

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaften  
(Direktor: Prof. Dr. habil K. Eder)  
der  
Landwirtschaftlichen Fakultät  
(Dekan: Prof. Dr. agr. habil W. Merbach)  
der  
Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

**Experimentelle Untersuchungen zum Einfluß oxidierter Fette  
auf ausgewählte Parameter des Schilddrüsenhormon- und Lipidstoffwechsels  
beim Modelltier Ratte**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor agriculturarum (Dr. agr.)

von Diplomagraringenieur  
Peter Škufca

**urn:nbn:de:gbv:3-000004167**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004167>]

Halle/Saale 2002

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaften

**Experimentelle Untersuchungen zum Einfluß oxidierter Fette  
auf ausgewählte Parameter des Schilddrüsenhormon- und Lipidstoffwechsels  
beim Modelltier Ratte**

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

als

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor agriculturarum (Dr. agr.)

vorgelegt von

Diplomagraringenieur

Peter Škufca

geb. am 06. Juni 1971  
in Ljubljana, Slowenien

Gutachter:

1. Prof. Dr. habil Eder
2. PD Dr. habil Brandsch
3. Prof. Dr. habil Jareis

Dekan: Prof. Dr. agr. habil. W. Merbach

Verteidigung am 01. Juli 2002

Halle/Saale 2002

	Seite
Tabellenverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	IV
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Versuchsaufbau</b>	<b>4</b>
<b>2.1.1 Untersuchung zum Einfluß von oxidierten Fetten auf den Lipid- und Schilddrüsenhormonstoffwechsel bei unterschiedlicher Selenversorgung</b>	<b>4</b>
2.1.1.1 Zusammensetzung der Diät	6
2.1.1.2 Analysenparameter	8
<b>2.1.2 Untersuchungen zum Einfluß oxidierter Fette auf den Schilddrüsenhormon- und Lipidstoffwechsel bei unterschiedlicher Jodversorgung</b>	<b>9</b>
2.1.2.1 Zusammensetzung der Diät	11
2.1.2.2 Analysenparameter	12
<b>2.1.3 Untersuchungen zum Einfluß unterschiedlich thermisch behandelte Fette auf die Konzentrationen der Schilddrüsenhormone bei unterschiedlicher Vitamin E-Versorgungen</b>	<b>13</b>
2.1.3.1 Zusammensetzung der Diät	15
2.1.3.2 Analysenparameter	18
<b>2.1.4 Haltung der Versuchstiere</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials</b>	<b>18</b>
<b>2.2.1 Gewinnung von Plasma, Erythrozyten und Organentnahme</b>	<b>18</b>
<b>2.2.2 Fraktionierung der Lipoproteine</b>	<b>19</b>
<b>2.2.3 Gewinnung von Leberhomogenat und Leberzytosol</b>	<b>19</b>
<b>2.3 Analytische Methoden</b>	<b>20</b>
<b>2.3.1 Bestimmung der Fettkennzahlen zur Abschätzung des Oxidationsgrades der Fette</b>	<b>20</b>
2.3.1.1 Peroxidzahl	20
2.3.1.2 Säurezahl	20

---

<b>2.3.1.3</b>	<b>Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen</b>	<b>21</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Bestimmung der Konzentration von <math>\alpha</math>-Tocopherol von Fetten und tierischen Geweben</b>	<b>22</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Bestimmung des Fettsäuremusters von Fetten</b>	<b>22</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Bestimmung der Selenkonzentration in Diäten, Leber und Plasma</b>	<b>22</b>
<b>2.3.5</b>	<b>Bestimmung der Jodkonzentration in Diäten</b>	<b>23</b>
<b>2.3.6</b>	<b>Parameter des Schilddrüsenhormonstoffwechsels</b>	<b>23</b>
<b>2.3.6.1</b>	<b>Bestimmung von Thyrotropin im Plasma</b>	<b>23</b>
<b>2.3.6.2</b>	<b>Bestimmung von gesamtem und freiem Thyroxin sowie Trijodthyronin im Plasma</b>	<b>24</b>
<b>2.3.6.3</b>	<b>Histologische Untersuchungen an der Schilddrüse</b>	<b>24</b>
<b>2.3.6.4</b>	<b>Expressionsanalyse wichtiger Enzyme des Schilddrüsenhormonstoffwechsels</b>	<b>26</b>
<b>2.3.6.4.1</b>	<b>Schilddrüsenperoxidase</b>	<b>29</b>
<b>2.3.6.4.2</b>	<b>Natrium/Jodid-Symporter</b>	<b>30</b>
<b>2.3.6.4.3</b>	<b>Glutathionperoxidase der Schilddrüse</b>	<b>31</b>
<b>2.3.7</b>	<b>Parameter des antioxidativen Schutzsystems</b>	<b>32</b>
<b>2.3.7.1</b>	<b>Bestimmung der <math>\alpha</math>-Tocopherolkonzentration in Plasma und Leber</b>	<b>32</b>
<b>2.3.7.2</b>	<b>Oxidationsempfindlichkeit von Lipoproteinen geringer Dichte</b>	<b>32</b>
<b>2.3.7.3</b>	<b>Bestimmung der Aktivität der Glutathionperoxidase in Plasma</b>	<b>33</b>
<b>2.3.7.4</b>	<b>Bestimmung der Aktivität der Superoxiddismutase in den Erythrozyten</b>	<b>34</b>
<b>2.3.8</b>	<b>Charakterisierung des Lipidstoffwechsels</b>	<b>35</b>
<b>2.3.8.1</b>	<b>Extraktion der Gesamtlipide aus der Leber</b>	<b>35</b>
<b>2.3.8.1.1</b>	<b>Bestimmung der Konzentration von Triglyceriden in Plasma und Leber</b>	<b>35</b>
<b>2.3.8.1.2</b>	<b>Bestimmung der Konzentration von Cholesterin in Plasma und Leber</b>	<b>36</b>
<b>2.3.8.2</b>	<b>Bestimmung der Aktivitäten der lipogenen Enzyme in der Leber</b>	<b>36</b>
<b>2.3.8.2.1</b>	<b>Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase</b>	<b>36</b>
<b>2.3.8.2.2</b>	<b>Fettsäuresynthetase</b>	<b>37</b>
<b>2.3.8.3</b>	<b>Bestimmung der relativen mRNA-Konzentration der lipogenen Enzyme in der Leber</b>	<b>38</b>

---

2.3.8.3.1	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	39
2.3.8.3.2	Fettsäuresynthetase	40
2.4	Scheinbare Verdaulichkeit des $\alpha$ -Tocopherols	41
2.5	Mathematische und statistische Auswertung	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Der Einfluß von oxidierten Fetten auf den Lipid- und Schilddrüsenhormon-stoffwechsel bei unterschiedlicher Selenversorgung	42
3.1.1	Leistungsparameter	42
3.1.2	Parameter des antioxidativen Schutzsystems	43
3.1.2.1	Parameter des Selenstatus der Versuchstiere	43
3.1.2.2	Scheinbare Verdaulichkeit des Tocopherols	44
3.1.2.3	$\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in Plasma und Leber	45
3.1.2.4	Aktivität der Superoxiddismutase in Erythrozyten	46
3.1.2.5	<i>In vitro</i> -Oxidation von Lipoproteinen geringer Dichte	46
3.1.3	Parameter des Lipidstoffwechsels	47
3.1.3.1	Triglyceridkonzentration in Plasma, Lipoproteinfraktionen und Leber	47
3.1.3.2	Cholesterinkonzentration in Plasma, Lipoproteinfraktionen und Leber	48
3.1.3.3	Aktivität und relative mRNA-Konzentration der lipogenen Enzyme in der Leber	49
3.1.4	Parameter des Schilddrüsenhormonstoffwechsels	50
3.1.4.1	Konzentration von Thyrotropin, gesamtem und freiem Thyroxin- und Trijodthyronin in Plasma	50
3.2	Der Einfluß von oxidierten Fetten auf den Schilddrüsenhormon- und Lipidstoffwechsel bei unterschiedlicher Jodversorgung	52
3.2.1	Leistungsparameter	52
3.2.2	Parameter des antioxidativen Schutzsystems	53
3.2.2.1	<i>In vitro</i> -Oxidation von Lipoproteinen geringer Dichte	53
3.2.2.2	$\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in Plasma und Leber	53
3.2.3	Parameter des Schilddrüsenhormonstoffwechsels	54

---

3.2.3.1	Konzentrationen von Thyrotropin, gesamtem und freiem Thyroxin und Trijodthyronin in Plasma	54
3.2.3.2	Histologische Untersuchungen der Schilddrüse	55
3.2.3.3	Expression wichtiger Enzyme des Schilddrüsenhormonstoffwechsels	57
3.2.4	Parameter des Lipidstoffwechsels	58
3.2.4.1	Triglycerid- und Cholesterinkonzentration in Plasma und Leber	58
3.3	Der Einfluß unterschiedlich thermisch behandelter Fette auf die Konzentrationen der Schilddrüsenhormone bei unterschiedlicher Vitamin E-Versorgungen	60
3.3.1	Leistungsparameter	60
3.3.2	Parameter des Schilddrüsenhormonstoffwechsels	61
3.3.2.1	Konzentration von Thyrotropin, gesamtem und freiem Thyroxin und Trijodthyronin in Plasma	61
4	Diskussion	64
4.1	Versuchsdesign	64
4.2	Oxidierter Fette und antioxidatives Schutzsystem	67
4.2.1	Tocopherolstatus	67
4.2.2	Oxidationsempfindlichkeit der Lipoproteine geringer Dichte	68
4.2.3	Selenstatus und Aktivität der Glutathionperoxidase	68
4.3	Oxidierter Fette und die Lipidsynthese	70
4.4	Oxidierter Fette und Schilddrüsenhormonstoffwechsel	72
4.4.1	Konzentration von gesamtem und freiem Thyroxin, Trijodthyronin und Thyrotropin	72
4.4.2	Histologie der Schilddrüse	75
4.4.3	Schilddrüsenperoxidase	76
4.4.4	Einfluß von Thyrotropin auf die Schilddrüsenaktivität	77
4.5.5	Glutathionperoxidase	77
4.4.6	Natrium/Jodid-Symporter	79
4.4.7	Einfluß oxidierter Fette auf den Schilddrüsenhormonstoffwechsel	79
5	Zusammenfassung	83
	Summary	86
6	Literaturverzeichnis	89

**Tabellenverzeichnis**

Tab.- Nr.	Inhalt	Seite
1	Charakterisierung der eingesetzten Fette im ersten Versuch	5
2	Zusammensetzung der Diät im ersten Versuch	7
3	Selenkonzentrationen der eingesetzten Diäten und Einteilung der Versuchstiergruppen im ersten Versuch	7
4	Fettkennzahlen der Diätfette im ersten Versuch als Bestandteil der fertigen Diät	8
5	Tocopherol-Konzentrationen der Diäten im ersten Versuch	8
6	Charakterisierung der eingesetzten Fette im zweiten Versuch	10
7	Zusammensetzung der Diät im zweiten Versuch	11
8	Jodkonzentrationen der eingesetzten Diäten und Einteilung der Versuchstiergruppen im zweiten Versuch	12
9	Fettkennzahlen der Diätfette im zweiten Versuch als Bestandteil der fertigen Diät	12
10	Charakterisierung der eingesetzten Fette im dritten Versuch	14
11	Zusammensetzung der Diät im dritten Versuch	16
12	$\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen der eingesetzten Diäten und Einteilung der Versuchsgruppen im dritten Versuch	17
13	Fettkennzahlen der Diätfette im dritten Versuch als Bestandteil der fertigen Diät	17
14	Einbettungsschema im Einbettautomat	25
15	Entfernen des Einbettmittels	25
16	Reagenzien für RNA-Gel-Elektrophorese	27
17	Reagenzien für DNA-Gel-Elektrophorese	28
18	Parameter der RT-PCR für Schilddrüsenperoxidase	29
19	Parameter der RT-PCR für Natrium/Jodid-Symporter	30
20	Parameter der RT-PCR für Glutathionperoxidase in der Schilddrüse	31
21	Parameter der RT-PCR für Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	39
22	Parameter der RT-PCR für Fettsäuresynthetase	40
23	Anfangs- und Endlebensmasse, Lebensmassezunahme und Futtermittelverwertung im ersten Versuch	42
24	Parameter des Selenstatus der Versuchstiere	43

---

25	Gesamtaufnahme, -ausscheidung, -retention und scheinbare Verdaulichkeit des $\alpha$ -Tocopherols (7. Versuchswoche)	44
26	Konzentration von $\alpha$ -Tocopherol in Plasma und Leber	45
27	Aktivität der Superoxiddismutase in Erythrozyten	46
28	Lag-Time der in vitro oxidierten Lipoproteinen geringer Dichte	46
29	Triglyceridkonzentration in Plasma, Lipoproteinfraktionen und Leber	47
30	Cholesterinkonzentration in Plasma, Lipoproteinfraktionen und Leber	48
31	Aktivität und relative mRNA-Konzentration der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und der Fettsäuresynthetase in der Leber	49
32	Konzentrationen von Thyrotropin, gesamtem und freiem Thyroxin, sowie dem Trijodthyronin im Plasma	51
33	Anfangs- und Endlebensmasse, Lebensmassezunahme und Futtermittelverwertung im zweiten Versuch	52
34	Lag-Time der in vitro oxidierten Lipoproteinen geringer Dichte	53
35	Konzentration von $\alpha$ -Tocopherol in Plasma und Leber	54
36	Konzentrationen an Thyrotropin, gesamtem und freiem Thyroxin, sowie dem Trijodthyronin in Plasma	55
37	Follikeldurchmesser und Epithelhöhe der Schilddrüsenpräparate	56
38	Relative mRNA-Konzentration der Schilddrüsenperoxidase, des Natrium/Jodid-Symporters und der Schilddrüsen-glutathionperoxidase (Signalstärke von GAPDH beträgt 100 %)	58
39	Triglyceridkonzentration in Plasma, Lipoproteinfraktionen und Leber	59
40	Cholesterinkonzentration in Plasma, Lipoproteinfraktionen und Leber	59
41	Anfangs- und Endlebensmasse, Lebensmassezunahme und Futtermittelverwertung im dritten Versuch	62
42	Konzentration von Thyrotropin, gesamtem und freiem Thyroxin, sowie dem Trijodthyronin in Plasma	63
43	Einflußfaktoren des Schilddrüsenhormonstoffwechsels	82



**Abbildungsverzeichnis**

Abb.- Nr.	Inhalt	Seite
1	Reaktion von Malondialdehyd mit Thiobarbitursäure (nach Valenzuela, 1991)	21
2	Ermittlung der Lag-Time nach Kleinveld et al. (1992)	32
3	Prinzip der indirekten Bestimmung der Aktivität der Glutathionperoxidase	33
4	Auftrennung von PCR Produkten mittels Agarosegel-Elektrophorese	50
5	Schilddrüsenfollikel im Querschnitt	57
6	Wirkungsmechanismen oxidiertes Fette auf die Schilddrüsenhormon- synthese-Hypothese	81

**Abkürzungsverzeichnis**

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
ACO	Acyl-CoA-Oxidase
AJ	Adäquate Jodversorgung
ASe	Adäquate Selenversorgung
ATTC	Amerikanische Zellkultursammlung (American Type Culture Collection)
cDNA	Complementäre DANN
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CHO	Bezeichnung für kommerzielle ovarielle Zellkultur des chinesischen Hamsters (ECACC ID: 85050302)
$\text{ClO}_4^-$	Perchloration
CoA	Coenzym-A
CYP	Cytochrom P
DIT	Dijodthyronin
dATP	2'-Deoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Deoxycytidin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Deoxyguanosin-5'-Triphosphat
dNTP's	Deoxynucleosid-Triphosphate
dTTP	2'-Deoxythymidin-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
$\epsilon$	Molarer Absorptionskoeffizient
EMBI	Europäisches molekularbiologisches Institut
EMBL	Europäisches molekularbiologisches Labor
ECACC	Europäische Zellkultursammlung (European Collection of Cell Cultures)
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'- tetraessigsäure
EE	Erhöhte Vitamin E-Versorgung
Eq	Äquivalent
$\Delta E$	Extinktionsänderung
FA	Formaldehyd
FAME	Fettsäuremethylester
FF	Frisches Fett
FIAS	Fließinjektionssystem für Atomabsorptionsspektrometrie
FID	Flammenionisationsdetektor
FRTL-5	Bezeichnung für eine kommerzielle Schilddrüsenzellkultur (ATTC ID: CRL 8305)
FsS	Fettsäuresynthetase
fT <sub>4</sub>	Freies Thyroxin
FTC-133	Bezeichnung für eine kommerzielle humane Schilddrüsenkrebszellkultur (ECACC ID: 94060901)
FTC-238	Bezeichnung für eine kommerzielle humane Schilddrüsenkrebszellkultur (ECACC ID: 94060902)
G6P	Glucose-6-Phosphat
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion
GSH-Px	Glutathionperoxidase
GSSG	Glutathiondisulfid
GSSG-R	Glutathiondisulfid-Reduktase
HDL	Lipoproteine hoher Dichte

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
KH-Puffer	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer
KOH	Kaliumhydroxid
LDL	Lipoproteine geringer Dichte
MCF-7	Bezeichnung für eine kommerzielle humane Brustkrebszellkultur (ATTC ID: HTB-22)
MDA	Malondialdehyd
mEq	Milli Äquivalent
MIT	Monojodthyronin
MOPS	3-[N-Morpholino]-1-Propansulfonsäure
MUFA	Einfach ungesättigte Fettsäure
N	Normalität
Na <sup>+</sup> /J <sup>-</sup> -SYM	Natrium/Jodid-Symporter
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat reduziert
NE	Niedrige Vitamin E-Versorgung
NRC	National Research Council
OF	Oxidiertes Fett
OF # 1	Bei 50 °C oxidiertes Fett
OF # 2	Bei 105 °C oxidiertes Fett
OF # 3	Bei 190 °C oxidiertes Fett
PBS	Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung
POZ	Peroxidzahl
PPAR-alpha	Alpha- Rezeptor der perixosomalen Proliferierung
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäure
RIA	Radioimmunoassay
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
SCN <sup>-</sup>	Thiozianation
SDS	Natrium Lauryl Sulfat
SFA	Gesättigte Fettsäuren
SJ	Suboptimale Jodversorgung
SOD	Superoxiddismutase
SSe	Suboptimale Selenversorgung
SZ	Säurezahl
T <sub>3</sub>	Trijodthyronin
T <sub>4</sub>	Gesamtes Thyroxin
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
Te-125	Tellur
TEP	1, 1, 3, 3, Tetraethoxypropan
TMAH	Tetramethyammoniumhydroxid
TPO	Schilddrüsenperoxidase
TSH	Thyrotropin
TTF-1	Schilddrüsentranskriptionsfaktor-1
VLDL	Lipoproteine sehr geringer Dichte
vs.	Verglichen mit (versus)

## 1 Einleitung

Die thermische Behandlung von Fetten führt zur Oxidation darin enthaltener mehrfach ungesättigter Fettsäuren, die auch als Lipidperoxidation bezeichnet wird. Im Laufe der Lipidperoxidation entstehen verschiedene Produkte wie Peroxide, Hydroperoxide, Aldehyde, zyklische Polymere, Epoxide und freie Fettsäuren. Diese Produkte, speziell die Aldehyde haben eine große sensorische Relevanz; sie bedingen die Ranzigkeit erhitzter Fette. Es gibt zwar viele Untersuchungen zu den physiologischen Wirkungen von Fetten mit erhöhten Konzentrationen solcher Produkte, alle Wirkungen sind aber bislang noch nicht beschrieben und erklärt. In jüngsten Untersuchungen wurde beispielsweise gezeigt, dass die Fütterung oxidierter Fette zu erhöhten Konzentrationen an gesamtem und freiem Thyroxin im Blut bei Miniaturschweinen führt (Eder und Stangl, 2000; Eder et al., 2002). Wirkungsmechanismen zu diesen zweifelsohne physiologisch äußerst relevanten Effekten sind bislang unbekannt. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, zu untersuchen, ob dieser Effekt auch bei Ratten reproduziert werden kann; darüber hinaus sollte versucht werden, erste Informationen über den Wirkungsmechanismus der oxidierten Fette auf den Schilddrüsenhormonstoffwechsel zu erlangen. Eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der Schilddrüsenhormone spielt die Typ I-Deiodase. Sie spaltet von Thyroxin ein Jod-Atom ab; es entsteht dadurch das biologisch vielfach aktivere Trijodthyronin. Die Deiodase ist ein Selen-haltiges Enzym (Visser et al., 1982; Mori et al., 1991; Smit et al., 1993; Meinhold et al., 1993; Kralik et al., 1995; Eder et al., 1995; Bermano et al., 1995, 1996; Campos-Barros et al., 1997; Villette et al., 1998; Ruz et al., 1999). Bei einem Selenmangel ist die Aktivität dieses Enzyms vermindert; als Folge davon kommt es zu einer erhöhten Konzentration an Thyroxin im Blut (Corvilain et al., 1993; Gupta et al., 1997). Untersuchungen an Broiler haben gezeigt, daß die Fütterung oxidierter Fette zu einer verringerten Aktivität des Enzyms Glutathionperoxidase führt, das ebenfalls Selen enthält (Engberg et al., 1996). Dies läßt vermuten, dass die Fütterung oxidierter Fette zu einer Beeinträchtigung des Selenstatus führt. Ein verminderter Selenstatus durch die Fütterung oxidierter Fette könnte deshalb sekundär über eine verminderte Aktivität der Deiodase zu der beschriebenen erhöhten Konzentration an freiem und gesamtem Thyroxin im Blut geführt haben. Einem derartigen möglichen Zusammenhang sollte in der vorliegenden Arbeit nachgegangen werden. Dazu wurde ein erster Versuch mit Ratten durchgeführt, in dem neben der Art des Fettes (frisches Fett vs. erhitztes Fett) auch die Selenkonzentration der Diät variiert wurde, um den Selenstatus der Tiere zu modulieren. Sollte Selen eine Rolle in der Veränderung der Thyroxinkonzentration spielen, so ist zu erwarten, daß die Effekte bei einer

marginalen Selenversorgung stärker ausgeprägt sind als bei einer guten Selenversorgung. Aus diesem Grunde wurde neben einer ausreichenden auch eine knappe Selenversorgung gewählt.

Eine wichtige Rolle für den Status der Schilddrüsenhormone spielt das Element Jod, das Bestandteil der beiden Schilddrüsenhormone ist. Möglicherweise beeinflusst die Fütterung oxidierter Fette auch den Stoffwechsel von Jod. Im zweiten Versuch wurde deshalb neben der Art des Fettes auch die Jodversorgung von Ratten variiert. Es sollte überprüft werden, ob die Effekte oxidierter Fette auf die Konzentrationen der Schilddrüsenhormone durch die Höhe der Jodversorgung beeinflusst werden. Neben der Messung der Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Plasma sollten histologische Untersuchungen der Schilddrüse und Bestimmungen der genetischen Expression von Enzymen, die bei der Synthese von Thyroxin in der Schilddrüse eine Rolle spielen, weiteren Aufschluß über die Wirkungen oxidierter Fette ergeben.

Völlig unbekannt ist bislang auch, durch welche Lipidperoxidationsprodukte die Wirkungen oxidierter Fette auf den Stoffwechsel der Schilddrüsenhormone induziert werden. Beim Erhitzen von Nahrungsfetten bei niedrigen Temperaturen über längere Zeiträume entstehen überwiegend so genannte primäre Lipidperoxidationsprodukte wie Peroxide und Hydroperoxide. Beim Erhitzen von Fetten bei sehr hohen Temperaturen (>190°C) kommt es hingegen überwiegend zur Bildung sekundärer Lipidperoxidationsprodukte wie zyklischen Polymeren. Die Wirkung der beiden Klassen der Lipidperoxidationsprodukte ist insgesamt sehr unterschiedlich. Während primäre Lipidperoxidationsprodukte bei oraler Gabe wegen ihrer geringeren Verdaulichkeit nur eine geringe Toxizität aufweisen (Findlay et al., 1970; Kazanawa et al., 1985), wirken sekundäre Lipidperoxidationsprodukte wegen einer höheren Verdaulichkeit stärker toxisch (Orada et al., 1986). Um zumindest erste Anhaltspunkte zu erlangen, welche Lipidperoxide die größere Rolle spielen, wurden in einem dritten Versuch Fette eingesetzt, die bei sehr unterschiedlichen Bedingungen erhitzt wurden, entweder bei niedriger Temperatur über einen langen Zeitraum oder bei hoher Temperatur über einen kurzen Zeitraum. Es ist aber auch nicht auszuschließen, daß die Wirkungen oxidierter Fette auf den Stoffwechsel der Schilddrüsenhormone nicht von spezifischen Lipidperoxidationsprodukten induziert wurden, sondern generell auf oxidativen Streß zurückzuführen sind. Wenn dies der Fall wäre, wäre anzunehmen, daß die Effekte der oxidierten Fette durch erhöhte Versorgung an Vitamin E abgeschwächt werden können. Um dies zu prüfen, wurde auch eine unterschiedliche Vitamin E-Versorgung der Ratten gewählt.

