Lipoxygenasen zur Verfügung. Eicosanoide werden nicht wie andere Hormone in Zellen gespeichert, sondern bei Bedarf jeweils neu gebildet. Diese sogenannten Gewebshormone entwickeln schon in sehr kleinen Mengen große biologische Wirksamkeit. Sie spielen eine Rolle bei der Neurotransmission, bei der Auslösung und Empfindung von Schmerz, der Regulation der Körpertemperatur und der Blutdruckregulation. Erkenntnisse aus zahlreichen Untersuchungen deuten auf die Möglichkeit hin, dass CLA physiologische Funktionen, wie z.B. Karzinogenese, Diabetes, Fettleibigkeit und Plättchenaggregation, beeinflusst, indem sie Arachidonsäure in den Membranphospholipiden verringert und somit auch auf die Synthese von Arachidonsäuremetaboliten, den Eicosanoiden, wirkt. Studien an Zellkulturen und Tiermodellen zeigten, dass nach CLA-Behandlung die Freisetzung von Prostaglandin (PG) E₂ vermindert wurde (WHIGHAM ET AL. 2001, SUGANO ET AL. 1998, LIU AND BELURY 1998, LI AND WATKINS 1998, SUGANO ET AL. 1997, MILLER ET AL. 1994). In Blutplättchen hemmte CLA die Bildung von Thromboxan (TX) A₂ mit anschließender Hemmung der Plättchenaggregation (TRUITT ET AL. 1999). Im Gegensatz dazu führte die Behandlung von Brustkrebszellen mit CLA zu keinen Veränderungen in der PGE₂-Sekretion (PARK ET AL. 2000). In der Milz von Mäusen verursachte die CLA-Supplementierung der Diät sogar einen leichten Anstieg der PGE₂-Freisetzung (HAYEK ET AL. 1999). Einige Autoren vermuten, dass in diesem Zusammenhang CLA das COX-Enzymsystem beeinflusst (LI ET AL. 1999). Obwohl es Hinweise darauf gibt, dass CLA in den Eicosanoidstoffwechsel eingreift, sind die Ergebnisse kontrovers, und es liegen nur wenige Informationen über die Wirkung einzelner CLA-Isomere vor. Es gibt nur wenige Erkenntnisse darüber, ob CLA Enzyme, die im Eicosanoidstoffwechsel involviert sind, auf Transkriptions- und/oder Translationsebene beeinflusst.

Dem positiven Effekt von CLA-Supplementierungen auf Rückgang der Körperfettmasse wurde viel Aufmerksamkeit geschenkt, aber potentielle negative Wirkungen auf den Leberstoffwechsel wurden bisher ignoriert. Das ist insofern widersprüchlich, da in

verschiedenen Tierstudien durch CLA ausgelöste Hepatomegalie beobachtet wurde (KELLY 2001, DEDECKER ET AL. 1999). In Mäusen, deren Diäten mit CLA supplementiert wurden, vergrößerte sich die Leber durch Lipidanreicherung (TSUBOYAMA-KASAOKA ET AL. 2000, BELURY AND KEMPA-STECZKO 1997).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, die Wirkung von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA auf die Desaturierung von SFA, Linol- und α -Linolensäure und auf die Bildung von Eicosanoiden aus der Arachidonsäure im Detail zu charakterisieren. Dazu wird die Fettsäurezusammensetzung von Neutral- und Phospholipiden bestimmt und die mRNA-Konzentration der Δ^9 -, Δ^6 - und Δ^5 -Desaturase (EC 1.14.99.5) ermittelt. Weiterhin werden die Konzentrationen an Eicosanoiden, welche aus der Arachidonsäure gebildet werden, sowie die Aktivität der PLA₂ und die Genexpression der COX analysiert. Zusätzlich werden Triglyceride, Cholesterin sowie die Aktivität der lipogenen Enzyme Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49) und Fettsäure-Synthetase (FsS, EC 2.3.1.85) bestimmt.

Um isolierte Effekte von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA auf Lipide, Fettsäuren, Eicosanoide und Enzyme zu untersuchen und um die Komplexität von lebenden Organismen zu minimieren, werden im ersten Teil der Arbeit Versuche mit Zellkulturen durchgeführt. Besonders geeignet sind für die vorliegende Studie Zellkulturen aus der humanen Leberkrebszelllinie Hep G2, da sie normale Leberfunktionen, einschließlich die des Lipidmetabolismus besitzt (LIN ET AL. 2001, DOKKO ET AL. 1998, ANGELETTI AND DEALANIZ 1995, JAVITT 1990, ELLSWORTH ET AL. 1986, THRIFT ET AL. 1986).

Begleitend dazu wird im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit ein Fütterungsversuch mit männlichen Sprague-Dawley-Ratten als Modelltieren durchgeführt, um die Wirkung von CLA auf Lipide, Fettsäuren, Eicosanoide und Enzyme *in vivo* zu untersuchen. Im Vordergrund steht hier der Einfluss von CLA auf den Stoffwechsel von (n-3)-PUFA. Aus verschiedenen Studien geht hervor, dass ein vollständiger oder teilweiser Ersatz von Linolsäurereichen Ölen durch CLAreiche Öle zu einer vermehrten Inkorporierung von langkettigen (n-3)-PUFA in Gewebelipide von Ratten, Hühnern oder Eiern von Hühnern führte (RAES ET AL. 2002, SEBEDIO ET AL. 2001, SIMON ET AL. 2000, STANGL ET AL. 2000A,B). In den meisten dieser Studien war die Konzentration an (n-3)-PUFA in der Diät gering. Die semisynthetische Diät der Tiere in der vorliegenden Studie enthält entweder ein Gemisch bestehend aus 33% cis-9,trans-11 CLA und 34% trans-10,cis-12 CLA, Sonnenblumenöl (SBÖ) oder hochölsäurehaltiges Sonnenblumenöl (HÖ-SBÖ). SBÖ wird als ein Kontrollfett gewählt, da es gleiche Mengen an Linolsäure wie die im CLA-Öl

vorkommenden konjugierten Linolsäuren enthält. HÖ-SBÖ wird als weiteres Kontrollfett gewählt, um die Wirkungen von CLA mit einem Fett zu vergleichen, das reich an Ölsäure und arm an Linolsäure ist. Um den Einfluss der Diätfette auf den (n-3)-PUFA-Stoffwechsel zu charakterisieren, werden nach einer Anfangsphase, in der sich der Lipidmetabolismus der Ratten an die drei verschiedenen Diätfette adaptiert, die Diäten zusätzlich mit Leinöl (LÖ) supplementiert. LÖ wird als ein Diätfett gewählt, da es reich an α -Linolensäure ist.

2 Material und Methoden

2.1 Studie zur Wirkung der konjugierten Linolsäure-Isomere cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA auf den Lipidstoffwechsel und auf die Bildung von Eicosanoiden von Hep G2-Zellkulturen

2.1.1 Verwendete Reagenzien

Reagenzien:

Aceton
Acetyl-CoA
Agarose
Ammoniak, 32 %
Arachidonsäure, > 98 %
Brilliant™SYBR®Green QPCR Master Mix
Borsäure, z.A.
Ca²⁺-Ionophore A23187
Chloroform, > 99 %
CLA (cis-9,trans-11), > 96 %
CLA (trans-10,cis-12), > 98 %
Coomassie® Brilliant Blue G-250
Diethylpyrocarbonat
1,4-Dithiothreitol (DTT)
Ethidiumbromid
Ethyldiamin-tetraessigsäure (EDTA)
Eicosapentaensäure
Ethanol absolut, > 99,8 %, z.A.
Fötale Kälberserum
Gentamycin
Glucose-6-Phosphat
Glycerol, > 99 %
Hank's balanced salt solution (HBSS)
W/O Phenol Red
n-Hexan, > 97,5 %
Indometacin
Isopropanol, > 99,9 %
Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)
di-Kaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄)

Firma:

CarlRoth GmbH & Co., Karlsruhe
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
CarlRoth GmbH & Co., Karlsruhe
Cayman Chemical Company, USA
Stratagene, Niederlande
CarlRoth GmbH & Co., Karlsruhe
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Cayman Chemical Company, USA
Cayman Chemical Company, USA
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
CarlRoth GmbH & Co., Karlsruhe
Biochrom AG, Berlin
Gibco/Invitrogen Corp., Karlsruhe
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Gibco/Invitrogen Corp., Karlsruhe

CarlRoth GmbH & Co., Karlsruhe
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
CarlRoth GmbH & Co., Karlsruhe
VWR International GmbH, Dresden
VWR International GmbH, Dresden

6-keto Prostaglandin F _{1α} EIA Kit	Cayman Chemical Company, USA
Linolsäure, > 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
α-Linolensäure, > 98 %	Cayman Chemical Company, USA
MagnesiumchloridHexahydrat (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Magnesiumchloridlösung, 25mM	Promega Corporation, Mannheim
Maleinimid	VWR International GmbH, Dresden
Malonyl-CoA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Methanol, > 99,9 %	CarlRoth GmbH & Co., Karlsruhe
Methylenblaulösung, 0,1 % wässrig	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Natriumhydroxid	VWR International GmbH, Dresden
Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Pentadecansäure, > 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
o-Phosphorsäure, 85 %	CarlRoth GmbH & Co., Karlsruhe
Primer (GAPDH)	CarlRoth GmbH & Co., Karlsruhe
Primer (Δ9-, Δ6-, Δ5-Desaturase, COX-1, COX-2)	QIAGEN GmbH, Hilden
Prostaglandin E ₂ EIA Kit – Monoclonal	Cayman Chemical Company, USA
Prostaglandin F _{2α} EIA Kit	Cayman Chemical Company, USA
Rinderserumalbumin, > 96 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
ROTI-MIX PCR 3 (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; > 98 %; pH 7,0; 10 mM Lösung)	CarlRoth GmbH & Co., Karlsruhe
RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin	Gibco/Invitrogen Corp., Karlsruhe
sPLA ₂ Assay Kit	Cayman Chemical Company, USA
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
SYBR®Green	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Taq DNA Polymerase	Promega Corporation, Mannheim
thermophile DNA Polymerase 10x Puffer	Promega Corporation, Mannheim
Thromboxane B ₂ EIA Kit	Cayman Chemical Company, USA
Trimethylsulfoniumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
TRIS, >99,9 %	CarlRoth GmbH & Co., Karlsruhe
TRIZOL®Reagenz	Gibco/Invitrogen Corp., Karlsruhe
Trypanblaulösung, 0,4 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypsin-EDTA (1X) IN HBSS (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA)	Gibco/Invitrogen Corp., Karlsruhe

2.1.2 Hep G2-Zellkulturen

Die Zelllinie Hep G2 wurde 1975 von ADEN ET AL. (1979) aus der Leber eines an primärem Hepatoblastom erkrankten Patienten isoliert. Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde eine Stammkultur dieser Zelllinie über die American Type Culture Collection (WAK-Chemie Medical GmbH, Bad Soden, Deutschland) bezogen.

2.1.2.1 Kultivierung von Hep G2-Zellen

Zur Gewährleistung steriler Bedingungen diente als Arbeitsplatz eine LaminarFlowBox (Hera safe, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland).

Hep G2-Zellen wurden in 75cm²-Kulturflaschen (mit Filterkappe, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit 15ml Kulturmedium [RPMI 1640 Medium mit 0,3mg/ml L-Glutamin, supplementiert mit 10 % Fötale Kälberserum (FKS) und 0,5 % Gentamycin] versetzt, und im Brutschrank (Kendro Laboratory Products GmbH) bei 37°C und 90 % Luftfeuchtigkeit, 95 % Luft und 5 % CO₂ kultiviert. Für Wachstum und Vitalitätserhaltung der Zellen erfolgte die Erneuerung des Mediums im zeitlichen Abstand von 72h.

Bei Zelldichten von 80 – 90 % wurden die Zellen passagiert, indem nach Verwerfen des Kulturmediums mit 4ml steriler Trypsin-EDTA-Lösung [0,05 % Trypsin, 0,02 % Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)] 4min bei 37°C inkubiert wurde. Danach mußte das Trypsin mit 4ml Kulturmedium inaktiviert werden. Die Zellen wurden bei 100 x g 5min und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus, Kendro Laboratory Products GmbH) und das Trypsin-EDTA-Serum-Medium verworfen. Das Zellpellet wurde 2 x mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, pH 7,4) gewaschen und nach Zentrifugation (100 x g, 5min, RT) und Verwerfen des Überstandes in 5ml Kulturmedium aufgenommen. Die Subkultivierung erfolgte durch 1 x 10⁶ Zellen in eine mit Kulturmedium gefüllte 75cm² - Kulturflasche.

2.1.2.2 Bestimmung von Zellzahlen

Zellzahlen konnten mittels Häemocytometer (Neubauer-Zählkammer, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) bestimmt werden. Nach Trypsinierung und Aufnahme in Kulturmedium wurden 100µl der Zellsuspension mit 900µl physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %ig) verdünnt, und die Zählkammer mit 10µl dieser Zellsuspension luftblasenfrei gefüllt. Nach 1minütiger Sedimentationszeit konnte die Zellzahl mit Hilfe eines Inversen

Durchlichtmikroskops (Axiovert 25 mit Beleuchtung HAL 6V 25W, Carl Zeiss Mikroskopie, Jena, Deutschland) bei 100-facher Vergrößerung ermittelt werden.

Die Zellzahl wurde berechnet nach:

$$C_Z = X \times 10^4 \times V$$

mit

C_Z ... Zellkonzentration [$10^6/\text{ml}$]

X ... Zellzahl

V ... Verdünnungsfaktor

2.1.2.3 Bestimmung der Lebensfähigkeit von Zellen

Zum Nachweis der Lebensfähigkeit von Hep G2-Zellen wurden Vitalfärbungen mit Hilfe von Trypanblau durchgeführt (LINDL UND BAUER 1989).

100 μl Zellsuspension wurden mit 850 μl physiologischer Kochsalzlösung und 50 μl 0,4%ige Trypanblaulösung verdünnt und durchmischt. 10 μl wurden dieser Verdünnung entnommen und die Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer nach 1min Sedimentationszeit gezählt. Hierbei konnten lebende, nicht angefärbte Zellen, von toten, blau angefärbten, unterschieden werden.

Der Prozentsatz lebender Zellen ergibt sich aus:

$$V = \frac{u}{u + b} \times 100 \%$$

mit

V ... lebende Zellen [%]

u ... ungefärbte Zellen

b ... blauefärbte Zellen

2.1.2.4 Morphologische Untersuchungen von Hep G2-Zellen

Jeweils $0,15 \times 10^6$ Hep G2-Zellen wurden in Gewebekulturschalen (35/10mm, Greiner Bio-One GmbH) mit 1,5ml Kulturmedium, supplementiert mit jeweils 10 $\mu\text{mol/l}$ oder 100 $\mu\text{mol/l}$ cis-9,trans-11 CLA oder trans-10,cis-12 CLA, im Brutschrank (Kendro Laboratory Products GmbH) bei 37°C und 90 % Luftfeuchtigkeit, 95 % Luft und 5 % CO_2 24h inkubiert. Nach anschließender Entfernung des Mediums konnten die Zellen mit 1ml 0,1%iger Methylenblaulösung 3min angefärbt und danach mit HBSS gespült werden. Um die Zellen vor dem Austrocknen zu bewahren, wurden 0,5ml Kulturmedium hinzugegeben.

Derart gefärbte Zellen waren für morphologische Untersuchungen bei 200-facher Vergrößerung mittels Phasenkontrastmikroskop (Nikon Phot 2, Nikon Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland) geeignet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware LUCIA 32-G.

2.1.2.5 Gewinnung von Zellmikrosomen und Zellcytosol

Mikrosomen und Cytosol von Hep G2-Zellen konnten durch fraktionierte Pelletierung in Anlehnung an die Methoden von LIU ET AL. (2001) und HEVKO AND MURPHY (2002) gewonnen werden.

Nach Ablösen der am Boden der Kulturflasche anheftenden Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen durch 3ml PBS (pH 7,4) gewaschen. Nach anschließender Zentrifugation (Megafuge 1.0R, Heraeus) bei 100 x g 5min und RT wurde das Zellpellet in 0,4ml Homogenisierungspuffer (0,25mol/l Sucrose, 0,1mol/l K₂HPO₄, 0,1mol/l KH₂PO₄, pH 7,4) auf Eis resuspendiert und im Homogenisator (Potter-S-2ml, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland) mit 25 Hüben homogenisiert. Zellkerne und -bruchstücke konnten durch Zentrifugation (Biofuge fresco, Kendro Laboratory Products GmbH) bei 1300 x g 5min und 4°C entfernt werden. Um maximale Ausbeute an Mikrosomen und Cytosol zu gewinnen, wurde das Zellpellet nochmals unter gleichen Bedingungen homogenisiert und zentrifugiert. Zur Gewinnung des Zellcytosols und der mikrosomalen Fraktion wurde der Überstand bei 100.000 x g 60min bei 4°C zentrifugiert (Mikroultrazentrifuge RCM 150 GX, SORVALL GmbH, Bad Homburg, Deutschland). Nach diesem Zentrifugationsschritt findet sich das Cytosol im Überstand und die mikrosomale Fraktion im Pellet. Letzterer musste in 0,3ml Homogenisierungspuffer resuspendiert werden, bevor es bis zur Analyse bei -20°C gelagert werden konnte.

2.1.2.6 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD (1976) beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung und dem damit verbundenen Absorptionsmaximum bei 595nm. Messgrundlage ist das Lambert-Beersche Gesetz, das den Zusammenhang zwischen Lichtabsorption und Stoffkonzentration herstellt.

Lambert-Beersches Gesetz:

$$A_{595} = \epsilon_{595} \times c \times d$$

mit

A₅₉₅ ... Absorption bei 595nm Wellenlänge

ϵ ... molarer Absorptionskoeffizient [$M^{-1}cm^{-1}$] bei 595nm

c ... Stoffkonzentration [M]

d ... durchstrahlte Schichtdicke [cm]

Das benötigte Farbreagenz wurde durch Lösen von 100mg Coomassie® Brilliant Blue G-250 in 100ml 85%iger Phosphorsäure und 50ml 95%igem Ethanol und anschließendem Auffüllen mit dest. Wasser auf 1l hergestellt.

Aus Rinderserumalbumin wurden wässrige Lösungen steigender Konzentration hergestellt (10mg/l – 20mg/l – 40mg/l – 60mg/l – 80mg/l – 100mg/l) und zur Erstellung einer Eichkurve verwendet.

In Anlehnung an die Methode nach PAKULA ET AL. (1997) wurden Hep G2-Zellpellets (8×10^6 Zellen) mit 2ml 0,2mol/l NaOH-Lösung über Nacht bei RT lysiert und zur Bestimmung der Proteinkonzentration eingesetzt.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 800 μ l Reagenzlösung zu einer Mischung aus 20 μ l Proteinlösung und 180 μ l dest. Wasser gestartet. Nach 10minütiger Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 595nm spektralphotometrisch (Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) erfasst. Die Proteinkonzentrationen von Hep G2-Zellen wurden anhand der Eichkurve ermittelt.

2.1.3 Untersuchungen zum Einfluss von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA auf den Lipidstoffwechsel von Hep G2-Zellkulturen

2.1.3.1 Inkubation von Hep G2-Zellen mit cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA

Sowohl die CLA-Isomere cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA als auch Linol-, α -Linolen-, Arachidon- und Eicosapentaensäure wurden jeweils in Stammlösungen aus abs. Ethanol (c = 0,1mol/l) aufbewahrt. Nach Verdampfen des Ethanols unter Stickstoff und anschließendem Zusatz äquimolarer Menge an Natronlauge (0,01N NaOH) wurden die Fettsäuren in eine mediumlösliche Form gebracht.

Die Endkonzentration der zugegebenen Fettsäuren betrug entweder 10 μ mol/l, 25 μ mol/l oder 100 μ mol/l. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Zusatz an CLA-Isomere. Für den Versuchsansatz zur Bestimmung von Δ 6-, Δ 5- und Δ 4-Desaturierungen langkettiger ungesättigter Fettsäuren wurden als Kontrolle entweder Linol- oder α -Linolensäure bzw. Arachidon- oder Eicosapentaensäure dem Kulturmedium zugesetzt.

Nach Ablösen der am Boden der Kulturflasche anheftenden Hep G2-Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung und Waschen mit Kulturmedium wurden Zellzahl (2.1.2.2) und Zelllebensfähigkeit (2.1.2.3) bestimmt.

Bei 0,5h Inkubation wurden 16×10^6 Zellen in Kulturmedium je Ansatz in Probengefäße überführt und nach Zusatz der CLA-Isomere 0,5h bei 37°C im Schüttelwasserbad (SW 22, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland) inkubiert.

Bei 24h Inkubation wurden 16×10^6 Zellen in Kulturmedium je Ansatz in 75cm²-Kulturflaschen überführt und nach Zusatz der CLA-Isomere im Brutschrank (Kendro Laboratory Products GmbH) bei 37°C und 90 % Luftfeuchtigkeit, 95 % Luft und 5 % CO₂ 24h inkubiert. Für den Versuchsansatz zur Bestimmung von $\Delta 6$ -, $\Delta 5$ - Desaturierung langkettiger ungesättigter Fettsäuren wurde dem Kulturmedium zusätzlich zu den CLA-Isomeren Linol- oder α -Linolensäure und zur Bestimmung von $\Delta 4$ -Desaturierung Arachidon- oder Eicosapentaensäure zugesetzt.

Nach der Inkubation wurde das Medium verworfen und adhärenente Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung von dem Boden der Kulturflaschen abgelöst. Anschließend wurden die Zellen 2 x mit 8ml PBS (pH 7,4) gewaschen, bei 100 x g 5min bei RT zentrifugiert, in 8ml PBS (pH 7,4) aufgenommen und Zellzahl (2.1.2.2) sowie -lebensfähigkeit (2.1.2.3) bestimmt.

Für die nachfolgende Lipidextraktion wurden 16×10^6 Zellen je Ansatz in Probengefäße überführt. Für die Bestimmung der Boten-Ribonucleinsäure(mRNA)-Konzentration von $\Delta 9$ -, $\Delta 6$ - und $\Delta 5$ -Desaturasen wurden Zellpellets in sterile RNase-freie Probengefäße bis zur RNA-Isolierung bei -80°C aufbewahrt.

2.1.3.2 Analytische Methoden

2.1.3.2.1 Extraktion von Gesamtlipiden

Nach Behandlung von Hep G2-Zellen mit und ohne CLA-Isomere (Punkt 2.1.3.1) wurden Gesamtlipide nach der von HARA AND RADIN (1978) beschriebenen Methode, modifiziert nach EDER AND KIRCHGESSNER (1994), extrahiert.

Den Zellpellets wurden 1,5ml (auf 8×10^6 Zellen) und 3ml (auf 16×10^6 Zellen) n-Hexan: Isopropanol (3:2 v/v) sowie 0,2ml Pentadecansäure (C15:0) als interne Standardfettsäure zugesetzt. Unter Lichtschutz konnten zelluläre Lipide im Schüttelinkubator (G 25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific CO. INC Edison, New Jersey, USA) 18h bei RT extrahiert werden. Die Extrakte konnten durch Zentrifugation (Megafuge 1.0R, Heraeus) bei 500 x g

10min und 4°C von den Zellresten abgetrennt und bis zur weiteren Analyse aufbewahrt werden (bei -20°C).

2.1.3.2.2 Trennung von Lipidfraktionen

Die Lipidfraktionen Neutrallipide (NL), Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) wurden aus Gesamtlipidextrakten mittels Festphasenextraktion nach der modifizierten Methode von SUZUKI ET AL. (1997) separiert.

Das Lösungsmittel der unter 2.1.3.2.1 gewonnenen Gesamtlipidextrakte wurde unter Stickstoff verdampft.

Die unpolare Lipidfraktion wurde mit 0,2ml Aceton extrahiert und nach anschließendem Verdampfen des Acetons unter Stickstoff in 0,2ml n-Hexan:Isopropanol (8:2 v/v) gelöst, auf eine Festphasensäule (Supelclean™ 3ml LC-Si Säule, Supelco, Bellefonte, PA, USA) aufgetragen und NL mit 4 x 2ml n-Hexan:Isopropanol (8:2 v/v) eluiert.

Die polare Lipidfraktion konnte mit 0,2ml Chloroform:Methanol (2:1 v/v) extrahiert und auf die Festphasensäule aufgetragen werden. PE wurde mit 4 x 2ml Chloroform:Methanol (2:1 v/v) und PC mit 4 x 2ml Methanol eluiert.

Die Lipidfraktionen in den Eluaten wurden wie folgt mittels vertikaler Dünnschichtchromatographie identifiziert und auf Reinheit überprüft. Die Dünnschichtplatte (Kieselgel 60, 5x5cm, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) wurde nach Auftragen der Proben mit Chloroform:Methanol:Ammoniak (26:10:1,6 v/v/v) als Laufmittel entwickelt. NL, PC und PE konnten durch Jod-Färbung sichtbar gemacht werden.

2.1.3.2.3 Fettsäureanalytik

Fettsäuren in den extrahierten Gesamtlipiden und den aus der Festphasenextraktion eluierten Lipidfraktionen (NL, PC, PE) wurden nach der Methode von BUTTE (1983) mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) verestert. Anschließend konnten die Fettsäuremethylester (FAME) im Gaschromatographen (GC, HP 5890, Hewlett Packard GmbH, Waldbronn, Deutschland) mit automatischem Injektionssystem durch polare FFAP-Fused-Silica-Trennsäule (30m x 0,53mm ID x 1,0µm, Macherey und Nagel, Düren, Deutschland) im Heliumstrom (Flussrate: 7,1 ml/min) separiert werden. Die Detektion erfolgte mittels Flammenionisationsdetektor (FID).

Mit Hilfe der HP 3365 Datastation (Hewlett Packard GmbH) wurden die FAME durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen identischer Fettsäurestandards identifiziert und durch Pentadecansäuremethylester (C15:0) als intern zugesetzter Standard quantifiziert.

2.1.3.2.4 Bestimmung der mRNA-Konzentration von $\Delta 9$ -, $\Delta 6$ - und $\Delta 5$ -Desaturasen

2.1.3.2.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Der starke RNase-Inhibitor Diethylpyrocarbonat (DEPC) wurde für RNase-freie Arbeitsbedingungen eingesetzt (FEDORCSAK AND EHRENBERG 1966).

Zur Herstellung DEPC-behandelten Wassers wurde 1l bidest. Wasser mit 1ml DEPC versetzt, gemischt und 18h bei 37°C im Schüttelwasserbad (SW 22, Julabo Labortechnik GmbH) inkubiert und anschließend autoklaviert.

Zur Eliminierung von RNasen wurden sämtliche Probengefäße, die für die Isolierung von Gesamt-RNA benötigt wurden, vor Benutzung mit DEPC-behandeltem Wasser (1ml/l) 18h bei 37°C im Schüttelwasserbad (SW 22, Julabo Labortechnik GmbH) aufbewahrt, anschließend autoklaviert, das DEPC-Wasser unter sterilen Bedingungen (LaminarFlow, Hera safe, Kendro Laboratory Products GmbH) entfernt und die Probengefäße bei 100°C getrocknet.

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Hep G2-Zellen erfolgte in Anlehnung an CHIRGWIN ET AL. (1979) mit TRIzol®Reagenz (Phenol-Guanidin-Isothiocyanat-Lösung) nach vorgegebener Arbeitsvorschrift.

Mit und ohne CLA-Isomeren behandelte Hep G2-Zellen (2.1.3.1) wurden mit TRIzol®Reagenz versetzt. Nach Zusatz von Chloroform und anschließender Zentrifugation befindet sich die Gesamt-RNA in der wässrigen Phase und konnte aus der wässrigen Phase mit Isopropanol gefällt werden. Nach Zentrifugation wurde das RNA-Pellet mit 75 %igem Ethanol gewaschen und in 100µl DEPC-behandeltem bidest. Wasser gelöst.

RNA-Konzentrationen wurden photometrisch (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) in Quarzküvetten bei 260nm Wellenlänge bestimmt. Per Definition entspricht die optische Dichte (OD) von 1,0 bei 260nm 40µg/ml RNA.

Die Reinheit der RNA wurde anhand des Verhältnisses OD_{260} / OD_{280} überprüft. Die Reinheit der Präparationen lag zwischen 1,6 und 2,0 (ein Quotient $\leq 1,6$ weist auf einen höheren Proteinanteil hin, der Wert von über 2,0 auf hohen Anteil an RNA).

Die RNA-Proben wurden bei -80°C aufbewahrt.

Die Gesamt-RNA-Konzentration wurde berechnet nach:

$$C_{\text{RNA}} = A_{260} \times 40 \times V$$

mit

C_{RNA} ... Konzentration an Gesamt-RNA [$\mu\text{g/ml}$]

A_{260} ... Absorption bei 260nm Wellenlänge

40 ... Multiplikationsfaktor für RNA

V ... Verdünnungsfaktor

2.1.3.2.4.2 cDNA-Synthese

Die Synthese von copy-Desoxyribonucleinsäure (cDNA) erfolgte mittels Omniscript™ Reverse Transcriptase Kit von QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland) nach vorgegebener Arbeitsvorschrift.

Aliquote der RNA-Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem bidest. Wasser auf die Konzentration $c = 2\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ verdünnt. Zu $2\mu\text{l}$ RNA-Lösung wurden $\text{pd}(\text{T})_{12-18}$ ($5' \text{-PO}_4$, Na^+ Salt, Amersham Pharmacia, Inc, USA), im Kit enthaltener Reverse Transcriptase-Puffer, Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP)-Mix (5mmol/l), Omniscript™ Reverse Transcriptase (4U/ μl ; EC 2.7.7.49) und RNase-freies Wasser pipettiert. Die Gesamt-RNA wurde in einzelsträngige cDNA bei 37°C und 59min im Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) umgeschrieben. Anschließend konnte die Reverse Transcriptase-Aktivität bei 93°C nach 5min gestoppt werden. cDNA-Lösungen wurden bis zum Einsatz in die real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bei -20°C aufbewahrt.

2.1.3.2.4.3 real-time PCR

Die durchgeführten PCR-Reaktionen erfolgten nach Standardprotokoll:

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration in 15 μl Reaktionsansatz</u>
bidest. Wasser (DEPC-behandelt)	6,087 μl	
Thermophile DNA Polymerase 10xPuffer (10mmol/l Tris-HCl, 50mmol/l KCl, 0,1 % Triton®X-100)	1,5 μl	1x
MgCl ₂ (25mmol/l)	2,1 μl	3,5mmol/l
ROTI-MIX PCR3 (10mmol/l) (dATP, dUTP, dGTP, dCTP)	0,75 μl	0,125mmol/l
Taq-Polymerase (5U/ μl)	0,188 μl	0,05U/ μl

SYBR®Green (1:1000)	0,375µl	1x	
forward(fwd)-Primer	1µl		Δ9-Desaturase 0,17 µmol/l, Δ6-Desaturase 0,33 µmol/l, Δ5-Desaturase 0,33 µmol/l, GAPDH 0,20 µmol/l
reverse(rev)-Primer	1µl		Δ9-Desaturase 0,17 µmol/l, Δ6-Desaturase 0,33 µmol/l, Δ5-Desaturase 0,33 µmol/l, GAPDH 0,20 µmol/l
cDNA (Template)	2µl	0,2µg	

Die Reagenzien wurden in 0,1ml-Reaktionsgefäßen vermischt, die Zugabe der cDNA erfolgte zuletzt. Die anschließende Amplifizierung der spezifischen DNA-Fragmente im Rotorgene 2000 (Corbett Research, Mortlake, Australia) erfolgte nach:

Initial-Denaturierung	95°C	2min	
Δ9- und Δ5-Desaturasen			
Denaturierung	95°C	20s	} 30 Zyklen
Annealing	58°C	30s	
Elongation	72°C	40s	
Δ6-Desaturase			
Denaturierung	95°C	20s	} 35 Zyklen
Annealing	63°C	30s	
Elongation	72°C	40s	

In jedem PCR-Lauf wurde Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase (GAPDH, EC 1.2.1.12) als „house keeping gene“ unter gleichen Bedingungen mitgeführt.

Die Sequenzen der in der real-time PCR eingesetzten Primer der Δ6-Desaturase basierten auf der Publikation von WAHL ET AL. (2002). Die Primer der Δ9- Desaturase (NCBI: NM 005063), Δ5-Desaturase (NCBI: AF226273) und GAPDH wurden aus der mRNA-Sequenz mit Hilfe der Software PRIMER SELECT 4,0 (DNASTAR Inc., USA) ermittelt. Die Primer-Sequenzen sind nachfolgend aufgelistet:

Δ9-Desaturase (fwd) 5'TTC CTG GCT CTA CCC TGT CTG TCC3'
(rev) 5'GGG CAC CCT CAC CAA GTA3'

$\Delta 6$ -Desaturase	(fwd) 5' CCT ACA ATC ACC AGC ACG AA 3' (rev) 5' CCA TGC TTG GCA CAT AGA GA 3'
$\Delta 5$ -Desaturase	(fwd) 5' ACG TCC GCT TCT TCC TCA CTT ATG 3' (rev) 5' GGG GCT TGG ACT GGT ACT CTA TGC 3'
GAPDH	(fwd) 5' CGC CAG CCG AGC CAC ATC 3' (rev) 5' GCC AGC ATC GCC CCA CTT GA 3'

In Negativ-Kontrollreaktionen wurde anstelle der cDNA-Templates 2 μ l DEPC-behandeltes bidest. Wasser eingesetzt. Für den Einsatz definierter Standards in die PCR wurden die amplifizierten DNA-Fragmente ($\Delta 9$ -Desaturase 480 Basenpaare (bp), $\Delta 6$ -Desaturase 460bp, $\Delta 5$ -Desaturase 348bp, GAPDH 304bp) auf 4°C gekühlt und durch horizontale Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt (2.1.3.2.4.4). Anschließend konnten die DNA-Fragmente isoliert und quantifiziert werden (2.1.3.2.4.5).

Die Ergebnisauswertung und Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte mittels Rotorgene-Software Version 4.4.1.O.

2.1.3.2.4.4 Agarosegel-Elektrophorese

Der Nachweis von im elektrischen Feld nach Größe aufgetrennter DNA erfolgte durch Ethidiumbromid. Die Dokumentation erfolgte durch Photographien des Gels auf einem UV-Leuchttisch, wobei Nukleinsäuremoleküle mit kovalent gebundenem Ethidiumbromid im UV-Licht (254nm – 300nm) durch rot-orange Fluoreszenz sichtbar werden.

Zur Herstellung der Gele (2%ig) wurden 0,6g Agarose in 30ml 0,5 x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE, pH 7,4; 45mmol/l TRIS, 45mmol/l Borsäure, 1mmol/l EDTA) durch Erhitzen gelöst und die auf 70°C abgekühlte Lösung in einen Gelschlitten gegossen. In die noch heiße Agarosegellösung wurde der Kamm getaucht, der die Auftrageaschen ausspart. Nach vollständigem Erhärten des Gels (20min) wurden die Kämmen entfernt und das Gel in 0,5 x TBE-Puffer mindestens 30min äquilibriert.

Die in der real-time PCR amplifizierten DNA-Fragmente (Reaktionsansatz: 15 μ l) wurden mit 3 μ l 6 x Gelladepuffer gemischt und 10 μ l aus dieser Lösung in die Taschen pipettiert. Die Elektrophoresekammer wurde bei 100V ca. 1h an ein Stromversorgungsgerät angeschlossen. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-0,5 x TBE-Puffer-

Bad ($c = 0,5\mu\text{g/ml}$) 10min gefärbt, 2min in 0,5x TBE-Puffer entfärbt und unter UV-Licht mittels Fotoeinrichtung (SynGene Gene Genius, Synoptics Inc., USA) visualisiert.

Die Größe der DNA-Fragmente wurde anhand peqGOLD Leiter-Mix (mit 100 bis 10.000 bp; Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) identifiziert.

2.1.3.2.4.5 Isolierung und Quantifizierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Banden wurden unter UV-Licht ausgeschnitten und mittels MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH) nach vorgegebener Arbeitsvorschrift aus der Agarose isoliert. DNA-Konzentrationen der gewonnenen Eluate wurden mittels PicoGreen®dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes, Niederlande) nach vorgegebener Arbeitsvorschrift über Fluoreszenzmessung bei der Extinktion von 480nm Wellenlänge und bei der Emission von 520nm Wellenlänge (SpectraFluor Plus, TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) bestimmt.

Eluate wurden mit DEPC-behandeltem bidest. Wasser in 10er Schritten verdünnt und als definierter Standard in der real-time PCR eingesetzt.

2.1.3.2.5 Bestimmung von Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen

Die Bestimmung von Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in Hep G2-Zellen, im Zellmedium sowie im HBSS erfolgte mittels Test Kits (Ecoline®25, VWR International GmbH) nach vorgegebener Arbeitsvorschrift.

Hep G2-Zellen wurden mit $100\mu\text{mol/l}$ cis-9,trans-11 CLA oder $100\mu\text{mol/l}$ trans-10,cis-12 CLA oder ohne Zusatz an CLA-Isomere unter 2.1.3.1 genannten Bedingungen 24h inkubiert. Anschließend wurden je Ansatz 2×10^6 Hep G2-Zellen in HBSS 1h bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen ergaben sich aus:

$$C_P = A_P \times \frac{C_{St.}}{A_{St.}}$$

mit

C_P ... Konzentration Probe [mmol/l]

$C_{St.}$... Konzentration Standard [mmol/l]

A_P ... Absorption Probe

$A_{St.}$... Absorption Standard

2.1.3.2.6 Bestimmung der Aktivität lipogener Enzyme

Nach 24stündiger Inkubation von Hep G2-Zellen mit jeweils 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA oder ohne Zusatz an CLA-Isomeren (2.1.3.1) wurden die Aktivitäten von G6PDH und FsS im Cytosol (Cytosolgewinnung unter 2.1.2.5) von Hep G2-Zellen bestimmt.

2.1.3.2.6.1 Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Die Aktivität der G6PDH wurde nach der Methode von DEUTSCH (1985) bestimmt.

Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass G6PDH dem Testsystem zugesetztes Glucose-6-Phosphat und oxidiertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP⁺) zu 6-Phosphogluconolacton und NADPH/H⁺ umsetzt. Die gebildete Menge an NADPH/H⁺ ist der Aktivität der G6PDH proportional. Durch den Zusatz von Maleinimid zur Testlösung wurde die Bildung von NADPH/H⁺ durch 6-Phosphogluconatdehydrogenase gehemmt.

Alle Testmedien und Cytosolproben wurden auf 25°C temperiert. Im Ansatz wurden 50µl Probe mit 1ml Testmedium (50mmol/l TRIS (pH 7,5), 0,4mmol/l NADP⁺, 6,3mmol/l MgCl₂·6H₂O, 3,3mmol/l Glucose-6-Phosphat, 5mmol/l Maleinimid) versetzt. Anschließend konnte die Absorptionsänderung bei 339nm spektralphotometrisch (Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Biotech) über einen Zeitraum von 2min gemessen werden. Ein Leerwert mit 50µl bidest. Wasser wurde bestimmt, um die von der G6PDH unabhängige Bildung an NADPH/H⁺ zu korrigieren.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Cytosolproben erfolgte wie unter 2.1.2.6 beschrieben.