Kürzlich konnte auch gezeigt werden, daß die Fütterung oxidiertes Fett an Ratten die Konzentration an Triglyceriden im Plasma und in der Leber senkt (Liu und Huang, 1995; Eder und Kirchgessner, 1999; Eder, 1999) und die Aktivität der lipogenen Enzyme hemmt (Eder und Kirchgessner, 1998b). Die Mechanismen hierzu sind bislang ebenfalls unbekannt. Es wurde aber vermutet, daß oxidiertes Fett in die Genexpression der lipogenen Enzyme eingreifen. Um diese Vermutung zu verifizieren, wurde in die Arbeit neben den Untersuchungen des Stoffwechsels auch die Messung der Konzentrationen der mRNA verschiedener lipogener Enzyme in der Leber eingeschlossen.

Die meisten Untersuchungen zu den Wirkungen oxidiertes Fett, die in der Literatur publiziert wurden, weisen große methodische Probleme auf. Durch das Erhitzen von Fetten kommt es zu einem ranzigen, teils stechenden Geruch der Diäten, was dazu führt, daß die Aufnahme solcher Diäten durch Versuchstiere im Vergleich zu Kontrolldiäten mehr oder weniger stark vermindert ist. Somit besteht natürlich Unterschied in Versorgung mit Energie und Nährstoffen sowie in der Lebendmasseentwicklung der Versuchstiere, zumal oxidiertes Fett in der Regel auch schlechter verdaulich sind als frische Fett (Kanazawa et al., 1985; Yoshida und Kajimoto, 1989; Blanc et al., 1992; Borsting et al., 1992, 1994; Liu und Huang, 1995). Das Erhitzen oxidiertes Fett führt zu einer Reduktion der Gehalte mehrfach ungesättigter Fettsäuren und zu einem Verlust an Vitamin E (Yoshida und Kajimoto, 1989; Blanc et al., 1992; Liu und Huang, 1995; Engberg et al., 1996; Eder und Kirchgessner, 1997, 1998a, 1998b, 1999; Eder, 1999). Deshalb unterscheiden sich Kontrolldiäten und Versuchsdiäten auch in Fettsäuremuster und Vitamin E-Gehalten. Viele Effekte, die den oxidierten Fetten zugeschrieben werden, können wenigstens teilweise auf ein unterschiedliches Wachstum, eine unterschiedliche Nährstoffverdaulichkeit, eine unterschiedliche Fettsäurezusammensetzung und unterschiedliche Vitamin E-Gehalte der Diäten zurückzuführen sein.

Um den Effekt der Fettsäurezusammensetzung der Futterfette bzw. der Vitamin E-Konzentrationen auszuschließen, wurde in vorliegender Studie die Fettsäurezusammensetzung und die Vitamin E-Konzentration der Diäten der Versuchsgruppen den Diäten der Kontrollgruppe angeglichen. Um eine mögliche Verringerung der Futtermittelaufnahme durch die Tiere der Versuchsgruppen aufgrund veränderter sensorischer Eigenschaften des oxidiertes Fettes zu verhindern, wurde die Futtermittelaufnahme aller Versuchstiere vereinheitlicht. Dadurch gelang es, die methodischen Schwierigkeiten in Griff zu bekommen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchsaufbau**

In der vorliegenden Studie wurden drei Versuche durchgeführt, um den Einfluß oxidierter Fette auf den Lipid- und Schilddrüsenhormonstoffwechsel zu untersuchen. Darüber hinaus sollten jeweils im zweifaktoriellen Versuchsdesign die Auswirkungen unterschiedlicher Versorgung mit den Mikroelementen Selen bzw. Jod und dem Vitamin E untersucht werden.

#### **2.1.1 Untersuchung zum Einfluß von oxidierten Fetten auf den Lipid- und Schilddrüsenhormonstoffwechsel bei unterschiedlicher Selenversorgung**

In diesem Versuch sollte untersucht werden, welchen Einfluß oxidierte Fette bei adäquater und suboptimaler Selenversorgung auf ausgewählte Parameter des Lipidmetabolismus und des Schilddrüsenhormonstoffwechsels hat. In einem zweifaktoriellen Versuchsansatz wurden vier Gruppen mit je 10 Versuchstieren gebildet, die restriktiv 56 Tage halbsynthetische Diäten erhielten (Versuchsfaktoren: Fettart, Selenversorgung). Als Versuchstiere dienten männliche Sprague-Dawley Ratten (Fa. Charles River GmbH) mit einer mittleren Anfangslebensmasse von  $52,5 \pm 3,9$  g. Die Tiere wurden restriktiv gefüttert, um die Futterraufnahme zu standardisieren. Die tägliche Futtermenge wurde die ersten 14 Tage kontinuierlich von 8,1 g auf 18,0 g erhöht. Die mittlere tägliche Futterraufnahme über die ganze Fütterungsperiode betrug 16,9 g.

Die oxidierten Fette wurden durch Erhitzen von Sonnenblumenöl bei einer Temperatur von 50°C unter permanenter Luftzufuhr über einen Zeitraum von 6 Wochen hergestellt. Als Meßparameter der Oxidation des Öls während der Inkubationszeit wurden in täglichen Abständen die Peroxidzahl (POZ) und am Ende der Inkubationszeit die Konzentrationen an Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) und die Säurezahl (SZ) bestimmt. Das frische Versuchsfett hatte eine POZ von 4,0 mEq O<sub>2</sub>/kg Fett, eine SZ von 0,57 mg KOH/g Fett und die Konzentration an TBARS betrug 0,27 µmol/kg Fett. Die thermische Behandlung des Versuchsfetts führte zu einem deutlichen Anstieg der POZ auf 810 mEq O<sub>2</sub>/kg Fett, der SZ auf 1,44 mg KOH/g Fett sowie der TBARS-Konzentration auf 0,34 µmol/kg Fett. Das Erhitzen des Öls bei 50°C führte zu einem deutlichen Verlust mehrfach ungesättigter Fettsäuren (PUFA), der an einem Abfall des Anteils der Linolsäure (18:2 n-6) um 11,7 % (w/w) deutlich wurde, sowie an einem Anstieg des Anteils der Ölsäure (18:1) um

4,4 % (w/w). Um die Effekte der unterschiedlichen Fettsäurezusammensetzung der Versuchsfette auszuschalten, wurde die Fettsäurezusammensetzung des frischen Sonnenblumenöls durch Zugabe von 20 % Schweineschmalz dem Fettsäuremuster des oxidierten Fettes angeglichen. Die Linolsäure (18:2 n-6) stellte dabei den Orientierungswert (54,1 g/100 g Fettsäuren) dar (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Charakterisierung der eingesetzten Fette im ersten Versuch

	Ausgangsfette		Versuchsfette	
	Sonnenblumenöl	Schweineschmalz	Frisch	oxidiert
<b>Fettquelle [g/kg Diät]</b>				
Sonnenblumenöl	-	-	40	50
Schweineschmalz	-	-	10	-
<b>Behandlung</b>				
Temperatur [°C]	-	-	-	50
Zeit [Wochen]	-	-	-	6
<b>Fettkennzahlen</b>				
Peroxidzahl [mEq O <sub>2</sub> /kg Fett]	2,00	-	4,00	810
TBARS [µmol/kg Fett]	0,29	-	0,27	0,34
Säurezahl [mg KOH/g Fett]	0,55	-	0,57	1,44
<b>Fettsäurezusammensetzung</b>				
[g/100 g Fettsäuren]				
Myristinsäure (14:0)	0,1	1,6	0,4	0,1
Palmitinsäure (16:0)	6,3	26,7	10,6	7,4
Palmitoleinsäure (16:1)	0,1	2,3	0,5	0,1
Stearinsäure (18:0)	4,0	16,8	6,7	4,7
Ölsäure (18:1)	22,0	38,5	25,4	26,4
Linolsäure (18:2 n-6)	65,8	9,3	54,1	54,1
Arachinsäure (20:0)	0,3	0,0	0,2	0,3
Eicosensäure (20:1)	0,3	0,8	0,4	0,3
<b>Tocopherole [mg/kg Fett]</b>				
α-Tocopherol	556	19,2	464	-
all-rac-α-Tocopherolacetat (Zulage)	-	-	-	718
α-Tocopheroläquivalent [mg/kg]	556	19,2	464	481

Abkürzungen: KOH, Kaliumhydroxid; TBARS, Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen.



Da die Hitzebehandlung der Fette zu einem kompletten Verlust von Tocopherolen führte, wurde der Tocopherol-Gehalt des oxidierten Fettes durch Zugabe von all-rac- $\alpha$ -Tocopherolacetat dem des frischen Fettgemisches angeglichen. Da die physiologische Aktivität des all-rac- $\alpha$ -Tocopherolacetats 67 % im Vergleich zu  $\alpha$ -Tocopherol beträgt, wurde dessen Zugabe um den Faktor 1,49 erhöht. Damit wurde eine Endkonzentration von 464 mg  $\alpha$ -Tocopherolequivalent/kg Fett angestrebt. Die wichtigsten Parameter der eingesetzte Fette sind in der *Tabelle 1* aufgelistet.

### 2.1.1.1 Zusammensetzung der Diät

Für den ersten Versuch wurde eine halbsynthetische Diät auf Caseinbasis eingesetzt, die in Anlehnung an das National Research Council (NRC, USA, 1995; Reeves et al., 1993) hergestellt wurde und in *Tabelle 2* dargestellt ist. Der Fettanteil betrug 5 %. Das Selen wurde den Selen-adäquaten Diäten in Form von Natriumselenit in einer Konzentration von 500  $\mu$ g Selen/kg Diät zugegeben. Die analysierten Selenkonzentrationen der Diäten sind in *Tabelle 3* gezeigt. Die Bestimmung der Selenkonzentration ist im *Kapitel 2.3.4* beschrieben.

Die Grundfuttermischungen wurden mit 5 % Fettgemisch und Wasser vermischt und an einer Presse (Fa. Altromin, Lage, Deutschland) pelletiert und gekühlt. Aus den Diätpellets wurden die Fette mittels Hexan:Isopropanol (3:2, v/v) extrahiert. Vom Extrakt wurden nach Verdampfen der Lösungsmittel die Fettkennzahlen POZ und TBARS, sowie Tocopherolkonzentration bestimmt. Die Fettkennzahlen der Diätfette sind in *Tabelle 4* dargestellt. Ein Milligramm Äquivalent des  $\alpha$ -Tocopherols entspricht einem Milligramm  $\alpha$ -Tocopherol bzw. 1,49 Milligramm all-rac- $\alpha$ -Tocopherolacetat. Die Tocopherolkonzentrationen der Diäten sind in der *Tabelle 5* dargestellt. Die Methoden zur Bestimmung der Fettkennzahlen sind im *Kapitel 2.3.1*, die Bestimmung der Konzentration an Tocopherolen im *Kapitel 2.3.2* und die Bestimmung des Fettsäuremusters im *Kapitel 2.3.3* beschrieben.

**Tabelle 2:** Zusammensetzung der Diät im ersten Versuch

Fett Komponente	frisch Menge [g/kg]	oxidiert Menge [g/kg]
Casein	200	200
Stärke	345	345
Saccharose	313	313
Fett	50	50
davon:		
Sonnenblumenöl	39,6	50
Schweineschmalz	10,4	-
Zellulose	30	30
Vitaminmischung <sup>1</sup>	20	20
Mineralstoffmischung <sup>2</sup>	40	40
DL-Methionin	2	2

<sup>1</sup> Vitaminmischung pro kg Diät: 4000 I.E. Retinol; 1000 I.E. Cholecalciferol; 0,75 mg Menadion-Na-Bisulfid; 5 mg Thiaminhydrochlorid; 6 mg Riboflavin; 6 mg Pyridoxin-Hydrochlorid; 15 mg Ca-D-Pantothenat; 30 mg Nicotinsäure; 2,0 mg Folsäure; 0,025 mg Cobalamin; 0,2 mg Biotin; 1000 mg Cholinchlorid, Stärke 16,9 g.

<sup>2</sup> Mineralstoffmischung pro kg Diät: 9,83 g Calciumcarbonat; 9,42 g Di-Calciumphosphat; 4,87 g Magnesiumphosphat; 10,0 g Kaliumsulfat; 0,87 g Magnesiumoxid; 2,99 g Natriumchlorid; 0,16 g Eisensulfat; 50,6 mg Zinkoxid; 24,2 mg Manganoxid; 0,32 mg Calciumjodat; 30,0 mg Kupfersulfat-Pentahydrat; Saccharose 1,8 g.

**Tabelle 3:** Selenkonzentrationen der eingesetzten Diäten und Einteilung der Versuchstiergruppen im ersten Versuch

Gruppe	Fettart	Selenzulage [µg/kg Diät]	Selenkonzentration Analysiert [µg/kg Diät]	Selen- Gruppe	Kurzbezeichnung
I	frisch	keine	69 ± 2	70	FF/SSe
II		500	576 ± 46	600	FF/ASe
III	oxidiert	keine	70 ± 2	70	OF/SSe
IV		500	647 ± 58	600	OF/ASe

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett; SSe, suboptimale Selenversorgung; ASe, adäquate Selenversorgung.

**Tabelle 4:** Fettkennzahlen der Diätfette im ersten Versuch als Bestandteil der fertigen Diät

Gruppe	POZ [mEq O <sub>2</sub> /kg Fett]	TBARS [μmol/kg Fett]
I	36,3	1,00
II	34,6	0,34
III	734	19,9
IV	774	28,4

Abkürzungen: POZ, Peroxidzahl; TBARS, Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen.

**Tabelle 5:** Tocopherol-Konzentrationen der Diäten im ersten Versuch

Gruppe	α-TOC [mg/kg Diät ]	α-TOC-Eq [mg/kg Diät]
I	21,3	21,3
II	20,6	20,6
III	35,9	24,1
IV	37,4	25,1

Abkürzung: α-TOC, α-Tocopherol; α-TOC-Eq, α-Tocopheroläquivalen.

### 2.1.1.2 Analysenparameter

Als Versuchsparameter zum Lipidmetabolismus wurden die Konzentrationen an Triglyceriden und Gesamtcholesterin in Plasma, Lipoproteinen sehr geringer Dichte (VLDL), Lipoproteinen geringer Dichte (LDL), Lipoproteinen hoher Dichte (HDL) sowie in der Leber der Versuchstiere bestimmt. In der Leber wurde die Aktivität sowie die Expression der lipogenen Enzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) und Fettsäuresynthetase (FsS) gemessen. Beides sollte Aufschluß über einen veränderten Lipidmetabolismus geben. Als Versuchsparameter zum Schilddrüsenhormonstoffwechsel wurde die Konzentration an gesamtem und freiem Thyroxin (T<sub>4</sub> und fT<sub>4</sub>), Trijodthyronin (T<sub>3</sub>), und Thyrotropin (TSH) im Plasma gemessen. Als Parameter zum Status des antioxidativen Schutzsystems der Versuchstiere wurde die Oxidationsempfindlichkeit der LDL, die Tocopherol-Konzentration in Plasma und Leber, sowie die Aktivität der Glutathionperoxidase (GSH-Px), als ein antioxidativ wirkendes Selen-haltiges Enzym, bestimmt. Zum Selenstatus der Versuchstiere wurde die Selenkonzentration in Plasma und Leber bestimmt. Die Methoden hierzu sind in den *Kapiteln 2.3.4, 2.3.6.1-2, 2.3.7.1-4 und 2.3.8.1-3* beschrieben.

### 2.1.2 Untersuchungen zum Einfluß oxidierter Fette auf den Schilddrüsenhormon- und Lipidstoffwechsel bei unterschiedlicher Jodversorgung

In diesem Versuch sollte untersucht werden, welchen Einfluß oxidierte Fette bei adäquater bzw. suboptimaler Jodversorgung auf ausgewählte Parameter des Schilddrüsenhormonstoffwechsels ausübt. In einem zweifaktoriellen Versuchsansatz wurden vier Gruppen mit je 12 Versuchstieren gebildet, die restriktiv 35 Tage verschiedene Diäten erhielten (Versuchsfaktoren: Fettart, Jodversorgung). Als Versuchstiere dienten männliche Sprague-Dawley Ratten (Fa. Charles River GmbH) mit einer mittleren Anfangslebensmasse von  $51,9 \pm 3,5$  g. Die Tiere wurden restriktiv gefüttert, um die Futtermenge zu standardisieren. Die tägliche Futtermenge wurde in den ersten 20 Tagen kontinuierlich von 5,1 g auf 18,0 g erhöht. Die mittlere tägliche Futtermenge über die ganze Fütterungsperiode betrug 13,8 g. Die oxidierten Fette wurden durch Erhitzen von Sonnenblumenöl bei einer Temperatur von  $55^{\circ}\text{C}$  unter permanenter Luftzufuhr über den Zeitraum von 5 Wochen hergestellt. Als Meßparameter der Oxidation des Öls während des Erhitzungsvorganges wurden in täglichen Abständen die POZ, die Konzentration an TBARS und die SZ bestimmt. Das frische Versuchsfett hatte eine POZ von  $4,0$  mEq  $\text{O}_2/\text{kg}$  Fett, eine SZ von  $0,61$  mg KOH/g Fett und die Konzentration an TBARS betrug  $0,27$   $\mu\text{mol}/\text{kg}$  Fett. Die thermische Behandlung des oxidierten Versuchsfettes führte zu einem deutlichen Anstieg der POZ auf  $682$  mEq  $\text{O}_2/\text{kg}$  Fett, der SZ auf  $1,30$  mg KOH/g Fett sowie der TBARS-Konzentration auf  $0,34$   $\mu\text{mol}/\text{kg}$  Fett. Die Inkubation des Öls bei  $55^{\circ}\text{C}$  führte zu einem deutlichen Verlust an PUFA, der an einem Abfall des Linolsäureanteiles (18:2 n-6) um  $6,1$  % (w/w) deutlich wurde, sowie einem Anstieg des Ölsäureanteiles (18:1) um  $4,5$  % (w/w). Um die Effekte der unterschiedlichen Fettsäurezusammensetzung wurde das Fettsäuremuster des frischen Sonnenblumenöls durch die Zugabe von Palmöl (89:11, w/w) dem Fettsäuremuster des oxidierten Fettes angeglichen. Der Anteil an Linolsäure (18:2 n-6) stellte dabei den Orientierungswert ( $60,1$  g/100 g Fettsäuren) dar. In diesem Versuch wurde anstelle Schweineschmalz Palmöl verwendet, um eine Erhöhung des Jodgehaltes der Diät durch das Schweineschmalz zu vermeiden. Da das Erhitzen des Fetts bei  $55^{\circ}\text{C}$  zu einem kompletten Verlust von Tocopherolen führte, wurde der Tocopherol-Gehalt von oxidiertem Fett mit der Zugabe von all-rac- $\alpha$ -Tocopherolacetat dem des frischen Fettes angeglichen. Dabei wurde eine Endkonzentration von  $513$  Milligramm Tocopheroläquivalent/kg Fett angestrebt. Die wichtigsten Parameter der eingesetzten Fette sind in *Tabelle 6* aufgelistet.

**Tabelle 6:** Charakterisierung der eingesetzten Fette im zweiten Versuch

	Ausgangsfette		Versuchsfette	
	Sonnen- blumenöl	Palmöl	Frisch	oxidiert
<b>Fettquelle [g/kg Diät]</b>				
Sonnenblumenöl	-	-	89	100
Palmöl	-	-	11	-
<b>Behandlung</b>				
Temperatur [°C]	-	-	-	55
Zeit [Wochen]	-	-	-	5
<b>Fettkennzahlen</b>				
Peroxidzahl [mEq O <sub>2</sub> /kg]	2,0	-	4,00	682
TBARS [µmol/kg]	0,29	-	0,27	0,34
Säurezahl	0,59	-	0,61	1,30
<b>Fettsäurezusammensetzung</b>				
[g/100 g Fettsäuren]				
Myristinsäure (14:0)	0,1	1,2	0,2	0,1
Palmitinsäure (16:0)	6,3	45,9	10,5	7,4
Palmitoleinsäure (16:1)	0,1	0,2	0,1	0,1
Stearinsäure (18:0)	4,4	4,5	4,4	4,7
Ölsäure (18:1)	22,4	37,7	24,3	26,9
Linolsäure (18:2 n-6)	66,2	9,5	59,8	60,1
Arachinsäure (20:0)	0,3	0,4	0,3	0,3
Eicosensäure (20:1)	0,2	0,2	0,2	0,3
<b>Tocopherole [mg/kg Fett]</b>				
α-Tocopherol	563	89,7	513	-
all-rac-α-Tocopherolacetat	-	-	-	775
(Zulage)				
α-Tocopheroläquivalent [mg/kg]	563	89,7	513	520

Abkürzungen: TBARS, Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen.

### 2.1.2.1 Zusammensetzung der Diät

Im zweiten Versuch wurde eine halbsynthetische Diät auf Caseinbasis eingesetzt, die in Anlehnung an das National Research Council (NRC, USA, 1995; Reeves et al., 1993) hergestellt wurde und in *Tabelle 7* dargestellt ist. Der Fettanteil betrug 10 %. Das Jod wurde den jodadäquaten Diäten in Form von Kaliumjodidlösung in einer Konzentration von 350 µg Jod/kg Diät zugegeben. Die analysierten Jodkonzentrationen der Diäten sind in *Tabelle 8* gegeben.

**Tabelle 7:** Zusammensetzung der Diät im zweiten Versuch

Fett	frisch	oxidiert
Komponente	Menge [g/kg]	Menge [g/kg]
Casein	200	200
Stärke	320	320
Saccharose	288	288
Fett	100	100
davon:		
Sonnenblumenöl	89,0	100
Palmöl	11,0	-
Zellulose	30	30
Vitaminvormischung <sup>1</sup>	20	20
Mineralstoffvormischung <sup>2</sup>	40	40
DL-Methionin	2	2

<sup>1</sup> Vitaminvormischung pro kg Diät: 4000 I.E. Retinol; 1000 I.E. Cholecalciferol; 0,75 mg Menadion-Na-Bisulfid; 5 mg Thiaminhydrochlorid; 6 mg Riboflavin; 6 mg Pyridoxin-Hydrochlorid; 15 mg Ca-D-Pantothenat; 30 mg Nicotinsäure; 2,0 mg Folsäure; 0,025 mg Cobalamin; 0,2 mg Biotin; 1000 mg Cholinchlorid, Stärke 16,9 g.

<sup>2</sup> Mineralstoffvormischung pro kg Diät: 9,83 g Calciumcarbonat; 9,42 g Di-Calciumphosphat; 4,87 g Magnesiumphosphat; 10,0 g Kaliumsulfat; 0,87 g Magnesiumoxid; 2,99 g Natriumchlorid; 0,16 g Eisensulfat; 50,6 mg Zinkoxid; 30,0 mg Kupfersulfat-Pentahydrat; 24,2 mg Manganoxid; 0,33 mg Natriumselenit, Saccharose 1,8 g.

**Tabelle 8:** Jodkonzentrationen der eingesetzten Diäten und Einteilung der Versuchstiergruppen im zweiten Versuch

Gruppe	Fettart	Jodzulage [µg/kg Diät]	Jodkonzentration analysiert [µg/kg Diät]	Jodgruppe	Kurzbezeichnung
I	frisch	keine	51,8	50	FF/SJ
II		350	423,8	400	FF/AJ
III	oxidiert	keine	44,6	50	OF/SJ
IV		350	378,9	400	OF/AJ

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett; SJ, suboptimale Jodversorgung; AJ, adäquate Jodversorgung.

Die Grundfuttermischungen wurden mit 10 % Fett vermischt und nach der Zugabe von Reinstwasser zu einem Teig geknetet und gefriergetrocknet (Gefriertrocknungsanlage Gamma 2-20, Fa. Christ, Osterode/Harz, Deutschland). Aus den gefriergetrockneten Diäten wurden die Fette extrahiert und die Fettkennzahlen POZ und TBARS bestimmt (*Tabelle 9*).

**Tabelle 9:** Fettkennzahlen der Diätfette im zweiten Versuch als Bestandteil der fertigen Diät

Gruppe	POZ [mEq O <sub>2</sub> /kg Fett]	TBARS [µmol/kg Fett]
I	32,5	0,6
II	33,0	0,8
III	866	18,6
IV	887	31,6

Abkürzungen: POZ, Peroxidzahl; TBARS, Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen.