Die Aktivität der G6PDH ergibt sich aus:

$$\text{Aktivität} = \frac{V}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A \times p^{-1}$$

$$= \text{nmol NADPH/H}^+ \times \text{mg}^{-1} \text{ Protein} \times \text{min}^{-1} \text{ (bei 25}^\circ\text{C)}$$

mit

V ... Testvolumen [ml]

ε ... Extinktionskoeffizient für NADPH/H⁺ (6,22 x 10⁻³ ml x nmol⁻¹ x cm⁻¹)

d ... Schichtdicke [cm]

v ... Probenvolumen [ml]

ΔA ... Absorptionsänderung pro min

p ... Proteinkonzentration der Cytosolprobe [mg/ml]

2.1.3.2.6.2 Fettsäure-Synthetase

Die Aktivität der FsS wurde nach der Methode von NEPOKROEFF ET AL. (1975) bestimmt.

Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass durch die Aktivität der FsS Malonyl-CoA und Acetyl-CoA unter Oxidation von NADPH/H⁺ in n-Carbonsäuren überführt werden. Die Menge des bei der Reaktion entstehenden Oxidationsproduktes NADP⁺ ist der Aktivität der FsS proportional.

Alle Testmedien und Cytosolproben wurden auf 25°C temperiert. Die Cytosolproben wurden 1:2 mit Präinkubationsmedium [pH 7,0; 0,5mol/l K₂HPO₄/KH₂PO₄, 5mmol/l Dithiotreitol (DTT)] verdünnt und 30min bei 37°C inkubiert.

Im Ansatz wurden 700µl Testmedium 1 (pH 7,0; 700mmol/l K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0,14mmol/l NADPH/H⁺, 1,4mmol/l EDTA, 1,4mmol/l DTT), 100µl Testmedium 2 (0,33 mmol/l Acetyl-CoA) und 100µl Testmedium 3 (1mmol/l Malonyl-CoA) in einer Küvette gemischt. Nach Zugabe von 100µl Probe wurde anschließend die Absorptionsänderung bei 340nm und 25°C spektralphotometrisch (Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Biotech) über einen Zeitraum von 2min gemessen.

Der Leerwert mit 100µl bidest. Wasser wurde ohne Zusatz von Malonyl-CoA bestimmt, um die unspezifische Oxidation von NADPH/H⁺ zu ermitteln und wurde anschließend vom Probenwert subtrahiert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Cytosolproben erfolgte wie unter 2.1.2.6 beschrieben.

Die Berechnung der Aktivität der FsS erfolgte nach der Gleichung der Berechnung der G6PDH wie unter 2.1.3.2.6.1 beschrieben.

2.1.4 Untersuchungen zum Einfluss von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA auf die Bildung von Eicosanoiden von Hep G2-Zellkulturen

2.1.4.1 Stimulierung von Hep G2-Zellen zur Eicosanoidbildung

Die Stimulierung von Zellen zur Eicosanoidbildung erfolgte in Anlehnung an die Versuche von BECKER ET AL. (1995).

CLA-Isomere sowie Arachidonsäure wurden jeweils in Stammlösungen aus abs. Ethanol der Konzentration 0,1mol/l aufbewahrt. Nach Verdampfen des Ethanols und anschließendem

Zusatz äquimolarer Menge an Natronlauge (0,01N NaOH) wurden die Fettsäuren in eine mediumlösliche Form gebracht.

Ca²⁺- Ionophore A23187 wurde in Stammlösung aus 0,42 %igen Ethanol der Konzentration 2,4mmol/l aufbewahrt. Für die Versuche wurden 0,084ml Stammlösung auf 1ml mit HBSS aufgefüllt. Indometacin wurde in äquimolarer Menge 0,1N NaOH gelöst und mit bidest. Wasser auf 10ml aufgefüllt (c = 4,5mmol/l).

Durch Zusatz von Arachidonsäure und Ca²⁺- Ionophore A23187 sollte der Arachidonsäurestoffwechsel in den Hep G2-Zellen stimuliert werden. Durch Ca²⁺- Ionophore A23187 wurden dem Kulturmedium freie Ca²⁺- Ionen zugesetzt und somit die extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erhöht, was zur Aktivierung von PLA₂ führt (MICHAL 1999).

Der Versuch bestand aus zwei unterschiedlichen Ansätzen.

Im ersten Versuchsansatz wurden 16 x 10⁶ Hep G2-Zellen mit Kulturmedium, supplementiert mit jeweils 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA oder nur mit Kulturmedium (Kontrolle) unter angemessenen Bedingungen 24h inkubiert (2.1.3.1). Nach Zellzählung (2.1.2.2) und Bestimmung der Zellebensfähigkeit (2.1.2.3) wurden 2 x 10⁶ lebende Zellen in HBSS, supplementiert mit 25µmol/l Arachidonsäure und/oder 10µmol/l Ca²⁺-Ionophore A23187, für 0,5h bei 37°C im Schüttelwasserbad (SW 22, Julabo Labortechnik GmbH) inkubiert.

In zweiten Versuchsansatz wurden 2 x 10⁶ lebende Hep G2-Zellen in HBSS, supplementiert mit jeweils 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA und 25µmol/l Arachidonsäure und/oder 10µmol/l Ca²⁺-Ionophore A23187, für 0,5h bei 37°C im Schüttelwasserbad (SW 22, Julabo Labortechnik GmbH) inkubiert.

Anschließend wurde die Stimulierung der Zellen durch Zusatz von eiskalter 4,5mmol/l Indometacin-Lösung (Cyclooxygenase-Inhibitor; HLA AND NEILSON 1992, FUNK ET AL. 1991) beendet. Es folgte die Zentrifugation (Megafuge 1.0R, Heraeus) der Proben bei 1800 x g 10min und 4°C und die Überführung der Überstände in eisgekühlte Probengefäße, die bei -80°C bis zur Eicosanoidbestimmung aufbewahrt wurden.

2.1.4.2 Inkubation von Hep G2-Zellen zur Bestimmung der sPLA₂-Aktivität und der mRNA-Konzentration von Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2

Die Durchführung der 24h Inkubationsversuche von Hep G2-Zellen mit den CLA-Isomeren war analog der unter 2.1.3.1 beschriebenen Arbeitsschritte.

Zur Bestimmung der Aktivität der sekretorischen(s) PLA₂ wurden anschließend 8 x 10⁶ lebende Hep G2-Zellen in 1ml HBSS bei 37°C 0,5h im Schüttelwasserbad inkubiert, bei 1800

x g 10min und 4°C zentrifugiert und die Überstände in eisgekühlte Probengefäße überführt. Diese wurden bis zur Bestimmung der sPLA₂-Aktivität bei –80°C aufbewahrt.

2.1.4.3 Analytische Methoden

2.1.4.3.1 Bestimmung von Eicosanoidkonzentrationen

Im Zellüberstand (HBSS) der mit und ohne CLA-Isomeren behandelten Hep G2-Zellen (2.1.4.1) wurden folgende Eicosanoide mittels Enzymimmunoassay (EIA)-Kits von Cayman Chemical Company nach der vorgegebenen Arbeitsvorschrift bestimmt: 6-keto-Prostaglandin F_{1α} (6-keto-PGF_{1α}), Thromboxan B₂ (TXB₂), Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}), Prostaglandin E₂ (PGE₂). 6-keto-PGF_{1α} wurde als stabile Verbindung des Prostacyclins (PGI₂) und TXB₂ als stabile Verbindung des Thromboxan A₂ (TXA₂) gemessen.

Die Nachweisgrenzen der EIA-Kits lagen für 6-keto-PGF_{1α} und PGF_{2α} bei 3,9pg/ml und für TXB₂ und PGE₂ bei 7,8pg/ml. Die Kreuzreaktion von TXB₂, PGF_{2α} und PGE₂ mit den Eicosanoiden TXB₃, PGF_{3α} und PGE₃ wird von Cayman Chemical Company mit 30 %, 100% und 43 % angegeben.

Die Kavitäten der Mikrotiterstreifen sind mit Maus-Anti-Kaninchen-Immunglobulin(IgG) (PGE₂-EIA-Kit: Ziegen-Anti-Maus-IgG) gegen das entsprechende Eicosanoid beschichtet. In den Kavitäten wurden Standardlösung (3,9 – 500pg/ml bzw. 7,8 – 1000pg/ml) bzw. Probelösung, mit Acetylcholinesterase markiertes Eicosanoid (Tracer) und Kaninchen-Antiserum (PGE₂-EIA-Kit: PGE₂ monoklonale Antikörper) pipettiert. Als Richtwert für maximale Bindung (B₀) des Tracers wurden Tracer und Antiserum in die Kavitäten der beschichteten Platte pipettiert, und für geringste Bindung (NSB) des Tracers ausschließlich Tracer. Zur Bestimmung des Leerwertes und der maximalen Aktivität des Tracers wurden unbehandelte Kavitäten mitgeführt. Anschließend wurden die Proben 18h bei RT (für 6-keto-PGF_{1α} und PGE₂ bei 4°C) inkubiert.

Freies und enzymmarkiertes Eicosanoid konkurrieren um die begrenzte Zahl an Eicosanoid-spezifischen Bindungsstellen für Kaninchen-Antiserum (PGE₂-EIA-Kit: PGE₂ monoklonale Antikörper). Der Kaninchen-Antiserum-Eicosanoidkomplex wurde (PGE₂-EIA-Kit: Antikörper-PGE₂-Komplex) an die Kaninchen-IgG-Maus monoklonalen Antikörper (für PGE₂-Bestimmung: Ziegen-Anti-Maus polyklonalen Antikörper) gebunden. Nach 18h wurden ungebundene Reagenzien durch fünfmaliges Waschen mit im Kit enthaltenem Waschpuffer entfernt. Nach Zugabe von Ellman's Reagenz (enthält Acetylthiocholin als Substrat für die Acetylcholinesterase) und 5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB)

wurde nach 90min (für 6-keto-PGF_{1α} nach 120min) unter Lichtschutz und ständiger Bewegung der Kavitäten 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure als gelb gefärbtes Produkt der enzymatischen Reaktion gebildet. Zur Bestimmung der maximalen Aktivität des Tracers wurde zusätzlich zu Ellman's Reagenz Tracer pipettiert. Absorptionen konnten bei 405nm Wellenlänge spektralphotometrisch (SpectraFluor Plus, TECAN Deutschland GmbH) gemessen werden. Die Farbintensität des Produktes ist proportional zur Menge an gebundenem enzymmarkierten Eicosanoid und indirekt proportional zur Menge an freiem Eicosanoid.

In der Ergebniskalkulation (easyWIN kinetics Software-Version 6,0a) wurde nach Subtraktion des Leerwertes für Standard und Proben das prozentuale Verhältnis zwischen gebundenem Eicosanoidstandard bzw. Eicosanoidprobe und maximale Bindung des enzymmarkierten Eicosanoid (% B/B₀) berechnet. Die Eicosanoidkonzentrationen [pg/ml] wurden anhand der Standardkurve ermittelt:

$$\frac{B}{B_0} [\%] = \frac{X-NSB}{B_0-NSB} \times 100 \%$$

mit

NSB ... Wert der nichtspezifischen Bindung (Leerwert)

B₀ ... Wert der maximalen Bindung

B ... Wert der Bindung

X ... Standard- bzw. Probenmesswert

2.1.4.3.2 Bestimmung der sPLA₂-Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität der sPLA₂ im Zellüberstand (HBSS) und der mikrosomalen Fraktion von mit und ohne CLA-Isomere inkubierten Hep G2-Zellen (2.1.4.2) erfolgte mittels sPLA₂-Assay-Kits von Cayman Chemical Company. Die vorgegebene Arbeitsvorschrift wurde in bezug auf erhöhtes Probenvolumen und verringertes Substratvolumen modifiziert.

In die Kavitäten der Mikrotiterplatte wurden Proben, Substrat (1,2-Dithio-diheptanoyl phosphatidylcholin) und DTNB pipettiert. Als Positivkontrolle diente die im Kit enthaltene Bienengift-Phospholipase. Für Leerwertbestimmungen wurde Probenpuffer eingesetzt. Nach Zugabe des Substrates konnte die Bildung von 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure im zeitlichen Intervall von 10min für 1h bei RT in Anlehnung an die Methode von PETROVIC ET AL. (2001) bei 405nm Wellenlänge im Spectralphotometer (SpectraFluor Plus, TECAN Deutschland

GmbH) gemessen werden. Vor jeder Messung wurde die Mikrotiterplatte 8s mit einer mittleren Intensität orbital geschüttelt.

Die sPLA₂-Aktivität ergibt sich aus:

1. Berechnung Absorptionsänderung (ΔA_{405}) pro min:

$$\Delta A_{405}/\text{min} = \frac{A_{405}(\text{Zeit 2}) - A_{405}(\text{Zeit 1})}{\text{Zeit 2 [min]} - \text{Zeit 1 [min]}}$$

2. Berechnung korrigierter Absorptionsänderung von der Probe [$\Delta A_{405}/\text{min (P)}$] pro min:

$$\Delta A_{405}/\text{min (P)} = \Delta A_{405}/\text{min (Probe)} - \Delta A_{405}/\text{min (Leerwert)}$$

3. Berechnung der sPLA₂ Aktivität:

$$\begin{aligned} \text{sPLA}_2\text{-Aktivität} &= \frac{\Delta A_{405}/\text{min (P)}}{10,035 \text{ mM}^{-1\#}} \times \frac{T}{P} \times V \\ &= \text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1} \end{aligned}$$

mit

V ... Verdünnungsfaktor

T ... Gesamtvolumen in der Kavität [ml]

P ... Probenvolumen in der Kavität [ml]

justierter Extinktionskoeffizient von DTNB bei 405nm Wellenlänge

2.1.4.3.3 Bestimmung der mRNA-Konzentration von Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2

2.1.4.3.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Hep G2-Zellen erfolgte mit TRIzol®Reagenz (Phenol-Guanidin-Isothiocyanat-Lösung) nach vorgegebener Arbeitsvorschrift (2.1.3.2.4.1).

2.1.4.3.3.2 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA erfolgte mittels Omniscript™Reverse Transcriptase Kit von QIAGEN GmbH nach vorgegebener Arbeitsvorschrift (2.1.3.2.4.2).

2.1.4.3.3.3 real-time PCR

Die durchgeführten PCR-Reaktionen erfolgten nach Standardprotokoll:

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration in 15 µl Reaktionsansatz</u>
Brilliant™SYBR®Green QPCR Master Mix	7,5µl	1x
bidest Wasser (DEPC-behandelt)	3,5µl	
fwd-Primer	1µl	COX-1 0,67 µmol/l, COX-2 0,67 µmol/l GAPDH 0,20 µmol/l
rev-Primer	1µl	COX-1 0,67 µmol/l, COX-2 0,67 µmol/l GAPDH 0,20 µmol/l
cDNA (Template)	2µl	0,2µg

Die Reagenzien wurden in 0,1ml-Reaktionsgefäßen vermischt, wobei die Zugabe der cDNA zum Schluß erfolgte. Dem schloss sich die Amplifizierung der spezifischen DNA-Fragmente im Rotorgene 2000 (Corbett Research) nach folgendem Protokoll an:

Initial-Denaturierung	95°C	3min	
COX-1			
Denaturierung	95°C	30s	} 55 Zyklen
Annealing	65°C	30s	
Elongation	72°C	60s	
COX-2			
Denaturierung	95°C	30s	} 55 Zyklen
Annealing	55°C	30s	
Elongation	72°C	60s	

In jedem PCR-Lauf wurde GAPDH unter gleichen real-time PCR-Bedingungen mitgeführt.

Die in der real-time PCR eingesetzten Primer der COX-1 und COX-2 basierten auf der Veröffentlichung von BEASLEY (1999). Die Primer der GAPDH wurden aus der mRNA-Sequenz mit dem Programm PRIMER SELECT 4,0 (DNASTAR Inc., USA) ermittelt.

COX-1 (fwd) 5' CAG CTC CTG GCC CGC CGC TT3'
(rev) 5' GTG CAT CAA CAC AGG CGC CTC3'

COX-2	(fwd) 5'ATG AGA TTG TGG GAA AAT TGC T3' (rev) 5'GAT CAT CTC TTG CCT GAG TAT C3'
GAPDH	(fwd) 5'CGC CAG CCG AGC CAC ATC3' (rev) 5'GCC AGC ATC GCC CCA CTT GA3'

In Negativ-Kontrollreaktionen wurden anstelle der cDNA-Templates 2µl DEPC-behandeltes bidest. Wasser eingesetzt. Für den Einsatz definierter Standards in die PCR wurden die amplifizierten DNA-Fragmente (COX-1 299bp, COX-2 300bp, GAPDH 304bp) auf 4°C gekühlt und über horizontale Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, isoliert und quantifiziert (2.1.3.2.4.4 und 2.1.3.2.4.5).

2.2 Studie zur Wirkung eines Gemisches konjugierter Linolsäuren (cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA) auf den Lipidstoffwechsel und auf die Bildung von Eicosanoiden am Modelltier Ratte

2.2.1 Verwendete Reagenzien

Reagenzien:	Firma:
Cellulose (ARBOCEL, BWW 40)	J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg
CLA70 - TrofoCell	TrofoCell GmbH, Hamburg
DL- α -Tocopherylacetat	VWR International GmbH, Dresden
Kasein (Nährkasein, Säurekasein)	Meggle, Wasserburg/Inn
Leinöl	Kunella Feinkost GmbH, Cottbus
Maisstärke	Assi Domän, Deutschland
Mineralstoff- und Vitaminvormischung	Mineralstoffwerk Hohburg, Hohburg
Primer (GAPDH)	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Primer (Δ 9-, Δ 6-, Δ 5-Desaturase, COX-1, COX-2)	CarlRoth GmbH & Co., Karlsruhe
Saccharose (Raffinade Zucker)	Goldhand Vertrieb, Düsseldorf
Sonnenblumenöl	C. Thywissen GmbH, Neuss
Sonnenblumenöl, hochölsäurehaltig	C. Thywissen GmbH, Neuss
Triton-X-100	VWR International GmbH, Dresden

2.2.2 Versuchsdesign

Die vorliegende Studie wurde in Form eines einfaktoriellen Versuchsmodells mit 45 männlichen Sprague-Dawley-Ratten (Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Die Ratten wurden in 3 Gruppen (CLA, SBÖ, HÖ-SBÖ) zu je 15 Tieren

aufgeteilt und 5 Wochen mit 2 unterschiedlichen semisynthetischen Basisdiäten gefüttert. In der 1. Fütterungsperiode, die die ersten 4 Wochen umfasste, bekamen die Tiere in den drei Gruppen 3 verschiedene Fette in den Diäten verabreicht. Die Diäten enthielten in der CLA-Gruppe 3 % CLA70-TrofoCell, in der SBÖ-Gruppe 3 % Sonnenblumenöl und 3 % hochölsäurehaltiges Sonnenblumenöl in der HÖ-SBÖ-Gruppe. Nach der 1. Fütterungsperiode wurde von 5 Tieren je Gruppe die Leber entnommen. Nach der 4wöchigen Anfangsphase, in der sich der Lipidmetabolismus der Ratten an die drei verschiedenen Diätfette adaptierte, wurde in der 5. Woche die Diäten zusätzlich mit Leinöl (LÖ) supplementiert, wobei der Stärkeanteil der Diäten verringert wurde. Um den Einfluss der Diätfette auf den α -Linolensäure-Stoffwechsel zu charakterisieren, wurde Leinöl als Diätfett gewählt, da es reich an α -Linolensäure ist. Danach wurden die restlichen 10 Tiere je Gruppe dekapitiert und Leber sowie Plasma entnommen.

Tab. 1: Versuchsdesign

Diätfett (Gruppe)	CLA	SBÖ	HÖ-SBÖ
<i>1. Fütterungsperiode</i>		<i>1.-4. Woche</i>	
Anzahl der Tiere	15	15	15
Lebergewinnung bei Anzahl der Tiere	5	<i>nach der 4. Woche</i> 5	5
Diätfett (Gruppe)	CLA+LÖ	SBÖ+LÖ	HÖ-SBÖ+LÖ
<i>2. Fütterungsperiode</i>		<i>5. Woche</i>	
Anzahl der Tiere	10	10	10
Plasma- und Leber- gewinnung bei Anzahl der Tiere	10	<i>nach der 5. Woche</i> 10	10

2.2.3 Haltung und Fütterung der Ratten

Zu Versuchsbeginn hatten die Ratten mittlere Lebendmassen von 86 ± 2 g.

Die Haltung erfolgte einzeln in Makrolonkäfigen mit Metallgitterabdeckung auf Einstreu in den Versuchsterräumen des Institutes. 12 Stunden Licht- und Dunkelrhythmus bei Umgebungstemperaturen von durchschnittlich 22°C und durchschnittliche Luftfeuchtigkeit von ca. 50-60 % wurde in den Versuchsterräumen gewährleistet.

Die Tiere wurden restriktiv gefüttert, um die Futtermenge aller Gruppen zu standardisieren. In den ersten 4 Wochen wurde die Futtermenge kontinuierlich von 7 auf 16g

erhöht. In der 5. Woche erhielt jedes Tier 18g Futter pro Tag. Wasser stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

Es wurden sowohl die tägliche Futterraufnahme, als auch die wöchentliche Lebendmassenzunahme der Ratten protokolliert.

Alle experimentellen Vorgehensweisen erfolgten nach den durch das Land Sachsen-Anhalt anerkannten geltenden Richtlinien im Umgang und in der Betreuung mit Labortieren.

2.2.4 Zusammensetzung der Diäten

Die Zusammensetzung der semisynthetischen Diäten ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Die Mineralstoff- (Tabelle 3) und Vitaminvormischungen (Tabelle 4) wurden in Anlehnung an Empfehlungen des American Institute of Nutrition (AIN) nach REEVES ET AL. (1993) für wachsende Nager (Diättyp AIN 93-G) hergestellt und waren in allen Diäten identisch.

Die Grundfuttermischung von Basisdiät 1 und 2 wurde aufgrund des unterschiedlichen Stärkeanteils getrennt gemischt. DL- α -Tocopherylacetat und Futterfette wurden bei der Herstellung der Diäten zugefügt. Die Diäten wurden wöchentlich hergestellt, gefriergetrocknet (Gamma 2-20, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland) und bei 4°C gelagert.

Die Fettsäurezusammensetzung der Versuchsfette ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 2: Zusammensetzung der Diäten

Diät	CLA	SBÖ	HÖ-SBÖ	CLA +LÖ	SBÖ +LÖ	HÖ-SBÖ +LÖ
	Basisdiät 1. Fütterungsperiode			Basisdiät 2. Fütterungsperiode		
Komponenten [g/kg Diät]						
Kasein	200	200	200	200	200	200
Stärke	400	400	400	350	350	350
Saccharose	278	278	278	278	278	278
CLA70-TrofoCell	30	-	-	30	-	-
Sonnenblumenöl	-	30	-	-	30	-
hochölsäurehaltiges Sonnenblumenöl	-	-	30	-	-	30
Leinöl	-	-	-	50	50	50
Vitamin- und Mineral- stoffvormischung	60	60	60	60	60	60
Zellulose	30	30	30	30	30	30
DL- α -Tocopheryl- acetat *	0,150	0,106	0,107	0,213	0,147	0,148
DL-Methionin	2	2	2	2	2	2

* Der Bedarf der Ratten an Vitamin E (75IE) wurde durch Zusatz von DL- α -Tocopherylacetat in der Diät gedeckt. DL- α -Tocopherylacetat wurde den Diäten zugesetzt, um den gleichen Vitamin-E-Gehalt in den Versuchsfetten zu erhalten, unabhängig von dem natürlichen Vitamin-E-Gehalt der Fette.

Tab. 3: Supplementierung der Diät mit Mineralstoffen

Komponente	Konzentration
<i>Mengenelemente</i>	[g/kg Diät]
Calciumcarbonat (37 % Calcium)	7,5
Dicalciumphosphat (18 % Phosphat, 25,5 % Calcium)	8,7
Kaliumsulfat (45 % Kalium)	3,0
Kaliumchlorid (52,4 % Kalium, 47,6 % Chlorid)	0,6
Natriumchlorid (39,3 % Natrium, 60,2 % Chlorid)	2,6
Magnesiumoxid (50 % Magnesium)	1,0
<i>Spurenelemente</i>	[mg/kg Diät]
Eisensulfat (30 % Eisen)	117
Zinkoxid (79 % Zink)	38
Manganoxid (62 % Mangan)	16
Kupfersulfat (25 % Kupfer)	24
Calciumjodat (62 % Jod)	0,32
Ammoniummolybdat (54,3 % Molybdän)	0,28
Natriumselenit (45 % Selen)	0,33

Tab. 4: Supplementierung der Diät mit Vitaminen

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
Nikotinsäure (990 mg/g)	30 mg
Folsäure (1000 mg/g)	2 mg
Pantothensäure (1000 mg/g)	15 mg
Biotin (20 mg/g)	0,2 mg
Vitamin B ₁₂ (1 mg/g)	0,025 mg
Cholinchlorid (500 mg/g)	1000 mg

IE: Internationale Einheiten

Tab. 5: Fettsäurezusammensetzung der Versuchsfette

Diätfett	CLA	SBÖ	HÖ-SBÖ	CLA +LÖ	SBÖ +LÖ	HÖ-SBÖ +LÖ
Gewichtsprozentage [g/100g Fettsäuren]						
C16:0	7,1	6,9	4,1	6,2	6,2	5,1
C18:0	3,1	4,1	3,7	3,4	3,8	3,7
C18:1 (n-9)	14,6	23,8	75,0	17,7	21,1	35,4
C18:2 (n-6)	0,5	63,3	15,8	11,1	34,6	16,4
Cis-9,trans-11 CLA	33,0	-	-	12,4	-	-
Trans-10,cis-12 CLA	34,0	-	-	12,8	-	-
C18:3 (n-3)	-	0,1	0,5	32,9	33,0	33,1
C20:0	3,5	0,3	0,3	1,3	0,1	0,1
C20:1 (n-9)	4,1	0,5	0,4	1,5	0,6	0,5

2.2.5 Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials

2.2.5.1 Gewinnung von Plasma und Entnahme der Leber

Nach der 1. Fütterungsperiode wurden 5 Tiere pro Gruppe nach 12-stündiger Nüchterung unter Etherbetäubung dekapitiert und die Leber entnommen. Nach der 2. Fütterungsperiode wurden die verbleibenden 10 Tiere pro Gruppe nach 12-stündiger Nüchterung unter Etherbetäubung dekapitiert. Von diesen Tieren wurde aus dem Blut Plasma gewonnen, die Leber entnommen und das Lebergewicht protokolliert. Ca. 15mg Leber wurden in DEPC-behandelten Probengefäße für die spätere RNA-Isolierung überführt.

Die Leber wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analytik bei -20°C gelagert.

Für Gewinnung des Plasmas wurde Blut in heparinisierten Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) aufgefangen, bei $1800 \times g$ 10min und 4°C zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus) und der Überstand bei -20°C gelagert.

2.2.5.2 Gewinnung von Lebermikrosomen und Lebercytosol

Leberhomogenat und -cytosol konnten durch fraktionierte Pelletierung in Anlehnung an die Methoden von CHRISTIANSEN ET AL. (1991) und GARG ET AL. (1988) gewonnen werden.

1,5-2g gefrorene Leber wurden auf Eis mit dem Skalpell zerkleinert und nach Zugabe von 4ml Homogenisierungspuffer ($0,25\text{mol/l}$ Sucrose, $0,1\text{mol/l}$ K_2HPO_4 , $0,1\text{mol/l}$ KH_2PO_4 , pH

7,4) mittels eines Potter-S-Homogenisators (B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland) unter Eiskühlung bei 500U/min mit 13 Hüben homogenisiert. Zellkerne und -bruchstücke wurden durch Zentrifugation (Biofuge fresco, Kendro Laboratory Products GmbH) bei 1400 x g, 5min und 4°C entfernt. Zur Gewinnung von Mikrosomen und Cytosol wurde ein Aliquot vom Überstand 2x bei 100 000 x g, 6min und 4°C zentrifugiert (Mikroultrazentrifuge RC M 150 GX, SORVALL GmbH). Nach diesem Zentrifugationsschritt findet sich das Cytosol im Überstand und die mikrosomale Fraktion im Pellet. Dieses musste in 0,3ml Homogenisierungspuffer resuspendiert werden, bevor es bis zur Analyse bei -20°C gelagert werden konnte.

2.2.5.3 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt im Lebercytosol und Lebermikrosomen wurde nach der Methode von BRADFORD (1976) bestimmt.

Lebercytosol und -mikrosomen wurden mit Homogenisierungspuffer (0,25mol/l Sucrose, 0,1mol/l K₂HPO₄, 0,1mol/l KH₂PO₄, pH 7,4) 1:800 verdünnt. 50µl dieser Lösung wurden mit 200µl Bradford-Reagenzlösung (Zusammensetzung unter 2.1.2.6) versetzt, 10min bei RT inkubiert und die Absorption bei 595nm Wellenlänge spektralphotometrisch (SpectraFluor Plus, TECAN Deutschland GmbH) gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden anhand einer Eichreihe aus Rinderserumalbumin als Standard ermittelt (2.1.2.6).

2.2.6 Untersuchungen zum Einfluss des CLA-Gemisches auf den Lipidstoffwechsel von Ratten

2.2.6.1 Extraktion von Gesamtlipiden aus der Leber

Die Gesamtlipide wurden aus ca. 0,5g zerkleinertem Lebergewebe extrahiert nach der Methode von HARA AND RADIN (1978), modifiziert nach EDER AND KIRCHGESSNER (1994). Dem Lebergewebe wurden 4ml n-Hexan:Isopropanol (3:2 v/v) sowie 0,2ml C15:0 als interne Standardfettsäure zugesetzt. Lipide wurden im Schüttelinkubator (G 25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific CO.) 18h bei RT unter Lichtschutz extrahiert, anschließend bei 500 x g 10min und 4°C zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus) und bei -20°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

2.2.6.2 Trennung von Lipidfraktionen aus der Leber

Die Lipidfraktionen NL, PC und PE wurden aus Gesamtlipidextrakten von der Leber mittels Festphasenextraktion nach der modifizierten Methode von SUZUKI ET AL. (1997) separiert.

Die Durchführung war analog der unter 2.1.3.2.2 beschriebenen Arbeitsschritte.

2.2.6.3 Fettsäureanalytik

Fettsäuren in Gesamtlipiden der gewonnenen Lipidfraktionen wurden nach BUTTE (1983) mit TMSH verestert, im GC getrennt, identifiziert und mittels Pentadecansäuremethylester (C15:0) als intern zugesetztem Standard quantifiziert.

Die Durchführung war analog der unter 2.1.3.2.3 beschriebenen Arbeitsschritte.

2.2.6.4 Bestimmung von Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in Leber und Plasma

Die Bestimmung von Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in Leber und Plasma erfolgte mittels Test Kits (Ecoline®25, VWR International GmbH) nach vorgegebener Arbeitsvorschrift.

20µl Plasma und 20µl definierte Standardlösung (Calibrator, VWR International GmbH) wurden zur Bestimmung der Triglyceridkonzentration jeweils mit 800µl und zur Bestimmung der Cholesterinkonzentration jeweils mit 1000µl Reaktionslösung versetzt.

Die Reaktionsansätze wurden 10min bei RT inkubiert und konnten anschließend gegen den Reagenzienleerwert spektralphotometrisch bei 500nm Wellenlänge (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) gemessen werden.

Aliquote von Leberlipidextrakten wurden in einer Vakuumzentrifuge (SOCIETE JOUAN, Frankreich) eingengt, mit 20µl Triton-X-100:Chloroform (1:1 v/v) versetzt und das Chloroform in der Vakuumzentrifuge verdampft. Die Bestimmung von Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen erfolgte nach im Kit enthaltener Arbeitsvorschrift.

2.2.6.5 Bestimmung der mRNA-Konzentration von Δ^9 -, Δ^6 - und Δ^5 -Desaturasen der Leber

2.2.6.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Isolierung von Gesamt-RNA aus den bei Entnahme der Leber gewonnenen Leberstückchen (ca. 15mg) erfolgte mit TRIzol®Reagenz nach vorgegebener Arbeitsvorschrift (2.1.3.2.4.1).

2.2.6.5.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA der Leber erfolgte mittels Omniscript™ Reverse Transcriptase Kit von QIAGEN GmbH nach vorgegebener Arbeitsvorschrift (2.1.3.2.4.2).

2.2.6.5.3 real-time PCR

Die durchgeführten PCR-Reaktionen erfolgten nach Standardprotokoll wie unter 2.1.3.2.4.3 beschrieben.

Primerkonzentrationen im 15µl Reaktionsansatz:

fwd-Primer:	Δ9-Desaturase	0,47 µmol/l,
	Δ6-Desaturase	1,00 µmol/l,
	Δ5-Desaturase	1,00 µmol/l,
	GAPDH	0,20 µmol/l
rev-Primer:	Δ9-Desaturase	1,00 µmol/l,
	Δ6-Desaturase	1,00 µmol/l,
	Δ5-Desaturase	1,00 µmol/l,
	GAPDH	0,20 µmol/l

Die Amplifizierung der spezifischen DNA-Fragmente im Rotorgene 2000 (Corbett Research) erfolgte nach:

Initial-Denaturierung	95°C	2min	
Δ9-, Δ6-, Δ5- Desaturasen			
Denaturierung	95°C	20s	} 40 Zyklen
Annealing	60°C	30s	
Elongation	72°C	40s	

In jedem PCR-Lauf wurde GAPDH unter gleichen Bedingungen mitgeführt.

Die in der real-time PCR eingesetzten Primer der Δ9-Desaturase (EMBL ID: RNSCD), Δ6-Desaturase (EMBL ID: AB621980), Δ5-Desaturase (EMBL ID: AF320509) und GAPDH (EMBL ID: RNGADPHR) wurden aus der mRNA-Sequenz mit dem Programm PRIMER SELECT 4,0 (DNASTAR Inc., USA) ermittelt:

Δ9-Desaturase (fwd) 5'CCG TGG CTT TTT CTT CTC TCA3'
(rev) 5'CTT TCC GCC CTT CTC TTT GA3'

Δ 6-Desaturase	(fwd) 5'CTT TCT CCT CCT GTC CCA CAT3' (rev) 5'CAT TGC CGA AGT ACG AGA GGA3'
Δ 5-Desaturase	(fwd) 5'CCC CAT GCA CAT TGA TCA TG3' (rev) 5'AAC GTT GCA GGT TGC CTG TAG3'
GAPDH	(fwd) 5'GCA TGG CCT TCC GTG TTC C3' (rev) 5'GGG TGG TCC AGG GTT TCT TAC TC3'

In Negativ-Kontrollreaktionen wurde anstelle der cDNA-Templates 2 μ l DEPC-behandeltes bidest. Wasser eingesetzt. Für den Einsatz definierter Standards in die PCR wurden die amplifizierten DNA-Fragmente (Δ 9-Desaturase 76bp, Δ 6-Desaturase 71bp, Δ 5-Desaturase 71bp, GAPDH 337bp) auf 4°C gekühlt und über eine horizontale Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, isoliert und quantifiziert (2.1.3.2.4.4 und 2.1.3.2.4.5).

2.2.6.6 Bestimmung der Aktivität lipogener Enzyme in der Leber

2.2.6.6.1 Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Die Bestimmung der Aktivität der G6PDH im Lebercytosol erfolgte nach der Methode von DEUTSCH (1985) nach angegebener Arbeitsvorschrift (2.1.3.2.6.1).

2.2.6.6.2 Fettsäure-Synthetase

Die Aktivität der FsS im Lebercytosol wurde nach der Methode von NEPOKROEFF ET AL. (1975) nach angegebener Arbeitsvorschrift (2.1.3.2.6.2) bestimmt.

2.2.7 Untersuchungen zum Einfluss des CLA-Gemisches auf die Bildung von Eicosanoiden in Ratten

2.2.7.1 Bestimmung von Eicosanoidkonzentrationen in Leber und Plasma

Plasma-Aliquote wurden mit EIA-Puffer (im Kit enthalten) verdünnt (1:5; 1:200; 1:30; 1:50) und zur Konzentrationsbestimmung von Eicosanoiden in EIA-Kits (Cayman Chemical Company) eingesetzt.

0,5g zerkleinertes Lebergewebe konnte in PBS-Indometacin (100 μ mol/l)-Lösung (pH 7,4) mittels Potter-S-Homogenisator (B. Braun Biotech International) unter Eiskühlung bei 500U/min mit 20 Hüben homogenisiert werden. Zum Homogenat wurden 3ml Aceton gegeben, 2min gevortext, 5min bei RT inkubiert und bei 600 x g, 10min und RT zentrifugiert

(Biofuge 13, Kendro Laboratory Products GmbH). Aceton wurde in Probengefäße überführt und in der Vakuumzentrifuge (SOCIETE JOUAN) eingengt. Die Proben wurden anschließend in EIA-Puffer aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Konzentrationsbestimmung von Eicosanoiden wurden die Proben mit EIA-Puffer verdünnt (1:25; 1:30; 1:200; 1:100).

Die Bestimmung der Eicosanoide (6-keto-PGF_{1 α} , TXB₂, PGF_{2 α} , PGE₂) im Leberextrakt und Plasma erfolgte mittels EIA-Kits von Cayman Chemical Company nach vorgegebener Arbeitsvorschrift. 6-keto-PGF_{1 α} wurde als stabiler Metabolit des PGI₂ und TXB₂ als stabiler Metabolit des TXA₂ gemessen.

2.2.7.2 Bestimmung der sPLA₂-Aktivität in Leber und Plasma

Die Aktivität der sPLA₂ wurde im Lebercytosol, -mikrosomen und im Plasma mittels sPLA₂-Assay-Kit von Cayman Chemical Company bestimmt (2.1.4.3.2).

2.2.7.3 Bestimmung der mRNA-Konzentration von Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2 der Leber

2.2.7.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Isolierung von Gesamt-RNA aus den bei Entnahme der Leber gewonnenen Leberstückchen (ca. 15mg) erfolgte mit TRIzol®Reagenz nach vorgegebener Arbeitsvorschrift (2.1.3.2.4.1).

2.2.7.3.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA der Leber erfolgte mittels Omniscript™Reverse Transcriptase von QIAGEN GmbH nach vorgegebener Arbeitsvorschrift (2.1.3.2.4.2).

2.2.7.3.3 real-time PCR

Die durchgeführten PCR-Reaktionen erfolgten nach Standardprotokoll wie unter 2.1.3.2.4.3 beschrieben.

Primerkonzentration im 15 μl Reaktionsansatz:

fwd-Primer:	COX-1	0,17 $\mu\text{mol/l}$
	COX-2	0,17 $\mu\text{mol/l}$
	GAPDH	0,20 $\mu\text{mol/l}$
rev-Primer:	COX-1	0,17 $\mu\text{mol/l}$
	COX-2	0,17 $\mu\text{mol/l}$
	GAPDH	0,20 $\mu\text{mol/l}$

Dem schloss sich die Amplifizierung der spezifischen DNA-Fragmente im Rotorgene 2000 nach folgendem Protokoll an:

Initial-Denaturierung 95°C 2min

COX-1

Denaturierung	95°C	20s	} 40 Zyklen
Annealing	60°C	30s	
Elongation	72°C	40s	

COX-2

Denaturierung	95°C	20s	} 50 Zyklen
Annealing	55°C	30s	
Elongation	72°C	40s	

In jedem PCR-Lauf wurde GAPDH unter gleichen real-time PCR-Bedingungen mitgeführt.

In der real-time PCR eingesetzten Primer der COX-1 (NCBI: BC029840) und GAPDH (EMBL ID: RNGADPHR) wurden aus der mRNA-Sequenz mit dem Programm PRIMER SELECT 4,0 (DNASTAR Inc., USA) ermittelt. Die Primer der COX-2 basierten auf der Veröffentlichung von MATER ET AL. (1999).

COX-1 (fwd) 5'GCT CCC GGG TCT GAT GCT CTT CT3'
(rev) 5'ATG GCG ATG CGG TTG CGA TAC3'

COX-2 (fwd) 5'CTT GTA CGT CAG ATT GCT GCC GTA G3'
(rev) 5'CGA ACC GAA CAC TGA AAC CGT CCG A3'

GAPDH (fwd) 5'GCA TGG CCT TCC GTG TTC C3'
(rev) 5'GGG TGG TCC AGG GTT TCT TAC TC3'

In Negativ-Kontrollreaktionen wurde anstelle der cDNA-Templates 2µl DEPC-behandeltes bidest. Wasser eingesetzt. Für den Einsatz definierter Standards in die PCR wurden die amplifizierten DNA-Fragmente (COX-1 255bp, COX-2 254bp, GAPDH 337bp) auf 4°C gekühlt und über eine horizontale Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, isoliert und quantifiziert (2.1.3.2.4.4 und 2.1.3.2.4.5).

2.3 Statistische Auswertung der Ergebnisse

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

Alle Untersuchungsergebnisse aus der Studie an Hep G2-Zellkulturen und der Studie an Ratten wurden mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet. Bei signifikantem F-Wert wurde ein multipler Mittelwertvergleich nach dem Fisher-Test durchgeführt. Bei $P < 0,05$ wurden Unterschiede als signifikant bezeichnet.

In der Auswertung der Zellkulturstudie wurden die Mittelwerte (MW) der mit cis-9,trans-11 CLA oder trans-10,cis-12 CLA behandelten Hep G2-Zellkulturen mit denen unbehandelter Zellen (Kontrollgruppe) verglichen. In der Tierstudie wurden die Mittelwerte der CLA-Gruppe mit denen der SBÖ- oder HÖ-SBÖ-Gruppe verglichen. Die Ergebnisauswertung der Fettsäuren der Leberlipide erfolgte nach 2 unterschiedlichen Zeitpunkten, bevor und nachdem die Diäten mit LÖ supplementiert wurden. Es wurde zusätzlich ein *t*-Test durchgeführt, um den Einfluss des LÖs auf die Fettsäurezusammensetzung in den Leberlipiden beurteilen zu können.

Im Ergebnisteil sind die Mittelwerte der Gruppen mit den Standardabweichungen (SD) der Einzelwerte dargestellt. Signifikante Unterschiede der Mittelwerte der Gruppen wurden durch unterschiedliche hochgestellte Buchstaben (^{abc; ABC}) gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Studie zur Wirkung der konjugierten Linolsäure-Isomere cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA auf den Lipidstoffwechsel und auf die Bildung von Eicosanoiden von Hep G2-Zellkulturen

3.1.1 Hep G2-Zellkulturen

3.1.1.1 Zellwachstum und Lebensfähigkeit

Zellwachstum und Lebensfähigkeit von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit cis-9,trans-11 CLA oder trans-10,cis-12 CLA sind in Tabelle 6 dargestellt.

Ausgehend von der Ausgangszellzahl, 8×10^6 Zellen je Ansatz, hatten cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA mit Konzentrationen von $10 \mu\text{mol/l}$ und $100 \mu\text{mol/l}$ keinen Einfluss auf das Wachstum von Hep G2-Zellen.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde durch $100 \mu\text{mol/l}$ cis-9,trans-11 CLA oder $100 \mu\text{mol/l}$ trans-10,cis-12 CLA nicht beeinträchtigt.

Tab. 6: Zellwachstum, Lebensfähigkeit, Proteingehalt und Länge von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit $10 \mu\text{mol/l}$ und $100 \mu\text{mol/l}$ cis-9,trans-11 CLA oder $10 \mu\text{mol/l}$ und $100 \mu\text{mol/l}$ trans-10,cis-12 CLA im Zellmedium

Behandlung	Cis-9,trans-11 CLA			Trans-10,cis-12 CLA	
	Kontrolle	10	100	10	100
Zellwachstum [$\times 10^6$ Zellen] (n=5)					
24h	$9,28 \pm 3,17$	$9,40 \pm 3,01$	$8,26 \pm 3,05$	$8,32 \pm 2,87$	$7,01 \pm 2,21$
Lebensfähigkeit [% lebende Zellen/Gesamtzellzahl] (n=4)					
24h	$92,3 \pm 3,75$	-	$91,4 \pm 5,21$	-	$92,3 \pm 4,05$
Proteingehalt [mg/ 8×10^6 Zellen] (n=5)					
24h	$1,28 \pm 0,34$	$1,13 \pm 0,23$	$1,30 \pm 0,35$	$1,20 \pm 0,27$	$1,32 \pm 0,36$
Länge [μm] (n=2)					
24h	$19,5 \pm 0,5$	$18,2 \pm 0,9$	$21,4 \pm 1,6$	$18,6 \pm 2,1$	$22,9 \pm 0,9$

- nicht analysiert

3.1.1.2 Proteingehalt

Es zeigte sich kein signifikanter konzentrationsabhängiger Einfluss der CLA-Isomere auf den Proteingehalt von Hep G2-Zellen. Der Proteingehalt von Hep G2-Zellen, welche 24h mit $10 \mu\text{mol/l}$ und $100 \mu\text{mol/l}$ cis-9,trans-11 CLA oder trans-10,cis-12 CLA inkubiert wurden, unterschied sich nicht von dem Proteingehalt der Kontrollzellen (Tabelle 6).

3.1.1.3 Morphologie

Unter dem Lichtmikroskop erscheinen Hep G2-Zellen als flache, polygonal wachsende Zellen, mit einer Länge von 18 – 23µm. Sie wachsen größtenteils, aber nicht ausschließlich, als Monolayer. Im Zellrasen zeigten die Zellen epithelioides Wachstum. Bei längeren Kultivierungszeiten kam es zu einem dreidimensionalen Wachstum.

Bei 24stündiger Inkubation mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA erschienen die Hep G2-Zellen unter dem Lichtmikroskop unregelmäßig und aufgebläht (Abbildung 3, Seite 42). Die mit 10µmol/l CLA-Isomere inkubierten Hep G2-Zellen unterschieden sich nicht im äußeren Erscheinungsbild von dem der Kontrollzellen (Abb. 3).

3.1.2 Einfluss von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA auf den Lipidstoffwechsel von Hep G2-Zellkulturen

3.1.2.1 Anteile der CLA-Isomere in Lipide und Lipidfraktionen

Tabellen 7 und 8 (Seite 43) enthalten den prozentualen Anteil von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA des Zellmediums in Gesamtlipide und Lipidfraktionen von Hep G2-Zellen nach 0,5h- und 24h-Inkubation mit den CLA-Isomeren.

Nach 0,5stündiger Inkubation wurde ein Zehntel von cis-9,trans-11 CLA und ein Zehntel von trans-10,cis-12 CLA in die Gesamtlipide von Hep G2-Zellen inkorporiert, unabhängig von der Anfangskonzentration (10 oder 100µmol/l) der CLA-Isomere im Zellmedium (Tabelle 7).

Nach 24stündiger Inkubation wurden von jeweils 10µmol/l CLA-Isomere im Zellmedium ein Drittel und von jeweils 100µmol/l CLA-Isomere im Zellmedium die Hälfte von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA in die Gesamtlipide von Hep G2-Zellen inkorporiert (Tabelle 7).

Tab. 7: Prozentualer Anteil der CLA-Isomere des Zellmediums in Gesamtlipide von Hep G2-Zellen nach 0,5- und 24stündiger Inkubation mit 10µmol/l und 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 10µmol/l und 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA

Behandlung (n=6)	Cis-9,trans-11 CLA		Trans-10,cis-12 CLA	
	10	100	10	100
[g/100g CLA]				
0,5h Inkubation				
cis-9,trans-11 CLA	11,3 ± 3,31	9,34 ± 2,17	<0,1	<0,1
trans-10,cis-12 CLA	<0,1	<0,1	9,25 ± 1,90	8,08 ± 1,94
24h Inkubation				
cis-9,trans-11 CLA	28,6 ± 12,0 ^{ab}	42,2 ± 12,8 ^a	<0,1	<0,1
trans-10,cis-12 CLA	<0,1	<0,1	21,8 ± 7,32 ^b	43,2 ± 10,9 ^a

a, b: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05).

In NL und PC von Hep G2-Zellen unterschied sich der prozentuale Anteil von cis-9,trans-11 CLA des Zellmediums nicht von trans-10,cis-12 CLA (Tabelle 8). In PE war der prozentuale Anteil von cis-9,trans-11 CLA des Zellmediums signifikant höher als der von trans-10,cis-12 CLA (Tabelle 8).

Linol- [C18:2 (n-6)], α -Linolen- [C18:3 (n-3)], Arachidon- [C20:4 (n-6)] oder Eicosapentaensäure [C20:5 (n-3)] im Zellmedium hatten keinen Einfluss auf den prozentualen Anteil von cis-9,trans-11 CLA oder trans-10,cis-12 CLA des Zellmediums in NL, PC und PE von Hep G2-Zellen (Tabelle 8).

In den Tabellen 9, 10 und 11, 12 (Seite 48 - 51) sind die Anteile von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA an den Gesamtfettsäuren in Gesamtlipide und Lipidfraktionen von Hep G2-Zellen nach 0,5h- und 24h-Inkubation mit den CLA-Isomeren dargestellt.

Es zeigte sich ein konzentrations- und zeitabhängiger Einbau beider CLA-Isomere in die Gesamtlipide sowie ein konzentrationsabhängiger Einbau beider CLA-Isomere in die Lipidfraktionen von Hep G2-Zellen (Tabellen 9, 10 und 11,12).

In NL zeigten sich die höchsten Anteile beider CLA-Isomere (Tabelle 11 und 12). Der Anteil des cis-9,trans-11 CLA-Isomers an den Gesamtfettsäuren erreichte die Hälfte in PC und vier Fünftel in PE der in NL (Tabelle 11 und 12). Der Anteil des trans-10,cis-12 CLA-Isomers an den Gesamtfettsäuren erreichte die Hälfte in PC und die Hälfte in PE der in NL (Tabelle 11 und 12). In PE waren nach 24h Inkubation mit jeweils 25 μ mol/l CLA-Isomere der Anteil von cis-9,trans-11 CLA an den Gesamtfettsäuren um das Doppelte höher als der Anteil von trans-10,cis-12 CLA (Tabelle 11).

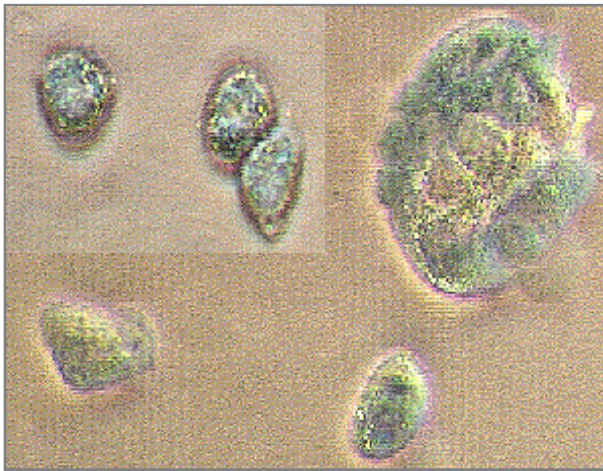


Abb. 3A: Hep G2-Zellen (Kontrolle)

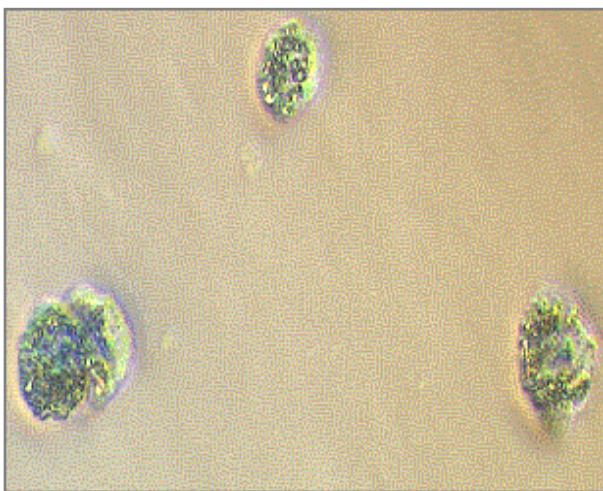


Abb. 3B: Hep G2-Zellen 24h inkubiert mit
100 μmol/l cis-9,trans-11 CLA

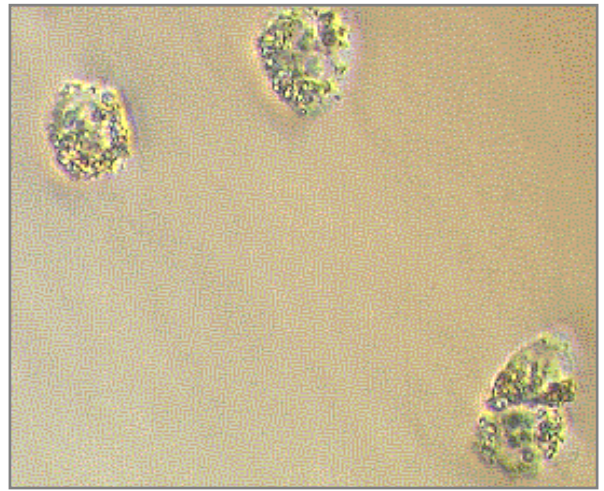


Abb. 3C: Hep G2-Zellen 24h inkubiert mit
100 μmol/l trans-10,cis-12 CLA

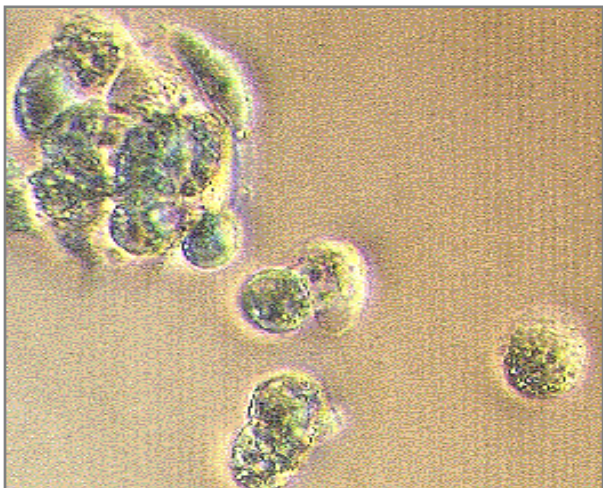


Abb. 3D : Hep G2-Zellen 24h inkubiert mit
10 μmol/l cis-9,trans-11 CLA

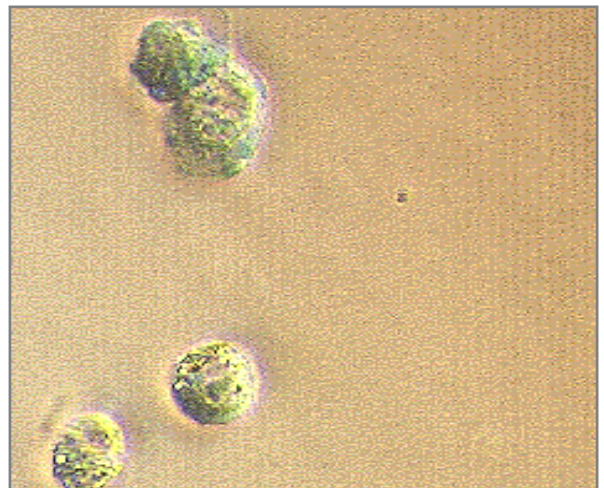


Abb. 3E: Hep G2-Zellen 24h inkubiert mit
10 μmol/l trans-10,cis-12 CLA

Abb. 3: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen einer Hep G2-Zellkultur bei 200-facher Vergrößerung

Tab. 8: Prozentualer Anteil der CLA-Isomere des Zellmediums in Lipidfraktionen von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 25µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA und jeweils 25µmol/l Linolsäure/α-Linolensäure oder jeweils 25µmol/l Arachidonsäure/Eicosapentaensäure

Lipidfraktion Behandlung (n=4)	Neutrallipide		Phosphatidylcholin		Phosphatidylethanolamin	
	Cis-9,trans-11 CLA	Trans-10,cis-12 CLA	Cis-9,trans-11 CLA	Trans-10,cis-12 CLA	Cis-9,trans-11 CLA	Trans-10,cis-12 CLA
[g/100g CLA]						
CLA						
cis-9,trans-11 CLA	14,1 ± 2,37	<0,1	6,88 ± 0,81	<0,1	11,2 ± 2,07 ^a	<0,1
trans-10,cis-12 CLA	<0,1	10,8 ± 4,97	<0,1	6,03 ± 3,25	<0,1	3,94 ± 1,14 ^b
Linolsäure						
cis-9,trans-11 CLA	15,5 ± 1,62	<0,1	5,53 ± 1,49	<0,1	9,68 ± 1,35 ^a	<0,1
trans-10,cis-12 CLA	<0,1	11,3 ± 7,23	<0,1	6,73 ± 3,04	<0,1	5,53 ± 2,81 ^b
α-Linolensäure						
cis-9,trans-11 CLA	19,2 ± 4,16	<0,1	8,14 ± 0,60	<0,1	9,82 ± 1,26 ^a	<0,1
trans-10,cis-12 CLA	<0,1	10,4 ± 6,34	<0,1	6,18 ± 2,87	<0,1	4,49 ± 1,98 ^b
Arachidonsäure						
cis-9,trans-11 CLA	17,8 ± 2,19	<0,1	13,0 ± 2,11	<0,1	10,1 ± 1,11 ^a	<0,1
trans-10,cis-12 CLA	<0,1	14,8 ± 2,70	<0,1	12,4 ± 2,62	<0,1	6,76 ± 0,92 ^b
Eicosapentaensäure						
cis-9,trans-11 CLA	18,2 ± 4,02	<0,1	13,6 ± 2,75	<0,1	10,7 ± 1,37 ^a	<0,1
trans-10,cis-12 CLA	<0,1	15,7 ± 5,22	<0,1	12,1 ± 2,68	<0,1	6,61 ± 1,35 ^b

a, b: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05).

3.1.2.2 Fettsäurezusammensetzung von Gesamtlipiden

Die Fettsäurezusammensetzung der Gesamtlipide von Hep G2-Zellen nach 0,5h und 24h Inkubationszeit mit 10µmol/l und 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 10µmol/l und 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA im Zellmedium ist in den Tabellen 9 (Seite 48) und 10 (Seite 49) dargestellt.

Nach 0,5stündiger Inkubation mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA konnte festgestellt werden, dass in den Gesamtlipiden der Hep G2-Zellen signifikant geringere Gewichtsprozentanteile an Myristinsäure (C14:0), Palmitinsäure (C16:0), MUFA, einschließlich Ölsäure [C18:1 (n-9)], auftraten als in Zellen, die ohne CLA inkubiert wurden. Hingegen zeigte die 0,5stündige Behandlung mit 10µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 10µmol/l trans-10,cis-12 CLA keine Effekte auf die Fettsäurezusammensetzung der Gesamtlipide von Hep G2-Zellen.

Bei 24stündiger Inkubation mit 10µmol/l und 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA waren die Gewichtsprozentanteile an SFA, einschließlich C14:0, C16:0 und Stearinsäure (C18:0), in den Gesamtlipiden höher als in Zellen, die ohne CLA inkubiert wurden.

Bei 24h Inkubation mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 10µmol/l und 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA im Zellmedium kam es in den Gesamtlipiden von Hep G2-Zellen zur deutlichen Senkung der Gewichtsprozentanteile an MUFA (um ein Drittel durch 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA, um ein Zehntel durch 10µmol/l trans-10,cis-12 CLA und um die Hälfte durch 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA), einschließlich der Fettsäuren Palmitoleinsäure [C16:1 (n-7)] und C18:1 (n-9). Der Quotient von MUFA/SFA, als Indikator der Δ^9 -Desaturierung, war in den Gesamtlipiden um ein Viertel durch 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA, um ein Fünftel durch 10µmol/l trans-10,cis-12 CLA und um die Hälfte durch 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA geringer als in Zellen, die ohne CLA-Isomere inkubiert wurden.

Cis-9,trans-11 CLA hatte bei der Konzentration von 10µmol/l nach 24h keinen Effekt auf die Gewichtsprozentanteile der SFA und MUFA in den Gesamtlipiden von Hep G2-Zellen.

Die Gewichtsprozentanteile der (n-6)-PUFA, einschließlich C18:2 (n-6), Dihomo- γ -Linolensäure [C20:3 (n-6)] und C20:4 (n-6), und der Docosahexaensäure [C22:6 (n-3)] waren in den Gesamtlipiden von Hep G2-Zellen, die mit jeweils 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder trans-10,cis-12 CLA 24h inkubiert wurden, signifikant geringer als in Zellen, die ohne CLA inkubiert wurden.

Cis-9,trans-11 CLA oder trans-10,cis-12 CLA hatte in der Konzentration von 10µmol/l nach 24h keinen Effekt auf die Gewichtsprozentage der (n-6)- und (n-3)-Fettsäuren in den Gesamtlipiden von Hep G2-Zellen.

Insgesamt waren die Gewichtsprozentage der (n-6)- und (n-3)-PUFA, im Gegensatz zu den Gewichtsprozentagen von SFA und MUFA, in den Gesamtlipiden von Hep G2-Zellen gering.

3.1.2.3 Fettsäurezusammensetzung von Lipidfraktionen

Um den konzentrationsabhängigen Einfluss von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA auf die Fettsäurezusammensetzung in NL, PC und PE von Hep G2-Zellen zu untersuchen, wurden Hep G2-Zellen mit jeweils 25µmol/l und 100µmol/l CLA-Isomere 24h inkubiert. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 11 (Seite 50) und 12 (Seite 51) dargestellt.

In NL waren nach 24stündiger Inkubation mit 25µmol/l und 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA die Gewichtsprozentage der SFA, einschließlich C14:0, C16:0 und C18:0, höher als in Hep G2-Zellen, die 24h mit 25µmol/l und 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder ohne CLA inkubiert wurden. Die 24stündige Inkubation mit 25µmol/l cis-9,trans-11 CLA hatte keinen Effekt auf die Gewichtsprozentage der SFA in NL von Hep G2-Zellen.

Die Zellen, die 24h mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA inkubiert wurden, hatten um ein Viertel geringere Gewichtsprozentage an MUFA und um ein Fünftel geringeren Quotienten von MUFA/SFA in NL als in Zellen, die ohne CLA inkubiert wurden. Die Gewichtsprozentage der MUFA waren um ein Viertel und um die Hälfte und der Quotient von MUFA/SFA um ein Drittel und um zwei Drittel geringer in NL von Hep G2-Zellen, die 24h mit 25µmol/l und 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA im Zellmedium inkubiert wurden als in den Kontrollzellen.

Die 24h Inkubation mit 25µmol/l cis-9,trans-11 CLA hatte keinen Effekt auf die Fettsäurezusammensetzung in PC von Hep G2-Zellen. Die 24h Inkubation mit 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA führte zur Senkung des Quotienten von MUFA/SFA sowie der Gewichtsprozentage an C20:4 (n-6) in PC von Hep G2-Zellen.

In PC konnte im Vergleich mit den Kontrollzellen nach 24stündiger Inkubation mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA signifikant geringere Gewichtsprozentage an MUFA, einschließlich C18:1 (n-9) und ein geringerer Quotient von MUFA/SFA ermittelt werden. In PC von Hep G2-Zellen, die 24h mit 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA inkubiert wurden, waren höhere Gewichtsprozentage an SFA und geringere Gewichtsprozentage an MUFA, einschließlich C16:1 (n-7) und C18:1 (n-9), und ein geringerer Quotient von MUFA/SFA ermittelt wurden als in PC von Zellen, die ohne CLA inkubiert wurden.

Hep G2-Zellen, die mit 25µmol/l cis-9,trans-11 CLA inkubiert wurden, hatten geringere Gewichtsprozentanteile an MUFA und (n-6)-PUFA in PE. Hep G2-Zellen, die 24h mit 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA inkubiert wurden, hatten höhere Gewichtsprozentanteile an SFA aber einen geringeren Quotienten von MUFA/SFA sowie geringere Gewichtsprozentanteile an (n-6)-PUFA in PE als Zellen, die ohne CLA-Isomere inkubiert wurden.

In PE führte die 24h Inkubation mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA und 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA zu geringeren Gewichtsprozentanteilen an (n-6)-PUFA, MUFA und des Quotienten von MUFA/SFA als in Zellen, die ohne CLA inkubiert wurden. Hep G2-Zellen, die 24h mit 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA inkubiert wurden, hatten in PE höhere Gewichtsprozentanteile an SFA.

Da der Anteil an (n-6)- und (n-3)-Fettsäuren an den Gesamtfettsäuren in PC und PE von Hep G2-Zellen in den durchgeführten Experimenten gering war (Tabelle 11) und um den Effekt von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA bei Konzentrationen von 25µmol/l auf die Δ^6 - und Δ^5 -Desaturierungen von Linol- und α -Linolensäure zu objektivieren, wurden Hep G2-Zellen neben der 24stündigen Behandlung mit 25µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA zusätzlich mit 25µmol/l Linolensäure oder 25µmol/l α -Linolensäure, als Substrat für die Δ^6 -Desaturase, inkubiert.

Die Ergebnisse in den Tabellen 13 (Seite 52) und 14 (Seite 53) zeigen, dass sich in PC die Anteile an cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA an den Gesamtfettsäuren nach 24h Inkubation mit entweder 25µmol/l Linolensäure oder 25µmol/l α -Linolensäure nicht unterschieden. In PE war der Anteil von cis-9,trans-11 CLA an den Gesamtfettsäuren um das Doppelte höher als der von trans-10,cis-12 CLA.

Die Ergebnisse in Tabelle 13 zeigen den Einfluss der CLA-Isomere auf die Δ^6 - und Δ^5 -Desaturierung von Linolensäure.

Die mit 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA und 25µmol/l Linolensäure 24h behandelten Hep G2-Zellen hatten signifikant höhere Gewichtsprozentanteile der C18:2 (n-6) in PC und PE, aber signifikant geringere Gewichtsprozentanteile der C20:4 (n-6) in PE als Kontrollzellen, die mit 25µmol/l Linolensäure inkubiert wurden. Der Quotient von C20:4 (n-6)/C18:2 (n-6) verringerte sich um die Hälfte in PC und um ein Drittel in PE nach Inkubation mit 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA und 25µmol/l Linolensäure. Für cis-9,trans-11 CLA konnten solche Effekte nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse in Tabelle 14 zeigen den Einfluss der CLA-Isomere auf die Δ^6 - und Δ^5 -Desaturierung von α -Linolensäure.

Die mit 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA und 25µmol/l α-Linolensäure 24h behandelten Zellen hatten signifikant höhere Gewichtsprozent der C18:3 (n-3) in PC und PE, aber signifikant geringere Gewichtsprozent der C20:5 (n-3) in PC als Zellen, die mit 25µmol/l α-Linolensäure inkubiert wurden. Der Quotient von C20:5 (n-3)/C18:3 (n-3) war in PC und PE von Hep G2-Zellen, die 24h mit 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA und 25µmol/l α-Linolensäure inkubiert wurden, um mehr als die Hälfte geringer als in Kontrollzellen, die mit 25µmol/l α-Linolensäure inkubiert wurden. Die Gewichtsprozent der C18:3 (n-3), C20:5 (n-3) und der Quotient von C20:5 (n-3)/C18:3 (n-3) unterschieden sich nach Inkubation von Hep G2-Zellen mit 25µmol/l cis-9,trans-11 CLA und 25µmol/l α-Linolensäure nicht von denen der Kontrollgruppe.

Der Einfluss von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA auf die Δ4-Desaturierung von C22:4 (n-6) und C22:5 (n-3) ist in den Tabellen 15 (Seite 54) und 16 (Seite 55) dargestellt.

Der Anteil von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA an den Gesamtfettsäuren war in PC nach 24stündiger Inkubation mit entweder 25µmol/l Arachidonsäure oder 25µmol/l Eicosapentaensäure gleich. In PE war der Anteil an cis-9,trans-11 CLA an den Gesamtfettsäuren signifikant höher als der von trans-10,cis-12 CLA.

Bei 24h Inkubation mit 25µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA und 25µmol/l Arachidonsäure hatten die CLA-Isomere keinen Einfluss auf die Gewichtsprozent von C20:4 (n-6), C22:4 (n-6), Docosapentaensäure [C22:5 (n-6)] in PC und PE von Hep G2-Zellen (Tabelle 15).

Mit 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA und 25µmol/l Eicosapentaensäure 24h behandelte Hep G2-Zellen hatten einen signifikant geringeren Quotienten von C22:6 (n-3)/C22:5 (n-3) in PC und PE als in Zellen, die mit 25µmol/l Eicosapentaensäure inkubiert wurden (Tabelle 16). Der Quotient von C22:6 (n-3)/C22:5 (n-3) in Hep G2-Zellen, die 24h mit 25µmol/l cis-9,trans-11 CLA und 25µmol/l Eicosapentaensäure inkubiert wurden, unterschied sich nicht von Zellen, die mit 25µmol/l Eicosapentaensäure inkubiert wurden (Tabelle 16).

3.1.2.4 mRNA-Konzentration von Δ9-, Δ6- und Δ5-Desaturasen

Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 (Seite 56) dargestellt.

Aufgrund der hohen Standardabweichungen konnte kein Effekt der CLA-Isomere auf die mRNA-Konzentration der Δ9-Desaturase oder Δ6-Desaturase festgestellt werden. Dagegen konnte eine Abnahme der relativen mRNA-Konzentration der Δ5-Desaturase durch 24stündige Behandlung von Hep G2-Zellen mit 10µmol/l und 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA nachgewiesen werden.

Tab. 9: Fettsäurezusammensetzung [Gewichtsprozente: g/100g Fettsäuren] in Gesamtlipiden von Hep G2-Zellen nach 0,5stündiger Inkubation mit 10µmol/l und 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 10µmol/l und 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA im Zellmedium

Behandlung (n=6)	Cis-9,trans-11 CLA			Trans-10,cis-12 CLA	
	Kontrolle	10	100	10	100
C18:2 c9,t11	<0,1	0,90 ± 0,33 ^b	7,45 ± 2,42 ^a	<0,1	<0,1
C18:2 t10,c12	<0,1	<0,1	<0,1	0,75 ± 0,31 ^b	6,68 ± 2,28 ^a
ΣSFA	34,9 ± 2,09	34,4 ± 1,98	32,4 ± 2,65	34,6 ± 1,94	32,7 ± 2,05
C14:0	3,41 ± 0,24 ^{a,b}	3,44 ± 0,22 ^a	3,16 ± 0,22 ^{bc}	3,40 ± 0,20 ^{ab}	3,12 ± 0,25 ^c
C16:0	21,6 ± 0,65 ^a	21,5 ± 0,82 ^a	20,1 ± 0,69 ^b	21,4 ± 0,53 ^a	19,9 ± 0,55 ^b
C18:0	9,44 ± 2,32	8,99 ± 2,12	8,69 ± 2,47	9,27 ± 2,01	9,01 ± 2,15
ΣMUFA	53,8 ± 2,15^a	53,2 ± 2,04^{ab}	50,1 ± 2,26^{bc}	52,9 ± 2,79^{ab}	49,6 ± 4,04^c
C16:1 (n-7)	11,3 ± 2,69	11,6 ± 2,63	10,6 ± 2,36	11,5 ± 2,43	10,3 ± 2,44
C18:1 (n-9)	25,4 ± 0,99 ^a	25,2 ± 1,02 ^{ab}	23,6 ± 1,58 ^{bc}	24,9 ± 1,55 ^{ab}	23,0 ± 2,31 ^c
C18:1 (n-7)	15,4 ± 2,28	14,9 ± 1,94	14,3 ± 2,45	14,7 ± 2,25	14,2 ± 3,01
C20:1 (n-9)	1,16 ± 0,22	0,97 ± 0,45	1,13 ± 0,40	1,15 ± 0,19	1,42 ± 0,37
ΣMUFA/ΣSFA	1,55 ± 0,14	1,56 ± 0,14	1,55 ± 0,16	1,54 ± 0,16	1,52 ± 0,16
ΣPUFA	11,3 ± 2,36^b	12,4 ± 1,70^b	17,5 ± 3,55^a	12,4 ± 2,23^b	17,6 ± 4,70^a
Σ(n-6)-PUFA	7,04 ± 2,34	7,39 ± 1,93	6,56 ± 2,24	7,27 ± 2,01	7,22 ± 3,29
C18:2 (n-6)	1,63 ± 0,21	1,70 ± 0,11	1,57 ± 0,20	1,70 ± 0,11	1,46 ± 0,25
C20:3 (n-6)	0,67 ± 0,10	0,70 ± 0,11	0,59 ± 0,05	0,68 ± 0,08	0,58 ± 0,05
C20:4 (n-6)	2,65 ± 0,40	2,76 ± 0,35	2,33 ± 0,26	2,80 ± 0,28	2,38 ± 0,30
Σ(n-3)-PUFA	3,81 ± 0,63	3,74 ± 0,89	3,10 ± 0,53	3,98 ± 0,68	3,39 ± 0,75
C18:3 (n-3)	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,05	0,20 ± 0,04	0,19 ± 0,04	0,16 ± 0,04
C20:4 (n-3)	0,37 ± 0,48	0,24 ± 0,19	0,19 ± 0,17	0,55 ± 0,64	0,43 ± 0,51
C20:5 (n-3)	0,59 ± 0,13	0,58 ± 0,20	0,48 ± 0,14	0,59 ± 0,16	0,51 ± 0,15
C22:5 (n-3)	0,54 ± 0,23	0,63 ± 0,27	0,49 ± 0,09	0,60 ± 0,22	0,47 ± 0,19
C22:6 (n-3)	2,04 ± 0,52	2,06 ± 0,58	1,74 ± 0,43	2,03 ± 0,49	1,86 ± 0,60

a,b,c: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05); C22:4 n-6, C22:5 n-6 <0,1; SFA: gesättigte Fettsäuren (saturated fatty acids), MUFA: einfachungesättigte Fettsäuren (monounsaturated fatty acids), PUFA: mehrfachungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids).

Tab. 10: Fettsäurezusammensetzung [Gewichtsprozente: g/100g Fettsäuren] in Gesamtlipiden von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 10µmol/l und 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 10µmol/l und 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA im Zellmedium

Behandlung (n=5)	Cis-9,trans-11 CLA			Trans-10,cis-12 CLA	
	Kontrolle	10	100	10	100
C18:2 c9,t11	<0,1	2,32 ± 0,37 ^b	22,8 ± 2,86 ^a	<0,1	<0,1
C18:2 t10,c12	<0,1	<0,1	<0,1	1,70 ± 0,32 ^b	23,9 ± 2,03 ^a
ΣSFA	33,8 ± 1,17^b	33,1 ± 0,61^{bc}	30,6 ± 1,80^c	38,4 ± 2,00^a	38,0 ± 2,82^a
C14:0	3,33 ± 0,19 ^b	3,35 ± 0,20 ^b	2,97 ± 0,24 ^c	3,70 ± 0,28 ^a	3,51 ± 0,29 ^{ab}
C16:0	21,7 ± 0,95 ^b	21,6 ± 0,67 ^{bc}	20,1 ± 1,15 ^c	23,3 ± 1,27 ^a	22,4 ± 1,32 ^{ab}
C18:0	8,30 ± 0,44 ^b	8,26 ± 0,42 ^b	6,79 ± 0,53 ^c	10,4 ± 0,66 ^a	10,4 ± 1,35 ^a
ΣMUFA	52,8 ± 2,34^a	50,3 ± 1,20^{ab}	36,2 ± 2,75^c	47,4 ± 2,30^b	28,7 ± 2,83^d
C16:1 (n-7)	11,3 ± 0,69 ^a	10,8 ± 0,04 ^{ab}	7,99 ± 0,81 ^c	10,0 ± 0,76 ^b	5,08 ± 0,40 ^d
C18:1 (n-9)	26,9 ± 0,71 ^a	25,6 ± 0,61 ^{ab}	18,5 ± 1,22 ^c	25,3 ± 0,58 ^b	15,0 ± 1,23 ^d
C18:1 (n-7)	12,9 ± 2,19 ^a	11,2 ± 0,37 ^{ab}	8,19 ± 1,51 ^c	10,6 ± 2,02 ^b	7,12 ± 1,65 ^c
C20:1 (n-9)	1,18 ± 0,14	1,15 ± 0,19	1,31 ± 0,25	1,05 ± 0,18	1,27 ± 0,28
ΣMUFA/ΣSFA	1,56 ± 0,06^a	1,51 ± 0,09^a	1,18 ± 0,10^b	1,24 ± 0,08^b	0,76 ± 0,10^c
ΣPUFA	13,3 ± 3,15^b	12,9 ± 1,28^b	33,1 ± 3,56^a	14,2 ± 3,15^b	33,3 ± 3,51^a
Σ(n-6)-PUFA	10,4 ± 1,79^a	8,47 ± 2,55^{ab}	6,05 ± 1,90^b	8,10 ± 2,53^{ab}	5,76 ± 1,58^b
C18:2 (n-6)	1,89 ± 0,25 ^a	1,95 ± 0,18 ^a	1,59 ± 0,18 ^b	2,04 ± 0,32 ^a	1,58 ± 0,16 ^b
C20:3 (n-6)	0,73 ± 0,11 ^a	0,71 ± 0,09 ^a	0,46 ± 0,03 ^b	0,64 ± 0,07 ^a	0,43 ± 0,06 ^b
C20:4 (n-6)	2,90 ± 0,46 ^a	2,81 ± 0,47 ^a	1,98 ± 0,34 ^b	2,82 ± 0,43 ^a	1,98 ± 0,39 ^b
Σ(n-3)-PUFA	3,65 ± 0,53	3,50 ± 0,37	4,06 ± 0,62	4,01 ± 0,68	3,19 ± 0,50
C18:3 (n-3)	0,18 ± 0,05 ^{abc}	0,22 ± 0,06 ^a	0,13 ± 0,04 ^{bc}	0,20 ± 0,06 ^{ab}	0,12 ± 0,03 ^c
C20:4 (n-3)	0,24 ± 0,19	0,23 ± 0,19	0,91 ± 0,58	0,48 ± 0,40	0,82 ± 0,22
C20:5 (n-3)	0,59 ± 0,10	0,53 ± 0,17	0,84 ± 0,57	0,74 ± 0,06	0,36 ± 0,13
C22:5 (n-3)	0,56 ± 0,09 ^{bc}	0,60 ± 0,06 ^b	0,47 ± 0,08 ^c	0,76 ± 0,08 ^a	0,54 ± 0,06 ^{bc}
C22:6 (n-3)	1,99 ± 0,25 ^a	1,84 ± 0,24 ^a	1,27 ± 0,24 ^b	1,73 ± 0,35 ^a	1,28 ± 0,33 ^b

a,b,c,d: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05); C22:4 n-6, C22:5 n-6 <0,1; SFA: gesättigte Fettsäuren (saturated fatty acids), MUFA: einfachungesättigte Fettsäuren (monounsaturated fatty acids), PUFA: mehrfachungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids).