### 2.1.2.2 Analysenparameter

Als Versuchsparameter zum Schilddrüsenhormonstoffwechsel wurden die Konzentrationen an T<sub>4</sub>, fT<sub>4</sub>, T<sub>3</sub> und TSH im Plasma gemessen. Als Schilddrüsenaktivitätsparameter wurden die Expressionen der Schilddrüsenperoxidase (TPO), des Natrium/Jodid-Symporters (Na<sup>+</sup>/J-SYM) und der Glutathionperoxidase (GSH-Px) der Schilddrüse gemessen. Die histologische Veränderungen der Schilddrüse wurden an Paraffinschnitten durch Messung der

Follikeldurchmesser und Epithelhöhen bestimmt. Als Kontrollparameter zum Jodstatus der Versuchstiere wurde die Jodkonzentration im Plasma gemessen. Zum Status des antioxidativen Schutzsystems der Versuchstiere wurde die in vitro Oxidationsempfindlichkeit der LDL durch kupferinduzierte Oxidation sowie die Tocopherol-Konzentration in Plasma und Leber bestimmt. Die Methoden hierzu sind in den *Kapiteln 2.3.4, 2.3.6.1-3, 2.3.7.1* sowie *2.3.8.1* beschrieben.

### **2.1.3 Untersuchungen zum Einfluß unterschiedlich thermisch behandelter Fette auf die Konzentrationen der Schilddrüsenhormone bei unterschiedlicher Vitamin E-Versorgungen**

In diesem Versuch sollte untersucht werden, welchen Einfluß unterschiedlich thermisch behandelte Fette bei adäquater und erhöhter Vitamin E-Versorgung auf ausgewählte Parameter des Schilddrüsenhormonstoffwechsels hat. In einem zweifaktoriellen Versuchsansatz wurden acht Gruppen mit je 12 Versuchstieren gebildet, die restriktiv 56 Tage semisynthetische Diäten erhielten (Versuchsfaktoren: Fettart, Vitamin E-Versorgung). Als Versuchstiere dienten männliche Sprague-Dawley Ratten (Fa. Charles River GmbH) mit einer mittleren Anfangslebensmasse von  $103 \pm 8$  g. Die Tiere wurden restriktiv gefüttert, um die Futteraufnahme zu standardisieren. Die tägliche Futtermenge wurde in den ersten 20 Tagen kontinuierlich von 7,8 g auf 18,0 g erhöht. Die mittlere tägliche Futteraufnahme über die ganze Fütterungsperiode betrug 16,0 g.

Die Tiere der Versuchsgruppen I und II erhielten die Diäten mit frischem Fettgemisch (10 %) aus Sonnenblumenöl und Schweineschmalz (31:69, w/w). Die oxidierten Fette der Gruppen III und IV wurden durch thermische Behandlung eines Sonnenblumenöl-/Schweineschmalzgemisches (1:1, w/w) bei einer Temperatur von 50°C unter permanenter Luftzufuhr über den Zeitraum von 38 Tage hergestellt (Fett # 1). Die oxidierten Fette der Gruppen V und VI wurden durch thermische Behandlung des zweiten Fettgemisches bei einer Temperatur von 105°C über den Zeitraum von 81 Stunden hergestellt (Fett # 2). Die oxidierten Fette der Gruppen VII und VIII wurden durch thermische Behandlung des zweiten Fettgemisches bei 190°C über den Zeitraum von 24 Stunden hergestellt (Fett # 3). Als Meßparameter der Oxidation der Öle während der thermischen Behandlung wurden in täglichen Abständen die Fettsäurezusammensetzung und die POZ bestimmt. Das frische Versuchsfett hatte eine POZ von 1,6 mEq O<sub>2</sub>/kg Fett. Die thermische Behandlungen der oxidierten Versuchsfette führte zu einem deutlichen Anstieg der POZ in Fett # 1 auf 804 mEq



**Tabelle 10:** Charakterisierung der eingesetzten Fette im dritten Versuch

	Ausgangsfett		Versuchsfette		
		FF	Fett # 1	Fett # 2	Fett # 3
<b>Fettquelle [g/kg Diät]</b>					
Sonnenblumenöl	50	31	50	50	50
Schweineschmalz	50	69	50	50	50
<b>Behandlung</b>					
Temperatur [°C]	-	-	50	105	190
Zeit [Stunden]	-	-	912	81	24
<b>Peroxidationsprodukte im Fett</b>					
Peroxidzahl [mEq O <sub>2</sub> /kg]	1,6	1,6	804	149	3,5
TBARS [µmol/kg]	0,08	0,13	10,3	2,18	0,29
<b>Fettsäurezusammensetzung</b>					
[g/100 g Fettsäuren]					
Myristinsäure (14:0)	0,8	1,1	0,9	1,0	0,9
Palmitinsäure (16:0)	15,2	13,2	17,4	17,8	17,5
Palmitoleinsäure (16:1)	1,5	1,3	1,6	1,6	1,5
Stearinsäure (18:0)	8,7	11,5	9,8	10,4	10,2
Ölsäure (18:1)	33,4	35,6	36,9	35,6	34,7
Linolsäure (18:2 n-6)	36,6	26,1	26,9	26,6	27,2
Linolensäure (18:3 n-3)	0,5	0,6	0,3	0,3	0,3
Eicosensäure (20:1)	0,7	0,8	0,7	0,7	0,8
<b>Tocopherole [mg/kg Fett]</b>					
α-Tocopherol (analysiert)	305	202	-	-	27,9
all-rac-α-Tocopherolacetat					
Niedrige Zulage	-	71,5	372	372	331
Erhöhte Zulage	-	3654	3725	3725	3683
α-Tocopheroläquivalent					
[mg/kg Fett] (errechnet)					
Niedrige Zulage	-	48	250	250	222
Erhöhte Zulage	-	2452	2500	2500	2472

Abkürzungen: FF, Frisches Fett; Fett # 1, bei 50°C erhitztes Fett, Fett # 2, bei 105°C erhitztes Fett; Fett # 3, bei 190°C erhitztes Fett; TBARS, Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen.

O<sub>2</sub>/kg Fett, in Fett # 2 auf 149 mEq O<sub>2</sub>/kg Fett und zu einem leichten Anstieg der POZ in Fett # 3 auf 3,5 mEq O<sub>2</sub>/kg Fett (*Tabelle 10*).

Das Erhitzen der Fettgemische führte zu einem deutlichen Verlust mehrfach ungesättigter Fettsäuren, der bei Fett # 1, Fett # 2 und Fett # 3 der an einem Abfall des Linolsäureanteiles (18:2 n-6) um 9,7, 10,0 bzw. 9,4 % (w/w), sowie einem Anstieg des Ölsäureanteiles (18:1) um 1,1, 3,5 bzw. 1,3 % (w/w) bei Fett # 1, Fett # 2 bzw. Fett # 3 und des Stearinsäureanteiles (18:0) um 1,1-1,7 % (w/w) deutlich wurde. Die Fettsäurezusammensetzung des frischen Sonnenblumenöl wurde durch Zugabe von Schweineschmalz dem Fettsäuremuster des oxidierten Fettes angeglichen. Die Linolsäure stellte dabei den Orientierungswert dar (26,6 g/100 g Fettsäuren).

Da die thermische Behandlung zu einem kompletten Verlust von Tocopherolen bei allen Fettgemischen führte, wurde der Tocopherol-Gehalt der oxidierten Fette durch Zugabe von all-rac- $\alpha$ -Tocopherolacetat dem des frischen Fettes angeglichen. Dabei wurde eine Endkonzentration von 317 mg  $\alpha$ -Tocopheroläquivalent/kg Fett angestrebt. Die wichtigsten Parameter der eingesetzten Fette sind in der *Tabelle 10* aufgelistet.

### 2.1.3.1 Zusammensetzung der Diät

Für den dritten Versuch wurde halbsynthetische Diät auf Caseinbasis eingesetzt, die in Anlehnung an das National Research Council (NRC, USA, 1995; Reeves et al., 1993) hergestellt wurde und in *Tabelle 11* dargestellt ist. Der Fettanteil betrug 10 %. Der Vitamin E-Gehalt der Diäten wurde mit Vitamin E-Zulage in der Form all-rac- $\alpha$ -Tocopherolacetat in Konzentration von 250 mg/kg Diät variiert. Die analysierten  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentrationen der Diäten sind in *Tabelle 12* dargestellt.

Die Grundfuttermischungen wurden mit 10 % Fett vermischt und nach der Zugabe von Reinstwasser zu einem Teig geknetet und gefriergetrocknet (Gefriertrocknungsanlage Gamma 2-20, Fa. Christ, Osterode/Harz, Deutschland). Aus gefriergetrockneten Diäten wurden die Fette extrahiert und die Fettkennzahlen POZ und TBARS bestimmt (*Tabelle 13*).

**Tabelle 11:** Zusammensetzung der Diät im dritten Versuch

Fett Komponente	frisch Menge [g/kg]	oxidiert Menge [g/kg]
Casein	200	200
Stärke	300	300
Saccharose	298	298
Fett	100	100
frisch davon:		
Sonnenblumenöl	31	50*
Schweineschmalz	69	50*
Zellulose	40	40
Vitaminmischung <sup>1</sup>	20	20
Mineralstoffmischung <sup>2</sup>	40	40
DL-Methionin	2	2

\* Sonnenblumenöl- und Schweineschmalzanteil für oxidierte Fette (Fett # 1, Fett # 2 und Fett # 3).

<sup>1</sup> Vitaminmischung pro kg Diät: 4000 I.E. Retinol; 1000 I.E. Cholecalciferol; 0,75 mg Menadion-Na-Bisulfid; 5 mg Thiaminhydrochlorid; 6 mg Riboflavin; 6 mg Pyridoxin-Hydrochlorid; 15 mg Ca-D-Pantothenat; 30 mg Nicotinsäure; 2,0 mg Folsäure; 0,025 mg Cobalamin; 0,2 mg Biotin; 1000 mg Cholinchlorid, Stärke 16,9 g.

<sup>2</sup> Mineralstoffmischung pro kg Diät: 9,83 g Calciumcarbonat; 9,42 g Di-Calciumphosphat; 4,87 g Magnesiumphosphat; 10,0 g Kaliumsulfat; 0,87 g Magnesiumoxid; 2,99 g Natriumchlorid; 0,16 g Eisensulfat; 50,6 mg Zinkoxid; 30,0 mg Kupfersulfat-Pentahydrat; 24,2 mg Manganoxid; 0,32 mg Calciumjodat; 0,33 mg Natriumselenit, Saccharose 1,8 g.

**Tabelle 12:**  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen der eingesetzten Diäten und Einteilung der Versuchsgruppen im dritten Versuch

Gruppe	Fettart	$\alpha$ -Tocopherolacetat Zulage [mg/kg Diät]	$\alpha$ -Tocopherol analysiert [mg/kg Diät]	Vitamin E Gruppe	Kurzbezeichnung
I	frisch	keine (25 mg/kg Diät)	$11,6 \pm 0,95$	25	FF/NE
II		250	$283 \pm 38,1$	250	FF/EE
III	oxidiert bei	25	$46,5 \pm 2,21$	25	OF # 1/NE
IV	50 °C	250	$262 \pm 30,4$	250	OF # 1/EE
V	oxidiert bei	25	$25,4 \pm 4,17$	25	OF # 2/NE
VI	105 °C	250	$281 \pm 40,5$	250	OF # 2/EE
VII	oxidiert bei	25	$26,7 \pm 1,64$	25	OF # 3/NE
VIII	190 °C	250	$290 \pm 7,45$	250	OF # 3/EE

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF # 1, bei 50°C erhitztes Fett; OF # 2, bei 105°C erhitztes Fett; OF # 3, bei 190°C erhitztes Fett; EE, erhöhte Vitamin E-Versorgung; NE, niedrige Vitamin E-Versorgung.

**Tabelle 13:** Fettkennzahlen der Diätfette im dritten Versuch als Bestandteil der fertigen Diät

Gruppe	POZ [mEq O <sub>2</sub> /kg Fett]	TBARS [mmol/kg Fett]
I	4,66	0,02
II	4,41	0,00
III	920	22,7
IV	915	21,1
V	329	2,21
VI	224	2,26
VII	39,2	0,15
VIII	37,7	0,21

Abkürzungen: POZ, Peroxidzahl; TBARS, Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen.

### 2.1.3.2 Analysenparameter

Als Versuchsparameter zum Schilddrüsenhormonstoffwechsel wurden die Konzentrationen von  $T_4$ ,  $fT_4$ ,  $T_3$  und TSH im Plasma gemessen. Die Methoden hierzu sind in den *Kapiteln 2.3.6.1-2* beschrieben.

### 2.1.4 Haltung der Versuchstiere

Die Tiere wurden in einem klimatisierten Raum bei konstanter Temperatur von  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , bei künstlicher Beleuchtung und einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus ( $6^{00}/18^{00}$ ) einzeln in Makrolonkäfigen gehalten. Das Trinkwasser (Reinstwasser, mit 0,14 g/l NaCl auf die Osmolarität von Leitungswasser eingestellt) stand den Ratten *ad libitum* zur Verfügung. Die Fütterung erfolgte restriktiv zwischen  $8^{00}$  und  $9^{00}$  Uhr. Die Gewichtszunahme wurde wöchentlich ermittelt.

Am vorletzten Tag nach dem Mittag erfolgte im halbstündigen Abstand die letzte Fütterung, da den Tieren um 17 Uhr, ebenso in halbstündigem Abstand, die Diät entzogen wurde.

## 2.2 Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials

### 2.2.1 Gewinnung von Plasma, Erythrozyten und Organentnahme

Die Ratten wurden unter Äthernarkose dekapitiert. Das Blut wurde in heparinisierte Monovetten (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) aufgefangen. Zur Gewinnung des Plasmas wurde das Blut bei 3000 U/min 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland). Die Erythrozyten wurden 3x mit physiologischer Kochsalz-Lösung gewaschen.

Die Schilddrüse und eine Gewebeprobe der Leber wurden für die Expressionsanalyse entnommen und wie auch der Hauptanteil der Leber, Herz, Niere und Hoden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Erythrozyten, Plasma und Gewebeproben wurden bis zur weiteren Aufbereitung bei  $-20^\circ\text{C}$  und die Proben zur Isolierung von RNA wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.2.2 Fraktionierung der Lipoproteine

Die Trennung der Lipoproteine des Plasmas erfolgte über eine Dichte-Gradienten-Zentrifugation in Anlehnung an die Vorschrift der Firma Sorvall (1997).

Im ersten Schritt wurde die Dichte des Plasmas mit einer Lösung 1 (0,195 M NaCl, 0,27 mM EDTA-Na-Salz, 1 mM NaOH) auf 1,006 g/ml eingestellt und bei 900.000 g 1,5 Stunde bei 4°C zentrifugiert (Mikroultrazentrifuge RC M 150 GX, Fa. Sorvall, Hanau, Deutschland). Anschließend wurde die VLDL (Dichte < 1,006 g/ml) als obere Schicht vorsichtig abpipettiert. Der Rest des Plasmas wurde mit einer Lösung 2 versetzt (24,27 mM NaBr, aufgefüllt auf 100 ml mit Lösung 1), um eine Dichte von 1,063 g/ml zu erreichen. Nach erneutem Zentrifugieren bei 900.000 g, 1,5 Stunden, 4°C wurde die LDL (Dichte zwischen 1,006-1,063 g/ml) als obere Schicht abpipettiert. Die HDL (Dichte > 1,063 g/ml) wurde nicht weiter getrennt, sondern zusammen mit dem proteinhaltigen Rest entnommen und alle Proben bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

### 2.2.3 Gewinnung von Leberhomogenat und Leberzytosol

Das Leberhomogenat und Leberzytosol wurden in Anlehnung an die Methoden von Garg et al. (1988) und Christiansen et al. (1991) gewonnen. 3-4 g gefrorene Leber wurden grob zerkleinert und nach der Zugabe von 8 ml Homogenisierungspuffer (0,25 M Saccharose, 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4) in einem Potter-S-Homogenisator (Fa. B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland) unter Eiskühlung bei 500 U/min mit 10 Hüben homogenisiert. Die Zelltrümmer wurden durch einen Zentrifugationsschritt bei 2.000 g, 10 min, 4°C (Megafuge 1,0, Fa. Sorvall, Hanau, Deutschland) abzentrifugiert. Ein Aliquot vom Überstand (Homogenat) wurde für weitere Analysen bei -20°C eingefroren. Das Leberzytosol wurde in zwei danach folgenden Zentrifugationsschritten bei 105.000 g, 60 min, 4°C (Mikroultrazentrifuge RC M 150 GX, Fa. Sorvall, Hanau, Deutschland) gewonnen. Zwischen dem ersten und den zweiten Zentrifugieren wurde vom Überstand die Fettschicht entfernt und der Restüberstand weiter zentrifugiert.

## 2.3 Analytische Methoden

### 2.3.1 Bestimmung der Fettkennzahlen zur Abschätzung des Oxidationsgrades der Fette

Zur Charakterisierung der eingesetzten Fette wurden die sogenannten Fettkennzahlen POZ und SZ; sowie die Konzentration an TBARS bestimmt.

#### 2.3.1.1 Peroxidzahl

Die POZ gibt die Menge an peroxidisch gebundenem Sauerstoff als Milliäquivalente Sauerstoff pro kg Fett an. Die Bestimmung erfolgte nach Wheeler (1932; Pardun, 1976; DGF-Einheitsmethoden, 1994). 0,5-1,0 g Fett wurde in 30 ml Chloroform/Eisessig (3:2, v/v) gelöst und mit 1 ml Kaliumjodid (gesättigte Lösung) versetzt. Nach 60 sec intensiven Mischens wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 ml Wasser gestoppt. Nach der Zugabe von 1 ml Stärkelösung (1 %, w/v im Reinstwasser) wurde das durch die Peroxide gebildete Jod mit 0,05 N Natriumthiosulfat-Lösung bis zum Farbumschlag titriert.

Berechnung der Peroxidzahl:

$$\text{POZ (mEq O}_2\text{/kg Fett)} = \frac{\text{Verbrauch Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\text{-Lsg. (ml)} \cdot \text{Konzentration Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\text{-Lsg. (N)} \cdot 1000}{\text{Fetteinwaage (g)}}$$

#### 2.3.1.2 Säurezahl

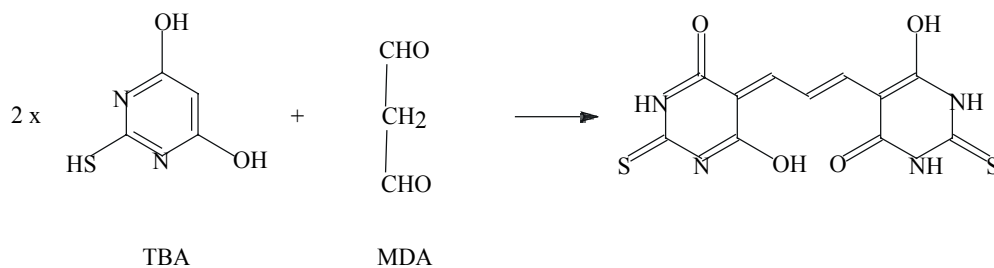
Die Säurezahl ist ein Maß für den Gehalt an freien Säuren in Fetten und Fettsäuren. Sie gibt die Menge von Kaliumhydroxid an, die notwendig ist, um die in 1 g Fett enthaltenen freien Säuren zu neutralisieren. Die Bestimmung erfolgte nach der DGF-Einheitsmethode (1994). 10 g Fett wurde in 50 ml Ethanol/Toluol (1:1, v/v) unter leichtem Erwärmen gelöst. Nach der Zugabe von 6-8 Tropfen Phenolphthalein (1%, w/v in Ethanol) wurde die Probe mit 0,1 N Kaliumhydroxid bis zum Farbumschlag titriert.

Berechnung der Säurezahl:

$$\text{SZ (mg KOH/g)} = \frac{56,1 \cdot \text{Verbrauch KOH (ml)} \cdot \text{Konzentration KOH (N)}}{\text{Fetteinwaage (g)}}$$

### 2.3.1.3 Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen

Die Bestimmung der TBARS erfolgte in Anlehnung an die Methode von Sidwell et al. (1954), modifiziert nach Halliwell und Gutteridge (1989) und Valenzuela (1991). Diese Bestimmung basiert auf der Reaktion von zwei Molekülen Thiobarbitursäure (TBA) und einem Molekül Malondialdehyd (MDA), unter dem Einfluß von Hitze in saurem Milieu (*Abbildung 1*).



**Abbildung 1:** Reaktion von Malondialdehyd mit Thiobarbitursäure  
(nach Valenzuela, 1991)

Zur Ermittlung der Menge an TBARS wurde eine Eichkurve mit 1,1,3,3-Tetraethoxypropan (TEP) als Standard erstellt. 0,2 g Fett bzw. 0,2 ml Standard wurde mit 4 ml Chloroform und 4 ml TBA-Reagenz (0,67 % (w/v) in destilliertem Wasser, 1:2 mit Eisessig verdünnt) versetzt und 4 min geschüttelt. Nach der Trennung der Phasen wurde die obere wäßrige Phase abpipettiert und 30 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurde die Absorption bei 532 nm in Glasküvetten gemessen. Mittels Eichkurve wurde die Menge an TBARS in  $\mu\text{mol}$  ermittelt und auf 1 kg Fett bezogen.



### **2.3.2 Bestimmung der Konzentration von $\alpha$ -Tocopherol von Fetten und tierischen Geweben**

Die Konzentration des  $\alpha$ -Tocopherols in den eingesetzten Ölen und Diäten wurde in Anlehnung an die Methoden von Balz et al. (1993) und Coors (1991) bestimmt. Dabei wurden die Diäten gemahlen und die Fette mit Hexan:Isopropanol (3:2, v/v) extrahiert (Hara und Radin, 1978; modifiziert nach Eder und Kirchgessner, 1994). 200  $\mu$ l dieser Extrakte wurden mit 1 ml Pyrogallol-Lösung (1 % in absolutem Ethanol, w/v) und 150  $\mu$ l gesättigter Natriumhydroxid Lösung versetzt und im geschlossenen Gefäß bei 70°C 30 min inkubiert. Die verseiften Tocopherole wurden danach mit 2 ml *n*-Hexan extrahiert. Die Hexanphase wurde zur Bestimmung der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration verwendet. Die Trennung der Tocopherole erfolgte mittels HPLC (1100-er Serie, Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland) über eine LiChrospher Si 60 Säule (5  $\mu$ m Partikelgröße, Länge 250 mm, 4 mm Innendurchmesser, bei 30°C) mittels *n*-Hexan und 1,4-Dioxan (94:6, v/v) als Laufmittel (Flußrate 1,0 ml/min). Die Tocopherole wurden über Fluoreszenzdetektion (Excitation: 295 nm, Emission: 330 nm) in Bezug auf externe Standards (Merck, Darmstadt, Deutschland) quantifiziert.

### **2.3.3 Bestimmung des Fettsäuremusters von Fetten**

Zur Bestimmung des Fettsäuremusters der verwendeten Fette wurden die Fettsäuren mit Trimethylsulfoniumhydroxid methyliert (Butte, 1989) und die Fettsäuremethylester (FAME) quantitativ mit einem Gaschromatographen (HP 5890, Hewlett Packard GmbH, Waldbronn, Deutschland) mittels Flammenionisationsdetektor (FID) bestimmt (Dänicke et al., 1999). Die Trennung der Fettsäuremethylester erfolgte auf einer 30 m langen FFAP-Si-Trennsäule (0,53 mm Innendurchmesser, Fa. Macherey und Nagel, Düren, Deutschland) mit Helium als Trägergas und einer Fließgeschwindigkeit von 5,4 ml/min. FAME wurden quantifiziert mit internem Standard (C15:0).

### **2.3.4 Bestimmung der Selenkonzentration in Diäten, Leber und Plasma**

Die Konzentration von Selen in Diäten und Leber wurde nach der Methode nach Schäfer und Behne (1985) bestimmt. 0,5 g Diät- oder Leberprobe wurden mit 3 ml HNO<sub>3</sub> (70 %) vermischt und anschließend 30 min bei 140°C gekocht. Zu den gekühlten Proben wurden

danach 1,0 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96 %) und 0,5 ml HClO<sub>4</sub> (70 %) gegeben, gründlich gemischt und 20 min bei 300°C gekocht. Nach dem Abschluß dieser Phase wurden die Proben schnell auf 100°C gekühlt mit 20 ml 6 N HCl versetzt und 30 min bei 100°C inkubiert. Nach Abkühlen der Proben wurden diese auf 40 ml mit Wasser aufgefüllt und mit einem Atomabsorptionsspektrometer (AAS 403, Perkin Elmer, Bodensee, Deutschland) und der FIAS System (MHS 20, Perkin Elmer, Bodensee, Deutschland) gemessen. Pro Probe wurden drei Messungen durchgeführt.