Tab. 11: Fettsäurezusammensetzung [Gewichtsprozente: g/100g Fettsäuren] in Lipidfraktionen von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 25µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA im Zellmedium

Lipidfraktion Behandlung (n=4)	Neutrallipide			Phosphatidylcholin			Phosphatidylethanolamin		
	Kontrolle	Cis-9,trans- 11 CLA	Trans-10, cis-12 CLA	Kontrolle	Cis-9,trans- 11 CLA	Trans-10, cis-12 CLA	Kontrolle	Cis-9,trans- 11 CLA	Trans-10, cis-12 CLA
C18:2 c9,t11	<0,1	5,52 ± 0,91	<0,1	<0,1	2,48 ± 0,39	<0,1	<0,1	4,45 ± 0,74 ^a	<0,1
C18:2 t10,c12	<0,1	<0,1	4,41 ± 1,92	<0,1	<0,1	2,24 ± 1,33	<0,1	<0,1	2,41 ± 0,90 ^b
ΣSFA	35,8 ± 0,92^b	34,6 ± 0,59^b	46,3 ± 3,50^a	42,7 ± 0,54	43,1 ± 0,92	44,9 ± 1,81	26,2 ± 1,30^b	26,2 ± 1,30^b	32,8 ± 2,60^a
C14:0	4,45 ± 0,21 ^b	4,26 ± 0,20 ^b	5,25 ± 0,42 ^a	4,36 ± 0,30	4,38 ± 0,23	4,45 ± 0,34	1,35 ± 0,26	1,39 ± 0,18	1,78 ± 0,40
C16:0	25,0 ± 0,44 ^b	23,9 ± 0,27 ^b	29,7 ± 1,89 ^a	31,0 ± 1,18	31,1 ± 1,77	30,6 ± 0,69	10,4 ± 0,57 ^b	10,4 ± 0,57 ^b	13,2 ± 2,41 ^a
C18:0	5,89 ± 0,48 ^b	5,43 ± 0,43 ^b	9,70 ± 0,99 ^a	6,92 ± 1,75	6,97 ± 1,07	8,60 ± 0,50	13,9 ± 0,80 ^b	13,7 ± 1,50 ^b	16,3 ± 1,45 ^a
ΣMUFA	60,3 ± 2,32^a	54,4 ± 2,31^a	45,6 ± 5,74^b	50,3 ± 1,50	47,6 ± 0,42	46,9 ± 2,93	52,2 ± 1,05^a	49,2 ± 0,76^b	46,3 ± 2,64^c
C16:1 (n-7)	7,98 ± 1,01	8,37 ± 1,26	6,49 ± 1,48	10,1 ± 1,09	10,2 ± 0,95	9,27 ± 0,68	9,73 ± 0,55 ^a	8,79 ± 0,56 ^{a,b}	8,00 ± 0,80 ^b
C18:1 (n-9)	34,9 ± 2,11 ^a	30,9 ± 1,46 ^b	26,9 ± 3,25 ^c	26,6 ± 0,97	25,0 ± 0,45	26,9 ± 1,47	28,5 ± 1,16	27,1 ± 1,01	27,5 ± 2,61
C18:1 (n-7)	14,5 ± 1,34 ^a	12,4 ± 1,59 ^a	9,95 ± 1,63 ^b	11,7 ± 0,39 ^a	10,6 ± 0,93 ^a	9,15 ± 1,00 ^b	12,3 ± 0,91 ^a	11,3 ± 1,04 ^a	9,14 ± 1,19 ^b
C20:1 (n-9)	2,45 ± 0,29	2,21 ± 0,31	1,89 ± 0,24	1,10 ± 0,09	1,13 ± 0,19	1,09 ± 0,03	1,48 ± 0,24	1,72 ± 0,29	1,47 ± 0,22
ΣMUFA/ΣSFA	1,68 ± 0,11^a	1,57 ± 0,08^a	1,00 ± 0,21^b	1,18 ± 0,05^a	1,10 ± 0,03^{ab}	1,05 ± 0,11^b	2,00 ± 0,14^a	1,88 ± 0,10^a	1,42 ± 0,19^b
ΣPUFA	3,34 ± 1,68^b	11,0 ± 2,05^a	8,05 ± 2,32^a	7,03 ± 1,00^b	9,32 ± 0,88^a	8,16 ± 1,15^{ab}	21,6 ± 0,80^b	24,5 ± 1,28^a	20,8 ± 2,21^b
Σ(n-6)-PUFA	2,13 ± 0,89	2,60 ± 0,91	2,13 ± 0,41	5,52 ± 0,77	5,13 ± 0,89	4,53 ± 0,17	16,7 ± 0,35^a	14,8 ± 0,44^b	13,8 ± 1,86^b
C18:2 (n-6)	1,07 ± 0,38	1,24 ± 0,38	1,09 ± 0,27	2,10 ± 0,40	2,16 ± 0,52	2,49 ± 0,25	3,20 ± 0,40	3,01 ± 0,31	3,21 ± 0,41
C20:3 (n-6)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C20:4 (n-6)	0,35 ± 0,11	0,36 ± 0,12	0,40 ± 0,13	1,34 ± 0,15 ^a	1,25 ± 0,23 ^a	0,93 ± 0,11 ^b	5,96 ± 0,29	5,41 ± 0,29	5,25 ± 0,70
Σ(n-3)-PUFA	1,21 ± 0,88	1,81 ± 0,45	1,51 ± 0,32	1,38 ± 0,53	1,53 ± 0,15	1,39 ± 0,26	4,38 ± 0,74	4,81 ± 0,64	4,19 ± 0,56
C18:3 (n-3)	0,41 ± 0,19	0,44 ± 0,25	0,21 ± 0,17	0,08 ± 0,12	0,04 ± 0,08	<0,1	0,11 ± 0,16	0,10 ± 0,15	0,05 ± 0,11
C20:4 (n-3)	0,04 ± 0,05	0,15 ± 0,27	0,41 ± 0,11	0,10 ± 0,11	0,14 ± 0,10	0,24 ± 0,06	0,04 ± 0,06	0,32 ± 0,22	0,12 ± 0,14
C20:5 (n-3)	0,12 ± 0,14	<0,1	0,32 ± 0,07	0,33 ± 0,14	0,23 ± 0,04	0,26 ± 0,05	0,85 ± 0,29	0,76 ± 0,14	0,87 ± 0,37
C22:5 (n-3)	0,49 ± 0,56	0,48 ± 0,19	0,40 ± 0,28	0,22 ± 0,25	0,25 ± 0,07	0,33 ± 0,07	1,04 ± 0,17	1,07 ± 0,10	0,90 ± 0,37
C22:6 (n-3)	0,09 ± 0,17	0,06 ± 0,12	0,16 ± 0,20	0,60 ± 0,20	0,72 ± 0,02	0,56 ± 0,10	2,46 ± 0,28	2,16 ± 0,45	2,05 ± 0,37

a,b,c: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05); C22:4 n-6, C22:5 n-6 <0,1; SFA: gesättigte Fettsäuren (saturated fatty acids), MUFA: einfachungesättigte Fettsäuren (monounsaturated fatty acids), PUFA: mehrfachungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids).

Tab. 12: Fettsäurezusammensetzung [Gewichtsprozente: g/100g Fettsäuren] in Lipidfraktionen von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA im Zellmedium

Lipidfraktion Behandlung (n=4)	Neutrallipide			Phosphatidylcholin			Phosphatidylethanolamin		
	Kontrolle	Cis-9,trans- 11 CLA	Trans-10, cis-12 CLA	Kontrolle	Cis-9,trans- 11 CLA	Trans-10, cis-12 CLA	Kontrolle	Cis-9,trans- 11 CLA	Trans-10, cis-12 CLA
C18:2 c9,t11	<0,1	19,9 ± 5,21	<0,1	<0,1	7,39 ± 1,90	<0,1	<0,1	15,5 ± 3,52	<0,1
C18:2 t10,c12	<0,1	<0,1	19,9 ± 5,77	<0,1	<0,1	10,5 ± 2,56	<0,1	<0,1	10,2 ± 2,79
ΣSFA	35,2 ± 0,38^b	32,7 ± 2,95^b	51,1 ± 4,16^a	44,3 ± 2,21^b	45,8 ± 2,65^b	51,1 ± 1,36^a	26,1 ± 0,93^b	24,2 ± 1,46^b	35,4 ± 1,59^a
C14:0	4,30 ± 1,04 ^b	3,93 ± 0,35 ^b	5,43 ± 0,39 ^a	4,93 ± 0,41	5,03 ± 0,54	5,00 ± 0,65	1,07 ± 0,30 ^{a,b}	0,94 ± 0,19 ^b	1,45 ± 0,40 ^a
C16:0	24,2 ± 1,44 ^b	23,2 ± 1,72 ^b	31,5 ± 2,42 ^a	33,5 ± 1,71	34,1 ± 1,93	33,0 ± 0,84	10,1 ± 1,03 ^b	9,25 ± 0,67 ^b	12,5 ± 1,10 ^a
C18:0	6,39 ± 1,67 ^b	4,29 ± 0,96 ^b	11,6 ± 1,67 ^a	5,58 ± 0,62 ^b	5,87 ± 0,37 ^b	10,7 ± 0,42 ^a	14,7 ± 0,83 ^b	13,1 ± 0,65 ^c	18,8 ± 0,40 ^a
ΣMUFA	55,3 ± 7,00^a	41,5 ± 3,14^b	25,1 ± 2,25^c	48,8 ± 1,31^a	40,0 ± 1,48^b	33,4 ± 2,24^c	51,4 ± 2,92^a	42,2 ± 1,69^b	36,2 ± 1,72^c
C16:1 (n-7)	7,26 ± 2,44 ^a	7,67 ± 0,44 ^a	2,94 ± 0,42 ^b	11,9 ± 0,45 ^a	11,3 ± 0,83 ^a	6,76 ± 1,08 ^b	9,95 ± 1,15 ^a	8,49 ± 0,66 ^b	6,93 ± 0,48 ^c
C18:1 (n-9)	34,0 ± 1,74 ^a	24,0 ± 1,95 ^b	14,6 ± 1,44 ^c	24,5 ± 0,91 ^a	19,8 ± 1,09 ^b	19,0 ± 1,45 ^b	28,1 ± 0,60 ^a	23,0 ± 1,09 ^b	21,0 ± 0,84 ^c
C18:1 (n-7)	11,9 ± 2,61 ^a	8,11 ± 0,88 ^b	6,01 ± 0,61 ^b	10,8 ± 0,56 ^a	7,51 ± 0,46 ^b	6,20 ± 0,29 ^c	11,9 ± 1,41 ^a	9,16 ± 0,12 ^b	6,93 ± 0,22 ^c
C20:1 (n-9)	1,75 ± 0,38	1,48 ± 0,15	1,36 ± 0,25	0,84 ± 0,14	0,91 ± 0,20	1,02 ± 0,23	1,28 ± 0,23	1,38 ± 0,25	1,42 ± 0,42
ΣMUFA/ΣSFA	1,57 ± 0,18^a	1,27 ± 0,06^b	0,49 ± 0,02^c	1,10 ± 0,07^a	0,88 ± 0,08^b	0,65 ± 0,04^c	1,97 ± 0,17^a	1,74 ± 0,04^b	1,02 ± 0,01^c
ΣPUFA	2,60 ± 0,91^b	25,7 ± 5,76^a	23,8 ± 6,17^a	5,29 ± 1,00^b	12,3 ± 2,78^a	15,5 ± 2,94^a	22,5 ± 2,09^c	33,7 ± 3,11^a	28,4 ± 3,29^b
Σ(n-6)-PUFA	1,39 ± 0,45	1,86 ± 0,50	1,86 ± 0,47	3,94 ± 0,95	3,06 ± 0,92	3,66 ± 0,63	17,4 ± 1,51^a	12,8 ± 0,41^b	13,1 ± 0,71^b
C18:2 (n-6)	1,09 ± 0,08	0,87 ± 0,23	0,79 ± 0,17	1,44 ± 0,03	1,50 ± 0,05	2,09 ± 0,69	3,18 ± 1,15	2,35 ± 0,09	2,67 ± 0,16
C20:3 (n-6)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C20:4 (n-6)	0,09 ± 0,10	0,14 ± 0,10	0,26 ± 0,20	1,01 ± 0,13	0,94 ± 0,14	0,82 ± 0,12	5,95 ± 0,49	5,46 ± 0,30	5,59 ± 0,69
Σ(n-3)-PUFA	1,61 ± 0,36	1,96 ± 0,38	1,58 ± 0,25	0,97 ± 0,30^b	1,71 ± 0,32^a	1,25 ± 0,43^{ab}	4,21 ± 0,42	4,77 ± 0,37	4,26 ± 0,34
C18:3 (n-3)	0,28 ± 0,40	0,33 ± 0,06	0,46 ± 0,20	<0,1	0,03 ± 0,06	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C20:4 (n-3)	<0,1	0,42 ± 0,26	0,83 ± 0,10	0,12 ± 0,08 ^b	0,34 ± 0,18 ^a	0,33 ± 0,05 ^a	<0,1	0,62 ± 0,42	0,21 ± 0,18
C20:5 (n-3)	0,31 ± 0,36	<0,1	0,17 ± 0,17	0,24 ± 0,05	0,17 ± 0,01	0,25 ± 0,09	0,79 ± 0,12 ^b	0,56 ± 0,01 ^c	1,13 ± 0,15 ^a
C22:5 (n-3)	0,32 ± 0,42	<0,1	0,06 ± 0,12	<0,1	<0,1	<0,1	0,90 ± 0,23	0,77 ± 0,09	0,92 ± 0,06
C22:6 (n-3)	0,13 ± 0,26	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	2,37 ± 0,22	2,09 ± 0,25	1,96 ± 0,32

a,b,c: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05); C22:4 n-6, C22:5 n-6 <0,1; SFA: gesättigte Fettsäuren (saturated fatty acids), MUFA: einfachungesättigte Fettsäuren (monounsaturated fatty acids), PUFA: mehrfachungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids).

Tab. 13: (n-6)-PUFA und Quotienten von (n-6)-Fettsäuren in Phospholipidfraktionen von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 25µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA und 25µmol/l Linolsäure im Zellmedium

Phospholipidfraktion	Phosphatidylcholin			Phosphatidylethanolamin		
	Behandlung (n=4)	Kontrolle	Cis-9,trans-11 CLA	Trans-10,cis-12 CLA	Kontrolle	Cis-9,trans-11 CLA
Gewichtsprozentage [g/100g Fettsäuren]						
Cis-9,trans-11 CLA	<0,1	2,36 ± 0,29	<0,1	<0,1	4,32 ± 0,56 ^a	<0,1
Trans-10,cis-12 CLA	<0,1	<0,1	2,17 ± 0,90	<0,1	<0,1	2,48 ± 0,88 ^b
Σ(n-6)-PUFA	8,93 ± 0,27	8,79 ± 0,90	9,78 ± 1,27	21,4 ± 0,86 ^a	19,3 ± 0,60 ^b	19,6 ± 0,98 ^b
C18:2 (n-6)	5,44 ± 0,53 ^b	5,45 ± 0,31 ^b	7,58 ± 1,47 ^a	7,98 ± 0,58 ^b	7,54 ± 0,25 ^b	8,98 ± 0,42 ^a
C20:3 (n-6)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
C20:4 (n-6)	1,49 ± 0,13	1,46 ± 0,31	1,05 ± 0,26	6,91 ± 0,84 ^a	5,95 ± 0,43 ^{ab}	5,47 ± 0,83 ^b
[g/g]						
Δ6- und Δ5-Desaturierung						
C20:4 (n-6)/C18:2 (n-6)	0,28 ± 0,05 ^a	0,27 ± 0,05 ^a	0,14 ± 0,05 ^b	0,87 ± 0,17 ^a	0,79 ± 0,08 ^{ab}	0,61 ± 0,11 ^b

a,b: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05); PUFA: mehrfachungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids).

Tab. 14: (n-3)-PUFA und Quotienten von (n-3)-Fettsäuren in Phospholipidfraktionen von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 25µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA und 25µmol/l α-Linolensäure im Zellmedium

Phospholipidfraktion	Phosphatidylcholin			Phosphatidylethanolamin		
	Behandlung (n=4)	Kontrolle	Cis-9,trans-11 CLA	Trans-10,cis-12 CLA	Kontrolle	Cis-9,trans-11 CLA
Gewichtsprozentage [g/100g Fettsäuren]						
Cis-9,trans-11 CLA	<0,1	2,72 ± 0,33	<0,1	<0,1	4,30 ± 0,44 ^a	<0,1
Trans-10,cis-12 CLA	<0,1	<0,1	2,31 ± 1,10	<0,1	<0,1	2,50 ± 1,03 ^b
Σ(n-3)-PUFA	3,93 ± 0,87	4,13 ± 0,15	3,87 ± 0,18	8,56 ± 1,34	9,81 ± 0,33	9,60 ± 1,00
C18:3 (n-3)	0,57 ± 0,16 ^b	0,69 ± 0,06 ^b	1,46 ± 0,42 ^a	1,02 ± 0,28 ^b	1,13 ± 0,24 ^b	2,22 ± 0,29 ^a
C20:4 (n-3)	0,50 ± 0,08 ^a	0,47 ± 0,02 ^a	0,37 ± 0,03 ^b	0,27 ± 0,12	0,38 ± 0,05	0,32 ± 0,03
C20:5 (n-3)	1,47 ± 0,33 ^a	1,50 ± 0,30 ^a	0,79 ± 0,07 ^b	3,62 ± 0,58 ^{ab}	3,95 ± 0,23 ^a	2,99 ± 0,52 ^b
[g/g]						
Δ6- und Δ5-Desaturierung						
C20:5 (n-3)/C18:3 (n-3)	2,64 ± 0,62 ^a	2,18 ± 0,56 ^a	0,57 ± 0,13 ^b	3,70 ± 0,93 ^a	3,65 ± 0,99 ^a	1,37 ± 0,34 ^b

a,b: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05);
PUFA: mehrfachungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids).

Tab. 15: (n-6)-PUFA und Quotienten von (n-6)-Fettsäuren in Phospholipidfraktionen von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 25µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA und 25µmol/l Arachidonsäure im Zellmedium

Phospholipidfraktion	Phosphatidylcholin			Phosphatidylethanolamin		
	Behandlung (n=6)	Kontrolle	Cis-9,trans-11 CLA	Trans-10,cis-12 CLA	Kontrolle	Cis-9,trans-11 CLA
Gewichtsprozentage [g/100g Fettsäuren]						
Cis-9,trans-11 CLA	<0,1	2,80 ± 0,42	<0,1	<0,1	3,48 ± 0,27 ^a	<0,1
Trans-10,cis-12 CLA	<0,1	<0,1	2,50 ± 0,27	<0,1	<0,1	2,24 ± 0,38 ^b
Σ(n-6)-PUFA	8,68 ± 1,15	8,74 ± 1,12	8,68 ± 0,96	21,9 ± 0,96	20,8 ± 1,19	21,5 ± 1,34
C20:4 (n-6)	4,98 ± 0,68	4,80 ± 0,73	4,60 ± 0,72	15,2 ± 1,49	14,2 ± 1,06	14,8 ± 1,27
C22:4 (n-6)	0,20 ± 0,05	0,20 ± 0,04	0,25 ± 0,07	0,27 ± 0,16	0,28 ± 0,15	0,39 ± 0,11
C22:5 (n-6)	0,05 ± 0,07	0,07 ± 0,08	0,09 ± 0,19	0,11 ± 0,12	0,07 ± 0,10	0,04 ± 0,07
[g/g]						
Δ4-Desaturierung						
C22:5 (n-6)/C22:4 (n-6)	0,19 ± 0,30	0,35 ± 0,42	0,30 ± 0,54	0,32 ± 0,37	0,21 ± 0,32	0,09 ± 0,14

a,b,c: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05);

PUFA: mehrfachungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids).

Tab. 16: (n-3)-PUFA und Quotienten von (n-3)-Fettsäuren in Phospholipidfraktionen von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 25µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 25µmol/l trans-10,cis-12 CLA und 25µmol/l Eicosapentaensäure im Zellmedium

Phospholipidfraktion	Phosphatidylcholin			Phosphatidylethanolamin		
	Kontrolle	Cis-9,trans-11 CLA	Trans-10,cis-12 CLA	Kontrolle	Cis-9,trans-11 CLA	Trans-10,cis-12 CLA
Behandlung (n=6)						
Gewichtsprozentage [g/100g Fettsäuren]						
Cis-9,trans-11 CLA	<0,1	2,88 ± 0,50	<0,1	<0,1	3,63 ± 0,49 ^a	<0,1
Trans-10,cis-12 CLA	<0,1	<0,1	2,55 ± 0,32	<0,1	0,1	2,12 ± 0,29 ^b
Σ(n-3)-PUFA	5,77 ± 0,80	5,79 ± 0,84	5,50 ± 0,63	14,1 ± 1,66	14,7 ± 2,95	14,6 ± 1,31
C20:5 (n-3)	3,09 ± 0,70	3,11 ± 0,70	2,97 ± 0,72	7,94 ± 1,53	7,44 ± 1,32	8,38 ± 1,62
C22:5 (n-3)	0,92 ± 0,29	0,92 ± 0,19	1,00 ± 0,08	2,00 ± 0,50	2,21 ± 0,42	2,62 ± 0,43
C22:6 (n-3)	1,29 ± 0,19	1,26 ± 0,18	1,13 ± 0,19	3,67 ± 0,72	3,70 ± 0,70	3,21 ± 0,54
[g/g]						
Δ4-Desaturierung						
C22:6 (n-3)/C22:5 (n-3)	1,63 ± 0,26 ^a	1,56 ± 0,39 ^a	1,21 ± 0,16 ^b	1,93 ± 0,56 ^a	1,74 ± 0,49 ^{ab}	1,24 ± 0,22 ^b

a,b,c: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05);

PUFA: mehrfachungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids).

Tab. 17: relative mRNA-Konzentration von $\Delta 9$ -, $\Delta 6$ - und $\Delta 5$ -Desaturasen von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 10 μ mol/l und 100 μ mol/l cis-9,trans-11 CLA oder 10 μ mol/l und 100 μ mol/l trans-10,cis-12 CLA im Zellmedium

Behandlung (n=5)	Cis-9,trans-11 CLA			Trans-10,cis-12 CLA	
	Kontrolle	10	100	10	100
[%/GAPDH]					
$\Delta 9$-Desaturase mRNA	28,2 \pm 7,64	29,8 \pm 5,65	20,2 \pm 7,53	34,6 \pm 8,29	34,9 \pm 10,3
$\Delta 6$-Desaturase mRNA	0,95 \pm 0,86	1,70 \pm 1,41	1,16 \pm 0,37	1,44 \pm 1,12	1,74 \pm 2,36
$\Delta 5$-Desaturase mRNA	6,68 \pm 2,93 ^a	3,85 \pm 0,88 ^{bc}	2,67 \pm 0,73 ^c	4,85 \pm 1,58 ^{ab}	3,87 \pm 0,91 ^{bc}

a,b,c: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05); mRNA: Boten-Ribonukleinsäure (Messenger-RNA), GAPDH: Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase.

3.1.2.5 Konzentration von Triglyceriden und Cholesterin

Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen nach Inkubation von Hep G2-Zellen mit cis-9,trans-11 CLA oder trans-10,cis-12 CLA sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tab. 18: Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in Hep G2-Zellen und im Zellmedium nach 24stündiger Inkubation mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA und in HBSS nach zusätzlich 1stündiger Inkubation

Behandlung (n=4)	Kontrolle	Cis-9,trans-11 CLA	Trans-10,cis-12 CLA
Triglyceride [µg/2x10 ⁶ Zellen]			
Hep G2-Zellen	21,3 ± 2,77 ^b	29,3 ± 14,3 ^{ab}	36,2 ± 5,58 ^a
Medium	158 ± 66,9 ^b	264 ± 87,6 ^{ab}	295 ± 61,5 ^a
HBSS	2,37 ± 1,02 ^b	3,46 ± 1,80 ^{ab}	4,62 ± 0,97 ^a
Cholesterin [µg/2x10 ⁶ Zellen]			
Hep G2-Zellen	5,90 ± 3,31	8,15 ± 2,83	7,48 ± 3,52
Medium	51,2 ± 25,7	61,6 ± 27,3	54,1 ± 20,0
HBSS	3,73 ± 1,64	4,56 ± 1,80	4,56 ± 2,51

a,b: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05).

Nach 24stündiger Inkubation mit 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA war die Triglyceridkonzentration in Hep G2-Zellen, im Zellmedium und in HBSS höher als bei den Kontrollzellen. Eine 24h Behandlung von Hep G2-Zellen mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA zeigte keinen Unterschied in der Konzentration an Triglyceriden im Vergleich mit trans-10,cis-12 CLA und mit der Kontrollgruppe.

Cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA in der Konzentration von 100µmol/l hatten nach 24h Inkubationszeit keinen Effekt auf die Cholesterinkonzentration von Hep G2-Zellen.

3.1.2.6 Aktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Fettsäure-Synthetase

Die Aktivität von G6PDH und FsS im Cytosol von Hep G2-Zellen nach 24h Inkubationszeit mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA ist in Tabelle 19 dargestellt.

Die Aktivität der G6PDH war im Cytosol von Hep G2-Zellen durch 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die Aktivität der FsS war nach Inkubation mit trans-10,cis-12 CLA um den Faktor 3 höher als die Aktivität in den beiden

anderen Gruppen. Nach Inkubation der Zellen mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA unterschied sich die Aktivität von G6PDH nicht von den Zellen, die mit trans-10,cis-12 CLA inkubiert wurden und nicht von den Kontrollzellen.

Tab. 19: Aktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Fettsäure-Synthetase im Cytosol von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA

Behandlung (n=4)	Kontrolle	Cis-9,trans-11 CLA	Trans-10,cis-12 CLA
[nmol NADPH/H ⁺ x mg ⁻¹ Protein x min ⁻¹]			
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	108 ± 26,0 ^b	137 ± 41,9 ^{ab}	161 ± 16,2 ^a
Fettsäure-Synthetase	0,56 ± 0,24 ^b	0,62 ± 0,31 ^b	1,71 ± 0,72 ^a

a,b: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05).

3.1.3 Einfluss von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA auf die Bildung von Eicosanoiden von Hep G2-Zellkulturen

3.1.3.1 Eicosanoidkonzentrationen

In einem weiteren Zellversuch wurde untersucht, ob nach 0,5h und 24h ein Einfluss von 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA auf die Konzentration an 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, PGF_{2α} und PGE₂ im Überstand (HBSS) von Hep G2-Zellen besteht.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 20 (Seite 60) und 21 (Seite 61) dargestellt.

Wie in den Tabellen 20 und 21 dargestellt, zeigte sich nach Stimulierung von Hep G2-Zellen mit 10µmol/l Ca²⁺-Ionophore A23187 innerhalb einer Behandlungsgruppe keine Erhöhung der 6-keto-PGF_{1α}-, TXB₂-, PGF_{2α}- und PGE₂-Konzentrationen nach 0,5h und 24h Inkubationszeit. Nach Stimulierung mit 25µmol/l Arachidonsäure oder 25µmol/l Arachidonsäure und 10µmol/l Ca²⁺-Ionophore A23187 konnte ein Anstieg der Eicosanoidkonzentrationen im Zellüberstand (HBSS) von Hep G2-Zellen nach 0,5- und 24stündiger Inkubation bestimmt werden.

Nach 0,5h Inkubationszeit zeichnete sich durch 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA eine um den Faktor 2 höhere PGF_{2α}-Konzentration ab als in der Kontrolle. 6-keto-PGF_{1α}- und TXB₂-Konzentrationen unterschieden sich nach 0,5h Inkubation mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA nicht von den Kontrollzellen.

Nach 24h Inkubationszeit war die 6-keto-PGF_{1α}- und PGF_{2α}-Konzentration durch 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA um den Faktor 2 erhöht. Die Konzentrationen von TXB₂ und

PGE₂ wiesen keine Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen auf. Der Quotient von 6-keto-PGF_{1α}/TXB₂ war nach 24h Inkubation mit trans-10,cis-12 CLA (MW ± SD; 3,09 ± 1,21) signifikant um den Faktor 2 höher als nach Inkubation mit cis-9,trans-11 CLA (1,46 ± 0,71) oder ohne CLA (1,48 ± 0,66).

3.1.3.2 sPLA₂-Aktivität

Die Ergebnisse der Analyse der sPLA₂-Aktivität in HBSS und in Hep G2-Zellmikrosomen nach 24stündiger Inkubation von Hep G2-Zellen mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA sind in Tabelle 22 dargestellt.

Im Zellüberstand (HBSS) und in den Mikrosomen zeigte sich nach 24stündiger Inkubation kein Effekt auf die sPLA₂-Aktivität, sowohl nicht durch cis-9,trans-11 CLA als auch nicht durch trans-10,cis-12 CLA.

Tab. 22: sPLA₂-Aktivität im Überstand (HBSS) und in Mikrosomen von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 100µmol/l trans-10, cis-12 CLA

Behandlung (n=5)	Kontrolle	Cis-9,trans-11 CLA	Trans-10,cis-12 CLA
[nmol/min/ml]			
HBSS	0,39 ± 0,18	0,42 ± 0,23	0,51 ± 0,20
[nmol/min/mg Protein]			
Mikrosomen	4,66 ± 1,65	3,69 ± 1,44	3,41 ± 0,69

sPLA₂: sekretorische Phospholipase A₂.

3.1.3.3 mRNA-Konzentration von Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2

Im Vergleich zur Kontrolle (MW ± SD; 0,18 ± 0,09 %/GAPDH) konnten nach 24stündiger Inkubation von Hep G2-Zellen mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA (0,10 ± 0,04 %/GAPDH) oder 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA (0,08 ± 0,06 %/GAPDH) keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Konzentration der COX-1 festgestellt werden. Die Detektierung der Amplifizierung von COX-2-cDNA von Hep G2-Zellen in der real-time PCR lag bei den gewählten methodischen Bedingungen unter der Nachweisgrenze.

Tab. 20: Konzentration an 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, PGF_{2α} im Überstand (HBSS) von Hep G2-Zellen nach 0,5stündiger Inkubation mit 100μmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 100μmol/l trans-10,cis-12 CLA im Zellmedium und Stimulation mit 10μmol/l Ca²⁺-Ionophore und/oder 25μmol/l Arachidonsäure

Behandlung (n=5)	Kontrolle	Cis-9,trans-11 CLA	Trans-10,cis-12 CLA
[pg/ml]			
6-keto-PGF_{1α}			
Basal	10,4 ± 3,76	11,4 ± 5,06	17,1 ± 7,38
+ Ca ²⁺ -Ionophore	15,6 ± 8,21	20,1 ± 13,7	20,3 ± 8,01
+ Arachidonsäure	119 ± 23,6	142 ± 34,4	134 ± 42,6
+ Ca ²⁺ -Ionophore + Arachidonsäure	143 ± 24,3	133 ± 18,0	130 ± 43,5
TXB₂			
Basal	9,51 ± 1,12	13,1 ± 5,51	11,2 ± 1,92
+ Ca ²⁺ -Ionophore	11,9 ± 1,43	13,0 ± 2,57	14,9 ± 2,49
+ Arachidonsäure	27,0 ± 3,02	38,4 ± 9,87	41,1 ± 11,2
+ Ca ²⁺ -Ionophore + Arachidonsäure	42,5 ± 16,5	43,2 ± 16,4	35,0 ± 6,02
PGF_{2α}			
Basal	10,0 ± 4,32 ^b	12,4 ± 6,55 ^b	23,5 ± 9,66 ^a
+ Ca ²⁺ -Ionophore	14,6 ± 4,30 ^b	14,1 ± 5,38 ^b	26,3 ± 11,4 ^a
+ Arachidonsäure	374 ± 145	367 ± 134	402 ± 109
+ Ca ²⁺ -Ionophore + Arachidonsäure	382 ± 126	368 ± 111	392 ± 109

a,b: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05);

6-keto-PGF_{1α}: 6-keto-Prostaglandin F_{1α}, TXB₂: Thromboxan B₂, PGF_{2α}: Prostaglandin F_{2α}.

Tab. 21: Konzentration an 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, PGF_{2α}, PGE₂ im Überstand (HBSS) von Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 100μmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 100μmol/l trans-10,cis-12 CLA im Zellmedium und Stimulation mit 10μmol/l Ca²⁺-Ionophore und/oder 25μmol/l Arachidonsäure

Behandlung (n=5)	Kontrolle	Cis-9,trans-11 CLA	Trans-10,cis-12 CLA
[pg/ml]			
6-keto-PGF_{1α}			
Basal	9,64 ± 3,95 ^b	9,92 ± 4,71 ^b	24,1 ± 10,7 ^a
+ Ca ²⁺ -Ionophore	7,88 ± 3,78 ^b	6,92 ± 2,75 ^b	19,1 ± 4,40 ^a
+ Arachidonsäure	25,9 ± 14,5	29,9 ± 17,1	42,1 ± 17,8
+ Ca ²⁺ -Ionophore + Arachidonsäure	31,7 ± 18,0	39,0 ± 20,6	52,3 ± 23,6
TXB₂			
Basal	8,29 ± 3,60	8,74 ± 2,32	8,44 ± 1,56
+ Ca ²⁺ -Ionophore	9,38 ± 3,21	9,68 ± 2,47	11,3 ± 3,28
+ Arachidonsäure	16,9 ± 9,98	19,8 ± 11,2	20,4 ± 10,4
+ Ca ²⁺ -Ionophore + Arachidonsäure	20,6 ± 9,43	29,4 ± 9,40	30,5 ± 5,85
PGF_{2α}			
Basal	19,4 ± 8,76 ^b	16,5 ± 7,14 ^b	39,4 ± 11,5 ^a
+ Ca ²⁺ -Ionophore	13,9 ± 4,58 ^b	15,7 ± 8,36 ^b	40,3 ± 13,7 ^a
+ Arachidonsäure	318 ± 98,0	357 ± 109	324 ± 79,1
+ Ca ²⁺ -Ionophore + Arachidonsäure	343 ± 101	419 ± 106	425 ± 84,4
PGE₂			
Basal	17,6 ± 4,66	15,5 ± 0,42	16,4 ± 1,54
+ Ca ²⁺ -Ionophore	27,6 ± 6,96	25,1 ± 5,63	27,8 ± 8,65
+ Arachidonsäure	640 ± 215	660 ± 170	640 ± 180
+ Ca ²⁺ -Ionophore + Arachidonsäure	604 ± 209	701 ± 55,8	714 ± 109

a,b: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05);

6-keto-PGF_{1α}: 6-keto-Prostaglandin F_{1α}, TXB₂: Thromboxan B₂, PGF_{2α}: Prostaglandin F_{2α}, PGE₂: Prostaglandin E₂.

3.2 Studie zur Wirkung eines Gemisches konjugierter Linolsäuren (cis-9,trans-11 CLA und trans- 10,cis-12 CLA) auf den Lipidstoffwechsel und auf die Bildung von Eicosanoiden am Modelltier Ratte

3.2.1 Lebendmassezunahme und Futterraufnahme

Die Lebendmasse der Tiere am ersten und jeweils letzten Versuchstag, die mittlere tägliche Lebendmassezunahme und die mittlere tägliche Futterraufnahme der Tiere sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Die Lebendmassezunahme der Ratten war unabhängig von der Art des eingesetzten Diätfettes.

Da die Tiere restriktiv gefüttert wurden, war die durchschnittliche tägliche Futterraufnahme im Versuchszeitraum bei allen Tieren, deren Diät CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielt, identisch und betrug 13,2g pro Tier und Tag. Die durchschnittliche tägliche Futterraufnahme war bei allen Tieren, deren Diäten CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ und in der 5. Woche zusätzlich LÖ enthielt, identisch und betrug 14,4g pro Tier und Tag.

Tab. 23: Lebendmassezunahme und Futterraufnahme von Ratten während 1. und 2. Fütterungsperiode

Diätfett	CLA	SBÖ	HÖ-SBÖ
Lebendmasse Tag 1 [g]	86,3 ± 5,09	86,8 ± 4,31	87,0 ± 4,89
Lebendmasse Tag 28 [g] (Ende der 1. Fütterungsperiode)	204 ± 17,2	217 ± 6,06	211 ± 8,95
Lebendmasse Tag 35 [g] (Ende der 2. Fütterungsperiode)	275 ± 5,61	278 ± 8,93	274 ± 9,91
Mittlere Lebendmassezunahme Tag 1 bis 28 [g/Tag]	4,21 ± 0,37	4,60 ± 0,04	4,34 ± 0,47
Mittlere Lebendmassezunahme Tag 1 bis 35 [g/Tag]	5,41 ± 0,18	5,57 ± 0,37	5,37 ± 0,26
Mittlere Futterraufnahme Tag 1 bis 28 [g/Tier/Tag]	13,2 ± 0,12	13,2 ± 0,09	13,2 ± 0,09
Mittlere Futterraufnahme Tag 1 bis 35 [g/Tier/Tag]	14,5 ± 0,02	14,4 ± 0,01	14,4 ± 0,06

3.2.2 Lebergewicht

Das Lebergewicht von Ratten, deren Diät CLA enthielt, war mit $10,9 \pm 0,83$ g (MW ± SD) signifikant höher als von Ratten, deren Diät SBÖ ($9,44 \pm 0,77$ g) oder HÖ-SBÖ ($8,91 \pm 0,48$ g) enthielt.

3.2.3 Einfluss des CLA-Gemisches auf den Lipidstoffwechsel von Ratten

3.2.3.1 Anteile der im CLA-Gemisch enthaltenen CLA-Isomere an den Gesamtfettsäuren der Lipide und Lipidfraktionen in der Leber

In Tabelle 24 sind die Anteile von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA an den Gesamtfettsäuren der Gesamtlipide und Lipidfraktionen in der Leber dargestellt.

In NL zeigten sich die höchsten Anteile beider CLA-Isomere. Die Anteile der CLA-Isomere in den Phospholipiden erreichten die Hälfte bis zwei Drittel der in NL. In den Gesamtlipiden, in NL und PE war der Anteil von cis-9,trans-11 CLA an den Gesamtfettsäuren höher als der Anteil von trans-10,cis-12 CLA. In PC zeigte sich ein höherer Anteil des trans-10,cis-12 CLA-Isomers als des cis-9,trans-11 CLA-Isomers an den Gesamtfettsäuren.