### **2.3.5 Bestimmung der Jodkonzentration in Diäten**

Die Konzentration von Jod in Diäten wurde nach der Methode nach Fecher et al. (1998) bestimmt. 250 mg Probe wurden in ein gut verschließbaren Kolben mit 5 ml Reinstwasser gemischt und anschließend mit 1 ml Tetramethylamoniumhydroxid (TMAH, 25 %) versetzt und 3 Stunden bei 90°C inkubiert. Nach Abkühlen wurde die Lösung quantitativ in einen 25 ml Meßkolben überführt. Die Meßlösung wurde durch zweifaches Filtrieren durch einen 5 µm und 0,45 µm Vorsatzfilter gewonnen. Zur Messung wurden danach 5 ml Filtrats mit 0,5 ml Telur-Standardlösung (Te-125, 10 mg Te/l) und 5 ml Reinstwasser versetzt. Die Messung erfolgte mittels ICP-MS (Elan 6000, Perkin Elmer, Bodensee, Deutschland).

### **2.3.6 Parameter des Schilddrüsenhormonstoffwechsels**

Als Parameter des Schilddrüsenhormonstoffwechsels wurden die Konzentrationen von TSH, T<sub>4</sub>, fT<sub>4</sub> sowie T<sub>3</sub> im Plasma bestimmt. Zusätzlich wurde die relative mRNA-Konzentration wichtiger Enzyme in der Schilddrüse (TPO, Na<sup>+</sup>/J<sup>-</sup>-SYM und GSH-Px) bestimmt und histologische Untersuchungen an Schilddrüsenschnitte durchgeführt.

#### **2.3.6.1 Bestimmung von Thyrotropin im Plasma**

Zur Messung des TSH im Plasma wurde ein Radioimmunoassay (RIA) (Biocode, Liege, Belgien) verwendet.

#### ***Messprinzip***

Das nicht markierte TSH in Plasma bzw. Standard konkurriert mit <sup>125</sup>I-markiertem TSH (Tracer) um die begrenzte Zahl an vorhandenen Antikörpern. Die Menge des an den hoch

spezifischen monoclonalen Antikörper (Kaninchen) gebundenen markierten TSH wird so reduziert. Nach 30 min Inkubation wurde die Trennung der gebundenen und freien Antikörpern durchgeführt. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren (1.500 g, 15 min) abpipettiert und die Radioaktivität im Pellet nach der Zugabe von 2 ml Szintillatormischung im Flüssigkeits-Szintillations-Zähler (TRI-Carb 2100TR, Camberra Packard, Dreieich, Deutschland) gemessen. Berechnung der Thyrotropinkonzentration in der Probe erfolgte mittels logarithmierter Eichkurve mit der Software SigmaPlot 2.01 (Jandel Scientific Software, Erkrath, Deutschland).

### **2.3.6.2 Bestimmung von gesamtem und freiem Thyroxin sowie Trijodthyronin im Plasma**

Zur Messung der Konzentration des  $T_4$ ,  $fT_4$  und  $T_3$  wurden die RIA Kits  $T_4$  MAb, FREE  $T_4$ , sowie  $T_3$  der Fa. ICN-Pharmaceuticals (Eschwege, Deutschland) verwendet.

#### ***Messprinzip***

Das nicht markierte Hormon im Plasma konkurriert mit dem markierten Hormon um die begrenzte Zahl vorhandener Antigenbindungsstellen. Mit zunehmender Hormonkonzentration im Plasma sinkt die Anzahl freier Bindungsstellen für den markierten Hormon-Tracer. Die Konzentration der gebundenen Radioaktivität ist daher umgekehrt proportional zu Hormonkonzentration im Plasma bzw. Standard. Nach einer entsprechenden Inkubationszeit wurden die Antikörper-gebundene und freie Fraktion getrennt und die Radioaktivität nach der Zugabe von 3 ml Szintillatormischung im Flüssigkeits-Szintillations-Zähler gemessen. Berechnung der Hormonkonzentration in der Probe erfolgte mittels logarithmierter Eichkurve mit Software SigmaPlot 2.01 (Jandel Scientific Software, Erkrath, Deutschland).

### **2.3.6.3 Histologische Untersuchungen an der Schilddrüse**

Die Schilddrüsen wurden nach der Entnahme in der 4 % Formaldehyd-Lösung (v/v) 24 Stunden fixiert (Bucher, 1938) und anschließend mittels Einbettautomat-Histokinette in Paraffin eingebettet (Hagemann und Rosenmund, 1989). Die Einbettstufen sind in *Tabelle 14* gezeigt. Mittels Mikrotom wurden 4  $\mu$ m dicke Schilddrüsenchnitte hergestellt, auf Objektträger fixiert und nach dem Entfernen des Einbettmittels (*Tabelle 15*) mit Hämalaun-Eosin nach Mayer (Böck, 1989) gefärbt. Die Zellkerne wurden blau, Zytoplasma und Schilddrüsenfollikel rot gefärbt.

Anschließend erfolgte die Messung der Follikeldurchmesser und der Epithelhöhen an digitalisierten Bildern, die mit einer Sony 3CCD Farbvideokamera am Axioskop bei 200-facher Vergrößerung (Zeiss, Jena, Deutschland) aufgenommen wurden. Pro Objektträger wurden 30 Follikeldurchmesser und die Höhe von drei zugehörigen Epithelzellen gemessen (Seffner und Heller, 1979; Seffner, 1982). Die Auswertung erfolgte mittels Auswertungsprogramm KS300 3.0 (Zeiss, Jena, Deutschland).

**Tabelle 14:** Einbettungsschema im Einbettautomat

Einbettstufen	Einbettdauer (Std.)
1 Ethanol 70 % I	1
2 Ethanol 70 % II	1
3 Ethanol 80 %	1
4 Ethanol 90 %	1
5 Ethanol 96 % I	1
6 Ethanol 96 % II	1
7 Ethanol abs. I	1
8 Ethanol abs. II	1
9 Xylen I	1
10 Xylen II	1
11 Paraffin I	2
12 Paraffin II	Mindestens 1

**Tabelle 15:** Entfernen des Einbettmittels

Entfernstufe	Entfernung	Dauer (min)
1. Xylen II	Entfernung des Paraffins	5
2. Xylen II	Entfernung des paraffinhaltigen Xylens	5
3. Xylen III	Entfernung der letzten Paraffinspuren	5
4. Xylen: Ethanol abs. 1:1 (v/v)	Entfernung des Xylens	1
5. Ethanol abs. I	Entfernung des Xylens	5
6. Ethanol abs. II	Beseitigung von Xylenresten	5
7. Ethanol abs. III	Beseitigung von Xylenresten	5
8. Ethanol 96 %		1
9. Ethanol 80 %		1
10. Wasser (Deionisiert)	Mehrmals wechseln	5

#### 2.3.6.4 Expressionsanalyse wichtiger Enzyme des Schilddrüsenhormonstoffwechsels

Die Bestimmung der Expressionsanalyse wichtiger Enzyme des Schilddrüsenhormonstoffwechsels wurde mittels Reverse-Transcriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) durchgeführt. Zunächst wurde aus der Schilddrüse die gesamte RNA mittels Guanidinium-Thiocyanat-Methode (in Anlehnung an Chirgwin et al., 1979, modifiziert von Chomczynski und Sacchi, 1987) mit RNazol B Reagenz (WAK Chemie Medical GmbH, Bad Soden, Deutschland) isoliert. In einer Reverse-Transcriptase Reaktion erfolgte die Umschreibung in die Komplementäre-DNA (c-DNA). Zur Quantifizierung relevanter Genabschnitte wurde anschließend eine PCR durchgeführt (Ready To Go™ RT-PCR Beads, Pharmacia Biosciences, Freiburg, Deutschland; Taq PCR Core Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland).

Etwa 10 mg Schilddrüse wurden mit 800 µl RNazol B Reagenz versetzt und unter Eiskühlung in einem Homogenisator homogenisiert. Nach Zugabe des Chloroforms (80 µl) erfolgte die Extraktion der gesamten RNA. Anschließend wurden die Proben bei 12.000 g, 4°C 15 min zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase, die die RNA enthielt, wurde abpipettiert und 1:2 mit Isopropanol versetzt. Nach 45 min Inkubation bei 4°C wurde die gefällte RNA durch Zentrifugieren (12.000 g, 4°C, 15 min) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das RNA-Pellet wurde mit 800 µl 75 % Ethanol gewaschen, bei 7.500 g 8 min zentrifugiert, und anschließend 15 min luft-getrocknet. Schließlich wurde die RNA mit 50-100 µl RNase freiem Wasser versetzt und 3 min bei 60°C in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gelöst. Zur Bestimmung der Reinheit der RNA-Proben wurden diese 1:50 bzw. 1:100 mit RNase freiem Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260 und 280 nm gemessen. Zur Einschätzung der Reinheit der Proben wurde der Quotient zwischen Extinktion bei 260 und 280 nm errechnet. Die Berechnung der RNA-Konzentration der Proben erfolgte nach der Gleichung:

$$\text{Ext}_{260} \cdot 40 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g RNA/ml}$$

Zur Kontrolle eines möglichen Abbaus der RNA während der Präparation durch RNAsen wurde denaturierende Formaldehyd-(FA)-Agarose-Gel-Elektrophorese (1,2 %) durchgeführt (1 Stunde, 5-7 V/cm).

**Tabelle 16:** Reagenzien für RNA-Gel-Elektrophorese

Pufferart	Reagenzien
10x FA Gelpuffer (pH 7,0)	200 mM MOPS 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA
1x FA Gellaufpuffer	100 ml 10x FA Gelpuffer 20 ml 37% Formaldehyd 880 ml RNase freies Wasser
5x RNA Gelladepuffer	20 mg Bromphenolblau 80 µl 500 mM EDTA (pH 8,0) 720 µl 37% Formaldehyd 2,0 ml Glycerol 3,1 ml Formamid 4,0 ml 10x FA-Gelpuffer

Abkürzungen: FA, Formaldehyd; MOPS, 3-[Morpholino]-Propanschwefelsäure.

Dazu wurden 2-4 µg RNA auf 10 µl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt, mit 2 µl 5x RNA-Gelladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen.

Das Gel wurde nach einer Stunde in einer Fotoeinrichtung (SynGene, GeneGenius, Synoptics Inc., USA) unter UV-Licht aufgenommen. Bei Vorhandensein zweier deutlichen Banden (18S- und 28S-Ribosomale-RNA) konnte von einer erfolgreichen Präparation ausgegangen werden.

Zur Bestimmung der relativen mRNA-Konzentration der TPO, des Na<sup>+</sup>/J<sup>-</sup>-SYM und der GSH-Px wurden die mRNA-Sequenzen in der SRS6 Version 6.07.3 EMBI-Datenbank (Europäisches molekularbiologisches Institut) herangezogen.

Die Primer wurden in Anlehnung an die Methode von Köhler (1995) mit dem Programm Primer Select 4.0 (DNASar Inc., USA) ermittelt. Die Basenpaarlänge sollte zwischen 18 und 30 Basen Länge, der Anteil der Guanidin/Cytosin zwischen 50-60 % und Schmelztemperatur zwischen 55-80°C betragen. In kinetischen Studien wurde die optimale Konzentration an Gesamt-RNA pro Ansatz, die Primer-Konzentration, die Schmelztemperatur und die Anzahl der notwendigen Zyklen für die TPO, den Na<sup>+</sup>/J<sup>-</sup>-SYM, die GSH-Px der Schilddrüse und des Referenzgenes (housekeeping gene) Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ermittelt. Um die Produktion von PCR-Produkten aus DNA auszuschließen, wurde eine

Nullkontrolle, d.h. ohne der cDNA-Synthese durchgeführt. Die RNA Proben wurden vor dem Ansatz auf eine Konzentration von 0,2 bzw. 0,4 µg RNA pro µl verdünnt.

Zur Bestimmung der Konzentrationen an PCR-Produkten wurde eine DNA-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurden 0,6 g Agarose mit 30 ml 0,5x TBE-Laufpuffer versetzt, zum Kochen gebracht und 5 min unter ständigem Mischen gekocht. Nach Abkühlen auf 65°C wurde 12 µl Ethidiumbromid (0,2 µg/ml Gel) zupipettiert, geschwenkt und gleich das Gel gegossen. Nach 20-30 min wurde des Gel für weitere 30-60 min in 0,5x TBE Laufpuffer mit 800 µl Ethidiumbromid pro Liter equilibriert. 10 µl PCR-Produkte wurden mit 2 µl 6x Gelladepuffer versetzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Trennung der PCR-Produkte erfolgte über 1 Stunde bei 5-7 V/cm.

**Tabelle 17:** Reagenzien für DNA-Gel-Elektrophorese

Pufferart	Reagenzien
5x TBE-Gelpuffer	54,0 g Tris Base 27,5 g Borsäure 0,1 M EDTA auf 1 l mit Reinstwasser aufgefüllt.
0,5x TBE-Laufpuffer	100 ml 5x TBE Gelpuffer 900 ml Reinstwasser
6x Gelladepuffer	300 µl Glycerol 2,5 µl Bromphenolblau (0,25 %, w/v) 700 µl Reinstwasser

Abkürzungen: EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure; TBE, Tris-Borsäure-EDTA.

Die PCR wurde im Bereich des linearen Anstiegs des Logarithmus der PCR-Produktkonzentration sowohl für die TPO, den Na<sup>+</sup>/J-SYM und die GSH-Px, als auch für GAPDH gestoppt. Die entstandenen PCR-Produkte wurden mittels 2 %iger Agarosegel-Elektrophorese getrennt (*Tabelle 17*). Die Färbung der Produkte folgte mittels Ethidiumbromid (Köhler et al., 1995). Unter UV-Licht wurden die Produkte in einer Fotoeinrichtung (SynGene GeneGenius, Synoptics Inc., USA) visualisiert und mittels zugehöriger Software ausgewertet. Die Peakfläche einer Probe wurde mit der Peakfläche des GAPDH verglichen und in Prozent dieser Fläche angegeben.

### 2.3.6.4.1 Schilddrüsenperoxidase

Die Reaktionsparameter sind in *Tabelle 18* gezeigt.

**Tabelle 18:** Parameter der RT-PCR für Schilddrüsenperoxidase

mRNA- und Primerpaarsequenzen	TPO (EMBL ID: RNTPO)	
	Primer 1	5' CCA CAA AAG GCC GAG GTT CAA G 3'
	Primer 2	5' AAG GGC TGT GGC ATT TAT TCG TCT 3'
	GAPDH (EBMI ID: RNGAPDHR)	
	Primer 1	5' GCA TGG CCT TCC GTG TTC C 3'
	Primer 2	5' GGG TGG TCC AGG GTT TCT TAC TC 3'
Primerkonzentration	TPO - 1,0 pmol/µl Primerpaargemisch	
	GAPDH - 1,0 pmol/µl Primerpaargemisch	
-----		
cDNA Synthese	34 µl RNase freies Reinstwasser	
(Redy To Go™ RT-PCR Beads, Amersham Pharmacia)	1 µl Oligo pd (T) <sub>(12-18)</sub> (0,5 µg/µl) 5 µl RNA Probe (0,2 µg/µl)	
-----		
Die Ansätze wurden gemischt und die cDNA in 25 min bei 42°C synthetisiert. Anschließend wurde cDNA bei 95°C für 4,5 min denaturiert.		
-----		
PCR - Reaktion (Pharmacia)	40 µl denaturiertes Reaktionsgemisch (cDNA Synthese)	
(Redy To Go™ RT-PCR Beads, Amersham Pharmacia)	5 µl TPO-Primerpaargemisch 5 µl GAPDH-Primerpaargemisch	
-----		
Die Ansätze wurden gemischt und 42 Zyklen (95°C, 30 sec. Denaturieren; 60°C, 30 sec. Primer-Anlagerung; 72°C, 45 sec. Primer-Amplifikation) durchgeführt.		
-----		
Abkürzungen: GAPDH, Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; TPO, Schilddrüsenperoxidase; EMBL ID, Identitätsnummer der mRNA-Sequenz beim Europäischen molekularbiologischen Labor.		



### 2.3.6.4.2 Natrium/Jodid-Symporter

Die Reaktionsparameter sind in *Tabelle 19* gegeben.

**Tabelle 19:** Parameter der RT-PCR für Natrium/Jodid-Symporter

mRNA- und Primerpaarsequenzen	Na <sup>+</sup> /J-SYM (EMBL ID: RN60282)
	Primer 1 5' GCG CTG CGA CTC TCC CAC TGA C 3'
	Primer 2 5' GGC GGT AGA AGA TCG GCA AGA AGA 3'
	GAPDH (EMBL ID: RNGADPHR)
	Primer 1 5' GCA TGG CCT TCC GTG TTC C 3'
	Primer 2 5' GGG TGG TCC AGG GTT TCT TAC TC 3'
Primerkonzentration	Na <sup>+</sup> /J-SYM -10,0 pmol/μl Primerpaargemisch
	GAPDH - 0,4 pmol/μl Primerpaargemisch
cDNA Synthese	34 μl RNase freies Reinstwasser
(Redy To Go <sup>TM</sup> RT-PCR Beads, 1 μl Oligo pd (T) <sub>(12-18)</sub> (0,5 μg/μl) Amersham Pharmacia)	5 μl RNA Probe (0,4 μg/μl)
Die Ansätze wurden gemischt und die cDNA in 25 min bei 42°C synthetisiert. Anschließend wurde cDNA bei 95°C für 4,5 min denaturiert.	
PCR - Reaktion	2,5 μl Na <sup>+</sup> /J-SYM -Primerpaargemisch
	2,5 μl GAPDH-Primerpaargemisch
PCR-Master-Mix (Qiagen)	11,85 μl Wasser
	2,00 μl 10x Puffer
	2,80 μl MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
	1,60 μl dNTP's (jeweils 10 mM <sup>*</sup> )
	0,25 μl Taq-Polymerase
	5,00 μl Primerpaar
	1,50 μl cDNA
Die Ansätze wurden gemischt und 42 Zyklen (95°C, 30 sec. Denaturieren; 60°C, 30 sec. Primer-Anlagerung; 72°C, 45 sec. Primer-Amplifikation) durchgeführt.	

Abkürzungen: Na<sup>+</sup>/J-SYM, Natrium/Jodid-Symporter; GAPDH, Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; dNTP's, Deoxynucleosid-Triphosphate. \* 10mM dATP, 2'-Deoxyadenosin-5'-Triphosphat, 10 mM dCTP, 2'-Deoxycytidin-5'-Triphosphat, 10 mM dGTP, 2'-Deoxyguanosin-5'-Triphosphat, 10 mM dTTP, 2'-Deoxythymidin-5'-Triphosphat; EMBL ID, Identitätsnummer der mRNA-Sequenz beim Europäischen-molekularbiologischen Labor.

### 2.3.6.4.3 Glutathionperoxidase der Schilddrüse

Die Reaktionsparameter für die RT-PCR der Glutathionperoxidase in der Schilddrüse sind in *Tabelle 20* gegeben.

**Tabelle 20:** Parameter der RT-PCR für Glutathionperoxidase in der Schilddrüse

mRNA- und Primerpaarsequenzen	GSH-Px (EMBL ID: S41066) Primer 1      5' CAC CAC GAC CCG GGA CTA CAC C 3' Primer 2      5' CAC CAA GCC CAG ATA CCA GGA ATG 3'  GAPDH (EMBL ID: RRGADPHR) Primer 1      5' GCA TGG CCT TCC GTG TTC C 3' Primer 2      5' GGG TGG TCC AGG GTT TCT TAC TC 3'
Primerkonzentration	GSH-Px - 0,20 pmol/µl Primerpaargemisch  GAPDH - 1,00 pmol/µl Primerpaargemisch
cDNA Synthese (Redy To Go™ RT-PCR Beads, Amersham Pharmacia)	34 µl RNase freies Reinstwasser 1 µl Oligo pd (T) <sub>(12-18)</sub> (0,5 µg/µl) 5 µl RNA Probe (0,4 µg/µl)
Die Ansätze wurden gemischt und die cDNA in 25 min bei 42°C synthetisiert. Anschließend wurde cDNA bei 95°C für 4,5 min denaturiert.	
PCR - Reaktion	2,5 µl GSH-Px Primerpaargemisch 2,5 µl GAPDH Primerpaargemisch
PCR-Master-Mix (Qiagen)	11,85 µl Wasser 2,00 µl 10x Puffer 2,80 µl MgCl <sub>2</sub> (25 mM) 1,60 µl dNTP's (jeweils 10 mM*) 0,25 µl Taq-Polimerase 5,00 µl Primerpaar 1,50 µl cDNA
Die Ansätze wurden gemischt und 42 Zyklen (95°C, 30 sec. Denaturieren; 60°C, 30 sec. Primer-Anlagerung; 72°C, 45 sec. Primer-Amplifikation) durchgeführt.	

Abkürzungen: GSH-Px, Glutathionperoxidase; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; dNTP's, Deoxynucleosid-Triphosphate. \* 10mM dATP, 2'-Deoxyadenosin-5'-Triphosphat, 10 mM dCTP, 2'-Deoxycytidin-5'-Triphosphat, 10 mM dGTP, 2'-Deoxyguanosin-5'-Triphosphat, 10 mM dTTP, 2'-Deoxythymidin-5'-Triphosphat; EMBL ID, Identitätsnummer der mRNA-Sequenz beim Europäischen-molekularbiologischen Labor.

### 2.3.7 Parameter des antioxidativen Schutzsystems

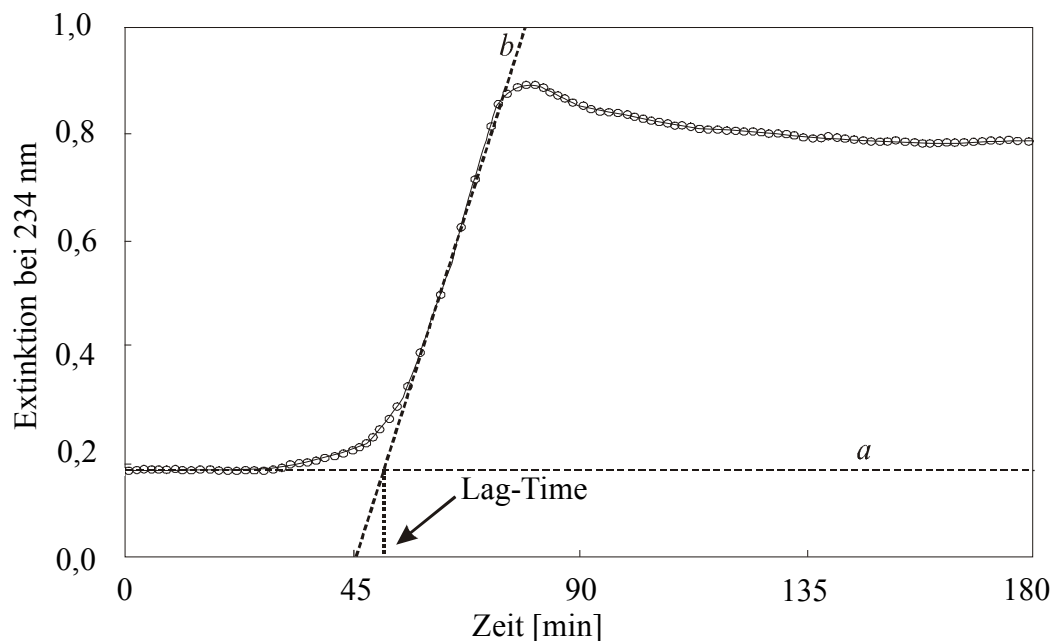
Als Parameter des antioxidativen Schutzsystems wurde die Konzentration an  $\alpha$ -Tocopherol in Plasma und Leber bestimmt. Als Parameter der Oxidationsempfindlichkeit der LDL wurde die Lag-Time bestimmt. Zusätzlich wurde die Aktivität der selenhaltigen GSH-Px im Leberzytosol, sowie die Aktivität der Superoxiddismutase (SOD) in Erythrozyten bestimmt.

#### 2.3.7.1 Bestimmung der $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in Plasma und Leber

Ausgegangen von 0,05 g Leber und 200  $\mu$ l Plasma wurde die Konzentration des enthaltenen  $\alpha$ -Tocopherols nach der Methode von Balz et al. (1993) und Coors (1991) bestimmt (siehe Kapitel 2.3.2).

#### 2.3.7.2 Oxidationsempfindlichkeit von Lipoproteinen geringer Dichte

Die Oxidationsempfindlichkeit der LDL wurde als Lag-Time in Anlehnung an die Methode von Esterbauer et al. (1989) ermittelt. Die Lag-Time wird als Intervall (min) zwischen dem Startpunkt der Messung und dem Schnittpunkt der Geraden (*a*) der Ausgangsabsorption und der Tangente (*b*) an dem Bereich des linearen Anstiegs der Absorptionskurve definiert (Kleinveld, et al., 1992) (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Ermittlung der Lag-Time nach Kleinveld et al. (1992)



Die Bestimmung der Aktivität der Glutathionperoxidase erfolgte nach der Gleichung:

$$\text{Aktivität (U/mg)} = \frac{V \cdot 1000 \cdot \Delta E}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot t \cdot p} \text{ [nmol NADPH/H}^+ \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Protein} \cdot \text{min}^{-1} \text{ bei } 25^\circ\text{C}]$$

Es gilt:

- P: Proteinkonzentration der Probe in mg/ml    V: Testvolumen [ml]  
 ε: Extinktionskoeffizient für NADPH/H<sup>+</sup>    v: Probenvolumen [ml]  
       6,22 · 10<sup>-3</sup> [ml · nmol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>]        d: Schichtdicke [cm]  
 ΔE: Extinktionsveränderung pro min

#### 2.3.7.4 Bestimmung der Aktivität der Superoxiddismutase in den Erythrozyten

Die Messung der Aktivität der SOD (EC 1.15.1.1) beruht auf der Hemmung der Autooxidation von Pyrogallol, entsprechend der Methode von Marklund und Marklund (1974). Eine Einheit (U) entspricht der Menge an Enzym, die eine 50%ige Hemmung der Pyrogallol-Autooxidation erreicht.

Durch Einfrieren und Auftauen hämolysierte Erythrozyten wurden bei 14.000 g für 4 min zentrifugiert und der Überstand mit Tris-Succinat-Puffer (0,05 M, pH 8,4) 1:40 verdünnt (Probe). Im Ansatz wurden 700 µl Tris-Succinat-Puffer mit 25 µl Probe bei 25°C für 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 25 µl Pyrogallol-Lösung (8 mM in 10 mM HCl) gestartet und die Extinktionsänderung 3 min bei 420 nm gemessen. Parallel zu jeder Probe wurde ein Blindwert angesetzt, wobei an Stelle von 25 µl Probe Reinstwasser zugesetzt wurde. Der Proteingehalt der verdünnten Proben wurde nach Lowry bestimmt. Die SOD Aktivität wurde in U/mg Protein angegeben.

Die Bestimmung der Aktivität der Superoxiddismutase erfolgte nach der Gleichung:

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

Es gilt:

V: Testvolumen [ml]

E: Extinktion

v: Probenvolumen [ml]

p: Proteinkonzentration der Probe [mg/ml]

### 2.3.8 Charakterisierung des Lipidstoffwechsels

Die Charakterisierung des Lipidstoffwechsels erfolgte durch die Bestimmung der Konzentration von Triglyceriden und Cholesterin in Plasma und Leber sowie durch die Bestimmung der Aktivitäten der lipogenen Enzymen Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) und Fettsäuresynthase (FsS) in Leberzytosol. Zusätzlich wurde die relative mRNA-Konzentration dieser Enzyme untersucht.

#### 2.3.8.1 Extraktion der Gesamtlipide aus der Leber

Aus den Leberproben wurden die Gesamtlipide mittels Hexan-Isopropanol (3:2, v/v) (Hara und Radin, 1978; Eder und Kirchgeßner, 1994) über einen Zeitraum von 18 Stunden in einem Schüttelinkubator G25 (Fa. New Brunswick Scientific inc. Edison, USA) bei Raumtemperatur extrahiert. Anschließend wurden 50-200 µl Extraktes mittels Zentrifugalverdampfers (Fa. Jouan, Unterhaching, Deutschland) bis zur Trocken eingengt.

##### 2.3.8.1.1 Bestimmung der Konzentration von Triglyceriden in Plasma und Leber

Die Bestimmung der Konzentration der Triglyceride in Plasma, Lipoproteinfraktionen VLDL, LDL und HDL sowie in der Leber erfolgte mittels enzymatischen Kits (Merck, Darmstadt, Deutschland). 20-100 µl extrahierter und abgedampfter Proben wurden zunächst mit 20 µl Triton X-100/Chloroform (1:2, v/v) emulgiert und das Lösungsmittel mittels Zentrifugalverdampfers (Fa. Jouan, Unterhaching, Deutschland) anschließend eingengt.

Die Berechnung erfolgte mittels Standard nach der Gleichung:

$$\text{Konzentration} = E_{\text{Probe}} \cdot \frac{\text{Konzentration Standard}}{E_{\text{Standard}}} \quad [\text{mmol/l}]$$

### 2.3.8.1.2 Bestimmung der Konzentration von Cholesterin in Plasma und Leber

Die Bestimmung der Konzentration des Cholesterins in Plasma, Lipoproteinfraktionen VLDL, LDL und HDL sowie in der Leber erfolgte mittels enzymatischen Kits (Merck, Darmstadt, Deutschland). 20-60 µl extrahierter und abgedampfter Proben wurden zunächst mit 20 µl Triton X-100/Chloroform (1:2, v/v) emulgiert und das Lösungsmittel mittels Zentrifugalverdampfers (Fa. Jouan, Unterhaching, Deutschland) eingengt. Die Berechnung erfolgte mittels Standard nach der Gleichung:

$$\text{Konzentration} = E_{\text{Probe}} \cdot \frac{\text{Konzentration Standard}}{E_{\text{Standard}}} \quad [\text{mmol/l}]$$

### 2.3.8.2 Bestimmung der Aktivitäten der lipogenen Enzyme in der Leber

Zur Beurteilung der Lipidsynthese wurden die Aktivitäten der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) und Fettsäuresynthetase (FsS) im Leberzytosol bestimmt.

#### 2.3.8.2.1 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Zur Messung der Aktivität der G6PDH (EC 1.1.1.49) wurde die Methode von Deutsch (1995) angewandt. Die G6PDH katalysiert die Reaktion von Glucose-6-Phosphat (G6P) und NADP<sup>+</sup>, zu 6-Phosphoglucolacton und NADPH/H<sup>+</sup>. Die Bildung von NADPH/H<sup>+</sup> durch die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase wurde durch Zusatz von Maleinimid zur Testlösung gehemmt. Die gebildete Menge an NADPH/H<sup>+</sup> ist so der Aktivität der G6PDH proportional. Im Ansatz wurden 50 µl Probe mit 1 ml Testmedium (50 mM Tris (pH 7,5); 50 mM NADP<sup>+</sup>; 6,3 mM MgCl<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O; 3,3 mM G6P; 5,0 mM Maleinimid) versetzt und die

Extinktionzunahme bei 339 nm, 25°C über 2 min gemessen. Um die von der G6PDH unabhängige Bildung von NADPH/H<sup>+</sup> zu korrigieren wurde ein Blindwert ohne Probe bestimmt. Die Proteinkonzentration der Leberzytosolproben (1:10 mit PBS verdünnt) wurde nach Lowry (1951) bestimmt.

Die eingesetzten Leberzytosol-Proben wurden 1:10 mit 0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,4) verdünnt und bei 25°C inkubiert. Alle Testmedien wurden vor der Bestimmung auf eine Temperatur von 25°C erwärmt. Die Messung wurde an einem Spektrometer (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 339 nm durchgeführt.

Die Berechnung der Aktivität der G6PDH und FsS erfolgte nach der Gleichung:

$$\text{Aktivität (U/mg)} = \frac{V \cdot 1000 \cdot \Delta E}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot t \cdot p} \quad [\text{nmol NADPH/H}^+ \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Protein} \cdot \text{min}^{-1} \text{ bei } 25^\circ\text{C}]$$

Es gilt:

- |     |  |    |                    |
|-----|--|----|--------------------|
| P:  | Proteinkonzentration der Probe in mg/ml  | V: | Testvolumen [ml]   |
| ε:  | Extinktionskoeffizient für NADPH/H <sup>+</sup><br>6,22 · 10 <sup>-3</sup> [ml · nmol <sup>-1</sup> · cm <sup>-1</sup> ] | v: | Probenvolumen [ml] |
|     |  | d: | Schichtdicke [cm]  |
| ΔE: | Extinktionsveränderung pro min   |    |                    |

### 2.3.8.2.2 Fettsäuresynthetase

Die Messung der Aktivität der FsS (EC 2.3.1.85) wurde nach der Methode von Nepokroeff et al. (1974) durchgeführt.

Die FsS katalysiert ausgehend von Acetyl-CoA dessen Kettenverlängerung. Dabei werden bei jedem Reaktionszyklus jeweils ein Molekül Malonyl-CoA und NADPH/H<sup>+</sup> umgesetzt und CO<sub>2</sub> freigesetzt. Dabei entstehen eine *n*-Carbonsäure und NADP<sup>+</sup> als Oxidationsprodukt. Die entstehende Menge an NADP<sup>+</sup> ist der Aktivität der FsS proportional.

Im Ansatz wurden 700 µl Testmedium-1 (700 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,0), 0,14 mM NADPH/H<sup>+</sup>, 1,4 mM EDTA, 1,4 mM DTT), 100 µl Testmedium-2 (0,33 mM Acetyl-CoA) und 100 µl Testmedium-3 (1,0 mM Malonyl-CoA) in eine Küvette pipettiert und gemischt. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 100 µl Probe, die mit 0,5 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,0) mit 5,0 mM Dithiothreitol (DTT) 1:5 verdünnt und 30 min bei 37°C vorinkubiert



wurde, gestartet. Alle Testmedien wurden vor der Bestimmung auf eine Temperatur von 25°C erwärmt und anschließend die Extinktionzunahme bei 339 nm und 25°C für 1 min an einem Spektrometer (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) gemessen.

Der Blindwert diente zur Korrektur der Probenwerte, dabei wurde die unspezifische Bildung von NADPH/H<sup>+</sup> ohne Zusatz von Malonyl-CoA bestimmt und von Probenwert subtrahiert. Die Berechnung der Aktivität der FsS erfolgte nach der Gleichung, die im *Kapitel 2.3.8.2.1* beschrieben wurde.

### **2.3.8.3 Bestimmung der relativen mRNA-Konzentration der lipogenen Enzyme in der Leber**

Die Gesamt-RNA wurde nach der Guanidinium Thiocyanat Methode von Chirgwin et al. (1979) modifiziert nach Chomaczynski und Sacchi (1987) mit RNazol B Reagenz (WAK Chemie Medical, Bad Soden, Deutschland), isoliert. Die G6PDH-, FsS- und GAPDH-Primer wurden in Anlehnung an die Methode von Köhler (1995) ermittelt und die Kinetikstudien durchgeführt (*siehe Kapitel 2.3.6.4*).

### 2.3.8.3.1 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Die relative mRNA-Konzentration der G6PDH wurde mit RT-PCR bestimmt. Die Reaktionsparameter sind in *Tabelle 21* gegeben.

**Tabelle 21:** Parameter der RT-PCR für Glucose-6-Phosphatdehydrogenase

mRNA- und Primerpaarsequenzen	G6PDH (EMBL ID: RNGD)
	Primer 1      5' CCA GCC TCC ACA AGC ACC TCA AC 3'
	Primer 2      5' AAT TAG CCC CCA CGA CCC TCA GTA 3'
	GAPDH (EBMI ID: RNGADPHR)
	Primer 1      5' GCA TGG CCT TCC GTG TTC C 3'
	Primer 2      5' GGG TGG TCC AGG GTT TCT TAC TC 3'
Primerkonzentration	G6PDH - 2,0 pmol/μl Primerpaargemisch
	GAPDH - 0,5 pmol/μl Primerpaargemisch
cDNA Synthese	34 μl RNase freies Reinstwasser
(Redy To Go <sup>TM</sup> RT-PCR Beads, 1 μl Oligo pd (T) <sub>(12-18)</sub> (0,5 μg/μl)	
Amersham Pharmacia)	5 μl RNA Probe (0,2 μg/μl)
Die Ansätze wurden gemischt und die cDNA in 25 min bei 42°C synthetisiert. Anschließend wurde cDNA bei 95°C für 4,5 min denaturiert.	
PCR - Reaktion	40 μl denaturiertes Reaktionsgemisch (cDNA Synthese)
(Redy To Go <sup>TM</sup> RT-PCR Beads, 5 μl G6PDH Primerpaargemisch	
Amersham Pharmacia)	5 μl GAPDH Primerpaargemisch
Die Ansätze wurden gemischt und 35 Zyklen	
(95°C, 30 sec. Denaturieren; 55°C, 30 sec. Primer-Anlagerung; 72°C, 45 sec. Primer-Amplifikation) durchgeführt.	
Abkürzungen:	G6PDH, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase; GAPDH, Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; EMBL ID, Identitätsnummer der mRNA-Sequenz beim Europäischen molekularbiologischen Labor.

### 2.3.8.3.2 Fettsäuresynthetase

Die relative mRNA Konzentration der FsS wurde mit RT-PCR bestimmt. Die Reaktionsparameter sind in *Tabelle 22* gegeben.

**Tabelle 22:** Parameter der RT-PCR für Fettsäuresynthetase

mRNA- und Primerpaarsequenzen	FsS (EMBL ID: RNFASA)
	Primer 1      5' GGG CCT GGA GTC TAT CAT CAA CAT 3'
	Primer 2      5' GCG GGT ACA GGG CTA AGA CAA AA 3'
	GAPDH (EMBL ID: RNGADPHR)
	Primer 1      5' GCA TGG CCT TCC GTG TTC C 3'
	Primer 2      5' GGG TGG TCC AGG GTT TCT TAC TC 3'
Primerkonzentration	FsS -      1,0 pmol/μl Primerpaargemisch
	GAPDH - 0,4 pmol/μl Primerpaargemisch
cDNA Synthese	34 μl RNase freies Reinstwasser
(Redy To Go <sup>TM</sup> RT-PCR Beads, 1 μl Oligo pd (T) <sub>(12-18)</sub> (0,5 μg/μl)	
Amersham Pharmacia)	5 μl RNA Probe (0,2 μg/μl)
Die Ansätze wurden gemischt und die cDNA in 25 min bei 42°C synthetisiert. Anschließend wurde cDNA bei 95°C für 4,5 min denaturiert.	
PCR - Reaktion	40 μl denaturiertes Reaktionsgemisch (cDNA Synthese)
(Redy To Go <sup>TM</sup> RT-PCR Beads, 5 μl FsS Primerpaargemisch	
Amersham Pharmacia)	5 μl GAPDH Primerpaargemisch
Die Ansätze wurden gemischt und 35 Zyklen	
(95°C, 30 sec. Denaturieren; 55°C, 30 sec. Primer-Anlagerung; 72°C, 45 sec. Primer-Amplifikation) durchgeführt.	
Abkürzungen: FsS, Fettsäuresynthetase; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; EMBL ID, Identitätsnummer der mRNA-Sequenz beim Europäischen molekularbiologischen Labor.	

## 2.4 Scheinbare Verdaulichkeit des $\alpha$ -Tocopherols

Die scheinbare Verdaulichkeit des  $\alpha$ -Tocopherols ergibt das Verhältnis zwischen der verdauten  $\alpha$ -Tocopherol-Menge und der  $\alpha$ -Tocopherol-Menge ausgeschieden mit Kot, wobei die endogene  $\alpha$ -Tocopherol-Menge im Kot nicht berücksichtigt wird (Jeroch et al., 1999).

Berechnung der scheinbaren Verdaulichkeit des  $\alpha$ -Tocopherols:

$$\text{Scheinbare Verdaulichkeit} = \frac{\alpha\text{-Tocopherol}_{\text{Aufnahme}} - \alpha\text{-Tocopherol}_{\text{Ausscheidung mit Kot}}}{\alpha\text{-Tocopherol}_{\text{Aufnahme}}} \cdot 100; [\%]$$

## 2.5 Mathematische und statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm Minitab (Version 13, Minitab Inc. USA). Alle 3 Versuche wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse ausgewertet. Die Einflußfaktoren waren im ersten Versuch Fett und Selen, im zweiten Versuch Fett und Jod, im dritten Versuch Fett und Vitamin E-Konzentration sowie Interaktionen zwischen den jeweiligen Einflußfaktoren.

Die Mittelwerte der Gruppen wurden mit dem Fisher-Test verglichen. Signifikante Unterschiede der Mittelwerte sind durch unterschiedliche Hochbuchstaben gekennzeichnet. Als Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % zugrunde gelegt ( $p \leq 0,05$ ).

Die Ergebnistabellen enthalten Mittelwerte und die Standardabweichungen der Einzelwerte. Die Anzahl der Beobachtungen wird in den jeweiligen Tabellen angegeben.

Bei verwendeten Eichgeraden wurde die Gleichung mit Hilfe einer einfachen linearen Regression errechnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der Einfluß von oxidierten Fetten auf den Lipid- und Schilddrüsenhormonstoffwechsel bei unterschiedlicher Selenversorgung

##### 3.1.1 Leistungsparameter

Table 23 zeigt die Anfangs- und Endlebensmasse und die Futterverwertung der Tiere in den Gruppen. Die Gesamtfutteraufnahme pro Tier betrug in allen Gruppen 946 g.

**Table 23:** Anfangs- und Endlebensmasse, Lebendmassezunahme und Futterverwertung im ersten Versuch

Gruppe	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
Fett	<b>FF</b>	<b>FF</b>	<b>OF</b>	<b>OF</b>
Selen [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät]	<b>70</b>	<b>600</b>	<b>70</b>	<b>600</b>
Anfangslebensmasse [g]	$51 \pm 3^b$	$52 \pm 3^b$	$52 \pm 5^b$	$56 \pm 4^a$
Endlebensmasse [g]	$330 \pm 11,7$	$325 \pm 7,0$	$331 \pm 9,2$	$332 \pm 7,6$
Lebendmassezunahme [g]	$280 \pm 12$	$274 \pm 8$	$279 \pm 7$	$276 \pm 9$
Futterverwertung [g Zuwachs/g Futter]	$0,30 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,01$

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n=10 pro Gruppe.

<sup>a, b</sup> Unterschiedliche Hochbuchstaben bedeuten statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Behandlungsgruppen getestet mit Fisher's multiple Test.

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett.

Während des Versuches ergaben sich keine statistisch gesicherten Unterschiede in den Parametern Endlebensmasse, Lebendmassezunahme und Futterverwertung der verschiedenen Versuchsgruppen.

### 3.1.2 Parameter des antioxidativen Schutzsystems

#### 3.1.2.1 Parameter des Selenstatus der Versuchstiere

Die Selenkonzentrationen in Leber und Plasma und die Aktivität der GSH-Px im Plasma sind in *Tabelle 24* gezeigt.

**Tabelle 24:** Parameter des Selenstatus der Versuchstiere

Gruppe	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
Fett	<b>FF</b>	<b>FF</b>	<b>OF</b>	<b>OF</b>
Selen [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät]	<b>70</b>	<b>600</b>	<b>70</b>	<b>600</b>
<i>Selenkonzentration</i>				
Plasma <sup>1,2,3</sup>	502 $\pm$ 42 <sup>b</sup>	619 $\pm$ 68 <sup>a</sup>	370 $\pm$ 37 <sup>c</sup>	550 $\pm$ 97 <sup>b</sup>
[ $\mu\text{g}/\text{l}$ ]				
Leber <sup>1,2,3</sup>	2,06 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	3,34 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>	1,40 $\pm$ 0,27 <sup>c</sup>	3,37 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>
[ $\mu\text{g}/\text{g}$ ]				
<i>Aktivität</i>				
GSH-Px <sup>1,2</sup>	2914 $\pm$ 685 <sup>bc</sup>	4775 $\pm$ 1624 <sup>a</sup>	2349 $\pm$ 735 <sup>c</sup>	3606 $\pm$ 1163 <sup>b</sup>
[U/mg Protein]				

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n=10 pro Gruppe.

<sup>a, b, c, bc</sup> Unterschiedliche Hochbuchstaben bedeuten statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Behandlungsgruppen getestet mit Fisher's multiplem Test.

Signifikanz der Faktoren ( $p < 0,05$ ): <sup>1</sup> Diätfett, <sup>2</sup> Selenkonzentration, <sup>3</sup> Interaktion zwischen Diätfett und Selenkonzentration.

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett GSH-Px, Glutathionperoxidase; U, Einheit [ $\text{nmol NADPH}/\text{H}^+ \cdot \text{min}^{-1}$  bei 25°C].

Die Fütterung des oxidierten Fettes führte bei suboptimaler Selenversorgung zu einer deutlichen Verminderung der Selenkonzentration in Plasma (-31 %) und Leber (-26 %). Bei höher Selenversorgung führte das oxidierte Fett zu einer leichten Absenkung der Selenkonzentration in Plasma (-11 %). Die Selenkonzentration in der Leber wurde bei höher Selenversorgung durch das oxidierte Fett im Vergleich zu Kontrollfett nicht verändert. Die Fütterung des oxidierten Fettes führte sowohl bei suboptimaler als auch bei adäquater Selenversorgung zu einer deutlich verminderten Aktivität der GSH-Px (-19 % und -24 %) im Plasma. Die Selensupplementierung führte bei Fütterung des frischen Fettes zu einer deutlich höheren Aktivität der GSH-Px (+64 %). Bei Fütterung des oxidierten Fettes war der Anstieg durch die Selensupplementierung geringer (+54 %).

### 3.1.2.2 Scheinbare Verdaulichkeit des Tocopherols

Gesamtaufnahme, -ausscheidung, -retention und scheinbare Verdaulichkeit des  $\alpha$ -Tocopherols der Versuchdiäten bei unterschiedlicher Behandlung sind in *Tabelle 25* gegeben.

**Tabelle 25:** Gesamtaufnahme, -ausscheidung, -retention und scheinbare Verdaulichkeit des  $\alpha$ -Tocopherols (7. Versuchswoche)

Gruppe	I	II	III	IV
Fett	<b>FF</b>	<b>FF</b>	<b>OF</b>	<b>OF</b>
Selen [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät]	<b>70</b>	<b>600</b>	<b>70</b>	<b>600</b>
<b>Gesamt</b>				
Aufnahme	2684	2520	4520*	4714*
[mg $\alpha$ -TOC]				
<b>Gesamt</b>				
Ausscheidung	558 $\pm$ 79 <sup>b</sup>	459 $\pm$ 94 <sup>b</sup>	1116 $\pm$ 66 <sup>a</sup>	1154 $\pm$ 243 <sup>a</sup>
[mg $\alpha$ -TOC]				
Gesamt	2126 $\pm$ 71 <sup>b</sup>	2061 $\pm$ 91 <sup>b</sup>	3404 $\pm$ 65 <sup>a</sup>	3559 $\pm$ 243 <sup>a</sup>
Retention <sup>1,3</sup>				
[mg $\alpha$ -TOC]				
<b>Scheinbare</b>				
Verdaulichkeit <sup>1</sup>	79,2 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>	82,2 $\pm$ 3,6 <sup>a</sup>	75,3 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>	75,5 $\pm$ 5,2 <sup>b</sup>
[%]				

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n=10 pro Gruppe.

<sup>a, b, c</sup> Unterschiedliche Hochbuchstaben bedeuten statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Behandlungsgruppen getestet mit Fisher's multiplem Test.

Signifikanz der Faktoren ( $p < 0,05$ ): <sup>1</sup> Diätfett, <sup>3</sup> Interaktion zwischen Diätfett und Selenkonzentration.

\* 1 Milligramm  $\alpha$ -Tocopherol entspricht 1,49 Milligramm all-rac- $\alpha$ -Tocopherolacetat.

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett;  $\alpha$ -TOC,  $\alpha$ -Tocopherol.

Die Fütterung des oxidierten Fettes führte zu einer deutlich erhöhten Retention (+66 %) und Ausscheidung (+52 %) des  $\alpha$ -Tocopherols und zu einer signifikanten Senkung der scheinbaren Verdaulichkeit des  $\alpha$ -Tocopherols (-7 %). Die Retention des  $\alpha$ -Tocopherols wurde durch die Interaktion zwischen der Fettart und Selenkonzentration in der Diät beeinflusst.

### 3.1.2.3 $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in Plasma und Leber

Die Konzentrationen von  $\alpha$ -Tocopherol in Plasma und Leber der unterschiedlichen Behandlung sind in *Tabelle 26* dargestellt.