Tab. 24: Anteile von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA an den Gesamtfettsäuren der Gesamtlipide und Lipidfraktionen in der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ

Diätfett	CLA+LÖ	SBÖ+LÖ	HÖ-SBÖ+LÖ
Gewichtsprozentage [g/100g Fettsäuren]			
Gesamtlipide			
Cis-9,trans-11 CLA	2,42 ± 0,74 ^a	<0,1	<0,1
Trans-10,cis-12 CLA	1,46 ± 0,31 ^b	<0,1	<0,1
Neutrallipide			
Cis-9,trans-11 CLA	5,71 ± 0,42 ^a	<0,1	<0,1
Trans-10,cis-12 CLA	2,67 ± 0,23 ^b	<0,1	<0,1
Phosphatidylcholin			
Cis-9,trans-11 CLA	0,56 ± 0,07 ^b	<0,1	<0,1
Trans-10,cis-12 CLA	0,82 ± 0,12 ^a	<0,1	<0,1
Phosphatidylethanolamin			
Cis-9,trans-11 CLA	1,69 ± 0,39 ^a	<0,1	<0,1
Trans-10,cis-12 CLA	1,13 ± 0,18 ^b	<0,1	<0,1

a,b: unterschiedliche hochgestellte Buchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den CLA-Isomeren im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05).

3.2.3.2 Fettsäurezusammensetzung von Gesamtlipiden in der Leber

Tabelle 25 (Seite 68) zeigt die Fettsäurezusammensetzung von Gesamtlipiden in der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, vor und nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ.

Nach der 1. Fütterungsperiode waren die Gewichtsprozent der MUFA, der Quotient von MUFA/SFA und die Gewichtsprozent der (n-3)-PUFA in der Leber der Tiere, deren Diät CLA enthielt, signifikant höher und die der PUFA signifikant geringer als in den Lebergesamtlipiden der Tiere, deren Diät SBÖ enthielt, unterschieden sich allerdings nicht von denen, deren Diät HÖ-SBÖ enthielt.

Die Gewichtsprozent der (n-6)-PUFA, einschließlich C20:4 (n-6), in den Lebergesamtlipiden der Tiere, deren Diät CLA enthielt, waren am geringsten und unterschieden sich signifikant von den Tieren, deren Diät SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielt.

Bei Fütterung mit CLA war der Quotient von C20:3 (n-9)/C20:4 (n-6) in den Lebergesamtlipiden der Ratten höher als in Ratten, deren Diät SBÖ enthielt, unterschied sich aber nicht von den Tieren, deren Diät HÖ-SBÖ enthielt.

Nachdem die Diäten mit LÖ supplementiert wurden, zeigten sich in den Lebergesamtlipiden bei allen Tieren der drei Diätgruppen höhere Gewichtsprozent an (n-3)-PUFA und geringere an (n-6)-PUFA. In den Lebergesamtlipiden der Tiere, deren Diät CLA enthielt, waren die Gewichtsprozent an (n-3)-PUFA um das Doppelte höher als an (n-6)-PUFA. Die Gewichtsprozent an C18:2 (n-6), C20:4 (n-6) und C22:4 (n-6) waren in dieser Gruppe signifikant geringer und die Gewichtsprozent an C18:3 (n-3), C22:5 (n-3) und C22:6 (n-3) signifikant höher als bei Fütterung mit SBÖ oder HÖ-SBÖ. Ratten, deren Diät SBÖ enthielt, wiesen in den Lebergesamtlipiden höhere Gewichtsprozent an (n-6)-PUFA als an (n-3)-PUFA auf. Ratten, die HÖ-SBÖ in ihrer Diät enthielten, hatten gleich hohe Gewichtsprozent an (n-3)- und (n-6)-PUFA in den Lebergesamtlipiden.

Ratten, deren Diät CLA enthielt, hatten höhere Anteile an SFA an den Gesamtfettsäuren als Ratten, deren Diät SBÖ enthielt, unterschieden sich aber nicht von denen, die HÖ-SBÖ in ihrer Diät hatten. Ratten, deren Diät HÖ-SBÖ enthielt, zeigten signifikant höhere Anteile an MUFA an den Gesamtfettsäuren und einen höheren Quotienten von MUFA/SFA als bei Fütterung mit CLA oder SBÖ.

Der Quotient von C20:3 (n-9)/C20:4 (n-6) war in den Lebergesamtlipiden nach Fütterung mit CLA am höchsten und bei den Tieren, deren Diät SBÖ enthielt, am geringsten.

3.2.3.3 Fettsäurezusammensetzung von Lipidfraktionen in der Leber

Neben der Fettsäureanalytik in den Lebergesamtlipiden wurden die Fettsäurezusammensetzung in den Leberlipidfraktionen NL (Tabelle 26, Seite 69), PC (Tabelle 27, Seite 70) und PE (Tabelle 28, Seite 71) der Leber mittels GC quantitativ bestimmt. In den Tabellen 29

(Seite 72) und 30 (Seite 73) sind Quotienten und Summen von (n-3)- und (n-6)-Fettsäuren in PC und PE der Leber dargestellt.

Nach der 1. Fütterungsperiode hatten Ratten, deren Diät CLA enthielt, in NL höhere Gewichtsprozentage an SFA als Ratten, deren Diät SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielt. Bei Fütterung mit CLA waren in NL die Gewichtsprozentage an MUFA höher und die der PUFA geringer als bei Fütterung mit SBÖ, unterschieden sich allerdings nicht von den Tieren, die HÖ-SBÖ in ihrer Diät hatten. Die Gewichtsprozentage an (n-6)-PUFA waren in NL signifikant geringer bei Fütterung mit CLA als bei Fütterung mit SBÖ oder HÖ-SBÖ.

In PE waren die Gewichtsprozentage an MUFA und der Quotient von MUFA/SFA bei Fütterung mit CLA höher als bei Fütterung mit SBÖ, unterschieden sich aber nicht von den Tieren, deren Diät HÖ-SBÖ enthielt. In PC zeigten Ratten, deren Diät CLA enthielt, die geringsten Gewichtsprozentage an C20:4 (n-6) und (n-6)-PUFA; Ratten, deren Diät SBÖ enthielt, wiesen die höchsten Gewichtsprozentage an C20:4 (n-6) und (n-6)-PUFA in PC auf. Die Gewichtsprozentage an C18:2 (n-6) in PC und PE waren bei Fütterung mit CLA geringer als bei Fütterung mit SBÖ, unterschieden sich aber nicht von den Werten der Tiere, deren Diät HÖ-SBÖ enthielt. Ratten, deren Diät CLA enthielt, zeigten höhere Gewichtsprozentage an C22:6 (n-3) und (n-3)-PUFA in PC als Ratten, die SBÖ in ihrer Diät hatten. Die Gewichtsprozentage an Minor-(n-3)-Fettsäuren, wie C18:3 (n-3), C20:5 (n-3) und C22:5 (n-3), waren in PC aller drei Gruppen gleich hoch. Die Gewichtsprozentage an (n-3)-PUFA in PE unterschieden sich nicht zwischen den Diätgruppen.

Ratten, deren Diät CLA enthielt, hatten in PC und PE höhere Quotienten von (n-3)-PUFA/(n-6)-PUFA und von C20:5 (n-3)/C20:4 (n-6) als bei Fütterung mit SBÖ oder HÖ-SBÖ. Bei Fütterung mit CLA waren die Gewichtsprozentage an C20-PUFA [C20:3 (n-6) + C20:4 (n-6) + C20:5 (n-3)] in PC geringer als bei Fütterung mit SBÖ oder HÖ-SBÖ und geringer in PE als bei Fütterung mit SBÖ. Die Desaturierungsprodukte der α -Linolensäure [C20:5 (n-3) + C22:5 (n-3) + C22:6 (n-3)] in PC waren bei Fütterung mit CLA höher als bei Fütterung mit SBÖ. In PE unterschieden sich die Desaturierungsprodukte der α -Linolensäure nicht zwischen den Gruppen. Der Quotient von C20:4 (n-6)/C18:2 (n-6) in PC, als Indikator der $\Delta 6$ - und $\Delta 5$ -Desaturierung der Linolensäure, war nach Fütterung mit CLA am geringsten.

Der Quotient C20:3 (n-9)/C20:4 (n-6) war in NL und PE der Leber der Tiere, deren Diät CLA enthielt höher als bei denen, die in ihrer Diät SBÖ hatten; unterschied sich jedoch nicht von den Tieren, deren Diät HÖ-SBÖ enthielt. In PC war der Quotient C20:3 (n-9)/C20:4 (n-6) bei Fütterung mit CLA am höchsten und bei den Tieren, deren Diät SBÖ enthielt, am geringsten.

In NL der CLA-Gruppe führte die LÖ-Supplementierung der Diät zu höheren Gewichtsprozenten an (n-3)-PUFA und geringeren an MUFA. In NL der SBÖ- und HÖ-SBÖ-Gruppe führte die LÖ-Supplementierung ebenfalls zu höheren Gewichtsprozenten an (n-3)-PUFA, aber zu geringeren an (n-6)-PUFA. In NL hatten Ratten, deren Diät CLA enthielt, die höchsten Gewichtsprozentage an (n-3)-PUFA, deren Diät SBÖ enthielt, die höchsten Gewichtsprozentage an (n-6)-PUFA und deren Diät HÖ-SBÖ enthielt, die höchsten Gewichtsprozentage an MUFA. Der Quotient C20:3 (n-9)/C20:4 (n-6) war in NL der Leber der Tiere, deren Diät CLA enthielt höher als bei denen, die in ihrer Diät SBÖ hatten; unterschied sich jedoch nicht von den Tieren, deren Diät HÖ-SBÖ enthielt.

In PC und PE führte die Supplementierung der Diäten mit LÖ zu höheren Gewichtsprozenten an (n-3)-PUFA und geringeren Gewichtsprozenten an (n-6)-PUFA bei allen drei Behandlungsgruppen. Die Gewichtsprozentage an C20:4 (n-6), C22:4 (n-6) und C22:5 (n-6) wurden durch die LÖ-Supplementierung verringert, während die Gewichtsprozentage an C18:2 (n-6) und C20:3 (n-6) zunahm. Die Abnahme der Gewichtsprozentage an (n-6)-PUFA und C20:4 (n-6) war durch LÖ-Supplementierung bei Fütterung mit CLA oder HÖ-SBÖ stärker ausgeprägt als bei Fütterung mit SBÖ. Ratten, deren Diät CLA enthielt, hatten die höchsten Gewichtsprozentage an (n-3)-PUFA in PC und PE und Ratten, deren Diät SBÖ enthielt, die geringsten Gewichtsprozentage an (n-3)-PUFA. Die Gewichtsprozentage an (n-3)-PUFA in PC und PE von den Tieren, deren Diät HÖ-SBÖ enthielt, waren geringer als bei Fütterung mit CLA. In PC und PE zeigten sich Unterschiede im Fettsäuremuster einzelner (n-3)-PUFA zwischen den drei Diätgruppen. Ratten, deren Diät CLA enthielt, hatten höhere Gewichtsprozentage an C22:6 (n-3) als an C20:5 (n-3), wobei nach Fütterung mit SBÖ oder HÖ-SBÖ die Gewichtsprozentage an C20:5 (n-3) und C22:6 (n-3) in PC und PE relativ gleich hoch waren.

Ratten, deren Diät CLA enthielt, hatten einen höheren Quotienten von (n-3)-PUFA/(n-6)-PUFA und von C20:5 (n-3)/C20:4 (n-6) in PC und PE sowie höhere Gewichtsprozentage an Desaturierungsprodukten der α -Linolensäure [C20:5 (n-3) + C22:5 (n-3) + C22:6 (n-3)] in PC als Ratten, deren Diät SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielt. Der Quotient von [C22:5 (n-3) + C22:6 (n-3)]/C20:5 (n-3) und der Quotient von C22:6 (n-3)/[C20:5 (n-3) + C22:5 (n-3)], als Indikatoren der Δ^4 -Desaturierung, war in PC und PE bei Fütterung mit CLA am höchsten und bei Fütterung mit HÖ-SBÖ am geringsten. Die Gewichtsprozentage der C20-PUFA [C20:3 (n-6) + C20:4 (n-6) + C20:5 (n-3)] und der Quotient von C20:4 (n-6)/C18:2 (n-6), als Indikator der Δ^6 - und Δ^5 -Desaturierung der Linolsäure, waren in PC und PE von Ratten, deren Diät CLA enthielt, am geringsten. Ratten, deren Diät CLA enthielt, hatten einen höheren

Quotienten von C20:5 (n-3)/C18:3 (n-3), als Indikator der Δ 6- und Δ 5-Desaturierung der α -Linolensäure, in PC als Ratten, deren Diät SBÖ enthielt.

Nach Fütterung mit CLA waren die Gewichtprozente an SFA in PC und PE höher als bei Fütterung mit SBÖ oder HÖ-SBÖ. Die Gewichtprozente an MUFA und der Quotient von MUFA/SFA in PC und PE waren bei Fütterung mit HÖ-SBÖ am höchsten und unterschieden sich nicht zwischen Ratten, deren Diät CLA oder SBÖ enthielt.

In PC und PE war der Quotient C20:3 (n-9)/C20:4 (n-6) nach Fütterung mit CLA am höchsten und bei den Tieren, deren Diät SBÖ enthielt am geringsten.

3.2.3.4 mRNA-Konzentration von Δ 9-, Δ 6- und Δ 5-Desaturasen in der Leber

Die Ergebnisse sind in Tabelle 31 dargestellt.

Die relative mRNA-Konzentration der Δ 9-Desaturase in der Leber war unabhängig von der Art des eingesetzten Diätfettes. In der Leber führte die Fütterung von CLA zu einer um den Faktor 2 höheren relativen mRNA-Konzentration der Δ 6-Desaturase als bei Fütterung mit SBÖ oder HÖ-SBÖ. Die relative mRNA-Konzentration der Δ 5-Desaturase war in der Leber der Tiere, deren Diät CLA enthielt, geringer als bei Ratten, deren Diät SBÖ enthielt.

Tab. 31: relative mRNA-Konzentration der Δ 9-, Δ 6- und Δ 5-Desaturasen in der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ

Diätfett	CLA+LÖ	SBÖ+LÖ	HÖ-SBÖ+LÖ
[%/GAPDH]			
Δ 9-Desaturase mRNA	1,55 \pm 0,78	1,01 \pm 0,44	1,22 \pm 0,58
Δ 6-Desaturase mRNA	0,53 \pm 0,18 ^a	0,20 \pm 0,08 ^b	0,22 \pm 0,06 ^b
Δ 5-Desaturase mRNA	0,49 \pm 0,22 ^b	0,85 \pm 0,19 ^a	0,59 \pm 0,08 ^b

a,b: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test ($P < 0,05$); mRNA: Boten-Ribonukleinsäure (Messenger-RNA), GAPDH: Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase.

Tab. 25: Fettsäurezusammensetzung [Gewichtsprozente: g/100g Fettsäuren] von Gesamtlipiden in der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, vor und nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ

Diätfett	CLA	CLA+LÖ	SBÖ	SBÖ+LÖ	HÖ-SBÖ	HÖ-SBÖ+LÖ
ΣSFA	39,7 ± 2,40	41,4 ± 2,32^A	38,0 ± 1,50	39,5 ± 1,09^B	38,5 ± 1,15	40,0 ± 0,52^{AB}
C14:0	0,76 ± 0,20	0,46 ± 0,15 ^A	0,52 ± 0,10	0,33 ± 0,12 ^B	0,61 ± 0,06	0,35 ± 0,08 ^{AB*}
C16:0	19,9 ± 0,60	23,7 ± 0,79 ^{A*}	19,8 ± 1,22	20,8 ± 0,87 ^C	19,9 ± 0,84	21,7 ± 1,17 ^B
C18:0	18,6 ± 2,41	16,6 ± 2,78	17,3 ± 1,02	18,1 ± 1,24	17,6 ± 1,32	17,7 ± 1,24
ΣMUFA	32,1 ± 7,24^a	17,9 ± 3,65^{B*}	19,1 ± 2,31^b	15,3 ± 2,72^B	28,8 ± 3,45^a	21,7 ± 1,72^{A*}
C16:1 (n-7)	5,19 ± 1,83 ^a	1,73 ± 0,47 ^{B*}	2,67 ± 0,28 ^b	2,05 ± 0,69 ^{AB}	3,45 ± 0,41 ^b	2,32 ± 0,46 ^{A*}
C18:1 (n-9)	20,2 ± 4,49 ^a	12,2 ± 2,94 ^{B*}	11,6 ± 2,10 ^b	10,1 ± 2,22 ^C	20,2 ± 2,97 ^a	16,0 ± 1,63 ^A
C18:1 (n-7)	5,73 ± 1,19	2,73 ± 0,33 [*]	4,47 ± 0,42	2,81 ± 0,31 [*]	4,36 ± 0,91	2,79 ± 0,28 [*]
C20:1 (n-9)	0,22 ± 0,17	0,41 ± 0,09 ^A	0,13 ± 0,07	0,19 ± 0,02 ^B	0,21 ± 0,18	0,24 ± 0,03 ^B
ΣMUFA/ΣSFA	0,82 ± 0,24^a	0,44 ± 0,11^{B*}	0,50 ± 0,06^b	0,39 ± 0,07^B	0,75 ± 0,11^a	0,54 ± 0,05^{A*}
ΣPUFA	27,6 ± 5,96^b	41,2 ± 2,21^{B*}	42,9 ± 2,73^a	45,1 ± 2,54^A	32,7 ± 2,62^b	38,2 ± 1,46^{C*}
Σ(n-6)-PUFA	22,7 ± 5,09^c	13,2 ± 1,33^{C*}	40,1 ± 2,95^a	32,4 ± 1,93^{A*}	27,8 ± 2,13^b	19,0 ± 0,85^{B*}
C18:2 (n-6)	6,71 ± 1,21 ^b	7,79 ± 0,57 ^C	12,5 ± 0,57 ^a	16,0 ± 0,82 ^{A*}	7,59 ± 0,60 ^b	9,33 ± 0,40 ^{B*}
C20:3 (n-6)	0,37 ± 0,38	0,74 ± 0,15	0,11 ± 0,25	0,83 ± 0,09 [*]	0,35 ± 0,48	0,75 ± 0,11
C20:4 (n-6)	11,9 ± 3,15 ^c	4,21 ± 0,99 ^{C*}	22,4 ± 2,70 ^a	14,9 ± 1,64 ^{A*}	17,5 ± 1,94 ^b	8,55 ± 0,51 ^{B*}
C22:4 (n-6)	0,30 ± 0,04 ^b	0,05 ± 0,05 ^{C*}	0,95 ± 0,19 ^a	0,20 ± 0,02 ^{A*}	0,36 ± 0,10 ^b	0,09 ± 0,01 ^{B*}
C22:5 (n-6)	2,68 ± 0,98 ^a	0,15 ± 0,05 ^{A*}	3,70 ± 0,86 ^a	0,11 ± 0,03 ^{B*}	1,43 ± 0,21 ^b	0,06 ± 0,02 ^{C*}
Σ(n-3)-PUFA	4,62 ± 0,94^a	24,2 ± 1,68^{A*}	2,72 ± 0,34^b	12,6 ± 0,93^{C*}	4,80 ± 0,57^a	19,1 ± 0,86^{B*}
C18:3 (n-3)	0,03 ± 0,03	4,87 ± 1,98 ^{A*}	0,03 ± 0,03	2,13 ± 0,58 ^{B*}	0,03 ± 0,03	0,47 ± 0,69 ^{B*}
C20:5 (n-3)	0,27 ± 0,04 ^a	5,01 ± 0,89 ^{B*}	0,07 ± 0,04 ^b	3,39 ± 0,59 ^{C*}	0,12 ± 0,05 ^b	7,52 ± 0,71 ^{A*}
C22:5 (n-3)	0,32 ± 0,19	3,76 ± 0,27 ^{A*}	0,38 ± 0,27	2,01 ± 0,18 ^{C*}	0,44 ± 0,15	2,51 ± 0,25 ^{B*}
C22:6 (n-3)	3,93 ± 1,00 ^a	10,3 ± 1,98 ^{A*}	2,14 ± 0,21 ^b	4,84 ± 0,54 ^{C*}	4,12 ± 0,52 ^a	6,45 ± 0,71 ^{B*}
C20:3 (n-9)	3,39 ± 0,97 ^a	0,53 ± 0,06 ^{A*}	0,24 ± 0,03 ^b	0,06 ± 0,01 ^{B*}	3,38 ± 1,15 ^a	0,54 ± 0,08 ^{A*}
C20:3 (n-9)/C20:4 (n-6)	0,25 ± 0,09 ^a	0,13 ± 0,02 ^A	<0,01 ^b	<0,01 ^C	0,20 ± 0,07 ^a	0,06 ± 0,01 ^{B*}

a,b,c; A,B,C: unterschiedliche hochgestellte Buchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05);

*: signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten innerhalb eines Basisfettes vor und nach LÖ-Supplementierung (CLA vs. CLA+LÖ; SBÖ vs. SBÖ+LÖ; HÖ-SBÖ vs. HÖ-SBÖ+LÖ) mittels *t*-Test (P<0,05); C20:4 (n-3) <0,01; SFA: gesättigte Fettsäuren (saturated fatty acids), MUFA: einfachungesättigte Fettsäuren (monounsaturated fatty acids), PUFA: mehrfachungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids).

Tab. 26: Fettsäurezusammensetzung [Gewichtsprozente: g/100g Fettsäuren] von Neutrallipiden in der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, vor und nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ

Diätfett	CLA	CLA+LÖ	SBÖ	SBÖ+LÖ	HÖ-SBÖ	HÖ-SBÖ+LÖ
ΣSFA	36,3 ± 1,94^a	33,4 ± 2,69^A	32,0 ± 2,09^b	30,7 ± 2,39^B	31,5 ± 0,49^b	31,3 ± 2,07^{AB}
C14:0	1,91 ± 0,01 ^a	1,10 ± 0,14 ^{A*}	1,42 ± 0,18 ^b	0,79 ± 0,45 ^B	1,49 ± 0,16 ^b	0,45 ± 1,03 ^{AB}
C16:0	27,0 ± 0,44 ^a	27,0 ± 2,15 ^A	23,8 ± 0,82 ^b	24,1 ± 1,91 ^B	24,2 ± 0,87 ^b	26,4 ± 1,63 ^A
C18:0	7,02 ± 1,57	4,85 ± 0,81 ^A	6,73 ± 1,12	5,35 ± 1,18 ^A	5,73 ± 0,49	3,59 ± 0,64 ^{B*}
ΣMUFA	53,9 ± 5,23^a	31,4 ± 3,72^{B*}	37,7 ± 3,47^b	33,3 ± 4,33^B	53,3 ± 2,27^a	47,0 ± 1,83^{A*}
C16:1 (n-7)	8,90 ± 3,30	2,98 ± 0,72 ^{B*}	4,64 ± 0,77	4,46 ± 1,93 ^A	5,48 ± 0,85	4,27 ± 0,69 ^A
C18:1 (n-9)	35,8 ± 1,57 ^a	24,8 ± 3,49 ^{B*}	25,7 ± 2,68 ^b	26,7 ± 3,58 ^B	40,4 ± 3,05 ^a	41,8 ± 1,62 ^A
C18:1 (n-7)	6,87 ± 0,41	2,37 ± 0,78 ^{A*}	6,06 ± 0,29	1,32 ± 1,17 ^{B*}	5,46 ± 1,33	<0,01 ^{C*}
C20:1 (n-9)	0,63 ± 0,14	0,65 ± 0,12 ^A	0,43 ± 0,22	0,29 ± 0,11 ^B	0,50 ± 0,07	0,23 ± 0,05 ^{B*}
ΣMUFA/ΣSFA	1,49 ± 0,22^{ab}	0,94 ± 0,13^{C*}	1,18 ± 0,19^b	1,09 ± 0,12^B	1,70 ± 0,08^a	1,51 ± 0,11^A
ΣPUFA	9,80 ± 3,29^b	35,2 ± 4,85^{A*}	30,3 ± 1,78^a	36,0 ± 5,91^A	15,2 ± 2,29^b	21,7 ± 2,90^{B*}
Σ(n-6)-PUFA	7,60 ± 2,97^c	7,78 ± 0,88^B	28,4 ± 1,50^a	22,8 ± 3,24^{A*}	13,2 ± 1,77^b	8,53 ± 0,83^{B*}
C18:2 (n-6)	3,56 ± 0,36 ^c	6,44 ± 0,79 ^{B*}	14,0 ± 1,14 ^a	18,1 ± 2,12 ^{A*}	5,51 ± 0,29 ^b	6,70 ± 0,70 ^{B*}
C20:3 (n-6)	0,13 ± 0,08 ^b	0,16 ± 0,04 ^B	0,55 ± 0,12 ^a	0,28 ± 0,09 ^{A*}	0,31 ± 0,06 ^b	0,13 ± 0,03 ^{B*}
C20:4 (n-6)	1,69 ± 1,01 ^b	0,75 ± 0,25 ^B	8,77 ± 1,23 ^a	3,69 ± 1,47 ^{A*}	3,37 ± 0,84 ^b	1,04 ± 0,22 ^{B*}
C22:4 (n-6)	0,11 ± 0,16 ^b	<0,1	1,69 ± 0,48 ^a	0,06 ± 0,09 [*]	0,50 ± 0,08 ^b	<0,1 [*]
C22:5 (n-6)	0,60 ± 0,40 ^b	<0,1 [*]	2,13 ± 0,71 ^a	<0,1 [*]	0,56 ± 0,17 ^b	<0,1 [*]
Σ(n-3)-PUFA	1,39 ± 0,47	19,2 ± 3,62^{A*}	1,80 ± 0,38	12,3 ± 2,57^{B*}	1,95 ± 0,58	12,3 ± 2,11^{B*}
C18:3 (n-3)	<0,1	12,5 ± 2,73 ^{A*}	<0,1	7,44 ± 1,24 ^{B*}	<0,1	7,55 ± 1,34 ^{B*}
C20:5 (n-3)	0,32 ± 0,10	2,38 ± 0,52 [*]	<0,1	2,46 ± 0,91 [*]	<0,1	2,33 ± 0,70 [*]
C22:5 (n-3)	0,38 ± 0,17	2,07 ± 0,67 ^{A*}	1,07 ± 0,27	1,21 ± 0,43 ^B	0,96 ± 0,43	1,31 ± 0,34 ^B
C22:6 (n-3)	0,68 ± 0,20 ^b	2,11 ± 0,78 ^{A*}	0,71 ± 0,18 ^b	1,12 ± 0,38 ^B	1,15 ± 0,13 ^a	1,04 ± 0,20 ^B
C20:3 (n-9)	1,34 ± 0,94 ^b	0,31 ± 0,04 ^B	0,27 ± 0,08 ^b	0,17 ± 0,09 ^B	2,56 ± 0,41 ^a	0,57 ± 0,24 ^A
C20:3 (n-9)/C20:4 (n-6)	0,76 ± 0,10 ^a	0,47 ± 0,15 ^A	0,03 ± 0,01 ^b	0,05 ± 0,04 ^B	0,77 ± 0,11 ^a	0,54 ± 0,18 ^A

a,b,c; A,B,C: unterschiedliche hochgestellte Buchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05);

*: signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten innerhalb eines Basisfettes vor und nach LÖ-Supplementierung (CLA vs. CLA+LÖ; SBÖ vs. SBÖ+LÖ; HÖ-SBÖ vs. HÖ-SBÖ+LÖ) mittels *t*-Test (P<0,05); C20:4 (n-3) <0,01; SFA: gesättigte Fettsäuren (saturated fatty acids), MUFA: einfachungesättigte Fettsäuren (monounsaturated fatty acids), PUFA: mehrfachungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids).

Tab. 27: Fettsäurezusammensetzung [Gewichtsprozente: g/100g Fettsäuren] von Phosphatidylcholin in der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, vor und nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ

Diätfett	CLA	CLA+LÖ	SBÖ	SBÖ+LÖ	HÖ-SBÖ	HÖ-SBÖ+LÖ
ΣSFA	51,6 ± 5,11	48,2 ± 0,95^A	46,0 ± 1,08	45,2 ± 0,91^C	45,7 ± 1,39	46,1 ± 0,37^B
C14:0	0,40 ± 0,07	0,26 ± 0,13 ^{AB}	0,40 ± 0,05	0,32 ± 0,04 ^A	0,41 ± 0,04	0,24 ± 0,07 ^{B*}
C16:0	22,8 ± 3,13	24,5 ± 0,68 ^A	24,7 ± 0,13	22,8 ± 0,79 ^{B*}	22,4 ± 0,56	23,4 ± 1,01 ^B
C18:0	28,1 ± 1,70 ^a	23,1 ± 1,35 ^{A*}	20,8 ± 1,06 ^b	21,8 ± 1,24 ^B	22,9 ± 0,95 ^b	22,2 ± 1,09 ^{AB}
ΣMUFA	15,0 ± 9,41	10,6 ± 2,35^B	11,3 ± 0,23	10,4 ± 1,05^B	15,1 ± 0,71	13,7 ± 0,35^A
C16:1 (n-7)	2,89 ± 0,87 ^a	0,87 ± 0,17 ^{C*}	1,17 ± 0,06 ^b	1,18 ± 0,16 ^B	1,27 ± 0,12 ^b	1,33 ± 0,09 ^A
C18:1 (n-9)	8,82 ± 5,09	7,23 ± 2,05 ^B	5,90 ± 0,30	6,14 ± 0,76 ^B	9,39 ± 0,03	9,35 ± 0,36 ^A
C18:1 (n-7)	2,69 ± 3,53	2,11 ± 0,28 ^B	3,90 ± 0,29	2,70 ± 0,29 ^{A*}	3,89 ± 0,70	2,58 ± 0,25 ^A
C20:1 (n-9)	0,09 ± 0,01	0,18 ± 0,15	0,11 ± 0,06	0,19 ± 0,02	0,15 ± 0,05	0,17 ± 0,03
ΣMUFA/ΣSFA	0,30 ± 0,21	0,22 ± 0,05^B	0,25 ± 0,01	0,23 ± 0,03^B	0,33 ± 0,02	0,30 ± 0,01^A
ΣPUFA	33,5 ± 4,30^b	41,2 ± 1,56^{B*}	42,7 ± 1,25^a	44,4 ± 0,53^A	39,2 ± 1,46^a	40,2 ± 0,27^C
Σ(n-6)-PUFA	28,9 ± 3,08^c	16,4 ± 0,68^{C*}	40,1 ± 1,31^a	35,4 ± 0,97^{A*}	34,9 ± 1,48^b	22,6 ± 0,85^{B*}
C18:2 (n-6)	6,04 ± 0,26 ^b	8,34 ± 0,77 ^{C*}	7,39 ± 0,14 ^a	14,3 ± 0,84 ^{A*}	5,30 ± 0,26 ^c	9,37 ± 0,29 ^{B*}
C20:3 (n-6)	0,45 ± 0,64	1,32 ± 0,18 [*]	0,71 ± 0,04	1,23 ± 0,11 [*]	1,08 ± 0,06	1,17 ± 0,13
C20:4 (n-6)	14,5 ± 4,45 ^c	6,55 ± 0,86 ^{C*}	27,6 ± 1,20 ^a	19,6 ± 1,56 ^{A*}	21,6 ± 0,50 ^b	11,9 ± 0,93 ^{B*}
C22:4 (n-6)	0,38 ± 0,14 ^a	<0,1 [*]	0,56 ± 0,03 ^a	0,11 ± 0,02 [*]	0,12 ± 0,10 ^b	0,05 ± 0,03
C22:5 (n-6)	3,77 ± 1,85 ^a	0,12 ± 0,05 ^{A*}	3,56 ± 0,58 ^a	0,04 ± 0,03 ^{B*}	1,32 ± 0,21 ^b	0,05 ± 0,02 ^{B*}
Σ(n-3)-PUFA	4,45 ± 1,19^a	24,3 ± 1,52^{A*}	2,62 ± 0,07^b	9,78 ± 0,64^{C*}	4,27 ± 0,24^a	18,6 ± 0,81^{B*}
C18:3 (n-3)	<0,1	0,45 ± 0,10 ^{A*}	<0,1	0,37 ± 0,06 ^{B*}	<0,1	0,46 ± 0,07 ^{A*}
C20:5 (n-3)	0,19 ± 0,01	7,09 ± 0,89 ^{B*}	0,06 ± 0,04	3,38 ± 0,70 ^{C*}	0,15 ± 0,09	9,48 ± 0,74 ^{A*}
C22:5 (n-3)	0,22 ± 0,16	3,95 ± 0,38 ^{A*}	0,40 ± 0,02	1,46 ± 0,14 ^{C*}	0,38 ± 0,06	2,14 ± 0,21 ^{B*}
C22:6 (n-3)	3,89 ± 1,32 ^a	12,5 ± 1,25 ^{A*}	1,86 ± 0,19 ^b	4,29 ± 0,39 ^{C*}	3,53 ± 0,33 ^a	6,30 ± 0,39 ^{B*}
C20:3 (n-9)	5,93 ± 0,86 ^a	0,75 ± 0,10 ^{A*}	0,22 ± 0,05 ^b	0,08 ± 0,01 ^{B*}	5,04 ± 0,97 ^a	0,71 ± 0,08 ^{A*}
C20:3 (n-9)/C20:4 (n-6)	0,42 ± 0,07 ^a	0,12 ± 0,02 ^{A*}	<0,01 ^c	<0,01 ^C	0,23 ± 0,04 ^b	0,06 ± 0,01 ^{B*}

a,b,c; A,B,C: unterschiedliche hochgestellte Buchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05);

*: signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten innerhalb eines Basisfettes vor und nach LÖ-Supplementierung (CLA vs. CLA+LÖ; SBÖ vs. SBÖ+LÖ; HÖ-SBÖ vs. HÖ-SBÖ+LÖ) mittels *t*-Test (P<0,05); C20:4 (n-3) <0,01; SFA: gesättigte Fettsäuren (saturated fatty acids), MUFA: einfachungesättigte Fettsäuren (monounsaturated fatty acids), PUFA: mehrfachungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids).

Tab. 28: Fettsäurezusammensetzung [Gewichtsprozente: g/100g Fettsäuren] von Phosphatidylethanolamin in der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, vor und nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ

Diätfett	CLA	CLA+LÖ	SBÖ	SBÖ+LÖ	HÖ-SBÖ	HÖ-SBÖ+LÖ
ΣSFA	49,3 ± 2,39	40,1 ± 1,70^{A*}	47,3 ± 2,80	36,7 ± 1,62^{B*}	52,7 ± 10,8	37,0 ± 0,85^{B*}
C14:0	1,07 ± 0,15	0,40 ± 0,20*	0,45 ± 0,17	0,41 ± 0,07	0,70 ± 0,38	0,44 ± 0,04
C16:0	19,8 ± 1,29	20,1 ± 0,85 ^A	17,8 ± 1,70	16,2 ± 1,02 ^B	19,7 ± 4,88	16,6 ± 0,42 ^B
C18:0	28,5 ± 1,25	19,2 ± 2,01*	29,1 ± 1,22	19,8 ± 1,84*	32,3 ± 5,69	19,7 ± 1,09*
ΣMUFA	30,9 ± 7,66^a	14,4 ± 3,32^{B*}	14,4 ± 3,21^b	13,7 ± 2,18^B	25,7 ± 6,17^{ab}	17,7 ± 1,63^{A*}
C16:1 (n-7)	5,52 ± 2,92	1,63 ± 0,49*	2,16 ± 0,29	1,94 ± 0,50	3,94 ± 1,69	2,02 ± 0,28
C18:1 (n-9)	18,0 ± 4,30 ^a	8,88 ± 2,59 ^{B*}	6,99 ± 1,91 ^b	8,15 ± 1,77 ^B	15,9 ± 3,73 ^a	12,1 ± 1,16 ^A
C18:1 (n-7)	5,77 ± 1,39	2,93 ± 0,30*	4,85 ± 0,97	2,99 ± 0,29*	5,55 ± 1,23	2,92 ± 0,27*
C20:1 (n-9)	0,70 ± 0,60	0,56 ± 0,14 ^A	0,21 ± 0,11	0,21 ± 0,03 ^B	0,10 ± 0,10	0,21 ± 0,06 ^B
ΣMUFA/ΣSFA	0,62 ± 0,12^a	0,36 ± 0,10^{B*}	0,30 ± 0,05^b	0,37 ± 0,07^B	0,48 ± 0,02^a	0,48 ± 0,05^A
ΣPUFA	19,8 ± 10,1	45,5 ± 2,50^{B*}	38,3 ± 5,98	49,6 ± 1,75^{A*}	30,3 ± 10,9	45,3 ± 1,00^{B*}
Σ(n-6)-PUFA	16,5 ± 7,77^b	12,5 ± 0,91^C	35,9 ± 5,24^a	31,8 ± 1,75^A	26,5 ± 9,65^{ab}	18,0 ± 0,75^{B*}
C18:2 (n-6)	4,31 ± 0,38 ^b	7,66 ± 0,43 ^{B*}	9,81 ± 0,74 ^a	15,6 ± 0,72 ^{A*}	4,67 ± 2,09 ^b	8,10 ± 0,36 ^{B*}
C20:3 (n-6)	0,29 ± 0,07	0,60 ± 0,10 ^{B*}	0,50 ± 0,09	0,74 ± 0,14 ^A	0,70 ± 0,30	0,67 ± 0,08 ^{AB}
C20:4 (n-6)	7,67 ± 5,38	4,18 ± 0,67 ^{C*}	20,2 ± 4,24	15,0 ± 1,49 ^A	15,6 ± 6,28	9,06 ± 0,66 ^{B*}
C22:4 (n-6)	<0,1	<0,1	0,85 ± 0,21	0,23 ± 0,03*	<0,1	0,06 ± 0,05
C22:5 (n-6)	1,80 ± 1,48	0,10 ± 0,06 ^{A*}	4,31 ± 1,50	0,12 ± 0,02 ^{A*}	1,28 ± 0,45	0,03 ± 0,04 ^{B*}
Σ(n-3)-PUFA	3,22 ± 2,28	30,1 ± 2,41^{A*}	2,33 ± 0,74	17,8 ± 0,64^{C*}	3,85 ± 1,21	27,5 ± 0,86^{B*}
C18:3 (n-3)	<0,1	3,49 ± 1,14 ^{A*}	<0,1	2,37 ± 0,74 ^{B*}	<0,1	2,85 ± 0,40 ^{AB*}
C20:5 (n-3)	0,55 ± 0,40	5,37 ± 0,83 ^{B*}	0,03 ± 0,06	4,48 ± 0,45 ^{C*}	0,46 ± 0,23	9,46 ± 0,76 ^{A*}
C22:5 (n-3)	<0,1	4,76 ± 0,38 ^{A*}	<0,1	2,75 ± 0,20 ^{C*}	<0,1	3,43 ± 0,27 ^{B*}
C22:6 (n-3)	1,92 ± 1,61	16,2 ± 2,40 ^{A*}	2,18 ± 0,56	7,95 ± 0,98 ^{C*}	3,45 ± 1,51	11,6 ± 0,75 ^{B*}
C20:3 (n-9)	2,41 ± 1,16	0,45 ± 0,08 ^{B*}	0,23 ± 0,05	0,11 ± 0,04 ^{C*}	3,05 ± 1,31	0,55 ± 0,10 ^{A+}
C20:3 (n-9)/C20:4 (n-6)	0,35 ± 0,09 ^a	0,11 ± 0,02 ^A	<0,01 ^b	<0,01 ^C	0,19 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,01 ^B

a,b,c; A,B,C: unterschiedliche hochgestellte Buchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05); *: signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten innerhalb eines Basisfettes vor und nach LÖ-Supplementierung (CLA vs. CLA+LÖ; SBÖ vs. SBÖ+LÖ; HÖ-SBÖ vs. HÖ-SBÖ+LÖ) mittels t-Test (P<0,05); C20:4 (n-3) <0,01; SFA: gesättigte Fettsäuren (saturated fatty acids), MUFA: einfachungesättigte Fettsäuren (monounsaturated fatty acids), PUFA: mehrfachungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids).