**Tabelle 26:** Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol in Plasma und Leber

Gruppe	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
Fett	<b>FF</b>	<b>FF</b>	<b>OF</b>	<b>OF</b>
Selen [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät]	<b>70</b>	<b>600</b>	<b>70</b>	<b>600</b>
<i>Plasma</i>				
[ $\mu\text{mol}/\text{l}$ ] <sup>1,2</sup>	13,0 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>	10,8 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	14,4 $\pm$ 3,3 <sup>a</sup>	13,6 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>
[ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Fett] <sup>1</sup>	8,01 $\pm$ 4,16 <sup>c</sup>	9,24 $\pm$ 8,92 <sup>c</sup>	22,0 $\pm$ 4,6 <sup>b</sup>	28,7 $\pm$ 7,4 <sup>a</sup>
<i>Leber</i>				
[nmol/g] <sup>1</sup>	38,3 $\pm$ 7,0 <sup>b</sup>	32,1 $\pm$ 1,8 <sup>c</sup>	42,5 $\pm$ 7,4 <sup>a</sup>	42,3 $\pm$ 5,4 <sup>a</sup>
[ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Fett] <sup>1</sup>	16,5 $\pm$ 3,0 <sup>ab</sup>	13,8 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	18,3 $\pm$ 3,2 <sup>a</sup>	18,2 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n=10 pro Gruppe.

<sup>a, b, c, ab</sup> Unterschiedliche Hochbuchstaben bedeuten statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Behandlungsgruppen getestet mit Fisher's multiplem Test.

Signifikanz der Faktoren ( $p < 0,05$ ): <sup>1</sup> Diätfett, <sup>2</sup> Selenkonzentration.

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett.

Die Fütterung des oxidierten Fettes führte zu einer erhöhten Vitamin E-Konzentration in Plasma (+18 %) und Leber (+20 %), sowie zu deutlich erhöhten Vitamin E-Konzentrationen in Plasma- (+194 %) und Leberlipiden (+20 %). Die Höhe der Selenversorgung hatte hingegen kein Einfluß auf die Konzentration des Tocopherols.



### 3.1.2.4 Aktivität der Superoxiddismutase in Erythrozyten

Die Aktivität der SOD in den Erythrozyten ist *Tabelle 27* gezeigt.

**Tabelle 27:** Aktivität der Superoxiddismutase in Erythrozyten

Gruppe	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
Fett	<b>FF</b>	<b>FF</b>	<b>OF</b>	<b>OF</b>
Selen [ $\mu\text{g/kg}$ Diät]	<b>70</b>	<b>600</b>	<b>70</b>	<b>600</b>
SOD [mU/mg Protein]	220 $\pm$ 100	170 $\pm$ 26	200 $\pm$ 43	174 $\pm$ 49

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n=10 pro Gruppe.

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett; SOD, Superoxiddismutase; mU, Einheit [ $\text{pmol NADPH/H}^+$  \*  $\text{min}^{-1}$  bei 25°C].

Weder die Fettart noch die Selenversorgung hatten den Einfluß auf die Aktivität der SOD in den Erythrozyten.

### 3.1.2.5 *In vitro*-Oxidation von Lipoproteinen geringer Dichte

Die Oxidationsempfindlichkeit der LDL wurde *in vitro* durch kupferinduzierte Oxidation bestimmt. Die Lag-Time der LDL ist in *Tabelle 28* dargestellt.

**Tabelle 28:** Lag-Time der *in vitro* oxidierten Lipoproteinen geringer Dichte

Gruppe	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
Fett	<b>FF</b>	<b>FF</b>	<b>OF</b>	<b>OF</b>
Selen [ $\mu\text{g/kg}$ Diät]	<b>70</b>	<b>600</b>	<b>70</b>	<b>600</b>
Lag-Time [min]	46,8 $\pm$ 13,9	50,8 $\pm$ 16,8	40,8 $\pm$ 10,6	54,4 $\pm$ 6,0

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n=10 pro Gruppe.

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett.

Hinsichtlich der Oxidationsempfindlichkeit der LDL wurden keine statistisch gesicherten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt; weder die Fettart noch die Selenzulage hatten einen signifikanten Einfluß auf die Lag-Time.

### 3.1.3 Parameter des Lipidstoffwechsels

#### 3.1.3.1 Triglyceridkonzentration in Plasma, Lipoproteinfraktionen und Leber

Die Konzentrationen der Triglyceride in Plasma, Lipoproteinfraktionen und in der Leber sind in *Tabelle 29* gezeigt.

Die Fütterung des oxidierten Fettes führte zu einer deutlichen Verminderung der Triglyceridkonzentration in Plasma (-69 %), VLDL (-81 %) und Leber (-19 %), während die Triglyceridkonzentrationen der LDL und HDL nicht beeinflusst wurden. Die Höhe der Selenversorgung hatte keinen Einfluß auf die Auswirkung des Fettes auf die Triglyceridkonzentration in Plasma, VLDL, LDL, HDL und Leber.

**Tabelle 29:** Triglyceridkonzentration in Plasma, Lipoproteinfraktionen und Leber

Gruppe	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
Fett	<b>FF</b>	<b>FF</b>	<b>OF</b>	<b>OF</b>
Selen [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät]	<b>70</b>	<b>600</b>	<b>70</b>	<b>600</b>
Plasma <sup>1</sup> [mmol/l]	2,01 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	1,79 $\pm$ 0,95 <sup>a</sup>	0,69 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	0,50 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>
VLDL <sup>1</sup> [mmol/l]	1,63 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup>	1,33 $\pm$ 0,84 <sup>a</sup>	0,32 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	0,24 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>
LDL [mmol/l]	0,22 $\pm$ 0,27	0,31 $\pm$ 0,18	0,25 $\pm$ 0,11	0,12 $\pm$ 0,05
HDL [mmol/l]	0,16 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,02
Leber <sup>1</sup> [mmol/g]	20,0 $\pm$ 5,7 <sup>a</sup>	17,0 $\pm$ 3,5 <sup>ab</sup>	15,9 $\pm$ 3,7 <sup>b</sup>	14,0 $\pm$ 4,8 <sup>b</sup>

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n=10 pro Gruppe.

<sup>a, b, ab</sup> Unterschiedliche Hochbuchstaben bedeuten statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Behandlungsgruppen getestet mit Fisher's multiplem Test.

Signifikanz der Faktoren ( $p < 0,05$ ): <sup>1</sup> Diätfett.

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett, VLDL, Lipoproteine sehr geringer Dichte; LDL, Lipoproteine geringer Dichte; HDL, Lipoproteine hoher Dichte.

### 3.1.3.2 Cholesterinkonzentration in Plasma, Lipoproteinfraktionen und Leber

Die Konzentrationen des Cholesterins im Plasma, Lipoproteinfraktionen und in der Leber sind in *Tabelle 30* gezeigt.

Die Fütterung des oxidierten Fettes führte zu einer deutlichen Senkung der Cholesterinkonzentration in VLDL (-86 %) und zu einem deutlichen Anstieg der Cholesterinkonzentration in LDL (+69 %). Hingegen hatte die Fütterung des oxidierten Fettes keinen Einfluß auf die Cholesterinkonzentration in Plasma, HDL und Leber. Die Höhe der Selenversorgung hatte keinen Einfluß auf Auswirkung des Fettes hinsichtlich der Cholesterinkonzentration in Plasma, VLDL, LDL, HDL und Leber.

**Tabelle 30:** Cholesterinkonzentration in Plasma, Lipoproteinfraktionen und Leber

Gruppe	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
Fett	<b>FF</b>	<b>FF</b>	<b>OF</b>	<b>OF</b>
Selen [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät]	<b>70</b>	<b>600</b>	<b>70</b>	<b>600</b>
Plasma [mmol/l]	1,45 $\pm$ 0,22	1,53 $\pm$ 0,24	1,48 $\pm$ 0,31	1,47 $\pm$ 0,25
VLDL <sup>1</sup> [mmol/l]	0,23 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	0,27 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
LDL <sup>1</sup> [mmol/l]	0,35 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	0,34 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup>	0,53 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	0,55 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>
HDL [mmol/l]	0,88 $\pm$ 0,14	0,92 $\pm$ 0,09	0,91 $\pm$ 0,16	0,91 $\pm$ 0,16
Leber [mmol/g]	8,33 $\pm$ 1,83	7,27 $\pm$ 1,39	7,18 $\pm$ 2,22	6,48 $\pm$ 2,11

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n=10 pro Gruppe.

<sup>a, b</sup> Unterschiedliche Hochbuchstaben bedeuten statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Behandlungsgruppen getestet mit Fisher's multiplem Test.

Signifikanz der Faktoren ( $p < 0,05$ ): <sup>1</sup> Diätfett.

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett; VLDL, Lipoproteine sehr geringer Dichte; LDL, Lipoproteine geringer Dichte; HDL, Lipoproteine hoher Dichte.

### 3.1.3.3 Aktivität und relative mRNA-Konzentration der lipogenen Enzyme in der Leber

Die Aktivitäten und die relative mRNA-Konzentrationen der G6PDH und FsS sind in *Tabelle 31* gezeigt.

**Tabelle 31:** Aktivität und relative mRNA-Konzentration der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und der Fettsäuresynthetase in der Leber

Gruppe	I	II	III	IV
Fett	FF	FF	OF	OF
Selen [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät]	70	600	70	600
<i>Aktivität</i>				
G6PDH <sup>1</sup> [U/mg Protein]	52,0 $\pm$ 20,9 <sup>a</sup>	54,1 $\pm$ 15,3 <sup>a</sup>	32,3 $\pm$ 11,9 <sup>b</sup>	39,1 $\pm$ 8,1 <sup>b</sup>
FsS <sup>1</sup> [U/mg Protein]	7,07 $\pm$ 2,83 <sup>a</sup>	7,70 $\pm$ 2,83 <sup>a</sup>	5,12 $\pm$ 2,44 <sup>b</sup>	3,77 $\pm$ 1,68 <sup>b</sup>
<i>Relative mRNA-Konzentration</i>				
G6PDH <sup>1</sup> [% von GAPDH]	73,3 $\pm$ 34,7 <sup>a</sup>	61,5 $\pm$ 22,6 <sup>a</sup>	27,9 $\pm$ 17,3 <sup>b</sup>	28,6 $\pm$ 22,1 <sup>b</sup>
FsS <sup>1</sup> [% von GAPDH]	121 $\pm$ 39 <sup>a</sup>	104 $\pm$ 65 <sup>a</sup>	59,2 $\pm$ 19,7 <sup>b</sup>	42,7 $\pm$ 34,8 <sup>b</sup>

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n=10 pro Gruppe.

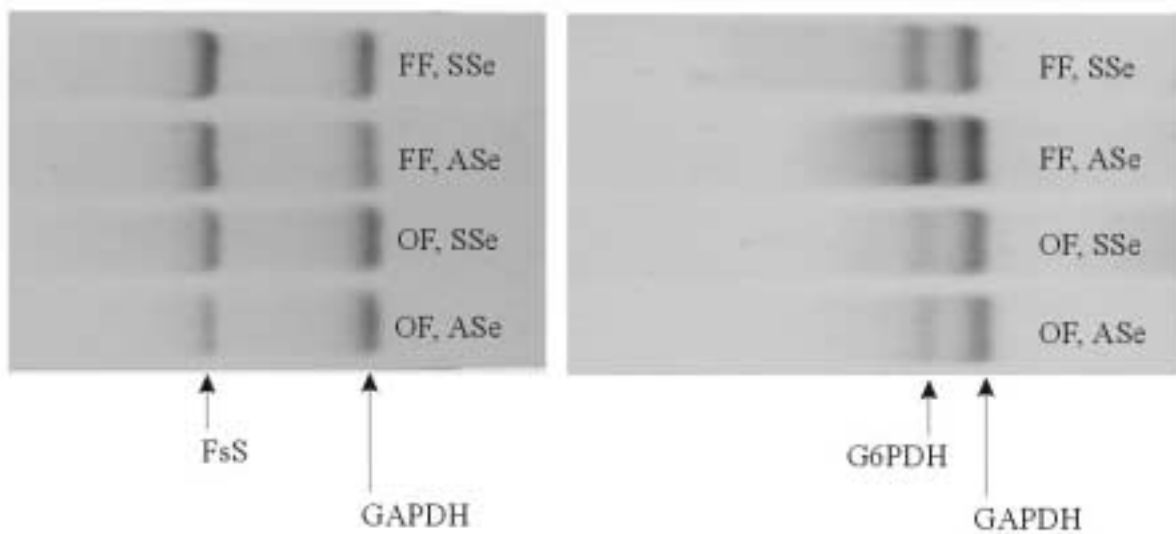
<sup>a, b</sup> Unterschiedliche Hochbuchstaben bedeuten statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Behandlungsgruppen getestet mit Fisher's multiplem Test.

Signifikanz der Faktoren ( $p < 0,05$ ): <sup>1</sup> Diätfett.

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett; G6PDH, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase; FsS, Fettsäuresynthetase; GAPDH, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; U, Einheit [nmol NADPH/H<sup>+</sup> \* min<sup>-1</sup> bei 25°C].

Die Fütterung des oxidierten Fettes führte zu einer deutlichen Senkung der Enzymaktivitäten von G6PDH (-33 %) und FsS (-40 %) in der Leber. Die Selenversorgung spielte hinsichtlich der Auswirkung von Fetten auf die Aktivitäten von G6PDH und FsS keine Rolle.

Die Fütterung des oxidierten Fettes führte zu einer deutlichen Senkung der relativen mRNA-Konzentration von G6PDH (-58 %) und FsS (-55 %) in der Leber wobei die Höhe der Selenversorgung keinen Einfluß auf die Auswirkung des Fettes hatte (*Abbildung 4*).



Abkürzungen: FsS, Fettsäurensynthetase; GAPDH, Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase; G6PDH, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase; FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett; SSe, suboptimale Selenversorgung; ASe, adäquate Selenversorgung.

**Abbildung 4:** Auftrennung von PCR Produkten mittels Agarosegel-Elektrophorese

### 3.1.4 Parameter des Schilddrüsenhormonstoffwechsels

Zur Beurteilung des Schilddrüsenhormonstoffwechsels wurden die Konzentration an TSH,  $T_4$ ,  $fT_4$  sowie an  $T_3$  im Plasma bestimmt.

#### 3.1.4.1 Konzentration von Thyrotropin, gesamtem und freiem Thyroxin- und Trijodthyronin in Plasma

Die Konzentrationen an TSH,  $T_4$ ,  $fT_4$  sowie an  $T_3$  im Plasma ist in *Tabelle 32* dargestellt.

**Tabelle 32:** Konzentrationen von Thyrotropin, gesamtem und freiem Thyroxin, sowie dem Trijodthyronin im Plasma

Gruppe	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
Fett	<b>FF</b>	<b>FF</b>	<b>OF</b>	<b>OF</b>
Selen [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät]	<b>70</b>	<b>600</b>	<b>70</b>	<b>600</b>
Thyrotropin [ng/ml]	4,56 $\pm$ 1,96	4,35 $\pm$ 2,37	3,82 $\pm$ 1,50	3,38 $\pm$ 1,38
Gesamt Thyroxin <sup>1</sup> [nmol/l]	88,4 $\pm$ 15,1 <sup>b</sup>	96,2 $\pm$ 19,8 <sup>b</sup>	129 $\pm$ 22 <sup>a</sup>	116 $\pm$ 21 <sup>a</sup>
Freies Thyroxin <sup>1</sup> [pmol/l]	42,7 $\pm$ 13,2 <sup>b</sup>	46,8 $\pm$ 17,6 <sup>b</sup>	70,4 $\pm$ 15,2 <sup>a</sup>	67,2 $\pm$ 13,0 <sup>a</sup>
Trijodthyronin [nmol/l]	1,45 $\pm$ 0,34	1,44 $\pm$ 0,39	1,50 $\pm$ 0,44	1,18 $\pm$ 0,11
T <sub>4</sub> /T <sub>3</sub> <sup>1</sup>	63,2 $\pm$ 12,5 <sup>b</sup>	72,1 $\pm$ 22,8 <sup>b</sup>	92,8 $\pm$ 28,4 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 24 <sup>a</sup>

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n=10 pro Gruppe.

<sup>a, b</sup> Unterschiedliche Hochbuchstaben bedeuten statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Behandlungsgruppen getestet mit Fisher's multiplem Test.

Signifikanz der Faktoren ( $p < 0,05$ ): <sup>1</sup> Diätfett.

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett; T<sub>4</sub>, gesamt Thyroxin; T<sub>3</sub>, Trijodthyronin.

Die Fütterung des oxidierten Fettes führte zu deutlich höheren Plasmakonzentrationen des T<sub>4</sub> (+33 %), des fT<sub>4</sub> (+54 %) und des Quotienten zwischen T<sub>4</sub> und T<sub>3</sub> (+42 %). Es bestand hingegen keinen Einfluß des oxidierten Fettes auf die Konzentrationen von T<sub>3</sub> und TSH. Die Höhe der Selenversorgung hatte keinen Einfluß auf die Auswirkung des Fettes.

### 3.2 Der Einfluß von oxidierten Fetten auf den Schilddrüsenhormon- und Lipidstoffwechsel bei unterschiedlicher Jodversorgung

#### 3.2.1 Leistungsparameter

Tabelle 33 zeigt die Anfangs- und Endlebensmasse der einzelnen Tiere, die Lebendmassezunahme und die Futtermittelverwertung. Futteraufnahme wurde bei allen Tieren bei 524 g gehalten.

**Tabelle 33:** Anfangs- und Endlebensmasse, Lebendmassezunahme und Futtermittelverwertung im zweiten Versuch

Gruppe	I	II	III	IV
Fett	FF	FF	OF	OF
Jod [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät]	50	400	50	400
Anfangslebensmasse [g]	51,5 $\pm$ 3,2	51,7 $\pm$ 4,1	52,8 $\pm$ 3,9	51,7 $\pm$ 3,2
Endlebensmasse [g]	275 $\pm$ 13	273 $\pm$ 11	267 $\pm$ 12	263 $\pm$ 8
Zunahme <sup>1</sup> [g]	224 $\pm$ 12 <sup>a</sup>	221 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	214 $\pm$ 12 <sup>b</sup>	211 $\pm$ 9 <sup>b</sup>
Futtermittelverwertung <sup>1</sup> [g Zuwachs/g Futter]	0,43 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,42 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	0,41 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,40 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n=12 pro Gruppe.

<sup>a, b</sup> Unterschiedliche Hochbuchstaben bedeuten statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Behandlungsgruppen getestet mit Fisher's multiplem Test.

Signifikanz der Faktoren ( $p < 0,05$ ): <sup>1</sup> Diätfett.

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett.

Die Fütterung des oxidierten Fettes führte zu einer leichten Senkung der Endlebensmasse (-3 %), der Zunahme (-4 %) und der Futtermittelverwertung (-5 %). Die Höhe der Jodversorgung hatte keinen Einfluß auf die Auswirkung des Fettes.

### 3.2.2 Parameter des antioxidativen Schutzsystems

#### 3.2.2.1 *In vitro*-Oxidation von Lipoproteinen geringer Dichte

Die Oxidationsempfindlichkeit der LDL wurde *in vitro* durch kupferinduzierte Oxidation untersucht. Die Lag-Time ist in *Tabelle 34* gezeigt.

Weder die Fettart noch die Höhe der Jodversorgung hatte einen Einfluß auf die Oxidationsempfindlichkeit der LDL.

**Tabelle 34:** Lag-Time der *in vitro* oxidierten Lipoproteinen geringer Dichte

Gruppe	I	II	III	IV
Fett	FF	FF	OF	OF
Jod [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät]	50	400	50	400
Lag-Time [min]	37,1 $\pm$ 6,15	42,5 $\pm$ 6,76	35,80 $\pm$ 4,57	36,0 $\pm$ 6,20

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n=12 pro Gruppe.  
Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett.

#### 3.2.2.2 $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in Plasma und Leber

Die Konzentrationen von  $\alpha$ -Tocopherol in Plasma und Leber der unterschiedlichen Behandlungsgruppen sind in *Tabelle 36* gezeigt.

Die Fütterung des oxidierten Fettes führte zu einer deutlichen Senkung der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in der Leber (-32 %). Die Höhe der Jodversorgung hatte keinen Einfluß auf die Auswirkung des Fettes. Auf die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in Plasma hatte weder die Art des Fettes noch die Höhe der Jodversorgung einen Einfluß.



**Tabelle 35:** Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol in Plasma und Leber

Gruppe	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
Fett	<b>FF</b>	<b>FF</b>	<b>OF</b>	<b>OF</b>
Jod [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	<b>50</b>	<b>400</b>	<b>50</b>	<b>400</b>
<i>Plasma</i> [ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Fett]	27,4 $\pm$ 7,7	27,5 $\pm$ 13,4	28,3 $\pm$ 6,9	27,0 $\pm$ 13,2
<i>Leber</i> [ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Fett] <sup>1</sup>	77,0 $\pm$ 27,1 <sup>a</sup>	65,5 $\pm$ 24,0 <sup>ab</sup>	46,4 $\pm$ 14,4 <sup>b</sup>	50,5 $\pm$ 15,7 <sup>b</sup>

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n=12 pro Gruppe.

<sup>a, b, ab</sup> Unterschiedliche Hochbuchstaben bedeuten statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Behandlungsgruppen getestet mit Fisher's multiplem Test.

Signifikanz der Faktoren ( $p < 0,05$ ): <sup>1</sup> Diätfett.

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett.

### 3.2.3 Parameter des Schilddrüsenhormonstoffwechsels

Zur Beurteilung des Stoffwechsels der Schilddrüsenhormone wurden die Konzentration an Thyrotropin, gesamten und freien Thyroxin, sowie den Trijodthyronin im Plasma herangezogen.

#### 3.2.3.1 Konzentrationen von Thyrotropin, gesamtem und freiem Thyroxin und Trijodthyronin in Plasma

Die Konzentrationen an TSH,  $T_4$ ,  $fT_4$ , sowie den  $T_3$  in Plasma sind in *Tabelle 36* dargestellt. Bei der niedrigen Jodversorgung war die Konzentration des  $T_4$  niedriger als bei der adäquaten Jodversorgung. Die Konzentrationen der anderen Hormone war hingegen bei niedrigen und adäquaten Jodversorgung unverändert.

**Tabelle 36:** Konzentrationen an Thyrotropin, gesamtem und freiem Thyroxin, sowie dem Trijodthyronin in Plasma

Gruppe	I	II	III	IV
Fett	FF	FF	OF	OF
Jod [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät]	50	400	50	400
Thyrotropin [ng/ml]	2,56 $\pm$ 1,35	2,55 $\pm$ 1,00	2,46 $\pm$ 0,90	3,80 $\pm$ 1,73
Gesamt Thyroxin <sup>1</sup> [nmol/l]	76,6 $\pm$ 15,5 <sup>b</sup>	97,4 $\pm$ 11,3 <sup>b</sup>	98,4 $\pm$ 18,0 <sup>a</sup>	107 $\pm$ 20 <sup>a</sup>
Freies Thyroxin <sup>1</sup> [pmol/l]	42,0 $\pm$ 10,2 <sup>b</sup>	41,1 $\pm$ 9,3 <sup>b</sup>	52,2 $\pm$ 12,2 <sup>a</sup>	55,0 $\pm$ 11,0 <sup>a</sup>
Trijodthyronin [nmol/l]	1,25 $\pm$ 0,23	1,32 $\pm$ 0,17	1,36 $\pm$ 0,23	1,27 $\pm$ 0,29
T <sub>4</sub> /T <sub>3</sub> <sup>1</sup>	62,3 $\pm$ 13,8 <sup>b</sup>	68,0 $\pm$ 14,8 <sup>ab</sup>	74,0 $\pm$ 18,5 <sup>ab</sup>	86,4 $\pm$ 18,1 <sup>a</sup>

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n=12 pro Gruppe.

<sup>a, b, ab</sup> Unterschiedliche Hochbuchstaben bedeuten statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Behandlungsgruppen getestet mit Fisher's multiplum Test.

Signifikanz der Faktoren ( $p < 0,05$ ): <sup>1</sup> Diätfett.

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett; T<sub>3</sub>, Trijodthyronin; T<sub>4</sub>, Thyroxin.

Die Fütterung des oxidierten Fettes führte zu deutlich erhöhten Konzentrationen an T<sub>4</sub> (+18 %), fT<sub>4</sub> (+29 %) und dem Quotienten zwischen T<sub>4</sub> und T<sub>3</sub> (+23 %). Die TSH- und T<sub>3</sub>-Konzentrationen in Plasma wurden durch die Fütterung des oxidierten Fettes nicht beeinflusst. Die Effekte des oxidierten Fettes trafen bei hoher und niedriger Jodversorgung gleichermaßen auf.

### 3.2.3.2 Histologische Untersuchungen der Schilddrüse

Als zusätzliche Merkmale der Schilddrüsenfunktion wurden histologische Untersuchungen der Schilddrüse durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in *Tabelle 37* dargestellt und in der *Abbildung 5* graphisch veranschaulicht.

Die niedrige Jodversorgung führte unabhängig von der Fettart zu einer Verringerung der Follikeldurchmesser und einer Vergrößerung der Epithelhöhe. Das oxidierte Fett führte jedoch unabhängig von der Jodversorgung zu einer Verringerung der Follikeldurchmesser und einer Vergrößerung der Epithelhöhen.

Die Fütterung des oxidierten Fettes führte bei suboptimaler Jodversorgung zu einer deutlichen Verringerung der Follikeldurchmesser (-28 %), zu einer deutlichen Erhöhung der Epithelhöhe (+50 %) und dadurch zu einer deutlichen Verringerung des Quotienten zwischen dem Follikeldurchmesser und der Epithelhöhe (-53 %).

**Tabelle 37:** Follikeldurchmesser und Epithelhöhe der Schilddrüsenpräparate

Gruppe	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
Fett	<b>FF</b>	<b>FF</b>	<b>OF</b>	<b>OF</b>
Jod [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät]	<b>50</b>	<b>400</b>	<b>50</b>	<b>400</b>
Follikel- Durchmesser <sup>1,2</sup> [ $\mu\text{m}$ ]	59,5 $\pm$ 5,7 <sup>a</sup>	64,5 $\pm$ 16,0 <sup>a</sup>	42,9 $\pm$ 9,3 <sup>b</sup>	58,9 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>
Epithelhöhe <sup>1,2</sup> [ $\mu\text{m}$ ]	6,89 $\pm$ 1,36 <sup>b</sup>	4,73 $\pm$ 1,32 <sup>c</sup>	10,4 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	6,92 $\pm$ 2,23 <sup>b</sup>
Quotient <sup>1,2</sup> Durchmesser/ Höhe	8,97 $\pm$ 2,16 <sup>ab</sup>	15,1 $\pm$ 6,6 <sup>a</sup>	4,26 $\pm$ 1,08 <sup>b</sup>	10,0 $\pm$ 5,9 <sup>ab</sup>

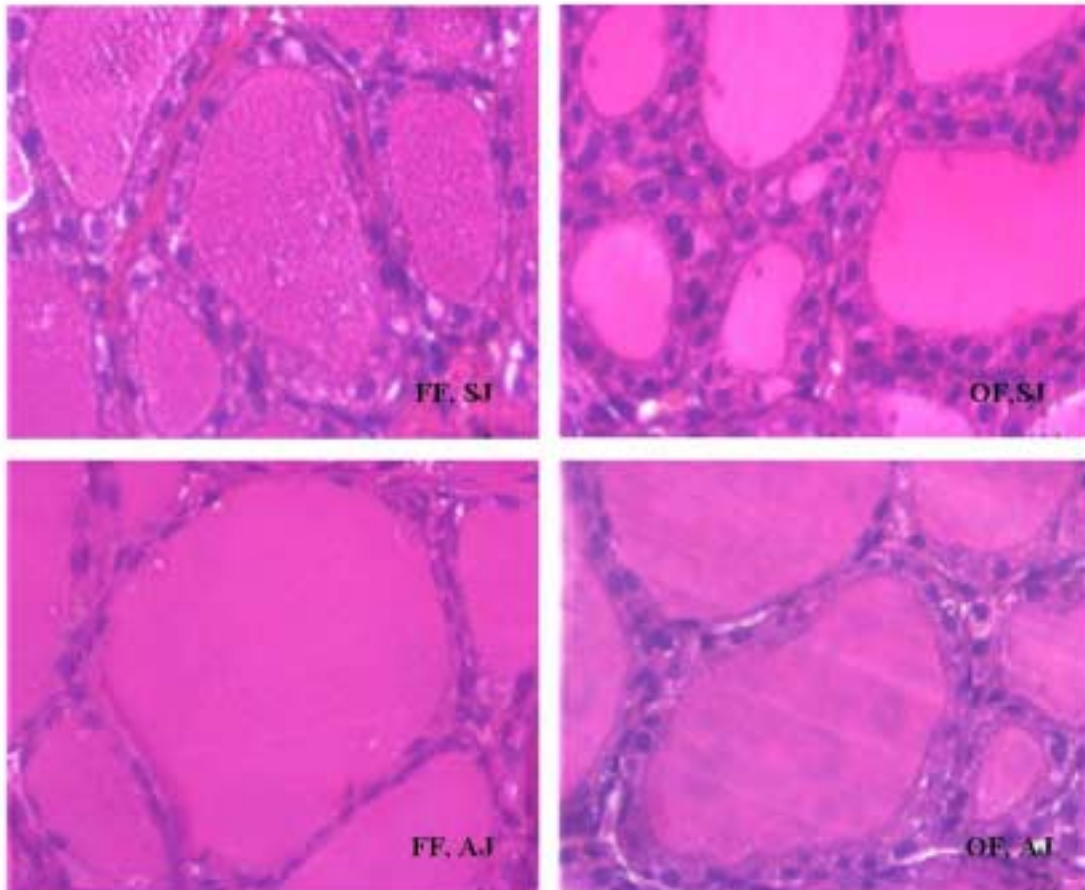
Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n=6 pro Gruppe.

<sup>a, b, c, ab</sup> Unterschiedliche Hochbuchstaben bedeuten statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Behandlungsgruppen getestet mit Fisher's multiplem Test.

Signifikanz der Faktoren ( $p < 0,05$ ): <sup>1</sup> Diätfett, <sup>2</sup> Jodzulage.

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett.

Die erhöhte Jodversorgung konnte dem Effekt des oxidierten Fettes entgegen wirken, so wurde eine geringere, jedoch noch immer deutliche Verringerung der Follikeldurchmesser (-9 %) und des Quotienten zwischen dem Follikeldurchmesser und der Epithelhöhe (-34 %) verzeichnet, wie auch eine deutliche Erhöhung der Epithelhöhe (+46 %).



Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett; SJ, Suboptimale Jodversorgung; AJ, adäquate Jodversorgung.

**Abbildung 5:** Schilddrüsenfollikel im Querschnitt

### 3.2.3.3 Expression wichtiger Enzyme des Schilddrüsenhormonstoffwechsels

Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung der mRNA der Schilddrüsenperoxidase, der Glutathionperoxidase und des Natrium/Jodid-Symporters sind in *Tabelle 38* gezeigt.

Die Fütterung des oxidierten Fettes führte zu einer deutlich erhöhten relativen mRNA-Konzentration der TPO (+61 %) und GSH-Px (+73 %) in der Schilddrüse. Die erhöhte Jodversorgung hatte bezüglich der relativen Expression dieser beiden Enzyme keinen Einfluß auf die Auswirkung des oxidierten Fettes. Hingegen führte die Fütterung des oxidierten Fettes zu einer verringerten relativen mRNA-Konzentration des  $\text{Na}^+/\text{J}^-$ -SYM bei niedriger Jodversorgung (-96 %) und bei erhöhter Jodversorgung (-91 %). Die niedrige Jodversorgung

fürte sowohl bei frischem (+1102 %) als auch bei oxidiertem Fett (+537 %) zu einer ebenfalls stark erhöhten relativen mRNA-Konzentration des Na<sup>+</sup>/J<sup>-</sup>-SYM.

**Tabelle 38:** Relative mRNA-Konzentration der Schilddrüsenperoxidase, des Natrium/Jodid-Symporters und der Schilddrüsen-glutathionperoxidase (Signalstärke von GAPDH beträgt 100 %)

Gruppe	I	II	III	IV
Fett	FF	FF	OF	OF
Jod [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät]	50	400	50	400
TPO <sup>1</sup> [% von GAPDH]	64,7 $\pm$ 11,2 <sup>a</sup>	70,8 $\pm$ 20,8 <sup>a</sup>	108 $\pm$ 26 <sup>b</sup>	110 $\pm$ 25,4 <sup>a</sup>
GSH-Px <sup>1,3</sup> [% von GAPDH]	40,7 $\pm$ 26,7 <sup>b</sup>	59,5 $\pm$ 8,3 <sup>b</sup>	97,3 $\pm$ 24,0 <sup>a</sup>	79,6 $\pm$ 12,2 <sup>ab</sup>
Na <sup>+</sup> /J <sup>-</sup> -SYM <sup>1,2</sup> [% von GAPDH]	983 $\pm$ 674 <sup>a</sup>	89,2 $\pm$ 40,9 <sup>b</sup>	44,0 $\pm$ 48,9 <sup>b</sup>	8,20 $\pm$ 7,80 <sup>c</sup>

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n=6 pro Gruppe.

<sup>a, b, ab</sup> Unterschiedliche Hochbuchstaben bedeuten statistisch signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den Behandlungsgruppen getestet mit Fisher's multiplem Test.

Signifikanz der Faktoren (p<0,05): <sup>1</sup> Diätfett, <sup>2</sup> Jodzulage, <sup>3</sup> Interaktion zwischen Fettart und Jodzulage.

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett; TPO, Schilddrüsenperoxidase; GSH-Px, Glutathionperoxidase; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; Na<sup>+</sup>/J<sup>-</sup>-SYM, Natrium/Jodid-Symporter.

### 3.2.4 Parameter des Lipidstoffwechsels

#### 3.2.4.1 Triglycerid- und Cholesterinkonzentration in Plasma und Leber

Die Konzentrationen der Triglyceride und des Cholesterins in Plasma, Lipoproteinfraktionen und Leber sind in *Tabelle 39* und *40* gezeigt.

Die Fütterung des oxidierten Fettes führte zu einer deutlichen Senkung der Triglyceridkonzentration in Plasma (-17 %) und Leber (-28 %).

**Tabelle 39:** Triglyceridkonzentration in Plasma, Lipoproteinfraktionen und Leber

Gruppe	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
Fett	<b>FF</b>	<b>FF</b>	<b>OF</b>	<b>OF</b>
Jod [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät]	<b>50</b>	<b>400</b>	<b>50</b>	<b>400</b>
Plasma [mmol/l]	0,61 $\pm$ 0,15	0,74 $\pm$ 0,46	0,58 $\pm$ 0,18	0,54 $\pm$ 0,21
VLDL [mmol/l]	0,35 $\pm$ 0,22	0,46 $\pm$ 0,17	0,35 $\pm$ 0,27	0,28 $\pm$ 0,09
HDL [mmol/l]	0,12 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,04	0,09 $\pm$ 0,02
Leber <sup>1</sup> [mmol/g]	6,76 $\pm$ 2,38 <sup>a</sup>	5,63 $\pm$ 2,10 <sup>a</sup>	4,07 $\pm$ 1,26 <sup>b</sup>	4,83 $\pm$ 1,86 <sup>b</sup>

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n=12 pro Gruppe.

<sup>a, b</sup> Unterschiedliche Hochbuchstaben bedeuten statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Behandlungsgruppen getestet mit Fisher's multiplem Test.

Signifikanz der Faktoren ( $p < 0,05$ ): <sup>1</sup> Diätfett.

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett; VLDL, Lipoproteine sehr geringer Dichte; HDL, Lipoproteine hoher Dichte.

**Tabelle 40:** Cholesterinkonzentration in Plasma, Lipoproteinfraktionen und Leber

Gruppe	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
Fett	<b>FF</b>	<b>FF</b>	<b>OF</b>	<b>OF</b>
Jod [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät]	<b>50</b>	<b>400</b>	<b>50</b>	<b>400</b>
Plasma <sup>1</sup> [mmol/l]	1,62 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	1,71 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	1,56 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	1,40 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>
LDL [mmol/l]	0,67 $\pm$ 0,14	0,64 $\pm$ 0,05	0,70 $\pm$ 0,09	0,61 $\pm$ 0,07
HDL <sup>1</sup> [mmol/l]	0,96 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,97 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,84 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	0,80 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>
Leber [mmol/g]	6,96 $\pm$ 0,85	7,19 $\pm$ 0,74	6,69 $\pm$ 0,53	6,26 $\pm$ 1,10

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n=12 pro Gruppe.

<sup>a, b</sup> Unterschiedliche Hochbuchstaben bedeuten statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Behandlungsgruppen getestet mit Fisher's multiplem Test.

Signifikanz der Faktoren ( $p < 0,05$ ): <sup>1</sup> Diätfett.

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF, oxidiertes Fett; LDL, Lipoproteine geringer Dichte; HDL, Lipoproteine hoher Dichte.

Gleichzeitig führte die Fütterung des oxidierten Fettes zu einer deutlichen Senkung der Cholesterinkonzentration in Plasma (-11 %) und HDL (-15 %) und zu einer tendenziellen Senkung der Cholesterinkonzentration in Leber (-8 %). Die Höhe der Jodversorgung hatte keinen Einfluß auf die Auswirkung des Fettes.

### **3.3 Der Einfluß unterschiedlich thermisch behandelter Fette auf die Konzentrationen der Schilddrüsenhormone bei unterschiedlicher Vitamin E-Versorgungen**

#### **3.3.1 Leistungsparameter**

*Tabelle 41* zeigt die Anfangs- und Endlebensmasse der Tiere und die Futtermittelverwertung. Die gesamte Futtermittelaufnahme pro Tier betrug in allen Gruppen 901 g.

Die Fütterung des bei 50°C oxidierten Fettes führte zu einer geringeren Endlebensmasse der Tiere (-4 %); hingegen hatte die Fütterung des bei 105°C und 190°C oxidierten Fettes auf die Endlebensmasse der Tiere keinen Einfluß. Die erhöhte Vitamin E-Versorgung führte hingegen zu einer Erhöhung der Endlebensmasse bei Fütterung des bei 50°C oxidierten Fettes (+3 %), 105°C oxidiertem Fett (+3 %) und bei 190°C oxidiertem Fett (+6 %). Es konnte zudem eine Interaktion zwischen der Fettart und der Vitamin E-Versorgung festgestellt werden. Analog zu Endlebensmasse führte die Fütterung des bei 50°C oxidierten Fettes zu einer Senkung der Lebendmassezunahme (-5 %), die Fütterung des bei 105°C und 190°C oxidiertem Fett hatte hingegen auf die Lebendmassezunahme keinen Einfluß. Die erhöhte Vitamin E-Versorgung führte ebenso zu einer Erhöhung der Lebendmassezunahme bei Fütterung des bei 50°C oxidierten Fettes (+4 %), 105°C oxidiertem Fett (+3 %) und bei 190°C oxidiertem Fett (+7 %).

Die Fütterung der oxidierten Fette führte zu einer Senkung der Futtermittelverwertung (-5 %), hingegen führte die erhöhte Vitamin E-Versorgung zu erhöhter Futtermittelverwertung bei Fütterung des bei 50°C oxidierten Fettes (+3 %), 105°C oxidiertem Fett (+3 %) und 190°C oxidiertem Fett (+7 %).

### 3.3.2 Parameter des Schilddrüsenhormonstoffwechsels

#### 3.3.2.1 Konzentration von Thyrotropin, gesamtem und freiem Thyroxin und Trijodthyronin in Plasma

Zur Beurteilung des Schilddrüsenhormonstoffwechsels wurden die Konzentration an TSH,  $T_4$  und  $fT_4$ , sowie dem  $T_3$  im Plasma herangezogen. Die Ergebnisse des Versuches sind in der *Tabelle 42* zusammengefaßt.

Die Fütterung des bei 50°C oxidierten Fettes führte zu einem deutlichen Anstieg der Konzentration von  $T_4$  (+10 %) und  $fT_4$  (+15 %). Analog dazu führte die Fütterung des bei 105°C oxidierten Fettes ebenso zu einem deutlichen Anstieg der Konzentration von  $T_4$  (+16 %) und  $fT_4$  (+26 %) und des bei 190°C oxidierten Fettes zu einem Anstieg der Konzentration von  $T_4$  (+5 %), sowie  $fT_4$  (+12 %). Die Höhe der Vitamin E-Versorgung hatte hingegen keinen Einfluß auf die Konzentration von  $T_4$  und  $fT_4$ . Weder Diätfett noch Vitamin E-Versorgung hatten einen Einfluß auf die Konzentration von TSH und  $T_3$  und den Quotienten zwischen  $T_3$  und  $T_4$ .



**Tabelle 41:** Anfangs- und Endlebensmasse, Lebendmassezunahme und Futtermittelverwertung im dritten Versuch

Gruppe	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Fett	FF		OF # 1		OF # 2		OF # 3	
Vitamin-E- $\alpha$ -Tocopherol-Äquivalent [mg /kg Diät]	25	250	25	250	25	250	25	250
Anfangs- lebensmasse [g]	103 ± 9	102 ± 8	103 ± 8	103 ± 7	102 ± 8	103 ± 7	101 ± 7	103 ± 7
End- lebensmasse <sup>1,2,3</sup> [g]	388 ± 12 <sup>a</sup>	378 ± 18 <sup>ab</sup>	364 ± 12 <sup>c</sup>	374 ± 11 <sup>bc</sup>	376 ± 13 <sup>ab</sup>	385 ± 16 <sup>a</sup>	362 ± 16 <sup>c</sup>	382 ± 12 <sup>a</sup>
Lebensmasse- zunahme <sup>1,2</sup> [g]	285 ± 15 <sup>a</sup>	276 ± 23 <sup>a</sup>	261 ± 15 <sup>b</sup>	271 ± 16 <sup>ab</sup>	275 ± 15 <sup>ab</sup>	283 ± 12 <sup>a</sup>	261 ± 15 <sup>b</sup>	280 ± 12 <sup>a</sup>
Futter- verwertung <sup>1,2</sup> [g Zuwachs/g Futter]	0,32 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,30 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,30 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,31 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,31 ± 0,01 <sup>a</sup>

Mittelwerte ± Standardabweichung, n=10 pro Gruppe.

<sup>a, b, c, ab, bc</sup> Unterschiedliche Hochbuchstaben bedeuten statistisch signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den Behandlungsgruppen getestet mit Fisher's multiplem Test.

Signifikanz der Faktoren (p<0,05): <sup>1</sup> Diätfett, <sup>2</sup> Jodkonzentration, <sup>3</sup> Interaktion zwischen Diätfett und Jodkonzentration.

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF # 1, oxidiertes Fett bei 50°C erhitzt; OF # 2, oxidiertes Fett bei 105°C erhitzt; OF # 3, oxidiertes Fett bei 190°C erhitzt.

**Tabelle 42:** Konzentration von Thyrotropin, gesamtem und freiem Thyroxin, sowie den Trijodthyronin in Plasma

Gruppe	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Fett	FF		OF # 1		OF # 2		OF # 3	
Vitamin-E- a-Tocopherol-Äquivalent [mg /kg Diät]	25	250	25	250	25	250	25	250
Thyrotropin [ng/ml]	1,64 ± 0,77	1,48 ± 0,96	1,85 ± 0,76	2,11 ± 1,25	1,65 ± 1,05	1,47 ± 0,94	2,47 ± 1,72	0,91 ± 0,48
Gesamtes Thyroxin <sup>1</sup> [nmol/l]	93,0 ± 10,8 <sup>b</sup>	88,3 ± 11,9 <sup>b</sup>	99,5 ± 12,0 <sup>a</sup>	99,8 ± 11,2 <sup>a</sup>	104 ± 9,44 <sup>a</sup>	107 ± 9,21 <sup>a</sup>	93,2 ± 14,2 <sup>b</sup>	97,1 ± 15,8 <sup>a</sup>
Freies Thyroxin <sup>1</sup> [pmol/l]	57,7 ± 9,37 <sup>b</sup>	52,4 ± 9,92 <sup>b</sup>	60,5 ± 9,81 <sup>b</sup>	66,3 ± 13,4 <sup>a</sup>	67,5 ± 11,1 <sup>a</sup>	71,1 ± 10,9 <sup>a</sup>	60,2 ± 13,9 <sup>a</sup>	62,6 ± 11,8 <sup>a</sup>
Trijodthyronin [nmol/l]	1,31 ± 0,37	1,13 ± 0,29	1,37 ± 0,39	1,37 ± 0,41	1,53 ± 0,41	1,53 ± 0,56	1,42 ± 0,41	1,49 ± 0,58
T <sub>4</sub> /T <sub>3</sub> <sup>1</sup>	66,2 ± 17,3	81,9 ± 28,0	69,5 ± 15,7	85,1 ± 23,2	64,3 ± 17,8	75,3 ± 16,0	61,6 ± 16,6	75,9 ± 26,0

Mittelwerte ± Standardabweichung, n=10 pro Gruppe.

<sup>a, b</sup> Unterschiedliche Hochbuchstaben bedeuten statistisch signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den Behandlungsgruppen getestet mit Fisher's multiplum Test.

Signifikanz der Faktoren (p<0,05): <sup>1</sup> Diätfett.

Abkürzungen: FF, frisches Fett; OF # 1, oxidiertes Fett bei 50°C erhitzt; OF # 2, oxidiertes Fett bei 105°C erhitzt; OF # 3, oxidiertes Fett bei 190°C erhitzt; T<sub>3</sub>, Trijodthyronin; T<sub>4</sub>, Thyroxin.

## 4 Diskussion

### 4.1 Versuchsdesign

Nahrungsfette bestehen aus einer Mischung verschiedener gesättigter und ungesättigter Fettsäuren. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind labile Verbindungen, die unter dem Einfluß von Hitze und Sauerstoff oxidieren können. Die dabei entstehenden Lipidperoxidationsprodukte wie Peroxide, Aldehyde und Polymere können im Organismus eine Vielzahl von Reaktionen auslösen. Die Untersuchung derartiger Reaktionen ist jedoch mit mehreren methodischen Problemen verbunden. Werden Fütterungsversuche mit thermisch oxidierten Fetten durchgeführt, wird eine Zuordnung der Effekte auf die Wirkung von Lipidperoxidationsprodukten schwierig, da mehrere sekundären Effekte die Interpretation der Ergebnisse erschweren. Vor allem für die sekundären Lipidperoxidationsprodukte wurden toxische Effekte am Darmepithel (Blanc et al., 1992) und in der Leber (Hayam et al., 1995; Hochgraf et al., 1997) nachgewiesen, die die Entwicklung der Versuchstiere erheblich beeinträchtigen können. Außerdem führten veränderte sensorische Eigenschaften von oxidierten Fetten bei Versuchstieren häufig zu einem deutlich niedrigeren Verzehr solcher Diäten und somit zu einer verringerten Körpermasseentwicklung (Yoshida und Kajimoto, 1989; Blanc et al., 1992; Engberg und Borsting, 1993; Engberg et al., 1994; Hayam et al., 1995; Hochgraf et al., 1997).

Eine verringerte Futteraufnahme beeinflusst unter anderem auch die Aktivität der Deiodase Typ I (Katzeff et al., 1990), welche die Deiodierung von  $T_4$  zu  $T_3$  realisiert. Veränderte Konzentrationen an Schilddrüsenhormonen nach Fütterung oxidiertes Fette könnten somit auch durch geringere Futteraufnahme begründet werden. Deshalb wurde in allen drei Versuchen dieser Studie ein restriktives Fütterungsregime eingeführt, so daß alle Tiere eines Versuchs die gleichen Futtermengen aufnahmen. Im ersten und zweiten Versuch konnten zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede in der Körpermasseentwicklung beobachtet werden. Im dritten Versuch der vorliegenden Studie hatte die Fütterung oxidiertes Fette bei erhöhter  $\alpha$ -Tocopherolzulage ebenfalls keinen Einfluß auf die Gewichtsentwicklung der Tiere. Lediglich bei Fütterung von oxidierten Fetten und niedriger  $\alpha$ -Tocopherolzulage wurde ein niedriges Endgewicht der Tiere festgestellt als bei Fütterung von oxidierten Fetten und hoher  $\alpha$ -Tocopherolzulage. Dieses Resultat stimmt mit den Ergebnissen von Yoshida und Kajimoto (1989) überein, die einen Zusammenhang zwischen verringerter Körpermasseentwicklung bei Fütterung oxidiertes Fette und einer

knappen  $\alpha$ -Tocopherolverversorgung bzw. einem daraus resultierenden verschlechterten  $\alpha$ -Tocopherolstatus beschrieben.

Da vor allem junge Tiere empfindlich auf toxische Lipidperoxidationsprodukte reagieren, wurde der Diät im ersten Versuch, bei dem das mittlere Anfangsgewicht der Tiere 53 g betrug, nur 5 % Fett zugegeben. Im zweiten Versuch betrug das mittlere Anfangsgewicht der Tiere 52 g. Da das oxidierte Fett geringere Konzentration an Lipidperoxidationsprodukten enthielt, wurde der Diät trotz geringem mittleren Anfangsgewicht der Tiere 10 % Fett zugegeben. Im dritten Versuch war das mittlere Anfangsgewicht der Tiere im Vergleich zu erstem und zweitem Versuch erhöht und betrug 103 g. Der Diät wurde 10 % Fett zugegeben.