Tab. 29: Quotienten und Summen von (n-3)- und (n-6)-Fettsäuren in Phosphatidylcholin der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, vor und nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ

Diätfett	CLA	CLA+LÖ	SBÖ	SBÖ+LÖ	HÖ-SBÖ	HÖ-SBÖ+LÖ
Gewichtsprozentage [g/100g Fettsäuren]						
Desaturierungsprodukte der α-Linolensäure						
C20:5 (n-3)+C22:5 (n-3)+C22:6 (n-3)	5,4 ± 1,0 ^a	23,6 ± 1,56 ^{A*}	2,7 ± 0,3 ^b	9,12 ± 0,60 ^{C*}	4,4 ± 0,2 ^a	17,9 ± 0,79 ^{B*}
ΣC20-PUFA						
C20:3 (n-6)+C20:4 (n-6)+C20:5 (n-3)	15,3 ± 4,5 ^b	13,8 ± 1,31 ^B	28,4 ± 1,3 ^a	23,2 ± 0,80 ^{A*}	23,0 ± 0,7 ^a	21,6 ± 0,45 ^{A*}
[g/g]						
Δ6- und Δ5-Desaturierung						
C20:4 (n-6)/C18:2 (n-6)	2,39 ± 0,63 ^b	0,80 ± 0,17 ^{B*}	3,73 ± 0,20 ^a	1,38 ± 0,18 ^{A*}	4,09 ± 0,28 ^a	1,27 ± 0,12 ^{A*}
C20:5 (n-3)/C18:3 (n-3)	<0,1	16,4 ± 3,74 ^{B*}	<0,1	9,16 ± 1,21 ^{C*}	<0,1	21,0 ± 3,54 ^{A*}
Δ4-Desaturierung						
[C22:5 (n-3)+C22:6 (n-3)]/C20:5 (n-3)	17,0 ± 2,5 ^b	2,32 ± 0,12 ^{A*}	26,2 ± 3,5 ^a	1,70 ± 0,26 ^{B*}	14,3 ± 1,7 ^c	0,88 ± 0,05 ^{C*}
C22:6 (n-3)/[C20:5 (n-3)+C22:5 (n-3)]	4,41 ± 0,53 ^a	1,13 ± 0,09 ^{A*}	2,88 ± 0,23 ^b	0,88 ± 0,09 ^{B*}	3,87 ± 0,21 ^a	0,54 ± 0,06 ^{C*}
(n-3)-PUFA/(n-6)-PUFA						
C20:5 (n-3)/C20:4 (n-6)	0,19 ± 0,07 ^a	1,57 ± 0,12 ^{A*}	0,07 ± 0,01 ^c	0,28 ± 0,02 ^{C*}	0,13 ± 0,02 ^b	0,86 ± 0,07 ^{B*}
C20:5 (n-3)/C20:4 (n-6)	0,02 ± 0,02 ^a	1,10 ± 0,18 ^{A*}	0,003 ± 0,002 ^c	0,18 ± 0,05 ^{C*}	0,014 ± 0,004 ^b	0,80 ± 0,11 ^{B*}

a,b,c; A,B,C: unterschiedliche hochgestellte Buchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05); *: signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten innerhalb eines Basisfettes vor und nach LÖ-Supplementierung (CLA vs. CLA+LÖ; SBÖ vs. SBÖ+LÖ; HÖ-SBÖ vs. HÖ-SBÖ+LÖ) mittels t-Test (P<0,05); PUFA: mehrfachungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids).

Tab. 30: Quotienten und Summen von (n-3)- und (n-6)-Fettsäuren in Phosphatidylethanolamin der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, vor und nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ

Diätfett	CLA	CLA+LÖ	SBÖ	SBÖ+LÖ	HÖ-SBÖ	HÖ-SBÖ+LÖ
Gewichtsprozentage [g/100g Fettsäuren]						
Desaturierungsprodukte der α-Linolensäure						
C20:5 (n-3)+C22:5 (n-3)+C22:6 (n-3)	2,8 \pm 2,2	26,3 \pm 3,00 ^{A*}	2,4 \pm 1,8	15,2 \pm 0,78 ^{B*}	3,2 \pm 2,5	24,7 \pm 0,69 ^{A*}
ΣC20-PUFA						
C20:3 (n-6)+C20:4 (n-6)+C20:5 (n-3)	15,5 \pm 5,2 ^b	10,0 \pm 1,44 ^B	21,3 \pm 4,2 ^a	19,8 \pm 1,01 ^A	16,7 \pm 6,4 ^b	18,6 \pm 1,04 ^A
[g/g]						
Δ6- und Δ5-Desaturierung						
C20:4 (n-6)/C18:2 (n-6)	1,84 \pm 1,41	0,55 \pm 0,09 ^C	2,09 \pm 0,59	0,96 \pm 0,11 ^{B*}	2,64 \pm 0,53	1,12 \pm 0,10 ^{A*}
C20:5 (n-3)/C18:3 (n-3)	<0,1	1,73 \pm 0,70 ^{B*}	<0,1	2,04 \pm 0,57 ^{B*}	<0,1	3,40 \pm 0,69 ^{A*}
Δ4-Desaturierung						
[C22:5 (n-3)+C22:6 (n-3)]/C20:5 (n-3)	4,58 \pm 0,89 ^b	3,94 \pm 0,25 ^A	5,01 \pm 1,02 ^b	2,38 \pm 0,30 ^{B*}	6,80 \pm 1,12 ^a	1,58 \pm 0,07 ^{C*}
C22:6 (n-3)/[C20:5 (n-3)+C22:5 (n-3)]	3,01 \pm 0,87 ^a	1,59 \pm 0,12 ^{A*}	0,85 \pm 0,72 ^b	1,10 \pm 0,14 ^B	2,92 \pm 1,33 ^a	0,90 \pm 0,07 ^{C*}
(n-3)-PUFA/(n-6)-PUFA	0,18 \pm 0,04 ^a	2,40 \pm 0,24 ^{A*}	0,07 \pm 0,02 ^c	0,57 \pm 0,02 ^{C*}	0,12 \pm 0,04 ^b	1,57 \pm 0,09 ^{B*}
C20:5 (n-3)/C20:4 (n-6)	0,06 \pm 0,03 ^a	1,32 \pm 0,07 ^{A*}	0,02 \pm 0,01 ^b	0,30 \pm 0,05 ^{C*}	0,03 \pm 0,02 ^b	1,05 \pm 0,10 ^{B*}

a,b,c; A,B,C: unterschiedliche hochgestellte Buchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05); *: signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten innerhalb eines Basisfettes vor und nach LÖ-Supplementierung (CLA vs. CLA+LÖ; SBÖ vs. SBÖ+LÖ; HÖ-SBÖ vs. HÖ-SBÖ+LÖ) mittels t-Test (P<0,05); PUFA: mehrfachungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids).

3.2.3.5 Konzentration von Triglyceriden und Cholesterin in Leber und Plasma

Als weitere Parameter zur Charakterisierung des Lipidstoffwechsels wurden die Konzentrationen an Triglyceriden und Cholesterin im Plasma und in der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ, bestimmt (Tabelle 32).

Die Triglyceridkonzentration im Plasma war unabhängig von der Art des eingesetzten Diätfettes. Ratten, deren Diät CLA enthielt, hatten eine signifikant geringere Konzentration an Cholesterin im Plasma, als die Ratten, denen SBÖ oder HÖ-SBÖ gegeben wurde.

Bei Fütterung mit CLA war die Konzentration der Triglyceride in der Leber um den Faktor 2 höher als bei Fütterung von SBÖ oder HÖ-SBÖ. Die Cholesterinkonzentration in der Leber war unabhängig von der Art des eingesetzten Diätfettes.

Tab. 32: Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen im Plasma und in der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ

Diätfett	CLA+LÖ	SBÖ+LÖ	HÖ-SBÖ+LÖ
Plasma [mmol/l]			
Triglyceride	0,62 ± 0,27	0,60 ± 0,09	0,59 ± 0,11
Cholesterin	1,31 ± 0,29 ^b	1,71 ± 0,14 ^a	1,81 ± 0,38 ^a
Leber [mmol/g]			
Triglyceride	14,9 ± 4,28 ^a	7,38 ± 3,67 ^b	6,54 ± 1,24 ^b
Cholesterin	5,92 ± 0,81	5,46 ± 0,54	5,82 ± 0,30

a,b: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test ($P < 0,05$).

3.2.3.6 Aktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Fettsäure-Synthetase in der Leber

Die Aktivität der G6PDH im Lebercytosol von Ratten, deren Diät CLA enthielt, war höher als bei den Tieren, die SBÖ als Diätfett erhielten, unterschied sich aber nicht von den Tieren, die HÖ-SBÖ als Diätfett bekamen (Tabelle 33).

Bei Fütterung mit CLA war die Aktivität der FsS im Lebercytosol der Ratten höher als bei Fütterung mit SBÖ oder HÖ-SBÖ (Tabelle 33).

Tab. 33: Aktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Fettsäure-Synthetase im Lebercytosol von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ

Diätfett	CLA+LÖ	SBÖ+LÖ	HÖ-SBÖ+LÖ
[nmol NADPH/H ⁺ x mg ⁻¹ Protein x min ⁻¹]			
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	43,9 ± 6,04 ^a	34,7 ± 4,88 ^b	42,5 ± 5,83 ^a
Fettsäure-Synthetase	1,22 ± 0,26 ^a	0,74 ± 0,19 ^b	0,35 ± 0,27 ^c

a,b: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05).

3.2.4 Einfluss des CLA-Gemisches auf die Bildung von Eicosanoiden in Ratten

3.2.4.1 Eicosanoidkonzentrationen in Leber und Plasma

Die Konzentration an 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, PGF_{2α} und PGE₂ im Plasma (Tabelle 34) und in der Leber (Tabelle 35) war von der Art des Diätfettes abhängig.

Im Plasma war die Konzentration an 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, PGF_{2α} und PGE₂ bei Ratten, deren Diät SBÖ enthielt, am höchsten. Bei Fütterung mit CLA war die Konzentration an 6-keto-PGF_{1α} und TXB₂ im Plasma signifikant geringer als bei Fütterung mit HÖ-SBÖ. Die Konzentration an PGF_{2α} und PGE₂ im Plasma der Ratten, deren Diät CLA enthielt, unterschied sich nicht von denen, die HÖ-SBÖ mit ihrer Diät erhielten. Der Quotient von 6-keto-PGF_{1α}/TXB₂ war bei Fütterung mit CLA (MW ± SD; 0,014 ± 0,005) im Plasma signifikant höher als bei Fütterung mit SBÖ (0,008 ± 0,003) oder HÖ-SBÖ (0,007 ± 0,002).

In der Leber war die Konzentration an 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, PGF_{2α} und PGE₂ bei Ratten, deren Diät SBÖ enthielt, am höchsten. Bei Fütterung mit CLA war die Konzentration an TXB₂, PGF_{2α} und PGE₂ in der Leber signifikant geringer als bei Fütterung mit HÖ-SBÖ. Die Konzentration an 6-keto-PGF_{1α} in der Leber unterschied sich nicht zwischen der CLA- und HÖ-SBÖ-Gruppe. Der Quotient von 6-keto-PGF_{1α}/TXB₂ war bei Fütterung mit CLA (MW ± SD; 0,69 ± 0,38) in der Leber signifikant höher als bei Fütterung mit HÖ-SBÖ (0,33 ± 0,14) unterschied sich jedoch nicht von den Tieren, die SBÖ in der Diät hatten (0,54 ± 0,13).

3.2.4.2 sPLA₂-Aktivität in Leber und Plasma

Bei Fütterung mit SBÖ war die Aktivität der sPLA₂ im Plasma signifikant höher als bei Fütterung mit CLA oder HÖ-SBÖ (Tabelle 34).

In den Lebermikrosomen war bei Fütterung mit CLA die sPLA₂-Aktivität geringer als bei Fütterung mit SBÖ oder HÖ-SBÖ (Tabelle 35). Im Lebercytosol hatten die Diätfette keinen Effekt auf die sPLA₂-Aktivität (Tabelle 35).

Tab. 34: Konzentration an 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, PGF_{2α}, PGE₂ und sPLA₂-Aktivität im Plasma von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ

Diätfett	CLA+LÖ	SBÖ+LÖ	HÖ-SBÖ+LÖ
Eicosanoide [ng/ml]			
6-keto-PGF _{1α}	0,11 ± 0,04 ^c	0,40 ± 0,14 ^a	0,21 ± 0,06 ^b
TXB ₂	8,76 ± 5,39 ^c	45,0 ± 6,47 ^a	32,7 ± 15,3 ^b
PGF _{2α}	0,44 ± 0,19 ^b	2,91 ± 0,82 ^a	0,83 ± 0,39 ^b
PGE ₂	0,67 ± 0,27 ^b	3,52 ± 1,82 ^a	1,30 ± 0,58 ^b
sPLA₂-Aktivität [nmol/min/ml]	33,8 ± 5,82 ^b	45,4 ± 8,77 ^a	34,0 ± 4,89 ^b

a,b,c: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05); 6-keto-PGF_{1α}: 6-keto-Prostaglandin F_{1α}, TXB₂: Thromboxan B₂, PGF_{2α}: Prostaglandin F_{2α}, PGE₂: Prostaglandin E₂, sPLA₂: sekretorische Phospholipase A₂.

Tab. 35: Konzentration an 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, PGF_{2α}, PGE₂, sPLA₂-Aktivität und relative mRNA-Konzentration von Cyclooxygenase-1 in der Leber von Ratten, deren Diäten 30g/kg CLA, SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielten, nach Supplementierung der Diäten mit 50g/kg LÖ

Diätfett	CLA+LÖ	SBÖ+LÖ	HÖ-SBÖ+LÖ
Eicosanoide [ng/g]			
6-keto-PGF _{1α}	1,46 ± 0,36 ^b	4,49 ± 0,95 ^a	2,00 ± 0,60 ^b
TXB ₂	2,47 ± 0,84 ^b	8,03 ± 0,71 ^a	7,16 ± 1,50 ^a
PGF _{2α}	6,81 ± 2,44 ^c	35,7 ± 8,59 ^a	18,1 ± 5,79 ^b
PGE ₂	2,66 ± 0,42 ^c	13,8 ± 4,74 ^a	7,11 ± 1,98 ^b
sPLA₂-Aktivität [nmol/min/mg Protein]			
Mikrosomen	1,93 ± 0,22 ^b	2,16 ± 0,27 ^a	2,20 ± 0,20 ^a
Cytosol	1,73 ± 0,11	1,72 ± 0,16	1,84 ± 0,20
Cyclooxygenase-1 mRNA [%/GAPDH]	0,47 ± 0,22	0,72 ± 0,23	0,66 ± 0,34

a,b,c: unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Mittelwertvergleich mit Fisher-Test (P<0,05); 6-keto-PGF_{1α}: 6-keto-Prostaglandin F_{1α}, TXB₂: Thromboxan B₂, PGF_{2α}: Prostaglandin F_{2α}, PGE₂: Prostaglandin E₂, sPLA₂: sekretorische Phospholipase A₂, COX-1: Cyclooxygenase-1, GAPDH: Glycerinaldehyd-phosphat-dehydrogenase.

3.2.4.3 mRNA-Konzentration von Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2 in der Leber

Um den Einfluss der Diätfette auf die Bildung von Eicosanoiden näher zu betrachten, wurde die Wirkung von CLA, SBÖ und HÖ-SBÖ auf die mRNA-Konzentration von COX-1 und COX-2 der Leber untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 35 dargestellt.

Die relative mRNA-Konzentration der COX-1 in der Leber war unabhängig von der Art der Diätfette. Die mRNA-Konzentration von COX-2 lag bei den gewählten methodischen Bedingungen unter der Nachweisgrenze.

4 Diskussion

4.1 Zellwachstum und Lebensfähigkeit von Hep G2-Zellkulturen

Der Einfluss von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA auf die Lebensfähigkeit und auf das Wachstum von Zellkulturen ist konzentrations-, zeitabhängig und zellspezifisch (IGARASHI AND MIYAZAWA 2001, CANTWELL ET AL. 1999). Es wurde gezeigt, dass CLA das Zellwachstum von Krebszellen durch eine erhöhte Lipidperoxidation hemmt und somit toxisch auf Zellen wirkt (SCHONBERG AND KROKAN 1995, DEVERY ET AL. 2001). In der vorliegenden Arbeit hatten cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA in Konzentrationen bis zu 100µmol/l keinen Einfluss auf das Zellwachstum und die Lebensfähigkeit von Hep G2-Zellen. Die Ergebnisse stimmen mit denen von JUN ET AL. (2000) überein, die ebenfalls in ihren Versuchen mit Hep G2-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 50, 100 und 250µmol/l cis-9,trans-11 CLA keine Veränderungen in der Lebensfähigkeit dieser Zellen feststellten. Erst ab einer Konzentration von 500µmol/l cis-9,trans-11 CLA war in diesen Versuchen die Hep G2-Zelllebensfähigkeit signifikant geringer als die der ohne CLA inkubierten Zellen (JUN ET AL. 2000). LIN ET AL. (2001) konnten keine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit von Hep G2-Zellen nach 5stündiger Inkubation mit jeweils 1mmol/l cis-9,trans-11 CLA oder trans-10,cis-12 CLA nachweisen.

Es kann davon ausgegangen werden, dass cis-9,trans-11 CLA oder trans-10,cis-12 CLA in Konzentrationen bis zu 100µmol/l bei 24stündiger Inkubation nicht toxisch auf Hep G2-Zellkulturen wirkten.

4.2 Morphologie von Hep G2-Zellkulturen

In der vorliegenden Zellkulturstudie erschien die morphologische Gestalt, der mit 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA 24h inkubierten Hep G2-Zellen, unregelmäßig und aufgebläht (Abbildung 3B und 3C), obgleich diese Zellen nicht größer waren als die Kontrollzellen. Unter dem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung waren nach 24stündiger Inkubation mit jeweils 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder trans-10,cis-12 CLA dunkle Tröpfchen in den Hep G2-Zellen zu sehen (Abbildung nicht dargestellt).

Die morphologische Gestalt von Hep G2-Zellen ist denen von humanen Hepatozyten in Kultur sehr ähnlich (BALLET ET AL. 1984, GUGUEN-GUILLOUZO ET AL. 1982). Im Gegensatz zu Hepatozyten des Menschen oder der Ratte besitzen sie einen großen Nukleus von 8-12µm. Große Vakuolen, von denen einige nach Anfärben mit Ölrot als Lipidtropfen identifiziert werden konnten, wurden im Zytoplasma beobachtet (BOUMA et al. 1989). Mitochondrien, Lysosomen, Desmosomen, das rauhe endoplasmatische Retikulum, der Golgi Apparat mit

mehreren Dictyosomen sowie Gallenkanäle, auf beiden Seiten durch tight junctions abgeschlossen und mit langen Mikrovilli versehen, nicht aber Peroxysomen, konnten auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Hep G2-Zellen identifiziert werden (BOUMA ET AL. 1989). Fettsäuren (Linol-, Ölsäure, cis-9,trans-11 CLA, trans-10,cis-12 CLA), die dem Zellmedium zugesetzt werden, reichern sich in den Lipiden von Hep G2 Zellen an (LIN ET AL. 2001). Gleiche Feststellungen machten auch DOKKO und seine Arbeitsgruppe (1998). Nach Inkubation von Hep G2-Zellen mit Stearin-, Öl-, Linol- oder α -Linolensäure wurden unter dem Lichtmikroskop zahlreiche intrazelluläre Lipidtröpfchen sichtbar.

Die unter dem Lichtmikroskop erkennbaren dunklen Tröpfchen in den Hep G2-Zellen könnten aus Lipideinlagerungen nach Inkubation mit jeweils 100 μ mol/l cis-9,trans-11 CLA oder trans-10,cis-12 CLA resultieren. Die Lipideinlagerungen können auf erhöhte Triglyceridkonzentrationen nach Inkubation der Zellen mit 100 μ mol/l CLA-Isomere (Tabelle 18) zurückgeführt werden.

4.3 Futteraufnahme und Gewichtsentwicklung von Ratten

Einige Studien zeigten, dass CLA bei *ad libitum* Fütterung zu vermindertem Futterverzehr führen kann (BADINGA ET AL. 2003, BASSAGANYA-RIERA ET AL. 2001). Daher wurde im Tierversuch dieser Studie ein restriktives Fütterungsregime angewendet. Im Vergleich zur *ad libitum* Fütterung ermöglichte die restriktive Fütterung eine gleiche Verzehrsmenge bei allen Tieren.

In der vorliegenden Studie konnten zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen (CLA, SBÖ, HÖ-SBÖ) keine Unterschiede in der Gewichtsentwicklung der Tiere nachgewiesen werden. Bei Mäusen (TERPSTRA ET AL. 2002, ROCHE ET AL. 2002, BELURY AND KEMPA-STEJCZKO 1997), Ratten (SZYMCZYK ET AL. 2000) und Hühnern (SZYMCZYK ET AL. 2001) wurden nach Fütterung mit Diäten, welche mehr als 1% CLA enthielten, ein vermindertes Körperwachstum festgestellt. Der Einfluss von CLA auf das Körpergewicht wird auf Veränderungen in der Körperzusammensetzung zurückgeführt (JAHREIS ET AL. 2000). Bei Ratten und Mäusen, deren Diät CLA enthielt, wurde trotz gleichbleibender Futteraufnahme eine verminderte Gewichtsentwicklung beobachtet, die auf einen geringeren Körperfettgehalt zurückgeführt werden konnte (STANGL 2000A, WEST ET AL. 1998).

Aufgrund der Untersuchungen, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, kann keine Aussage über den Gesamtkörperfettgehalt der Ratten getroffen werden; der Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf Leber und Plasma der Tiere.

4.4 Lebergewicht von Ratten

In der vorliegenden Studie war nach Fütterung mit CLA das Lebergewicht der Ratten erhöht. Ein Anstieg des Lebergewichtes durch CLA in der Diät wurde auch in Mäusen (TERPSTRA ET AL. 2002, MINER ET AL. 2001, DELANY ET AL. 1999, WEST ET AL. 1998), Hamstern (DEDECKERE ET AL. 1999) und Hühnern (BADINGA ET AL. 2003) nachgewiesen. WARREN ET AL. (2003) stellten in einer Studie an Mäusen fest, dass nach Fütterung mit einer trans-10,cis-12 CLA-angereicherten Diät das Lebergewicht anstieg, was mit einem Anstieg der Leberlipide einherging. In Ratten führt eine erhöhte *de novo* Fettsäuresynthese zur Triglyceridanreicherung in der Leber und zu einem Anstieg des Lebergewichtes (BALTZELL AND BERDANIER 1985, NACE AND SZEPESI 1976).

Somit könnte in der vorliegenden Studie das höhere Lebergewicht von Ratten, deren Diät CLA enthielt, aus signifikant höheren Triglyceridkonzentrationen in der Leber (Tabelle 32) dieser Tiere resultieren.

4.5 Einfluss konjugierter Linolsäuren (cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA) auf den Lipidstoffwechsel von Hep G2-Zellkulturen und der Rattenleber

4.5.1 Cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA in Lipiden und Lipidfraktionen

Es ist bekannt, dass sich CLA-Isomere und deren Metabolite in NL und Phospholipide von Zellkulturen inkorporieren (EVANS ET AL. 2001, PARK ET AL. 2000, JUN ET AL. 2000, LIU AND BELURY 1998).

Auch in der vorliegenden Zellkulturstudie zeigte die gaschromatographische Analyse der Fettsäuren einen Einbau von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA in die Lipide von Hep G2-Zellen. Bereits nach 0,5stündiger Inkubation mit jeweils 10µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder trans-10,cis-12 CLA wurden die CLA-Isomere in geringen Konzentrationen, von 0,8 bis 0,9g pro 100g Fettsäuren, in den Zelllipiden analysiert. Nach 24stündiger Inkubation von Hep G2-Zellen mit jeweils 25µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder trans-10,cis-12 CLA wurden die CLA-Isomere in moderaten Konzentrationen, von 2 bis 4g pro 100g Fettsäuren, in den Phospholipiden der Zellen nachgewiesen. In der Leber von Ratten und Mäusen, deren Diät CLA enthielt, konnten CLA-Isomere in der selben Größenordnung analysiert werden (HAYEK ET AL. 1999, STANGL 2000A). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA in Lipiden von Hep G2-Zellen nach Inkubation mit jeweils 25µmol/l CLA-Isomere in einem physiologischen Bereich lagen. Hingegen wurden nach Inkubation mit jeweils 100µmol/l cis-9,trans-11 CLA oder trans-10,cis-12 CLA sehr hohe Konzentrationen an CLA-Isomere, von 7 bis 15g pro 100g Fettsäuren, in PC und PE

analysiert. Die vierfach höhere Konzentration von 100µmol/l CLA in den hier durchgeführten Versuchen mit cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA wurde gewählt, um Effekte im Lipid- und Eicosanoidstoffwechsel von Hep G2-Zellen zu verdeutlichen. Sie wirkt dennoch nicht toxisch auf Hep G2-Zellkulturen (LIN ET AL. 2001, JUN ET AL. 2000).

Hinsichtlich der Verteilung der CLA-Isomere in Lipidfraktionen von Hep G2-Zellen zeigten sich in den hier durchgeführten Untersuchungen Unterschiede. In NL war der Anteil beider CLA-Isomere höher als der in PC und PE. Die Ergebnisse konnten mit denen einer Studie an Hep G2-Zellkulturen verglichen werden, in der der Anteil von cis-9,trans-11 CLA in Triglyceriden höher war als der in Phospholipiden (JUN ET AL. 2000). Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass cis-9,trans-11 CLA bevorzugt als Substrat für die Synthese von Triglyceriden verwertet wird und weniger für die Synthese von Phospholipiden. In PE von Hep G2-Zellen der vorliegenden Arbeit war der Anteil von cis-9,trans-11 CLA höher als der von trans-10,cis-12 CLA. Bei 3T3-L1 Preadipocyten bestimmten EVANS et al. (2001) höhere Konzentrationen an cis-9,trans-11 CLA in Phospholipiden nach Behandlung der Zellen mit cis-9,trans-11 CLA oder trans-10,cis-12 CLA. Nach Inkubation von Brustkrebszellen mit cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA wurde das trans-10,cis-12 CLA-Isomer schnell in Membranphospholipide inkorporiert und auch schnell wieder umgesetzt, wobei das cis-9,trans-11 CLA-Isomer länger gespeichert wurde (MA ET AL. 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Studie wäre festzuhalten, dass sich cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA zeit- und konzentrationsabhängig in Lipide von Hep G2-Zellen inkorporierten, v.a. in NL und in geringem Maße in die Phospholipide PC und PE.

Wie andere mehrfach ungesättigte Fettsäuren, inkorporieren sich CLA-Isomere und deren Metabolite in NL und Phospholipide verschiedener Gewebe von Modelltieren (SCHÄFER ET AL. 2001, MOYA-CAMARENA ET AL. 1999, BELURY AND KEMPA-STECZKO 1997, IP ET AL. 1996, IP ET AL. 1991, HA ET AL. 1990). Die CLA-Konzentrationen von 0,6 bis 1,7g pro 100g Fettsäuren in den Leberphospholipiden der Tiere, deren Diät CLA enthielt, sind mit denen aus anderen Tierstudien zu vergleichen (STANGL 2000A). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie am Modelltier Ratte zeigen, dass in der Leber der Tiere, deren Diät CLA enthielt, die höchsten Anteile von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA in NL analysiert wurden. Die Ergebnisse konnten mit denen anderer Studien an Mäusen (HAYEK ET AL. 1999) und Ratten (CANTWELL ET AL. 1999) verglichen werden, in denen der Anteil an CLA-Isomeren in NL größer war als der in Phospholipiden.

Die Ergebnisse der Studie am Modelltier Ratte zeigen weiterhin, dass die Verteilung von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA in der Leber unterschiedlich zum Verteilungsmuster

in der Diät war. In NL und PE der Rattenleber war der Anteil von cis-9,trans-11 CLA höher als der Anteil von trans-10,cis-12 CLA. Auch in anderen Tierstudien wurde festgestellt, dass der Anteil des cis-9,trans-11 CLA-Isomers in Phospholipiden von Leber (BANNI ET AL. 2001, BELURY AND KEMPA-STECZKO 1997), Haut (KAVANAUGH ET AL. 1999) und Knochen (LI AND WATKINS 1998) und in NL von Brust (IP ET AL. 1999) und Muskeln (EGGERT ET AL. 2002) höher war als der Anteil des trans-10,cis-12 CLA-Isomers. In der vorliegenden Studie könnte der geringere Anteil von trans-10,cis-12 CLA in den Lipiden der Rattenleber im folgendem Zusammenhang stehen. *In vitro* an Leberschnitten von Ratten, die mit cis-9,trans-11 CLA oder trans-10,cis-12 CLA inkubiert wurden, war die Sekretion von trans-10,cis-12 CLA als Teil von VLDL um das Doppelte höher als von cis-9,trans-11 CLA (GRUFFAT ET AL. 2003). Bei Ratten konnten sowohl SEBEDIO ET AL. (1997) als auch BANNI ET AL. (2001) nach Fütterung einer CLA-haltigen Diät in den Leberlipiden konjugierte Isomere der Linolensäure, der Eicosatriensäure und der Arachidonsäure nachweisen. Dabei war die Menge an konjugierter Arachidonsäure, welche aus trans-10,cis-12 CLA desaturiert und elongiert wurde, in den Leberlipiden der Tiere höher als an konjugierter Arachidonsäure, die aus cis-9,trans-11 CLA gebildet wurde (SEBEDIO ET AL. 1997). In der vorliegenden Arbeit waren CLA-Metabolite in den Lipiden der Rattenleber nicht messbar. Für die Identifizierung von CLA-Metaboliten in biologischen Proben sind Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie oder Massenspektrometrie leistungsfähiger als die in der vorliegenden Arbeit verwendete Gaschromatographie (BANNI ET AL. 2001, SEBEDIO ET AL. 1997).

Es kann davon ausgegangen werden, dass cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA in der Leber von Ratten, deren Diät CLA enthielt, unterschiedlich metabolisiert wurden. Cis-9,trans-11 CLA wurde bevorzugt in die Leberlipide inkorporiert. Möglicherweise wurde trans-10,cis-12 CLA bevorzugt in seine Metabolite desaturiert und elongiert und/oder bevorzugt als Teil von VLDL aus der Leber transportiert.

4.5.2 Δ 9-Desaturierung von gesättigten Fettsäuren, SFA und MUFA in Lipiden und Lipidfraktionen

Zellkulturstudien zeigten zeit- und konzentrationsabhängige Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung von Membranlipiden durch CLA (MA ET AL. 2002, CHUANG ET AL. 2001). In der vorliegenden Arbeit war bereits nach 0,5stündiger Inkubation von Hep G2-Zellen mit jeweils 100 μ mol/l cis-9,trans-11 CLA oder trans-10,cis-12 CLA der Anteil an MUFA in den Zelllipiden verringert. Der geringere Anteil an MUFA in Hep G2-Zelllipiden könnte in einer Verdrängung der MUFA aus Lipidfraktionen durch die CLA-Isomere

begründet sein, da eine Inkorporierung von CLA in gleiche Lipidfraktionen wie die von Ölsäure erfolgt (GRUFFAT ET AL. 2003, BANNI ET AL. 2001, BELURY ET AL. 1997).

Der Anteil an SFA in Lipiden von Hep G2-Zellen war nach 24stündiger Inkubation der Zellen mit 25 oder 100 $\mu\text{mol/l}$ trans-10,cis-12 CLA erhöht und der Anteil an MUFA sowie der Quotient von MUFA/SFA, als Indikator für die $\Delta 9$ -Desaturierung, verringert. Die Ergebnisse der vorliegenden Zellkulturstudie sind mit denen aus anderen Zellkulturstudien vergleichbar, bei denen nach Inkubation mit trans-10,cis-12 CLA der Anteil an SFA erhöht und der Anteil an MUFA in den Lipiden vermindert war (CHOI ET AL. 2001, PARK ET AL. 2000, CHOI ET AL. 2000). In einer Studie an Adipozyten wurde, nach Behandlung mit trans-10,cis-12 CLA, der geringere Anteil an MUFA auf eine gehemmte Genexpression der $\Delta 9$ -Desaturase zurückgeführt (CHOI ET AL. 2000). In der vorliegenden Studie hatte trans-10,cis-12 CLA keinen Einfluss auf die mRNA-Konzentration der $\Delta 9$ -Desaturase. In Hep G2-Zellen reguliert trans-10,cis-12 CLA die Aktivität der $\Delta 9$ -Desaturase hauptsächlich durch posttranslationale Mechanismen, indem eine Bindung des CLA-Isomers an die aktive Seite oder an eine unidentifizierte allosterische Seite des Enzymmoleküls erfolgt (CHOI ET AL. 2001). Dabei ist eine cis-12 Doppelbindung gekoppelt mit einer trans-10 Doppelbindung als Strukturmerkmal für die Hemmung der $\Delta 9$ -Desaturase-Aktivität verantwortlich (PARK ET AL. 2000). Aus technischen Gründen konnte in der vorliegenden Arbeit die Aktivitätsmessung der $\Delta 9$ -Desaturase nicht durchgeführt werden.

In der vorliegenden Studie wird weiterhin gezeigt, dass der Quotient von MUFA/SFA nach 24stündiger Inkubation mit cis-9,trans-11 CLA geringer war als in den Kontrollzellen. Dies deutet darauf hin, dass auch cis-9,trans-11 CLA die $\Delta 9$ -Desaturierung in Hep G2-Zellen hemmte. Allerdings wurde dieser Effekt nur nach Inkubation der Zellen mit der hohen Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ cis-9,trans-11 CLA festgestellt, welche nicht physiologisch relevant ist.

Es konnte gezeigt werden, dass in den hier durchgeführten Untersuchungen mit den CLA-Isomeren trans-10,cis-12 CLA die $\Delta 9$ -Desaturierung von gesättigten Fettsäuren in Hep G2-Zellen hemmte. Möglicherweise hemmte trans-10,cis-12 CLA aufgrund von Strukturmerkmalen die Aktivität der $\Delta 9$ -Desaturase.

In Studien an Mäusen (BELURY AND KEMPA-STECKO 1997), Hamster (DEDECKERE ET AL. 1999) und Hühnern (SZYMCZK ET AL. 2001) veränderte CLA in der Diät die Fettsäurezusammensetzung von Leberlipiden. Die Fütterung mit CLA führte zu höheren Anteilen an SFA und geringeren Anteilen an MUFA in Lipiden von Hühnern (BADINGA ET

AL. 2003, CHERIAN ET AL. 2002B, SCHÄFER ET AL. 2001, SIMON ET AL. 2000), Schweinen (BEE 2001) und Ratten (BANNI ET AL. 2001, MOYA-CAMARENA ET AL. 1999, LI AND WATKINS 1998). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Ratten, deren Diät CLA enthielt, die höchsten Anteile an SFA in PC und PE und den geringsten Quotient von MUFA/SFA in NL der Leber hatten. Aus Studien an Ratten und Mäusen geht hervor, dass Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung von Membranphospholipiden auf die verminderte Genexpression der $\Delta 9$ -Desaturase zurückzuführen ist (CHOI ET AL. 2000, NTAMBI 1999, LEE ET AL. 1998). Nach Fütterung mit CLA konnte der geringere Quotient von MUFA/SFA in den Leberlipiden von Mäusen auf eine verminderte Aktivität der $\Delta 9$ -Desaturase und auf eine geringere mRNA-Expression dieses Enzyms zurückgeführt werden (LEE ET AL. 1998). In der vorliegenden Studie hatte CLA keinen Einfluss auf die mRNA-Expression der $\Delta 9$ -Desaturase in der Leber. Somit ist zu vermuten, dass CLA die Aktivität der $\Delta 9$ -Desaturase in der Leber verminderte.

Zusammenfassend wäre festzuhalten, dass CLA die $\Delta 9$ -Desaturierung von gesättigten Fettsäuren in der Leber der Ratten hemmte. Weil ein hoher Anteil an SFA in Phospholipiden die Rigidität der Membran erhöht (NTAMBI 1999), könnte der hohe Anteil an SFA in Leberphospholipiden der Ratten, deren Diät CLA enthielt, zu Veränderungen in der Membranfluidität geführt haben.

4.5.3 Desaturierung von Linolsäure und α -Linolensäure, (n-6)- und (n-3)-PUFA in Lipiden und Lipidfraktionen

Nach 24stündiger Inkubation von Hep G2-Zellen mit 25 $\mu\text{mol/l}$ trans-10,cis-12 CLA wurden in PC der Zellen geringere Konzentrationen an Arachidonsäure ermittelt, was auf eine gestörte Desaturierung von Linolsäure durch trans-10,cis-12 CLA hindeutet. Da Linolsäure und α -Linolensäure durch die selben Enzyme desaturiert und elongiert werden (BRENNER 1989), wäre zu erwarten, dass die Desaturierung von α -Linolensäure ebenfalls durch CLA gestört wird.

Weil der Anteil an (n-6)- und (n-3)-Fettsäuren in den Phospholipiden von Hep G2-Zellen in den durchgeführten Experimenten gering war (Tabelle 11) und um die $\Delta 6$ - und $\Delta 5$ -Desaturierung von Linol- und α -Linolensäure in Hep G2-Zellen zu untersuchen, wurde das Zellmedium mit C18:2 (n-6) oder C18:3 (n-3), als Substrat für die $\Delta 6$ -Desaturase, supplementiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass nach 24stündiger Inkubation von Hep G2-Zellen mit 25 $\mu\text{mol/l}$ trans-10,cis-12 CLA die Konzentration an C18:2 (n-6) und C18:3 (n-3) in PC und PE der Zellen erhöht und die Konzentration an C20:4 (n-6)

und C20:5 (n-3) verringert war (Tabelle 13 und 14). Auch die Quotienten von C20:4 (n-6)/C18:2 (n-6) und C20:5 (n-3)/C18:3 (n-3), welche Rückschlüsse auf die Δ 6- und Δ 5-Desaturierung geben (ANGELETTI AND DEALANIZ 1995), waren nach Inkubation der Zellen mit trans-10,cis-12 CLA verringert. Die Ergebnisse sind mit einer Studie an Brustkrebszellen vergleichbar, in der nach Behandlung mit trans-10,cis-12 CLA angereichertem CLA-Gemisch die Synthese von Arachidonsäure gehemmt wurde, was zu höheren Anteilen an Linolsäure und geringeren Anteilen an Arachidonsäure in PC und PE führte (MA ET AL. 2002). In einer Humanstudie von SMEDMAN AND VESSBY (2001) wurden nach Aufnahme von 4,2g CLA pro Tag geringere Anteile an C20:3 (n-6) in Serumlipiden bestimmt, was die Autoren auf eine Hemmung der Δ 6-Desaturase-Aktivität zurückführten. Im Gegensatz zu BRETILLON ET AL. (1999) und CHUANG ET AL. (2001), die in Rattenlebermikrosomen und transformierter Hefekulturen eine höhere Aktivität des cis-9,trans-11 CLA-Isomers auf die Δ 6-Desaturase nachwiesen, zeigte in der vorliegenden Studie cis-9,trans-11 CLA keinen Effekt auf die Δ 6- und Δ 5-Desaturierung. Einen Einfluss von trans-10,cis-12 CLA auf die mRNA-Expression der Δ 6-Desaturase, welche das mengenlimitierende Enzym in der Desaturierung von Linolsäure und α -Linolensäure ist (BRENNER 1989), kann im Rahmen dieser Studie ausgeschlossen werden. Allerdings war die relative mRNA-Konzentration der Δ 5-Desaturase nach Inkubation der Hep G2-Zellen mit trans-10,cis-12 CLA verringert. Weil die Δ 5-Desaturase für die Bildung langkettiger PUFA nicht mengenlimitierend ist (BRENNER 1989) und eine verminderte Δ 6-Desaturase-Aktivität *in vitro* gewöhnlich mit einer Inhibierung der Δ 5-Desaturase einhergeht (POISSON 1985, BRENNER 1981), ist anzunehmen, dass in der vorliegenden Arbeit nach Inkubation der Hep G2-Zellen mit trans-10,cis-12 CLA die Aktivität der Δ 6-Desaturase vermindert war. Aus technischen Gründen konnte in der vorliegenden Arbeit die Aktivität der Δ 6-Desaturase nicht bestimmt werden.

Um den Einfluss von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA auf die Δ 4-Desaturierung in Hep G2-Zellen zu untersuchen, wurde das Zellmedium mit C20:4 (n-6) oder C20:5 (n-3) supplementiert. Die Konzentration an C22:4 (n-6) und C22:5 (n-6) in PC und PE von Hep G2-Zellen waren nach Inkubation der Zellen mit C20:4 (n-6) sehr gering (Tabelle 15). Im Gegensatz dazu kam es nach Inkubation von Hep G2-Zellen mit C20:5 (n-3) zu einem Anstieg von C22:5 (n-3) und C22:6 (n-3) in den Phospholipiden der Zellen (Tabelle 16). Dass C20:5 (n-3) besser elongiert und desaturiert wurde als C20:4 (n-6), ist auf eine bevorzugte Desaturierung und Elongation von (n-3)-PUFA durch in diesem Zusammenhang stehenden Enzyme in Hep G2-Zellen zurückzuführen (FUJIYAMA-FUJIWARA ET AL. 1992). Die 24stündige Inkubation der Hep G2-Zellen mit 25 μ mol/l trans-10,cis-12 CLA führte zu einem

geringeren Quotient von C22:6 (n-3)/C22:5 (n-3) in PC und PE der Zellen, welcher Rückschlüsse auf die Δ 4-Desaturierung gibt (ANGELETTI AND DEALANIZ 1995). Cis-9,trans-11 CLA zeigte in diesem Zusammenhang keine Effekte.

Es kann davon ausgegangen werden, dass in den hier durchgeführten Untersuchungen mit cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA ausschließlich das trans-10,cis-12 CLA-Isomer die Δ 6- und Δ 5-Desaturierung von Linolsäure und die Δ 6-, Δ 5- und Δ 4-Desaturierung von α -Linolensäure in Hep G2-Zellen hemmte. Eine Hemmung der Desaturierung von Linol- und α -Linolensäure ist von physiologischer Relevanz, weil die Produkte der Desaturierung/Elongation, die C20- und C22-PUFA, wichtige Bestandteile von Membranlipiden sind und somit Einfluss auf Membraneigenschaften nehmen (STUBBS AND SMITH 1984).

Ein Ziel der vorliegenden Studie am Modelltier Ratte war es, ein möglicher Einfluss von CLA auf den Stoffwechsel der α -Linolensäure zu untersuchen. Hierfür wurden den Tieren 4 Wochen verschiedene Basisdiäten verabreicht, in denen sich der Lipidmetabolismus der Ratten an die verschiedenen Diätfette (CLA, SBÖ, HÖ-SBÖ) adaptierte. In den meisten Tierstudien werden die Effekte von CLA in der Diät mit Diäten verglichen, die pflanzliche Öle reich an Linolsäure enthalten (STANGL 2000B, SIMON ET AL. 2000). Es ist bekannt, dass der Fettsäuremetabolismus von Tieren durch die Fettsäurezusammensetzung der Diät, v.a. von den Mengen an SFA, MUFA und PUFA sowie von dem Verhältnis zwischen (n-6)- und (n-3)-PUFA, stark abhängig ist (BRENNER 1989). Deshalb können die Wirkungen von CLA nur unter Berücksichtigung der Kontrollfette interpretiert werden. Nach der anfänglichen 4-wöchigen Fütterungsperiode waren die Anteile an (n-6)- und (n-3)-PUFA in den Leberphospholipiden nach Fütterung mit CLA denen nach Fütterung mit HÖ-SBÖ ähnlicher als denen nach Fütterung mit SBÖ. Ratten, deren Diät CLA enthielt, hatten einen geringeren Anteil an Arachidonsäure und einen höheren Anteil an (n-3)-PUFA in den Leberphospholipiden. Der Quotient von (n-3)-PUFA/(n-6)-PUFA war nach Fütterung mit CLA in den Leberphospholipiden am höchsten. Die veränderte Fettsäurezusammensetzung der Leberphospholipide durch CLA stimmt mit Studien aus der Literatur überein (TISCHENDORF ET AL. 2002, SIMON ET AL. 2000, STANGL 2000A, LI AND WATKINS 1998).

Nachdem die Diäten in der 5. Woche mit LÖ supplementiert wurden, erhöhte sich der Anteil an (n-3)-PUFA in den Leberphospholipiden der Ratten aller drei Behandlungsgruppen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass das Basisfett in der Diät einen Einfluss auf die Konzentration an (n-3)-PUFA sowie deren Fettsäureprofil in den Leberlipiden der Ratten

hatte. Der Anteil an (n-3)-PUFA unterschied sich nicht wesentlich zwischen den Ratten, deren Diät CLA enthielt von denen, deren Diät HÖ-SBÖ enthielt. Hingegen war das Profil einzelner (n-3)-PUFA unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen. Ratten, deren Diät CLA enthielt, wiesen höhere Anteile an (n-3)-PUFA und vor allem einen höheren Anteil an Docosahexaensäure auf als Ratten, deren Diät SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielt. Der höhere Quotient von C22:6 (n-3)/[C20:5 (n-3) + C22:5 (n-3)] in den Leberphospholipiden der Ratten, deren Diät CLA enthielt, deutet auf eine gesteigerte Δ 4-Desaturierung der Eicosapentaensäure durch CLA hin.

Der Anteil an Arachidonsäure in den Leberphospholipiden der Ratten, deren Diät CLA enthielt, war geringer als bei den Tieren, deren Diät SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielt. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stimmen mit einer Studie an Legehennen überein, in der nach Fütterung einer mit Leinöl versetzten Basisdiät, CLA zum Anstieg an langkettigen (n-3)-PUFA unter Ausschluß von Arachidonsäure in Gesamtlipiden von Eidotter führte (RAES ET AL. 2002). Die Autorengruppe zeigte, dass CLA, in Abhängigkeit vom Fettsäuremuster der Diät, die Synthese langkettiger (n-6)- und (n-3)-PUFA unterschiedlich beeinflusst. Eine weitere Studie an Legehennen zeigte, dass nach Fütterung mit Fischöl und CLA der Anteil an C22:6 (n-3) in den Eilipiden anstieg und der Anteil an Arachidonsäure abnahm (CHERIAN ET AL. 2002A). Geringe Konzentrationen an Arachidonsäure in Lipiden von Zellen und Tieren, die mit CLA behandelt wurden, deuteten auf eine gestörte Desaturierung von Linolsäure durch CLA hin (CHUANG ET AL. 2001, BRETILLON ET AL. 1999). Linolsäure und α -Linolensäure werden durch die selben Enzyme desaturiert und elongiert (BRENNER 1989). Es wäre zu erwarten, dass durch eine gestörte Desaturierung geringere Anteile an C20:5 (n-3), C22:5 (n-3) und C22:6 (n-3) in den Leberlipiden der Ratten vorhanden sind. Der hohe Anteil an Desaturierungsprodukten der α -Linolensäure [C20:5 (n-3) + C22:5 (n-3) + C22:6 (n-3)] in PC bei Fütterung mit CLA zeigt, dass die Desaturierung der α -Linolensäure nicht gehemmt, sondern stimuliert wurde. Die erhöhte mRNA-Konzentration der Δ 6-Desaturase in der Leber, welche das mengenlimitierende Enzym in der Desaturierung von Linol- und α -Linolensäure ist (BRENNER 1989), könnte eine Ursache für die höheren Anteile an langkettigen (n-3)-PUFA in der Leber von Ratten, deren Diät CLA enthielt, sein. Es wird vermutet, dass eine stimulierte Genexpression der Δ 6-Desaturase positiv mit der Aktivität dieses Enzyms korreliert. Aus technischen Gründen konnte die Aktivität dieses Enzyms in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt werden. Die Aktivität der Δ 6-Desaturase wird durch eine Feedback-Regulierung kontrolliert, bei der mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie C20:4 (n-6), C22:4 (n-6), C22:5 (n-6) und C22:6 (n-3) direkt mit den Substraten dieser Reaktion konkurrieren (BRENNER 1989). Die Aktivität der Desaturasen wird durch die Fluidität mikrosomaler

Membranen reguliert (BRENNER 1981). In Membranphospholipiden gebundene Arachidonsäure trägt größtenteils zur Aufrechterhaltung der Membranfluidität bei (STUBBS AND SMITH 1984). Geringere Anteile an Arachidonsäure in Membranen können zu verminderter Membranfluidität führen. Die erhöhte mRNA-Expression der $\Delta 6$ -Desaturase und der hohe Anteil an langkettigen (n-3)-PUFA in den Leberphospholipiden der Ratten, deren Diät CLA enthielt, könnten auf die geringe Konzentration an C20:4 (n-6) in den Leberphospholipiden und dies wiederum auf die geringe Konzentration an C18:2 (n-6) in der Diät zurückgeführt werden. Die vermehrte Inkorporierung von (n-3)-PUFA in Membranlipiden der Rattenleber könnte sich kompensatorisch auf die homöostatische Kontrolle der Membranfluidität auswirken. Die Regulation der Membranfluidität ist von zentraler Bedeutung für alle biochemischen Prozesse, die an oder über Membranen stattfinden (STUBBS AND SMITH 1984).

Aufgrund der geringen Mengen an Linolsäure in der CLA-Diät könnte vermutet werden, dass bei Fütterung mit CLA bei den Ratten ein Mangel an essentiellen Fettsäuren vorlag. Die Berechnung des Verhältnisses C20:3 (n-9)/C20:4 (n-6) ist die klassische biochemische Methode, um ein Mangel an essentiellen Fettsäuren zu ermitteln (HOLMAN 1960). Wenn der Anteil an C18:2 (n-6) unzureichend ist, im Fall eines Mangels an essentiellen Fettsäuren, wird C18:1 (n-9) vermehrt zu C20:3 (n-9) desaturiert und elongiert. In der vorliegenden Arbeit war der Quotient von C20:3 (n-9)/C20:4 (n-6) bei Fütterung mit CLA in den Leberphospholipiden der Ratten, deren Diät CLA enthielt, mit 0,1 bis 0,4 höher als bei Ratten, deren Diät SBÖ (0,01) oder HÖ-SBÖ (0,06 bis 0,23) enthielt. Mangel an essentiellen Fettsäuren führte bei Ratten zu pathologischen Veränderungen der Haut und zu Wachstumsstörungen (CUNNANE AND ANDERSON 1997). Der Quotient C20:3 (n-9)/C20:4 (n-6) war in den Leberphospholipiden dieser Ratten mit 3,40 höher als der bei den Kontrollratten mit 0,02, die ausreichend Linolsäure in ihrer Diät hatten (CUNNANE AND ANDERSON 1997).

Der nur leicht erhöhte Quotient von C20:3 (n-9)/C20:4 (n-6) in der vorliegenden Studie nach Fütterung mit CLA könnte ein Ausdruck eines beginnenden Mangels an essentiellen Fettsäuren sein, da der Bedarf an Linolsäure von 6g pro kg Diät für wachsende Ratten (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1995) mit der CLA-Diät nicht gedeckt wurde. Dennoch wurden weder vermindertes Wachstum noch pathologische Hautveränderungen bei Ratten, deren Diät CLA enthielt, beobachtet.

Es wird gezeigt, dass bei Ersatz von Diätfetten, welche reich an Linolsäure sind, durch Diätfette, welche hohe Konzentrationen an CLA und geringe Konzentrationen an Linolsäure

enthalten, erhebliche Veränderungen im Stoffwechsel von (n-3)-PUFA in der Rattenleber zu erkennen waren. CLA in der Diät führte zu einer erhöhten mRNA-Expression der $\Delta 6$ -Desaturase in der Leber und zu einer gesteigerten Inkorporierung von langkettigen (n-3)-PUFA in die Leberphospholipide der Ratten.

4.5.4 Aktivität lipogener Enzyme und Konzentration an Triglyceriden

Die Inkubation von Hep G2-Zellen mit cis-9,trans-11 CLA oder einem CLA-Gemisch bestehend aus cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA führte zu höheren Triglyceridkonzentrationen in den Zellen (IGARASHI AND MIYAZAWA 2001, JUN ET AL. 2000). Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit höhere Triglyceridkonzentrationen in Hep G2-Zellen analysiert, welche mit trans-10,cis-12 CLA inkubiert wurden. Die Ergebnisse sind mit einer Studie von LIN ET AL. (2001) vergleichbar. Die Autoren zeigten, dass nach Inkubation mit trans-10,cis-12 CLA die Triglyceridkonzentration in Hep G2-Zellen erhöht war. Die Triglyceridkonzentration korreliert positiv mit der Aktivität von Leberenzymen, welche in der Fettsäuresynthese eine Rolle spielen (TAKEUCHI ET AL. 2001). In der vorliegenden Arbeit war die Aktivität der lipogenen Enzyme G6PDH und FsS nach Inkubation der Hep G2-Zellen mit trans-10,cis-12 CLA erhöht.

Daraus wird geschlossen, dass in den hier durchgeführten Untersuchungen mit cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA ausschließlich das trans-10,cis-12 CLA-Isomer die Lipogenese in Hep G2-Zellen durch erhöhte Aktivitäten von FsS und G6PDH stimulierte.

Bei Mäusen führte die Fütterung von CLA zu einer Zunahme des Fettgehalts in der Leber (BELURY AND KEMPA-STECZKO 1997). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Tierstudie zeigen, dass Ratten, deren Diät CLA enthielt, erhöhte Triglyceridkonzentrationen in der Leber hatten. In Ratten kann eine Triglyceridanreicherung in der Leber auf eine erhöhte *de novo* Fettsäuresynthese zurückgeführt werden (BALTZELL AND BERDANIER 1985, NACE AND SZEPESI 1976). In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie war nach Fütterung von Mäusen mit einem CLA-Gemisch aus cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA die Triglyceridkonzentration in der Leber ebenfalls erhöht (TAKAHASHI ET AL. 2003). Die Autoren führten diesen Effekt auf eine erhöhte Lipogenese zurück, da die Aktivität und die Genexpression lipogener Enzyme in der Leber durch CLA stimuliert wurden. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine erhöhte Aktivität des lipogenen Enzyms FsS in der Leber der Ratten, deren Diät CLA enthielt, analysiert.

CLEMENT ET AL. (2002) führten eine erhöhte Lipogenese in der Leber von Mäusen auf das trans-10,cis-12 CLA-Isomer zurück. In dieser Studie wurde nach Fütterung mit trans-10,cis-

12 CLA Leberverfettung beobachtet (CLEMENT ET AL. 2002). Eine Leberverfettung tritt auf, wenn die Triglyceridkonzentration in der Leber 5% der Lebermasse übersteigt. Eine Leberverfettung ist bei den Ratten in der vorliegenden Studie, deren Diät CLA enthielt, auszuschließen, da die Triglyceridkonzentration bei ca. 1% der Lebermasse lag. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass in Langzeitstudien dieser Effekt durch CLA verstärkt werden kann und pathologische Reaktionen der Leber auftreten. So wurde auch in einer Humanstudie gezeigt, dass trans-10,cis-12 CLA Leberhypertrophie verursacht (LARSEN ET AL. 2003).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, dass CLA die Lipogenese in der Rattenleber durch eine höhere Aktivität von FsS stimuliert.

4.6 Einfluss konjugierter Linolsäuren (cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA) auf die Bildung von Eicosanoiden von Hep G2-Zellkulturen und der Rattenleber

Der Einfluss von CLA auf die Bildung von Eicosanoiden aus Arachidonsäure wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Verschiedene Tier- und Zellkulturstudien zeigten, dass CLA die Biosynthese von Eicosanoiden vermindert (EDER ET AL. 2003, WHIGHAM ET AL. 2002, KAVANAUGH ET AL. 1999, TRUITT ET AL. 1999, LI ET AL. 1999, LIU AND BELURY 1998, SUGANO ET AL. 1998). Dagegen berichten einige Autoren, dass CLA die Eicosanoidsynthese in Mäusen und Meerschweinchen nicht beeinflussen (WHIGHAM ET AL. 2001, HANSEN-PETRIK ET AL. 2000). Interessanterweise wird zunehmend eine Stimulierung der Eicosanoidsynthese durch CLA in Mäusen und menschlichen Zellkulturen diskutiert (URQUHART ET AL. 2002, MILLER ET AL. 2001, KAVANAUGH ET AL. 1999).

Die Biosynthese von PGI₂, TXA₂, PGE₂ und PGF_{2α} beinhaltet drei sequentielle Stufen: (1) die Freisetzung der Arachidonsäure aus Phospholipiden durch PLA₂, (2) eine oxidative Transformation von Arachidonsäure zu dem cyclischen Prostaglandinperoxid H (PGH₂) durch COX und (3) eine Isomerisierung von PGH₂ zu Serie-2-Eicosanoiden durch Synthasen, Isomerasen und Reduktasen.

Es wäre zu erwarten, dass geringe Konzentrationen an Arachidonsäure in den Membranlipiden zu einer verminderten Bildung von 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, PGF_{2α}, PGE₂ führt. Dies war in der vorliegenden Zellkulturstudie nicht der Fall. Die Konzentration an 6-keto-PGF_{1α} und PGF_{2α} im Zellmedium war nach 24stündiger Inkubation mit 100µmol/l trans-10,cis-12 CLA erhöht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind mit Studien an Endothelzellen zu vergleichen. URQUHART ET AL. (2002) zeigten, dass trans-10,cis-12 CLA in der Konzentration von 100µmol/l die Synthese von PGI₂, TXB₂, PGF_{2α} und PGE₂ in menschlichen Venenendothelzellen stimuliert; aber bei Konzentrationen von 25 und

50 $\mu\text{mol/l}$ hemmte. In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie mit menschlichen Endothelzellen stimulierte das mit Zelllipiden verresterte trans-10,cis-12 CLA-Isomer die Bildung von 6-keto-PGF_{1 α} um das Dreifache, hemmte die Bildung jedoch als freie Fettsäure (TORRES-DUARTE AND VANDERHOEK 2003).

Die Konzentration an freier Arachidonsäure in Zellen ist sehr gering, da das Gleichgewicht zwischen De- und Reacylierung unter physiologischen Bedingungen auf Seiten der Reacylierung liegt (FLESCH ET AL. 1989, IRVINE 1982). In Zellen vorkommende hohe Konzentrationen an freier Arachidonsäure sind auf einer gehemmten Reacylierung von Lysophospholipiden zurückzuführen (BALSINDE ET AL. 1999). Es wäre möglich, dass in der vorliegenden Arbeit die Reacylierung von Arachidonsäure in Hep G2-Zellen nach Inkubation mit trans-10,cis-12 CLA gehemmt wurde. Die Vermutung wird durch die Feststellung unterstützt, dass nach Inkubation der Hep G2-Zellen mit trans-10,cis-12 CLA die Konzentration an Arachidonsäure in PC vermindert war.

Freie Arachidonsäure steht als Substrat für COX zur Verfügung (HANEL ET AL. 1993). In der vorliegenden Studie hatte die Inkubation der Hep G2-Zellen mit trans-10,cis-12 CLA keinen Einfluss auf die mRNA-Konzentration der COX-1. In einer Studie an menschlichen Endothelzellen zeigte trans-10,cis-12 CLA ebenfalls keine Wirkung auf die Expression der COX-1, trotz veränderter Eicosanoidkonzentrationen (URQUHART ET AL. 2002). COX-1 ist ein konstitutiv vorkommendes Enzym (SMITH AND DEWITT 1996). Zellkulturstudien zeigten, dass nach Stimulation und Inkubation mit CLA-Isomere die Genexpression von COX-2 vermindert wurde (EDER ET AL. 2003, YU ET AL. 2002, IWAKIRI ET AL. 2002, YAMASAKI ET AL. 2002). COX-2-mRNA konnte in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden. Hierfür wäre ein anderer Versuchsansatz notwendig, da COX-2 hauptsächlich in stimulierten Zellen exprimiert wird (JONES ET AL. 1993, HLA AND NEILSON 1992).

Die Freisetzung von Arachidonsäure aus Membranlipiden durch PLA₂ ist der mengenlimitierende Schritt bei der Bildung von Eicosanoiden (HERSCHMAN 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der sPLA₂ nach Inkubation der Hep G2-Zellen mit trans-10,cis-12 CLA nicht beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit war die Konzentration an TXB₂ und PGE₂ nach Inkubation der Hep G2-Zellen mit trans-10,cis-12 CLA nicht verändert. Es wird vermutet, dass trans-10,cis-12 CLA die Enzyme Prostacyclin-Synthase und Prostaglandin E₂-9-Ketoreduktase beeinflusst. Prostacyclin-Synthase katalysiert die Synthese von PGI₂ aus PGH₂ und Prostaglandin E₂-9-Ketoreduktase katalysiert die Synthese von PGF_{2 α} aus PGE₂. Bislang gibt es keine Erkenntnisse darüber, ob CLA bei der Bildung von Eicosanoiden Synthesen, Isomerasen oder Reduktasen beeinflussen.

Es wäre festzuhalten, dass in den hier durchgeführten Untersuchungen mit cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA ausschließlich das trans-10,cis-12 CLA-Isomer zur gesteigerten Bildung von 6-keto-PGF_{1α} und PGF_{2α} in Hep G2-Zellen führte. Die sPLA₂ und die COX-1 spielten in diesem Zusammenhang keine Rolle. Es ist darauf hinzuweisen, dass in der vorliegenden Studie die hohe Konzentration an CLA-Isomeren von 100μmol/l gewählt wurde, um Effekte zu erzielen. Es ist fragwürdig, ob der Einfluss von 100μmol/l trans-10,cis-12 CLA auf die Bildung von Eicosanoiden in Hep G2-Zellen physiologisch relevant ist.

Ratten, deren Diät CLA enthielt, hatten in PC und PE der Leber signifikant geringere Anteile an Arachidonsäure, als Ratten, deren Diät SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielt. Wie zu erwarten, waren die Konzentrationen an 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, PGF_{2α} und PGE₂ in der Leber von Ratten, deren Diät CLA enthielt, deutlich geringer als in Ratten, deren Diät SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielt. Die Höhe der Synthese an Eicosanoiden richtet sich im wesentlichen nach der Verfügbarkeit der Ausgangssubstanzen Arachidonsäure und Eicosapentaensäure im Membranlipidpool und deren Relation zueinander (WHELAN 1996, KINSELLA ET AL. 1990). In der vorliegenden Arbeit war der Quotient von C20:5 (n-3)/C20:4 (n-6) in den Phospholipiden der Ratten, deren Diät CLA enthielt, am höchsten. Eicosapentaensäure beeinflusst die Synthese der Eicosanoide aus Arachidonsäure auf mehrfache Weise. Das geschieht zunächst über den Einfluss auf die Gewebespiegel der Arachidonsäure. Eicosapentaensäure hat außerdem eine höhere Affinität zu COX als Arachidonsäure und hemmt die Aktivität der COX (ZÖLLNER AND TATO 1992). Zum anderen können Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure den Pool an freier Arachidonsäure über die Freisetzung der Arachidonsäure aus Membranphospholipiden und ihren Einbau in diese regulieren (KINSELLA 1990). Von Interesse wären in diesem Zusammenhang die Konzentrationen von Prostaglandinen und Thromboxan der 3er-Serie, Metabolite der Eicosapentaensäure. Während PGI₂ und PGI₃ gleichermaßen antiaggregatorisch wirken, ist TXA₃ eine weniger proaggregatorische Substanz als TXA₂, was zu weniger Vasokontraktionen führt (NEEDLEMAN ET AL. 1986). Aus labortechnischen Gründen konnten die Metabolite der Eicosapentaensäure im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht gemessen werden.

Die geringere Aktivität von sPLA₂ in den Lebermikrosomen dieser Tiere könnte auch zu geringeren Konzentrationen an 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, PGE₂, PGF_{2α} beigetragen haben. Weil die Aktivität nur leicht vermindert war, aber die Konzentrationen an Eicosanoiden deutlich gesunken sind, wird die verminderte Aktivität der sPLA₂ nicht als Hauptursache gesehen. Es wird angenommen, dass die geringere sPLA₂ Aktivität die Folge von verminderten Anteilen an Arachidonsäure in den Membranphospholipiden war, da mit Phospholipiden veresterte

Arachidonsäure zu einem Anstieg von membrangebundener PLA₂ führt (MOMCHILOVA ET AL. 1998).

Auch die gemessene mRNA-Konzentration von COX-1 in der Leber der Ratten, deren Diät CLA enthielt, unterschied sich nicht von den Tieren, deren Diät SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielt. Das Ergebnis könnte darauf zurückgeführt werden, dass die mRNA und das Protein von COX-1 in Geweben in relativ stabilen Konzentrationen vorkommen, wobei die Eicosanoidsynthese in diesen Geweben variieren kann (WILLIAMS AND RAYMOND 1996).

Ein weiterer möglicher Mechanismus bei der Hemmung der Eicosanoidsynthese besteht durch desaturierte/elongierte Metabolite der CLA. SEBADIO ET AL. (1997) zeigten, dass in der Rattenleber CLA in konjugierte C20:4 desaturiert und elongiert wird und somit die Verfügbarkeit der C20:4 (n-6) für COX blockiert. Weiterhin ist es möglich, dass membrangebundene CLA und deren desaturierte/elongierte Metabolite mit anderen PUFA um die PLA₂- und/oder COX-Enzymfamilie konkurrieren.

PGI₂, TXA₂, PGF_{2α} und PGE₂ werden in der Rattenleber von Nicht-Parenchymzellen, wie Kupfer- und Endothelzellen, gebildet (FENNEKOHL ET AL. 1999). Hepatozyten synthetisieren keine Cyclooxygenaseprodukte (MATER ET AL. 1999, JOHNSTON AND KROENING 1996). Hepatozyten metabolisieren, transportieren und reagieren auf Cyclooxygenaseprodukte, die von Nicht-Parenchymzellen freigesetzt wurden. PGF_{2α} und PGE₂ erhöhen die Glycogenolyse in Hepatozyten (DEVRIES ET AL. 1995, NEUSCHÄFER-RUBE ET AL. 1994). PGE₂ vermindert in der Leber mRNA-Konzentrationen von Schlüsselenzymen im Kohlenhydrat-Stoffwechsel (PÜSCHEL AND CHRIST 1994). TXA₂ vermindert den Blutfluss in den Sinusoiden, dadurch kommt es zur vermehrten Adhäsion von Leukozyten, außerdem wird die sinusoidale Filtration gehemmt (FENNEKOHL ET AL. 1999). PGI₂ wirkt diesem Effekt von TXA₂ entgegen.

Es kann davon ausgegangen werden, dass bei der verminderten Bildung von 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, PGE₂, PGF_{2α} in der Leber der Ratten, deren Diät CLA enthielt, COX-1 keine Rolle spielt. Die geringeren Konzentrationen an 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, PGE₂, PGF_{2α} und die verminderte sPLA₂ Aktivität in der Leber werden auf verminderte Anteile an Arachidonsäure und auf das höhere Verhältnis zwischen C20:5 (n-3) und C20:4 (n-6) in den Leberlipiden zurückgeführt.

5 Zusammenfassung

Konjugierte Linolsäuren (engl.: conjugated linoleic acid, CLA) sind biologisch hoch aktive Substanzen, die sich in einigen ihrer Eigenschaften von denen der Linolsäure unterscheiden. Aus Zellkultur- und Tierstudien ist bekannt, dass CLA den Lipidstoffwechsel und die Bildung von Eicosanoiden beeinflussen. Die Ergebnisse sind jedoch zum Teil kontrovers und es gibt nur wenige Erkenntnisse darüber, ob CLA Enzyme, die im Lipid- und Eicosanoidstoffwechsel involviert sind, auf Transkriptions- und/oder Translationsebene beeinflussen. Auch liegen nur wenige Informationen über die Wirkung einzelner CLA-Isomere vor.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Wirkung von cis-9,trans-11 CLA und trans-10,cis-12 CLA auf die Fettsäuresaturierung, auf Lipide und auf die Bildung von Eicosanoiden aus der Arachidonsäure im Detail zu charakterisieren.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Zellkulturversuche mit Hep G2-Zellen durchgeführt, welche mit den CLA-Isomeren cis-9,trans-11 CLA oder trans-10,cis-12 CLA inkubiert wurden. Als Kontrolle dienten Hep G2-Zellen, welche nur mit Medium (ohne CLA-Isomere) inkubiert wurden. Beide CLA-Isomere hatten keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit und das Zellwachstum von Hep G2-Zellen. Beide CLA-Isomere inkorporierten sich zeit- und konzentrationsabhängig in die Lipide, vor allem in die Neutrallipide (NL) und in geringerem Maße in die Phospholipide Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) von Hep G2-Zellen. Nach Inkubation der Hep G2-Zellen mit trans-10,cis-12 CLA war der Anteil an gesättigten Fettsäuren (engl.: saturated fatty acids, SFA) in NL, PC und PE der Zellen erhöht und der Anteil an einfach-ungesättigten Fettsäuren (engl.: monounsaturated fatty acids, MUFA) sowie der Quotient von MUFA/SFA verringert. In PC und PE waren nach Inkubation der Hep G2-Zellen mit trans-10,cis-12 CLA die Quotienten von C20:4 (n-6)/C18:2 (n-6), von C20:5 (n-3)/C18:3 (n-3) und von C22:6 (n-3)/C22:5 (n-3) verringert. Keine Veränderungen wurden in der mRNA-Konzentration der Δ^9 -Desaturase und Δ^6 -Desaturase, welche das mengenlimitierende Enzym in der Desaturierung von Linol- und α -Linolensäure ist, beobachtet. Obwohl nach Inkubation von Hep G2-Zellen mit trans-10,cis-12 CLA der Anteil an Arachidonsäure in PC verringert war, war die Konzentration an 6-keto-Prostaglandin (PG) F_{1 α} und PGF_{2 α} im Medium der Zellen erhöht. Die Aktivität der sekretorischen (s) Phospholipase A₂ (PLA₂) und die relative mRNA-Konzentration der Cyclooxygenase-1 (COX-1) unterschieden sich nicht zwischen den Behandlungsgruppen. Hep G2-Zellen, die mit trans-10,cis-12 CLA inkubiert wurden, wiesen höhere Konzentrationen an Triglyceriden und höhere Aktivitäten von Fettsäure-Synthetase (FsS) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

(G6PDH) auf. Cis-9,trans-11 CLA zeigte hinsichtlich der untersuchten Parameter keine Effekte.

Es kann zusammenfassend gesagt werden, dass unter den beiden untersuchten CLA-Isomeren trans-10,cis-12 CLA das aktive Isomer im Lipidmetabolismus und bei der Bildung von Eicosanoiden in Hep G2-Zellen ist. Bereits physiologische Konzentrationen von trans-10,cis-12 CLA in den Zelllipiden zeigten Effekte auf die Fettsäurezusammensetzung von NL, PC und PE in Hep G2-Zellen. Trans-10,cis-12 CLA hemmte die $\Delta 9$ -Desaturierung gesättigter Fettsäuren, die $\Delta 6$ -, $\Delta 5$ -Desaturierung von Linolsäure und die $\Delta 6$ -, $\Delta 5$ - und $\Delta 4$ -Desaturierung von α -Linolensäure in Hep G2-Zellen. Dieser Effekt dürfte offensichtlich nicht auf eine veränderte Genexpression der Desaturasen, sondern auf eine Inaktivierung des Enzymproteins zurückzuführen sein. Trans-10,cis-12 CLA stimulierte die Bildung von 6-keto-PGF_{1 α} und PGF_{2 α} in Hep G2-Zellen, wobei die Enzyme sPLA₂ und COX-1 in den hier durchgeführten Versuchen keine Rolle spielten. Trans-10,cis-12 CLA stimulierte die Lipogenese in Hep G2-Zellen durch erhöhte Aktivitäten von FsS und G6PDH.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Fütterungsversuch mit männlichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Die Tiere wurden restriktiv gefüttert. Die Ratten erhielten in den ersten 4 Wochen mit der Diät entweder 30g/kg CLA70-TofoCell (33g cis-9,trans-11 CLA und 34g trans-10,cis-12 CLA pro 100g Fettsäuren) oder Sonnenblumenöl (SBÖ) oder Hochölsäurehaltiges Sonnenblumenöl (HÖ-SBÖ). SBÖ wurde als ein Kontrollfett gewählt, da es gleiche Mengen an Linolsäure wie die im CLA-Öl vorkommenden konjugierten Linolsäuren enthält. HÖ-SBÖ wurde als weiteres Kontrollfett gewählt, um die Wirkungen von CLA mit einem Fett zu vergleichen, das reich an Ölsäure und arm an Linolsäure ist. Eine wichtige Intention des Tierversuches bestand darin, den Einfluss von CLA auf den Stoffwechsel von (n-3)-mehrfach ungesättigten Fettsäuren (engl.: polyunsaturated fatty acids, PUFA) zu untersuchen. Deshalb wurde nach der 4wöchigen Anfangsphase, in der sich der Lipidstoffwechsel der Ratten an die drei verschiedenen Diätfette adaptierte, in der 5. Woche die Diäten zusätzlich mit 50g Leinöl/kg supplementiert, da dieses Diätfett reich an α -Linolensäure ist. Die Futteraufnahme und Gewichtsentwicklung der Ratten war unabhängig von der Art des eingesetzten Diätfettes. Das Lebergewicht der Ratten, deren Diät CLA enthielt, war erhöht. Beide CLA-Isomere inkorporierten sich in die Leberlipide, vor allem in NL und in geringerem Maße in PC und PE. Nach Fütterung mit CLA waren die Anteile an SFA in PC und PE der Rattenleber am höchsten und der Quotient von MUFA/SFA in NL am geringsten. Ratten, deren Diät CLA enthielt, hatten höhere mRNA-Konzentrationen der $\Delta 6$ -Desaturase in der Leber, höhere Gewichtsprozentanteile an Desaturierungsprodukten der α -

Linolensäure [C20:5 (n-3) + C22:5 (n-3) + C22:6 (n-3)], vor allem an C22:6 (n-3), einen höheren Quotienten von (n-3)-PUFA mit 22 C-Atomen zu C20:5 (n-3) und geringere Gewichtsprozent an Gesamt-C20-PUFA [C20:3 (n-6) + C20:4 (n-6) + C20:5 (n-3)] in den Leberlipiden als Ratten, deren Diät SBÖ oder HÖ-SBÖ enthielt. Bei Fütterung mit CLA war die Konzentration an Triglyceriden in der Leber und die Aktivität der FsS im Lebercytosol von Ratten signifikant höher als bei Fütterung mit SBÖ oder HÖ-SBÖ. Die Anteile der Arachidonsäure in den Phospholipiden sowie die Konzentration von 6-keto-PGF_{1α}, Thromboxan (TX)B₂, PGF_{2α} und PGE₂ in der Leber und im Plasma waren nach Fütterung mit CLA geringer als nach Fütterung mit SBÖ oder HÖ-SBÖ. Die Aktivität der sPLA₂ war in den Lebermikrosomen nach Fütterung mit CLA signifikant geringer als nach Fütterung mit SBÖ oder HÖ-SBÖ. Die relative mRNA-Konzentration von COX-1 in der Leber unterschied sich nicht zwischen den 3 Gruppen.

Es kann zusammenfassend gesagt werden, dass bei Ersatz von Diätfetten, welche reich an Linolsäure sind, durch Diätfette, welche hohe Konzentrationen an CLA und geringe Konzentrationen an Linolsäure enthalten, erhebliche Veränderungen im Stoffwechsel von (n-3)-PUFA in der Rattenleber zu erkennen waren. CLA in der Diät führte zu einer erhöhten mRNA-Expression der Δ6-Desaturase in der Leber und zu einer gesteigerten Inkorporierung von langkettigen (n-3)-PUFA, welche durch die Δ6-, Δ5- und Δ4-Desaturierung der α-Linolensäure gebildet wurden, in die Leberphospholipide der Ratten. CLA in der Diät hatte geringere Konzentrationen an 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, PGF_{2α} und PGE₂ in der Leber und im Plasma von Ratten zur Folge, wobei sPLA₂ keine wesentliche und COX-1 offenbar keine Rolle in diesem Zusammenhang spielten. Aufgrund der ermittelten Resultate ist es eher wahrscheinlich, dass die erhöhte Bildung und Inkorporierung von langkettigen (n-3)-PUFA in die Leberphospholipide sowie die verminderten Eicosanoidkonzentrationen in der Leber in geringere Arachidonsäuregehalte in den Leberphospholipiden begründet sind. Das höhere Lebergewicht der Ratten, deren Diät CLA enthielt, ist auf die höhere Konzentration an Triglyceriden in der Leber zurückzuführen, die Folge der erhöhten Aktivität der FsS im Lebercytosol war.

5 Summary

Conjugated linoleic acids (CLA) are biologically highly active compounds which differ in their biologic properties in several ways from linoleic acid. Recent studies on cell culture and animal models demonstrated that CLA affects the lipid metabolism and the formation of eicosanoids. However, some results in this regard are contradictory and experimental evidence that CLA affects enzymes of lipid metabolism and of eicosanoid formation is lacking so far. The effects of single isomers of CLA has not yet been studied in detail.

Therefore, the aim of the present work was to determine the effects of two different isomers of CLA, cis-9,trans-11 CLA and trans-10,cis-12 CLA, on fatty acid desaturation, on lipids and on the formation of eicosanoids deriving from arachidonic acid.

In the first part of the work Hep G2 cells were treated with cis-9,trans-11 CLA or trans-10,cis-12 CLA in the cell medium or with medium alone (control). The growth and viability of the cells were not affected by incubation with either CLA isomer. There was a time- and concentration-dependent incorporation of both CLA isomers into the lipids of Hep G2 cells. The concentrations of cis-9,trans-11 CLA and trans-10,cis-12 CLA after incubation, however, were greater in neutral lipids (NL) than in phospholipids phosphatidyl choline (PC) and phosphatidyl ethanolamine (PE). After incubation with trans-10,cis-12 CLA there was an increase of saturated fatty acids (SFA) in NL, PC and PE and a decrease of monounsaturated fatty acids (MUFA) and a decrease of the ratio of MUFA to SFA in Hep G2 cells. Hep G2 cells treated with trans-10,cis-12 CLA had lower ratios of C20:4 (n-6)/C18:2 (n-6), of C20:5 (n-3)/C18:3 (n-3) and of C22:6 (n-3)/C22:5 (n-3) in PC and PE. The relative mRNA concentrations of Δ^9 -desaturase and Δ^6 -desaturase, which is the rate limiting enzyme in the desaturation pathway of linoleic acid and α -linolenic acid, were not different between Hep G2 cells treated with trans-10,cis-12 CLA or with medium alone. In PC the concentration of arachidonic acid was reduced after incubation of Hep G2 cells with trans-10,cis-12 CLA. But Hep G2 cells which treated with trans-10,cis-12 CLA released more 6-keto-prostaglandin (PG) F_{1 α} and PGF_{2 α} than control cells. The activity of secretory (s) phospholipase A₂ (PLA₂) and the relative mRNA concentration of cyclooxygenase (COX) -1 were not different between control cells and cells treated with trans-10,cis-12 CLA. After incubation with trans-10,cis-12 CLA there was an increase of the concentration of triglycerides and an increase of the activities of lipogenic enzymes fatty acid synthetase (FAS) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) in Hep G2 cells. The fatty acid desaturation, the concentration of triglycerides and the formation of eicosanoids of Hep G2 cells were not affected by incubation with cis-9,trans-11 CLA.

In conclusion, the results of the first part of the present work suggests that trans-10,cis-12 CLA is the active isomer in the lipid metabolism and in the formation of eicosanoids of Hep G2 cells. The fatty acid composition in NL, PC and PE of Hep G2 cells was influenced by the trans-10,cis-12 CLA at physiologic concentrations in cell lipids. Trans-10,cis-12 CLA had significant effects on the metabolism of SFA, MUFA, (n-6) and (n-3) PUFA in Hep G2 cells by suppressing $\Delta 9$ -desaturation of SFA, $\Delta 6$ -, $\Delta 5$ -desaturation of linoleic acid and $\Delta 6$ -, $\Delta 5$ - and $\Delta 4$ -desaturation of α -linolenic acid. This effect wasn't associated with an impaired genexpression of desaturases but might be due to an inactivation of enzyme protein. Trans-10,cis-12 CLA stimulated the formation of 6-keto-PGF_{1 α} and PGF_{2 α} in Hep G2 cells, however, sPLA₂ and COX-1 did not play a role in this respect. The increased concentration of triglycerides might be due to the increased activities of FAS and G6PDH in Hep G2 cells treated with trans-10,cis-12 CLA.

In the second part of the present work a study with male Sprague-Dawley rats was carried out. The rats were fed restricted amounts of diets. Rats were fed diets with 30g/kg of either a CLA oil (containing 33g cis-9,trans-11 CLA and 34g trans-10,cis-12 CLA per 100g fatty acids), or sunflower oil (SFO) or high-oleic acid-sunflower oil (HO-SFO) for 4 wk. SFO was used as a control fat because its concentration of linoleic acid was similar with that in the CLA oil used in this study; this allowed a comparison of the effects of linoleic acid and CLA. HO-SFO was used to compare the effects of CLA with a fat rich in oleic acid and low in linoleic acid. After an initial period, in which the lipid metabolism has been adapted to the different types of fat, in the 5th wk the diets were supplemented with 50g of linseed oil/kg as a source of α -linolenic acid. Diet intake and final body weights did not differ between the three groups. Rats fed CLA had a higher liver weight as rats fed SFO or HO-SFO. Both CLA isomers were incorporated in hepatic lipids of rats fed CLA. The concentration of both isomers was greater in NL than in PC and PE of the liver. The concentration of SFA in PC and PE was higher in the rats fed CLA than in the rats fed SFO or HO-SFO. The ratio of MUFA to SFA in NL of rats, whose diets contained CLA as dietary fat, was lower than in NL of rats, whose diets contained SFO or HO-SFO as dietary fats. Rats fed the CLA diet had a higher relative mRNA concentration of $\Delta 6$ -desaturase in the liver, higher concentrations of total desaturation products derived from α -linolenic acid [C20:5 (n-3) + C22:5 (n-3) + C22:6 (n-3)] in PC, particularly C22:6 (n-3), increased ratios of (n-3) PUFA with 22 carbon atoms to C20:5 (n-3) and lower concentrations of total C20-PUFA [C20:3 (n-6) + C20:4 (n-6) + C20:5 (n-3)] in liver PC and PE than rats fed SFO or HO-SFO. The hepatic concentration of triglycerides and the activity of FAS in the cytosol were higher in rats fed CLA than in rats fed SFO or HO-

SFO. The hepatic concentration of arachidonic acid in PC and PE, the activity of sPLA₂ in the liver and the hepatic concentrations of 6-keto-PGF_{1α}, thromboxane (TX)B₂, PGF_{2α} and PGE₂ of rats, whose diets contained CLA as dietary fat, were lower than in the liver of rats, whose diets contained SFO or HO-SFO as dietary fats. The relative hepatic mRNA concentration of COX-1 was not different between the three groups of rats.

In conclusion, this study shows the replacement of a dietary oil rich in linoleic acid by an oil with high concentrations of CLA and low concentrations of linoleic acid causes profound alterations of the metabolism of (n-3) PUFA of rats. Dietary CLA enhanced the hepatic mRNA concentration of Δ6-desaturase and stimulated the incorporation of long chain (n-3) PUFA deriving from Δ6-, Δ5- and Δ4-desaturation into liver phospholipids of rats. According to the results of this study, we assume that the enhanced formation and incorporation of long chain (n-3) PUFA into liver phospholipids and reduced formation of 2-series eicosanoids in rats fed the CLA diet was predominately due to markedly reduced amounts of arachidonic acid in phospholipids. The reduction of the activity of sPLA₂ in the liver of rats fed CLA was not the main reason for the strongly reduced concentrations of eicosanoids and COX-1 did not play a role in this respect. The increased liver weight might be due to the increased concentration of triglycerides in the liver and that might be due to the increased activity of FAS in the liver of rats fed CLA.

6 Literaturverzeichnis

- Aden D.P., Fogel A., Plotkin S., Damjanov I., Knowles B.B.: Controlled synthesis of HbsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979; 282: 615-616.
- Angeletti C. and deAlaniz M.J.: Fatty acid uptake and metabolism in Hep G2 human-hepatoma cells. *Mol. Cell Biochem.* 1995; 143: 99-105.
- Badinga L., Selberg K.T., Dinges A.C., Comer C.W., Miles R.D.: Dietary conjugated linoleic acid alters hepatic lipid content and fatty acid composition in broiler chickens. *Poult. Sci.* 2003; 82: 111-116.
- Ballet F., Bouma M.E., Wang S.R.: Isolation, culture and characterisation of human hepatocytes from surgical liver biopsies. *Hepatology* 1984; 4: 849-854.
- Balsinde J., Balboa M.A., Insel P.A., Dennis E.A.: Regulation and inhibition of phospholipase A₂. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999; 39: 175-89.
- Baltzell J.K. and Berdanier C.D.: Effect on the interaction of dietary carbohydrate and fat on the responses of rats to starvation/refeeding. *J. Nutr.* 1985; 115: 101-110.
- Banni S., Angioni E., Casu V., Melis M.P., Carta G., Corongiu F.P., Thompson H., Ip C.: Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1019-1024.
- Banni S., Carta G., Angioni E., Murru E., Scanu P.: Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. *J. Lipid Res.* 2001; 42: 1056-1061.
- Bassaganya-Riera J., Hontecillas-Magarzo R., Bregendahl K., Wannemuehler M.J., Zimmerman D.R.: Effects of dietary conjugated linoleic acid in nursery pigs of dirty and clean environments on growth, empty body composition, and immune competence. *J. Anim. Sci.* 2001; 79: 714-721.
- Beasley D.: COX-2 and cytosolic PLA₂ mediate IL-1 β -induced cAMP production in human vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 1999; 276: H1369-H1378.
- Becker K., Heinroth-Hoffmann I., Giessler C., Pönicke K., Brodde O.E.: PAF effects on eicosanoid release in neonatal rat cardiomyocytes. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 1995; 53: 197-200.
- Bee G.: Dietary conjugated linoleic acids affect tissue lipid composition but not de novo lipogenesis in finishing pigs. *Anim. Res.* 2001; 50: 383-399.
- Belury M.A. and Kempa-Steczko A.: Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. *Lipids* 1997; 32: 199-204.
- Bouma M.E., Rogier E., Verthier N., Labarre C., Feldmann G.: Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived cell line Hep G2: Morphologie and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 1989; 25: 267-275.

- Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
- Brenner R.R.: Factors influencing fatty acid chain elongation and desaturation. In: *The Role of Fats in Human Nutrition*. Vergroesen A.J., Crawford M. (Hrsg.). Academic Press, London 1989, pp. 45-79.
- Brenner R.R.: Nutritional and hormonal factors influencing desaturation of essential fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 1981; 20: 41-47.
- Bretillon L., Chardigny J.M., Gregoire S., Berdeaux O., Sebedio J.L.: Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities in vitro. *Lipids* 1999; 34: 965-969.
- Butte W.: Rapid method for the determination of fatty acid profiles from fats and oils using trimethylsulfonium hydroxide for transesterification. *J. Chromatogr.* 1983; 261: 142-145.
- Cantwell H., Devery R., O'Shea M., Stanton C.: The effect of conjugated linoleic acid on the antioxidant enzyme defense system in rat hepatocytes. *Lipids* 1999; 34: 833-839.
- Cherian G., Goeger M.P., Ahn D.U. (A): Dietary conjugated linoleic acid with fish oil alters yolk n-3 and trans fatty acid content and volatile compounds in raw, cooked, and irradiated eggs. *Poult. Sci.* 2002; 81: 1571-1577.
- Cherian G., Holsonbake T.B., Goeger M.P., Bildfell R. (B): Dietary CLA alters yolk and tissue FA composition and hepatic histopathology of laying hens. *Lipids* 2002; 37: 751-757.
- Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J., Rutter W.J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.* 1979; 18: 5294-5299.
- Choi Y., Kim Y.C., Han Y.B., Park Y., Pariza M.W., Ntambi J.M.: The trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid down-regulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr.* 2000; 130: 1920-1924.
- Choi Y., Park Y., Pariza M.W., Ntambi J.M.: Regulation of stearoyl-CoA desaturase activity by the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid in HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 284: 689-693.
- Christiansen E.N., Lund J.S., Rortveit T., Rustan A.C.: Effect of dietary n-3 and n-6 fatty acids on fatty acid desaturation in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1991; 1082: 57-62.
- Chuang L.T., Thurmond J.M., Liu J.W., Kirchner S.J., Mukerji P., Bray T.M., Huang Y.S.: Effect of conjugated linoleic acid on fungal $\Delta 6$ -desaturase activity in a transformed yeast system. *Lipids* 2001; 36: 139-143.
- Clement L., Poirier H., Niot I., Bocher V., Guerre-Millo M., Krief S., Staels B., Besnard P.: Dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J. Lipid Res.* 2002; 43: 1400-1409.
- Cunnane S.C. and Anderson M.J.: Pure linoleate deficiency in the rat: influence on growth, accumulation of n-6 polyunsaturates, and [1-¹⁴C]linoleate oxidation. *J. Lipid Res.* 1997; 38: 805-812.

- DeDeckere E.A.M., van Amelsvoort J.M.M., McNeill G.P., Jones P.: Effects of conjugated linoleic acid (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. *Br. J. Nutr.* 1999; 82: 309-317.
- DeLany J.P., Blohm F., Truett A.A., Scimeca J.A., West D.B.: Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *Am. J. Physiol.* 1999; 276: R1172-R1179.
- Deutsch J.: Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. In: *Methods of Enzymatic analysis*, H.U. Bergmeyer (Hrsg.). VCH Verlagsgesellschaft, 3. Auflage 1985: 190-197.
- Devery R., Miller A., Stanton C.: Conjugated linoleic acid and oxidative behaviour in cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.* 2001; 29: 341-344.
- DeVries C., Neuschäfer-Rube F., Hänecke K., Jungermann K., Püschel G.P.: Molecular cloning, expression and functional characterization of a hepatocyte prostaglandin F_{2α} receptor. *Hepatology* 1995; 22: 304A.
- Dokko R.C., Cho B.H.S., Chung B.H.: Cellular uptake of stearic, oleic, linoleic, and linolenic acid and their effects on synthesis and secretion of lipids in Hep-G2-cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1998; 30: 65-76.
- Eder K. and Kirchgessner M.: Dietary fat influences the effect of zinc deficiency on liver lipids and fatty acids in rats force-fed equal quantities of diet. *J. Nutr.* 1994; 124: 1917-1926.
- Eder K., Schleser S., Becker K., Körting R.: Conjugated linoleic acids lower the release of eicosanoids and nitric oxide from human aortic endothelial cells. *J. Nutr.* 2003; 133: 4083-4089.
- Eggert J.M., Belury M.A., Kempa-Steczko A., Mills S.E., Schinckel A.P.: Effects of conjugated linoleic acid on the belly firmness and fatty acid composition of genetically lean pigs. *J. Anim. Sci.* 2002; 79: 2866-2872.
- Ellsworth J.L., Erickson S.K., Cooper A.D.: Very low and low-density lipoprotein synthesis and secretion by the human hepatoma cell line Hep G-2. *J. Lipid Res.* 1986; 27: 858-874.
- Evans M., Park Y., Pariza M., Curtis L., Kuebler B., McIntosh M.: Trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid reduces triglyceride content while differentially affecting peroxisome proliferator activated receptor gamma2 and aP2 expression in 3T3-L1 preadipocytes. *Lipids* 2001; 36: 1223-1232.
- Fedorcsak I. and Ehrenberg L.: Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem. Scand.* 1966; 20: 107-112.
- Fenekohl A., Schieferdecker H.L., Jungermann K., Püschel G.P.: Differential expression of prostanoid receptors in hepatocytes, Kupffer cells, sinusoidal endothelial cells and stellate cells of rat liver. *J. Hepatol.* 1999; 30: 38-47.
- Flesch I., Schonhardt T., Ferber E.: Phospholipases and acyltransferases in macrophages. *Klin. Wochenschr.* 1989; 67: 119-122.

Fritsche J. and Steinhart H.: Analysis, occurrence and physiological properties of trans fatty acids (TFA) with particular emphasis on conjugated linoleic acid isomers (CLA). *Fett. Lipid* 1998; 100: 190-210.

Fujiyama-Fujiwara Y., Umeda R., Igarashi O.: Metabolism of arachidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids in HepG2 cells and rat hepatocytes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1992; 38: 329-334.

Funk C.D., Funk L.B., Kennedy M.E., Pong A.S., Fitzgerald G.A.: Human platelet/erythrocyte cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J.* 1991; 5: 2304-2312.

Garg M.L., Thomson A.B., Clandinin M.T.: Effect of dietary cholesterol and/or omega 3 fatty acids on lipid composition and delta-5 desaturase activity of rat liver microsomes. *J. Nutr.* 1988; 118: 661-668.

Griinari J.M., Cori B.A., Lacy S.H., Chouinard P.Y., Nurmela K.V.V., Bauman D.E.: Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. *J. Nutr.* 2000; 130: 2285-2291.

Gruffat D., DeLaTorre A., Chardigny J.M., Durand D., Loreau O., Sebedio J.L., Bauchart D.: In vitro comparison of hepatic metabolism of 9cis-11trans and 10trans-12cis isomers of CLA in the rat. *Lipids* 2003; 38: 157-163.

Guguen-Guillouzo C., Campion J.P., Brissot P., Glaise D., Launois B., Bourel M., Guillouzo A.: High yield preparation of isolated human adult hepatocytes by enzymatic perfusion of the liver. *Cell. Biol. Int. Rep.* 1982; 6: 625-628.

Ha Y.L., Grimm N.K., Pariza M.W.: Anticarcinogens from fried ground beef heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 1987; 8: 1881-1887.

Ha Y.L., Storkson J., Pariza M.W.: Inhibition of Benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.* 1990; 50: 1097-1101.

Hanel A.M., Schuttel M.H., Gelg M.H.: Percussive interfacial catalysis by mammalian 85-kDa Phospholipase A₂ enzymes on product-containing vesicles: application to the determination of substrate preference. *Biochemistry* 1993; 32: 5954-5958.

Hansen-Petrik M.B., McEntee M.F., Johnson B.T., Obukowicz M.G., Whelan J.: Highly unsaturated (n-3) fatty acids, but not (alpha)-linolenic acid, conjugated linoleic acid or (gamma)-linolenic acid reduce tumorigenesis in APCmin/+mice. *J. Nutr.* 2000; 130: 2434-2443.

Hara A. and Radin N.S.: Lipid extraction of tissue with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* 1978; 90: 420-426.

Hayek M.G., Nim Han S., Wu D., Watkins B.A., Meydani M., Dorsey J.L., Smith D.E., Meydani S.N.: Dietary conjugated linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCrBR mice. *J. Nutr.* 1999; 129: 32-38.

- Herschman H.R.: Regulation of prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2. *Cancer Metastasis Rev.* 1994; 13: 241-256.
- Hevko J.M. and Murphy R.C.: Formation of murine macrophage-derived 5-oxo-7-glutathionyl-8,11,14-eicosatrienoic acid (FOG₇) is catalyzed by leukotriene C₄ synthase. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 7037-7043.
- Higgs E.A., Moncada S., Vane J.R.: Prostaglandins and thromboxanes from fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 1986; 25: 5-11.
- Hla T. and Neilson K.: Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 7384-7388.
- Holman R.T.: The ratio of trienoic:tetraenoic acids in tissue lipids as a measure of essential fatty acid requirements. *J. Nutr.* 1960; 70: 405-10.
- Houseknecht K.L., Vanden Heuvel J.P., Moya-Camarena S.Y., Portocarrero C.P., Peck L.W., Nickel K.P., Belury M.A.: Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 244: 678-682.
- Igarashi M. and Miyazawa T.: The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on a human hepatoma cell line, HepG2, is induced by a change in fatty acid metabolism, but not the facilitation of lipid peroxidation in the cells. *Biochim. Biophys. Acta* 2001; 1530: 162-171.
- Ip C., Banni S., Angioni E., Carta G., McGinley J., Thompson H.J., Barbano D., Bauman D.: Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J. Nutr.* 1999; 129: 2135-2142.
- Ip C., Briggs S.P., Haegele A.D., Thompson H.J., Storkson J.M., Scimeca J.A.: The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1045-1050.
- Ip C., Chin S.F., Scimeca J.A., Pariza M.W.: Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.* 1991; 51: 6118-6124.
- Ip C., Lisk D.J., Scimeca J.A.: Potential of food modification in cancer prevention. *Cancer Res. (Suppl.)* 1994; 54: 1957S-1959S.
- Irvine R.F.: How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells. *Biochem. J.* 1982; 204: 3-16.
- Iwakiri Y., Sampson D.A., Allen K.G.: Suppression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by conjugated linoleic acid in murine macrophages. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 2002; 67: 435-443.
- Jahreis G., Kraft J., Tischendorf F., Schöne F., von Loeffelholz C.: Conjugated linoleic acids: physiological effects in animal and man with special regard to body composition. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2000; 102: 695-703.

- Javitt N.B.: Hep G2 cells as a resource of metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *FASEB* 1990; 4: 161-168.
- Jones D.A., Carlton D.P., McIntyre T.M., Zimmerman G.A., Prescott S.M.: Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 9049-9054.
- Johnston D.E. and Kroening C.: Stimulation of prostaglandin synthesis in cultured liver cells by CCl₄. *Hepatology* 1996; 24: 677-684.
- Jun W.J., Yang H.C., Cho B.H.: Comparison of conjugated linoleic acid and linoleic acid on cytotoxicity, synthesis and secretion of lipids in HepG2 cells. *In Vitro. Mol. Toxicol.* 2000; 13: 181-189.
- Kavanaugh C.J., Liu K.L., Belury M.A.: Effect of dietary conjugated linoleic acid on phorbol ester-induced PGE₂ production and hyperplasia in mouse epidermis. *Nutr. Cancer* 1999; 33: 132-138.
- Kelly G.S.: Conjugated linoleic acid: a review. *Altern. Med. Rev.* 2001; 6: 367-382.
- Kepler C.R., Hirons K.P., McNeill J.J., Tove S.B.: Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 1966; 241: 1350-1354.
- Kinsella J.E., Broughton K.S., Whelan J.W.: Dietary unsaturated fatty acids: Interaction and possible needs in relation to eicosanoid synthesis. *J. Nutr. Biochem.* 1990; 1: 123-141.
- Kritchevsky D.: Antimutagenic and some other effects of conjugated linoleic acid. *Br. J. Nutr.* 2000; 83: 459-465.
- Larsen T.M., Toubro S., Astrup A.: Efficacy and safety of dietary supplements containing CLA for the treatment of obesity: evidence from animal and human studies. *J. Lipid Res.* 2003; 44: 2234-2241.
- Lee K.N., Kritchevsky D., Pariza M.W.: Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 1994; 108: 19-25.
- Lee K.N., Pariza M.W., Ntambi J.M.: Conjugated linoleic acid decreases hepatic steroyl-CoA desaturase mRNA expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 248: 817-821.
- Li Y., Seifert M.F., Ney D.M., Grahn M., Grant A.L., Allen K.D.G., Watkins B.A.: Dietary conjugated linoleic acids alter serum IGF-I and IGF binding protein concentrations and reduce bone formation in rats fed (n-6) or (n-3) fatty acids. *J. Bone Miner. Res.* 1999; 14: 1153-1162.
- Li Y. and Watkins B.A.: Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce ex vivo prostaglandin E₂ biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids. *Lipids* 1998; 33: 417-425.
- Lin Y., Schuurbijs E., Van der Veen S., DeDeckere A.M.: Conjugated linoleic acid isomers have differential effects on triglyceride secretion in Hep G2 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 2001; 1533: 38-46.

- Lindl T. und Bauer J.: Zell- und Gewebekultur. Fischer, Stuttgart New York, 2. Auflage 1989.
- Liu K.L. and Belury A.A.: Conjugated linoleic acid reduces arachidonic acid content and PGE₂ synthesis in murine keratinocytes. *Cancer Lett.* 1998; 127: 15-22.
- Liu J., Takano T., Papillon J., Khadir A., Cybulsky V.: Cytosolic phospholipase A₂- α associates with plasma membrane, endoplasmic reticulum and nuclear membrane in glomerular epithelial cells. *Biochem.* 2001; 353: 79-90.
- Ma D.W.L., Field C.J., Clandinin M.T.: An enriched mixture of trans-10,cis-12-CLA inhibits linoleic acid metabolism and PGE₂ synthesis in MDA-MB-231 cells. *Nutr. Cancer* 2002; 44: 202-212.
- Mater M.K., Thelen A.P., Jump D.B.: Arachidonic acid and PGE₂ regulation of hepatic lipogenic gene expression. *J. Lipid Res.* 1999; 40: 1045-1052.
- Michal G.: Arachidonsäurestoffwechsel und Eicosanoide. In: *Biochemical Pathways.* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin 1999: 220-221.
- Miller C.C., Park Y., Pariza M.W., Cook M.E.: Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 198: 1107-1112.
- Miller A., Stanton C., Devery R.: Modulation of arachidonic acid distribution by conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in MCF-7 and SW480 cancer cells. *Lipids* 2001; 36: 1161-1168.
- Miner J.L., Cederberg C.A., Nielson M.K., Chen X., Baile C.A.: Conjugated linoleic acid (CLA), body fat, and apoptosis. *Obes. Res.* 2001; 9: 129-134.
- Momchilova A., Markovska T., Pankov R.: Phospholipid dependence of membrane-bound phospholipase A₂ in ras-transformed NIH 3T3 fibroblasts. *Biochimie* 1998; 80: 1055-1062.
- Moya-Camarena S.Y., Vanden Heuvel J.P., Belury M.A.: Conjugated linoleic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor α and β subtypes but does not induce hepatic peroxisome proliferation in Sprague-Dawley rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1436: 331-342.
- Nace C.S. and Szepesi B.: Dietary fatty acids on the control of glucose-6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme in the starved-refed rat. *J. Nutr.* 1976; 106: 285-291.
- National Research Council: Nutrient requirements of laboratory animals. National Academy Press 1995.
- Needleman P., Turk J., Jakschik B.A., Morrison A.R., Lefkowitz J.B.: Arachidonic acid metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* 1986; 55: 69-102.
- Nepokroeff C.M., Lakshmanan M.R., Porter J.W.: Fatty-acid synthase from rat liver. *Methods. Enzymol.* 1975; 35: 37-44.

- Neuschäfer-Rube F., DeVries C., Hänecke K., Jungermann K., Püschel G.P.: Molecular cloning and expression of a prostaglandin E₂ receptor of the EP₃ beta subtype from rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 1994; 351: 119-122.
- Nicolosi R.J., Rogers E.J., Kritchevsky D., Scimeca J.A., Huth P.J.: Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypocholesterolemic hamsters. *Artery* 1997; 22: 266-277.
- Ntambi J.M.: Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J. Lipid Res.* 1999; 40: 1549-1558.
- Pariza M.W., Park Y., Cook M.E.: Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 2000; 223: 8-13.
- Pakula R., Rubin M., Moser A.M., Lichtenberg D., Tietz A.: Biosynthesis of medium-chain triacylglycerols and phospholipids by HepG2 cells. *Lipids* 1997; 32: 489-495.
- Park Y., Albright K., Liu W., Storkson J., Cook M., Pariza M.: Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 1997; 32: 853-858.
- Park Y., Storkson J.M., Ntambi J.M., Cook M.E., Sih C.J., Pariza M.W.: Inhibition of hepatic stearoyl-CoA desaturase activity by trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 1486: 285-292.
- Petrovic N., Grove C., Langton P.E., Misso L.A., Thompson P.J.: A simple assay for a human serum phospholipase A₂ that is associated with high-density lipoproteins. *J. Lipid Res.* 2001; 42: 1706-1713.
- Poisson J.P.: Comparative in vivo and in vitro study of the influence of experimental diabetes on rat liver linoleic acid delta 6- and delta 5-desaturation. *Enzyme* 1985; 34: 1-14.
- Püschel G.P. and Christ B.: Inhibition by PGE₂ of glucagon-induced increase in phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA and acceleration of mRNA degradation in cultured rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 1994; 351: 353-356.
- Raes K., Huyghebaert G., DeSmet S., Nollet L., Arnouts S., Demeyer D.: The deposition of conjugated linoleic acids in eggs of laying hens fed diets varying in fat level and fatty acid profile. *J. Nutr.* 2002; 132: 182-189.
- Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C.: 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.* 1993; 123: 1939-1951.
- Roche H.M., Noone E., Sewter C., McBennett S., Savage D., Gibney M.J., O'Rahilly S., Vidal-Puig A.J.: Isomer-dependent metabolic effects of conjugated linoleic acid. *Diabetes* 2002; 51: 2037-2044.
- Schäfer K., Manner K., Sagredos A., Eder K., Simon O.: Incorporation of dietary linoleic and conjugated linoleic acids and related effects on eggs of laying hens. *Lipids* 2001; 36: 1217-1222.

Schonberg S. and Krokan H.E.: The inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives (CLA) of linoleic acid on the growth of human tumour cells is in part due to increased lipid peroxidation. *Anticancer Res.* 1995; 15: 1241-1246.

Sebedio J.L., Angioni E., Cardigny J.M., Gregoire S., Juaneda P., Bordeaux O.: The effect of conjugated linoleic acid isomers on fatty acid profiles of liver and adipose tissue and their conversion to isomers of 16:2 and 18:3 conjugated fatty acids in rats. *Lipids* 2001; 36: 575-582.

Sebedio J.L., Juaneda P., Dobson G., Ramilison I., Martin J.C., Chardigny J.M., Christie W.W.: Metabolites of conjugated isomers of linoleic acid (CLA) in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1997; 1345: 5-10.

Simon O., Männer K., Schäfer K., Sagredos A., Eder K.: Effects of conjugated linoleic acids on protein to fat proportions, fatty acids, and plasma lipids in broilers. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2000; 102: 402-410.

Smedman A. and Vessby B.: Conjugated linoleic acid supplementation in humans – The metabolic effects. *Lipids* 2001; 36: 773-781.

Smith W.L. and DeWitt D.L.: Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv. Immunol.* 1996; 62: 167-215.

Sprecher H.: Biochemistry of essential fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 1981; 20: 13-22.

Stangl G.I. (A): High dietary levels of a conjugated linoleic acid mixture alter hepatic glycerophospholipid class profile and cholesterol-carrying serum lipoproteins of rats. *J. Nutr. Biochem.* 2000; 11: 184-191.

Stangl G.I. (B): Conjugated linoleic acids exhibit a strong fat-to-lean partitioning effect, reduce serum VLDL lipids and redistribute tissue lipids in food-restricted rats. *J. Nutr.* 2000; 130: 1140-1146.

Stubbs C.D. and Smith A.D.: The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1984; 921: 378-391.

Sugano M., Tsujita A., Yamasaki M., Noguchi M., Yamada K.: Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats. *Lipids* 1998; 33: 521-527.

Sugano M., Tsujita A., Yamasaki M., Yamada K., Ikeda I., Kritchevsky D.: Lymphatic recovery, tissue distribution and metabolic effects of conjugated linoleic acid in rats. *J. Nutr. Biochem.* 1997; 8: 38-43.

Suzuki E., Sano A., Kuriki T., Miki T.: Improved separation and determination of phospholipids in animal tissue employing solid phase extraction. *Biol. Pharm. Bull.* 1997; 20: 299-303.

Szymczyk B., Pisulewski M., Hanczakowski P., Szczurek W.: The effects of feeding conjugated linoleic acid on rat growth performance, serum lipoproteins and subsequent lipid composition of selected rat tissues. *J. Sci. Food Agric.* 2000; 80: 1553-1558.

Szymczyk B., Pisulewski M., Szczurek W., Hanczakowski P.: Effects of conjugated linoleic acid on growth performance, feed conversion efficiency, and subsequent carcass quality in broiler chickens. *Br. J. Nutr.* 2001; 85: 465-473.

Takahashi Y., Kushiro M., Shinohara K., Ide T.: Activity and mRNA levels of enzymes involved in hepatic fatty acid synthesis and oxidation in mice fed conjugated linoleic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 2003; 1631: 265-273.

Takeuchi H., Nakamoto T., Mori Y., Kawakami M., Mabuchi H., Ohishi Y., Ichikawa N., Koike A., Masuda K.: Comparative effects of dietary fat types on hepatic enzyme activities related to the synthesis and oxidation of fatty acid and to lipogenesis in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001; 65: 1748-1754.

Terpstra A.H.M., Beynen A.C., Everts H., Kocsis S., Katan M.B., Zock P.L.: The decrease in body fat in mice fed conjugated linoleic acid is due to increases in energy expenditure and energy loss in the excreta. *J. Nutr.* 2002; 132: 940-945.

Thrift R.N., Forte T.M., Cahoon B.E., Shore V.G.: Characterization of lipoproteins produced by the human liver cell line, Hep G2, under defined conditions. *J. Lipid Res.* 1986; 27: 236-250.

Tischendorf F., Möckel P., Schöne F., Plonne M., Jahreis G.: Effect of dietary conjugated linoleic acids on the distribution of fatty acids in serum lipoprotein fractions and different tissues of growing pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2002; 86: 313-325.

Torres-Duarte A.P. and Vanderhoek J.Y.: Conjugated linoleic acid exhibits stimulatory and inhibitory effects on prostanoid production in human endothelial cells and platelets. *Biochim. Biophys. Acta* 2003; 1640: 69-76.

Truitt A., McNeill G., Vanderhoek J.Y.: Antiplatelet effects of conjugated linoleic acid isomers. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1438: 239-246.

Tsuboyama-Kasaoka N., Takahashi M., Tanemura K., Kim H.J., Tange T., Okuyama H., Kasai M., Ikemoto S., Ezaki O.: Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 2000; 49: 1534-1542.

Urquhart P., Parkin S.M., Rogers J.S., Bosley J.A., Nicolaou A.: The effect of conjugated linoleic acid on arachidonic acid metabolism and eicosanoid production in human saphenous vein endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 2002; 1580: 150-160.

Wahl H.G., Kausch C., Machicao F., Rett K., Stumvoll M., Häring H.U.: Troglitazone downregulates $\Delta 6$ -desaturase gene expression in human skeletal muscle cell cultures. *Diabetes* 2002; 51: 1060-1065.

Warren J.M., Simon V.A., Bartolini G., Erickson K.L., Mackey B.E., Kelley D.S.: Trans-10,cis-12 CLA increases liver and decreases adipose tissue lipids in mice: possible roles of specific lipid metabolism genes. *Lipids* 2003; 38: 497-504.

West D.B., Delany J.P., Carnet P.M., Blohm F., Trett A.A., Scimeca J.: Effect of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Am. J. Physiol.* 1998; 275: R667-R672.

- Williams C.S. and Raymond N.: Prostaglandin endoperoxide synthase: Why two isoforms? *Am. J. Physiol.* 1996; 270: G393-G400.
- Whelan J.: Antagonistic effects of dietary arachidonic acid and n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr.* 1996; 126: 1086S-1091S.
- Whigham L.D., Cook E.B., Stahl J.L., Saban R., Bjorling D.E., Pariza M.W., Cook M.E.: CLA reduces antigen-induced histamine and PGE(2) release from sensitized guinea pig tracheae. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2001; 280: R908-R912.
- Whigham L.D., Higbee A., Bjorling D.E., Park Y., Pariza M.W., Cook M.E.: Decreased antigen-induced eicosanoid release in conjugated linoleic acid fed guinea pigs. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2002; 282: R1104-R1112.
- Yamasaki M., Ikeda A., Hirao A., Tamaka Y., Rikimaru T., Shimada M., Sugemachi K., Tachibana H., Yamada K.: Dose-dependent effect of dietary conjugated linoleic acid on the growth of rat hepatoma dRLh-84 cells in vivo. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2002; 48: 505-511.
- Yu Y., Correll P.H., Vanden Heuvel J.P.: Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR γ -dependent mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 2002; 1581; 89-99.
- Zöllner N. and Tato F.: Fatty acid composition of the diet: Impact on serum lipids and atherosclerosis (review). *Clin. Invest.* 1992; 70: 968-1009.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Zuname Nadine Slomma
Geburtsdatum 15.07.1976
Geburtsort Querfurt
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

1983 – 1991 Realschule in Wohlsdorf
1991 – 1995 Friederiken-Gymnasium in Bernburg
Abschluss: Abitur

Studium

1995 – 1999 Hochschule Anhalt (FH)
Abschluss: Dipl.-oec.troph

Berufspraxis

01/2000 – 09/2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
am Prof. Hellriegel Institut e.V. in Bernburg

Promotionsstudium

 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 am Institut für Ernährungswissenschaften
10/2000 – 09/2002 Graduiertenstipendiatin des Landes Sachsen-Anhalts
10/2002 – 06/2003 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
07/2003 – 04/2004 Promotionsstudentin

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die eingereichte Dissertation „Wirkung konjugierter Linolsäuren (CLA) auf den Lipidstoffwechsel und auf die Bildung von Eicosanoiden von Hep G2-Zellkulturen und am Modelltier Ratte“ selbständig angefertigt und diese nicht bereits für eine Promotion oder ähnliche Zwecke an einer anderen Universität eingereicht habe. Ferner versichere ich, dass ich die zur Erstellung der Dissertationsschrift verwendeten wissenschaftlichen Arbeiten und Hilfsmittel genau und vollständig angegeben habe.

Desweiteren erkläre ich, dass keine Strafverfahren gegen mich anhängig sind.

Halle, den 13.04.2004

.....
Nadine Slomma

Danksagung

Herrn Prof. Dr. K. Eder möchte ich an dieser Stelle sehr herzlich für die Ermöglichung der Promotion am Institut für Ernährungswissenschaften sowie auch für seine stets freundliche und äußerst konstruktive Unterstützung bei den Arbeiten zu meiner Promotion danken.

Ebenso möchte ich Frau Dr. K. Becker für die Einweisung in die Zellkulturtechnik und für ihre konstruktiven Hinweise sowie auch für ihre stete Diskussionsbereitschaft ein herzliches Dankeschön aussprechen.

Desweiteren gilt mein herzlicher Dank Frau Dr. C. Brandsch für die tierexperimentelle Betreuung und die umfangreiche Hilfestellung bei der Probeentnahme sowie Herrn Dr. F. Hirche für seine jederzeit bereitwillige Unterstützung bei analytischen Problemstellungen.

An dieser Stelle sei auch den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Ernährungswissenschaften, insbesondere Frau Schibelius-Aßmann und Herrn Böttcher, herzlich gedankt, die sich äußerst hilfsbereit bei den analytischen Untersuchungen eingebracht haben.

Bei Frau Dr. D. Zeuske möchte ich mich für die sehr aufmerksame Durchsicht und die äußerst hilfreichen Anmerkungen zu meiner Arbeit ganz herzlich bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin sämtlichen Doktoranden/-innen des Institutes für Ernährungswissenschaften für die freundliche Aufnahme am Institut.

Der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalts danke ich herzlich für die Gewährung des Graduiertendstipendiums.

Liste der Veröffentlichungen

Eder K., Slomma N., Becker K.: Trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid suppresses the desaturation of linoleic and α -linolenic acid in HepG2 cells. *J Nutr.* 2002; 132: 1115-21.

Slomma N., Becker K., Eder K.: The effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acids on Δ 4-desaturation in HepG2 cells. *Int J Vitam Nutr Res.* 2004 Jul; 74 (4): 243-6.

Eder K., Slomma N., Becker K., Brandsch C.: Effect of linseed oil supplementation on concentrations of (n-3) polyunsaturated fatty acids in liver phospholipids of rats fed diets containing either an oil rich in conjugated linoleic acids, sunflower oil or high-oleic acid sunflower oil. *J Anim Physiol Anim Nutr.* (angenommen).

Vorträge

Slomma N., Becker K., Eder K.: Wirkung konjugierter Linolsäuren auf die Arachidonsäure-Kaskade von Hepatozyten. 8. *Symposium für Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier 2001, Jena.*

Slomma N., Becker K., Brandsch C., Eder K.: The effect of dietary conjugated linoleic acids on desaturation of α -linolenic acid and the formation of eicosanoids in rats fed a diet containing linseed oil. 9. *Symposium für Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier 2003, Jena.*

Posterpräsentation

Slomma N., Becker K., Brandsch C., Eder K.: Der Einfluss eines Gemisches konjugierter Linolsäuren auf Fettsäuresaturation, Phospholipase A₂ und Eicosanoidbildung von Ratten bei einer α -Linolensäurereichen Diät. 40. *Wissenschaftlicher Kongress der DGE 2003, Potsdam.*