Außerdem wurde bei Fütterung oxidierter Fette wiederholt eine verringerte Futtermittelverwertung festgestellt. Mehrere Untersuchungen belegen eine verringerte Verdaulichkeit oxidierter Fette (Yoshida und Kajimoto, 1989; Blanc et al., 1992; Engberg und Börsting, 1993; Börsting et al., 1994; Liu und Huang, 1995; Hochgraf et al., 1997). Eine verringerte Fettverdaulichkeit würde ebenfalls zu einer verringerten Körpermasseentwicklung führen. Aus diesem Grunde wurde im ersten und im dritten Versuch die scheinbare Verdaulichkeit der Fette zu mehreren Zeitpunkten untersucht. Im ersten Versuch konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der scheinbaren Verdaulichkeit der oxidierten Fette und der scheinbaren Verdaulichkeit der entsprechenden frischen Fette festgestellt werden, beide lagen bei 99 %. Im Dritten Versuch wurde hingegen ein leichter Rückgang in der scheinbaren Verdaulichkeit beim Fett # 1 und Fett # 3 um 0,4 % und beim Fett # 2 um 0,3 % von 99,9 % auf 99,5 % bzw. 99,6 % im Vergleich zu frischem Fett festgestellt. Huang et al. (1988) stellten bei Ratte einen Rückgang der scheinbaren Verdaulichkeit des oxidierten Sojaöls im Vergleich zu dem frischen Sojaöl um 10 % von 96 % auf 86 %. Das Öl wurde jedoch bei 205°C 6 Stunden pro Tag in vier folgenden Tagen erhitzt und in einer Menge von 15 % der Diät zugegeben. Die Art dieses Oxidationsvorgangs könnte stärker als in vorliegender Studie zu einer Polymerisierung der Fettsäuren führen, die die Verdaulichkeit vom Fett negativ beeinflusst (Corcos Benedetti et al., 1987; Huang et al., 1988; Borstung et al., 1994).

In einzelnen Studien, in denen die Versuchstiere restriktiv gefüttert wurden, zeigte sich weiterhin, daß die Fütterung oxidierter Fette auch die Verdaulichkeit des  $\alpha$ -Tocopherols vermindert (Liu und Huang, 1995). Eine verminderte Tocopherolverdaulichkeit kann wiederum zu einem verschlechtertem Tocopherol-Status führen und somit zu einer Beeinträchtigung des antioxidativen Schutzsystems (Eder und Kirchgessner, 1997a, 1998a, 1998b, 1999). Dieses könnte ein vermindertes Wachstum zur Folge haben (Yoshida und

Kajimoto, 1989). Außerdem führt Oxidation von Fetten zum Abbau des Fett-eigenen Vitamin E. Bei der Mehrzahl der in dieser Studie eingesetzten Fette führte die thermische Behandlung zum totalen Verlust der Tocopherole. Lediglich im dritten Versuch konnte nach 24-stündiger Erhitzung bei 190°C eine geringe Restaktivität festgestellt werden. Durch Zugabe von entsprechenden Mengen an all-rac-Tocopherolacetat sollten im ersten und zweiten Versuch die Konzentrationen an Tocopheroläquivalenten der oxidierten Fette an die der entsprechenden frischen Fette angeglichen werden. Im dritten Experiment wurde all-rac-Tocopherolacetat entsprechend dem Versuchsplan (niedrige vs. erhöhte Zulage) zugesetzt, so daß auch hier die Konzentrationen an Tocopheroläquivalenten bei frischem und oxidierten Fett identisch sein sollten.

Die Oxidation von Fetten führt aber auch zum Abbau von PUFA (Engberg und Borsting, 1993; Borsting et al., 1994; Liu und Huang, 1995; Engberg et al., 1996; Eder und Kirchgessner, 1997a, 1998a, 1998b, 1999; Eder, 1999; Eder und Stangl, 2000). Das Fettsäuremuster kann den Stoffwechsel in vielfältiger Weise beeinflussen. Ein verringerter Gehalt an PUFA im Futterfett führte bei Ratten z. B. zu einer erhöhten Aktivität der GSH-Px in der Leber (D'Aquino et al., 1991). Weiterhin wurde mehrfach berichtet, daß der Anteil der PUFA im Fett die Lipidsynthese in der Leber beeinflußt und somit auch die Lipidkonzentration im Plasma (Chait et al., 1974a, 1974b; Brussaard et al., 1980; Bonanome et al., 1988; Lee et al., 1989; Stangl et al., 1994a, 1994c) und in der LDL-Fraktion (Chait et al., 1974a, 1974b; Nestel et al., 1984; Mensink und Katani, 1987, 1989; Stangl et al., 1993a, 1994a). Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Studie das Fettsäuremuster der eingesetzten Fette vor und nach thermischer Behandlung bestimmt. Die Fettsäurezusammensetzung der frischen Fette wurde durch Zugabe von Schweineschmalz oder Palmöl an die Fettsäurezusammensetzung der jeweiligen oxidierten Fette angeglichen, wobei die Linolsäure (C18:2) einen Orientierungswert darstellte. Im ersten Versuch sank der Anteil der Linolsäure durch die thermische Behandlung von 65,8 % auf 54,1 %. Durch Zugabe von 10 % Schweineschmalz zum frischen Fett wurde der Anteil der Linolsäure im frischen Fett ebenfalls auf 54,1 % reduziert. Thermische Behandlung der Fette führte im zweiten Versuch zur Senkung des Anteils der Linolsäure von 66,2 % auf 59,8 %. Durch Zugabe von 11 % Palmöl zum frischen Fett wurde der Anteil der Linolsäure im frischen Fett auf 60,1 % reduziert. Im dritten Versuch sank der Anteil an Linolsäure im Sonnenblumenöl-/Schweineschmalzgemisch (50:50, w/w) durch die thermische Behandlung vom 36,6 % auf 26,9 %. Durch die Zugabe von 69 % Schweineschmalz zum frischen Sonnenblumenöl wurde der Anteil der Linolsäure im frischen Fett auf 26,1 % verringert.

## 4.2 Oxidierte Fette und antioxidatives Schutzsystem

### 4.2.1 Tocopherolstatus

Wie bereits erwähnt, konnten einige Autoren zeigen, daß die Verdaulichkeit oxidierter Fette geringer ist als die Verdaulichkeit frischer Fette, und daß eine verringerte Fettverdaulichkeit eine reduzierte Verdaulichkeit des fettlöslichen  $\alpha$ -Tocopherol zur Folge haben kann (Liu und Huang, 1995). Außerdem ist bei Fütterung von oxidierten Fetten davon auszugehen, daß auch Lipidperoxidationsprodukte mit verabreicht werden, die oxidativen Streß hervorrufen können (Yoshida und Kajimoto, 1989; Hayam et al., 1995; Eder und Kirchgessner, 1999). Eine ohnehin verminderte  $\alpha$ -Tocopherolaufnahme sowie ein erhöhter  $\alpha$ -Tocopherolverbrauch resultieren in einem verschlechterten  $\alpha$ -Tocopherolstatus, der sich unter anderem in einer verringerten  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in Plasma, Leber, Niere und Fettgewebe widerspiegelt (D'Aquino et al., 1985; Liu und Huang, 1995; Eder und Kirchgessner, 1997a, 1998b, 1999). Demzufolge wird der  $\alpha$ -Tocopherolbedarf bei Fütterung oxidierter Fette erheblich erhöht.

In der vorliegenden Studie war im ersten Versuch die gemessene Konzentration an  $\alpha$ -Tocopherol in den angefertigten Diäten mit oxidiertem Fett höher als bei den Diäten mit frischem Fett. Ursache hierfür könnte die erhöhte Stabilität des all-rac- $\alpha$ -Tocopherolacetats sein, d.h. das native  $\alpha$ -Tocopherol könnte während der Diätherstellung und Lagerung abgebaut worden sein. Die erhöhte  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen in den Diäten mit oxidierten Fetten führte, trotz einer erhöhten  $\alpha$ -Tocopherolausscheidung mit dem Kot, zu einer erhöhten  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in Plasma und Leber bei den entsprechenden Tieren. Dies könnte erklären, weshalb diese Ergebnisse im Widerspruch zu anderen Untersuchungen stehen, die nach Gabe von oxidierten Fetten verminderte  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen in verschiedenen Organen der Versuchstiere ermittelten (Eder und Kirchgessner, 1997a, 1998b, 1999).

Im zweiten Versuch waren die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen in den Diäten nahezu angeglichen. Hier führte die Fütterung oxidierter Fette erwartungsgemäß zu einer Senkung der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in der Leber. Bezüglich der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen im Plasma konnte kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden. Die Ursache hierfür dürfte in einer stark erniedrigten Triglycerikonzentration in der Leber, aber nur mäßig erniedrigten Triglyceridkonzentration im Plasma der Tiere, die oxidiertes Fett erhielten, liegen. Mehrere Autoren belegten eine Korrelation zwischen den  $\alpha$ -

Tocopherolkonzentration in Plasma und Geweben mit den Konzentration an Triglyceriden (D'Aquino et al., 1985; Eder und Kirchgessner, 1997a, 1998b, 1999; Eder, 1999).

#### **4.2.2 Oxidationsempfindlichkeit der Lipoproteine geringer Dichte**

Die Empfindlichkeit der LDL gegenüber Kupfer-induzierter Oxidation *in vitro* ist ein Parameter des antioxidativen Status dieser Lipoproteinfraktion (Steinberg et al., 1984; Esterbauer et al., 1987; Esterbauer et al., 1989). Die Empfindlichkeit der LDL hängt zum einen von ihrer Fettsäurezusammensetzung und zum anderen von der Konzentration an Antioxidantien ab. Hierbei spielt das Vitamin E eine zentrale Rolle (Palinski et al., 1989; Parthasarathy et al., 1990; Reaven et al., 1991; Eder und Kirchgessner, 1997b). Sowohl für den Menschen (Dieber-Rotheneder et al., 1991; Jialal und Grundy, 1992) als auch für Kaninchen (Morel et al., 1994) konnte gezeigt werden, daß eine erhöhte Vitamin E-Konzentration in der LDL zu einer Verlängerung der Lag-Time führt, daß heißt, der Beginn der Oxidation wurde hinaus gezögert. Bei Fütterung von oxidiertem Sojaöl an Ratten wurde gezeigt, daß bei unveränderter Fettsäurezusammensetzung eine kürzere Lag-Time nach Kupfer-induzierter Oxidation der LDL resultiert, als bei Fütterung von frischem Öl (Eder und Kirchgessner, 1997a). Diese Verkürzung beruht vermutlich auf einer Verringerung der Vitamin E-Konzentration im oxidierten Öl und die daraus resultierende Verringerung der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen in den LDL.

In der vorliegenden Studie konnten im ersten Versuch die Ergebnisse von Eder und Kirchgessner (1997a) nicht bestätigt werden. Die Lag-Time bei Kupfer-induzierter Oxidation der LDL nach Fütterung oxidierter Fette unterschied sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Ursache hierfür könnte die bereits erwähnte erhöhte  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Plasma der Tiere sein, die oxidiertes Fett erhielten. Aus technischen Gründen konnte die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in den LDL nicht gemessen, es kann aber davon ausgegangen werden, daß die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Plasma mit der der LDL korreliert.

#### **4.2.3 Selenstatus und Aktivität der Glutathionperoxidase**

Oxidativer Stress ist mit Oxidation der PUFA in Zellen und Zellmembranen und mit der Entstehung von Lipidperoxidationsprodukten verbunden. Neben dem Vitamin E spielt die Glutathionperoxidase, ein Selen-abhängiges Metalloenzym, im antioxidativen Schutzsystem

eine zentrale Rolle. Vitamin E hemmt die Oxidation der PUFA in der Zellmembran durch Reduktion von Oxiden (Burton und Ingold, 1989), während die Glutathionperoxidase organisch gebundene Peroxide und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Zytoplasma abbaut (Utsunomiya et al., 1991; Zachara, 1992; Girotti, 1998). Besonders bei suboptimaler Vitamin E-Versorgung ist eine ausreichende Selenversorgung sehr wichtig (Combs, 1975; Fischer und Whanger, 1977; Kirchgessner et al., 1995).

In Studien mit Ratten wurde eine Korrelation zwischen der Aktivität der Glutathionperoxidase und der Selenkonzentration in der Leber (Gromadzinska et al., 1988; Burk und Hill, 1993; Bermanno et al., 1995; Bermanno et al., 1996; Mitchell et al., 1997; Arthur et al., 1997; Ruz et al., 1999) sowie eine inverse Korrelation zwischen der Glutathionperoxidaseaktivität und der Konzentration von Lipidperoxiden (Gromadzinska et al., 1988) festgestellt. Suboptimale Selenversorgung bei Ratten hatte eine verminderte Aktivität der Glutathionperoxidase in der Leber zur Folge (Saedi et al., 1988; Toyoda et al., 1990; Lane et al., 1991; Christensen und Burgener, 1992; Bermanno et al., 1995; Lei et al., 1995; Bermanno et al., 1996; Weiss et al., 1996). Bei Fütterung Selen-defizitärer Diäten an Ratten (Saedi et al., 1988; Christensen und Burgener, 1992, Weiss et al., 1996; Nakane et al., 1998) und Mäuse (Toyoda et al., 1990) wurde eine verringerte Aktivität sowie eine verringerte Genexpression der Glutathionperoxidase in der Leber bestimmt. Nach Fütterung einer Diät mit 3 µg Se/kg wurde sogar eine absolute Hemmung der Aktivität von Glutathionperoxidase festgestellt (Bermanno et al., 1995). Beim Auftritt eines Selenmangels werden nicht alle Selen-haltigen Enzyme im gleichen Maße gehemmt. Burk und Hill (1993) berichten, daß bei Selenmangel die zytosolische Glutathionperoxidase der Leber am stärksten gehemmt wird und so als erstes Selen-haltiges Enzym eine suboptimale Selenversorgung widerspiegelt.

Es existieren in der Literatur nur wenige Untersuchungen, in denen dem Einfluß oxidierter Fette auf den Selenstatus nachgegangen wurde. Dabei wurde festgestellt, daß die Fütterung oxidierter Fette bei Forellen die Selenkonzentration im Plasma (Hartfiel und Oberbach, 1990) und bei Broiler die Aktivität der Glutathionperoxidase in der Leber verringert wird (Engberg und Mitarbeiter, 1996).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß durch die Fütterung oxidierter Fette an Versuchstiere die Selenkonzentration und die Aktivität der Glutathionperoxidase im Plasma beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie untersucht, in wie fern die Fütterung oxidierter Fette bei einer gleichzeitigen suboptimalen Vitamin E-Versorgung den Selenstatus der Versuchstiere beeinflusst.



Im ersten Versuch dieser Studie führte die Fütterung oxidiertes Fette unabhängig von der Selenversorgung zu einer deutlichen Verminderung der Selenkonzentration in Plasma und Leber sowie zu einer deutlichen Verminderung der Aktivität der Glutathionperoxidase in dem Plasma. Dies bedeutet darauf hin, daß sich nach Fütterung von oxidierten Fetten der Selenbedarf erhöht. Diese Ergebnisse stimmen teilweise mit den Befunden von Hartfiel und Oberbach (1990) und Engberg et. al. (1996) überein. Diese Autoren machten allerdings keine Angaben zum Selenstatus der Leber. In vorliegender Studie führte eine erhöhte Selenversorgung bei Fütterung oxidiertes und frischer Fette zu einer erhöhten Selenkonzentration in Leber und Plasma und zu einer erhöhten Aktivität der Glutathionperoxidase in dem Plasma. Diese Resultate deuten darauf hin, daß die erhöhte Selenversorgung auch bei Fütterung oxidiertes Fette zu einem verbesserten Selenstatus beiträgt.

### **4.3 Oxidierte Fette und die Lipidsynthese**

Anhand bisher publizierter Daten über den Einfluß oxidiertes Fette auf die Lipidsynthese ist es schwer, eine genaue Aussage über die Wirkungsmechanismen zu treffen. Die Ursachen für teilweise widersprüchliche Ergebnisse dürften in der verschiedenen Fettsäurezusammensetzung der verwendeten Fetten (Blanc, 1992; Borsting et al., 1994; Hochgraf et al., 1997) und den daraus folgenden methodischen Konsequenzen sowie in einem unterschiedlichen Versuchsdesign zu suchen sein (Siehe *Kapitel 4.1*).

Es existiert in der Literatur eine Reihe von Untersuchungen, in denen dem Einfluß oxidiertes Fette auf die Lipidsynthese nachgegangen wurde (D'Aquino et al., 1985; Yoshida und Kajimoto, 1989; Blanc et al., 1992; Hochgraf et al., 1997; Eder und Kirchgessner, 1997, 1998a, 1998b, 1999; Eder, 1999). In Untersuchungen, in denen die Fettsäurezusammensetzung und der Vitamin E-Gehalt der Versuchs- und Kontrolldiäten angeglichen wurde, konnte festgestellt werden, daß die Tiere, die Diäten mit oxidierten Fetten erhielten, niedrigere Triglyzerid- und Cholesterin-konzentrationen in Plasma und Leber hatten, als die Tiere, die Diäten mit frischem Fett erhielten (Eder und Kirchgessner, 1998a, 1998b). Diese Senkung war offensichtlich von der Herkunft der Fette (Eder, 1999; Eder und Kirchgessner, 1999) und der Vitamin E-Versorgung unabhängig und beruhte auf einer Senkung der Aktivität der lipogenen Enzyme (Eder und Kirchgessner, 1998b; Eder 1999). Aus diesen Gründen wurde vermutet, daß die Fütterung oxidiertes Fette die Expression der entsprechenden codierenden Gene beeinträchtigt.

In der vorliegenden Studie wurde die Lipidsynthese nach Fütterung oxidierter Fette an Ratten näher betrachtet. Um die Art und den Grad der Störung der Lipidsynthese genauer zu bestimmen, wurden die Aktivität der lipogenen Enzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Fettsäuresynthetase bestimmt, sowie die relative Konzentration der entsprechenden mRNA.

Die Fütterung oxidierter Fette führte in der vorliegenden Studie erwartungsgemäß zu einer deutlichen Senkung der Triglyceridkonzentration in Plasma, VLDL und Leber. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Huang et al. (1988), Eder und Kirchgessner (1997b, 1998a) und Eder (1999) überein. Außerdem führte die Fütterung oxidierter Fette zu einer deutlich niedrigeren relativen mRNA-Konzentration der lipogener Enzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Fettsäuresynthetase. In vorliegender Studie beruhte demzufolge die 40 % verminderte Aktivität der Fettsäuresynthetase und 33 % verminderte Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase auf einer verminderten Genexpression. Gleichzeitig führte die Aufnahme von Diäten mit oxidiertem Fett zu einer deutlichen Senkung der Cholesterinkonzentration in den VLDL.

Erst kürzlich wurde die Wirkung oxidierter Fette auf den peroxisomalen Abbau von Fettsäuren diskutiert (Chao und Huang, 2001; Lin et al., 2001). Es wurde festgestellt, daß die Fütterung von oxidiertem Öl an Ratten genetische Expression und Aktivität der Acyl-CoA-Oxidase (ACO) erhöht. Gleichzeitig wurde eine starke Senkung der Triglyceridkonzentration in der Leber beobachtet, die durch die  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren mit der Aktivierung der Expression der ACO als Zielenzym des  $\alpha$ -Rezeptors der peroxisomalen Proliferierung begründet wurde (Dreyer et al., 1993; Sterchele et al., 1996; Jump et al., 1999; Martin et al., 2000). Wie stark die Triglyceridkonzentration in der Leber von der Lipidsynthese und/oder der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren beeinträchtigt wird, wurde bisher in der Literatur nicht diskutiert.

In der vorliegenden Studie handelte es sich wahrscheinlich nicht um eine Produkt-spezifische Expressionshemmung bzw. Aktivitätsminderung von lipogenen Enzymen, wie z. B. bei erhöhter Aufnahme von PUFA (Chait et al., 1974b; Clarke et al., 1990; Shillabeer et al., 1990; Iritani et al., 1995; Eder und Kirchgessner, 1996) oder bei einem veränderten Verhältnis zwischen n-6/n-3 PUFA (Lee et al., 1989) oder bei erhöhter Aufnahme von langkettigen Fettsäuren (Foufelle et al., 1992; Girard et al., 1994), da die Fettsäurezusammensetzung der verwendeten Fette annähernd gleich war. Die Senkung der Expression lipogener Enzyme ist offensichtlich auf die Wirkung spezifischer Lipidperoxidationsprodukte, wie z. B. die 9-

Oxononanoisäure, einem Abbauprodukt der Linolsäure (Minamoto et al., 1988), zurückzuführen.

Da in oxidierten Fetten eine Vielzahl von reaktiven Abbauprodukten vorhanden sind, die auch in der Diät weiter reagieren, ist es weiterhin nicht klar, welches dieser Produkte die Hemmung der Genexpression bedingt. Eine weitere Frage stellt sich bezüglich der Wirkungsmechanismen, durch die eine Hemmung der Genexpression hervorgerufen werden kann. Es ist hinreichend bekannt, daß relative Genexpression, wie in vorliegender Studie mit RT-PCR bestimmt (Köhler et al., 1995), von der Transkription der DNA in die RNA abhängt, wobei eine Vielzahl an Promotoren regulierend wirkt. Andererseits hängt die relative mRNA-Konzentration auch von der Stabilität der RNA im Zytoplasma ab (Bermano et al., 1995, 1996). Diese Fragen könnten in weiteren Studien in einem in vitro-System mit Hepatozyten-Zellkulturen nach Behandlung mit spezifischen Lipidperoxidationsprodukten untersucht werden.

#### **4.4 Oxidierte Fette und Schilddrüsenhormonstoffwechsel**

##### **4.4.1 Konzentration von gesamtem und freiem Thyroxin, Trijodthyronin und Thyrotropin**

Die Schilddrüse ist ein wichtiges endokrines Organ, das durch die Synthese und die Ausscheidung der Schilddrüsenhormone Thyroxin und Trijodthyronin eine zentrale Rolle im Energie- und Sauerstoffverbrauch in nahezu allen Zellen spielt.

Über den Einfluß von oxidierten Fetten auf den Schilddrüsenhormonstoffwechsel in vivo wurde bisher in der Literatur wenig berichtet. Eder und Stangl (2000) fanden nach Fütterung von oxidierten Fetten bei Miniaturschwein erhöhte Konzentrationen von gesamtem und freiem Thyroxin. Oxidiertes Fett hatte keinen Einfluß auf die Konzentrationen von Trijodthyronin und Thyrotropin in Plasma. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Synthese und/oder Freisetzung von Thyroxin aus der Schilddrüse durch Lipidperoxidationsprodukte gefördert wird, oder daß die Aktivität der selenabhängigen Deiodase Typ I im peripheren Gewebe gehemmt wird.

Die Freisetzung der Schilddrüsenhormone aus der Schilddrüse und die Dejodierung des Thyroxins durch die Deiodase Typ I wird durch den Ernährungsstatus der Tiere, vorwiegend durch die Energieaufnahme reguliert (Katzeff et al., 1990). Mehrere Autoren berichten jedoch, daß die Hemmung der Aktivität der Deiodase Typ I unter anderem auch durch einen suboptimalen Selenstatus verursacht werden kann (Visser et al., 1982; Saedi et al., 1988; Mori

et al., 1991; Kohrle et al., 1992; Smit et al., 1993; Meinhold et al., 1993; Kralik et al., 1995; Eder et al., 1995; Gross et al., 1995; Bermano et al., 1995; Bermano et al., 1996; Visser, 1996; Campos-Barros et al., 1997; Villette et al., 1998; Ruz et al., 1999).

Engberg et al. (1996) berichten über eine verringerte Aktivität der Glutathionperoxidase beim Broiler nach der Verfütterung oxidierter Fette. Dies deutet darauf hin, daß bei Fütterung oxidierter Fette der Selenstatus der Tiere verschlechtert wird. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie untersucht, inwiefern oxidierte Fette den Selenstatus der Versuchstiere beeinflussen und ob dadurch der Schilddrüsenhormonstoffwechsel beeinträchtigt wird.

In vorliegender Studie wurde nach Fütterung oxidierter Fette an Ratten ebenfalls eine Erhöhung der Konzentration an gesamtem und freiem Thyroxin in Plasma festgestellt. Weiterhin zeigte sich jedoch, daß die durch Fütterung oxidierter Fette erhöhte Konzentration an gesamtem und freiem Thyroxin im Plasma von der Selenzulage unabhängig ist. Die Selenzulage spielte hinsichtlich der Auswirkung oxidierter Fette auf den Schilddrüsenhormonstoffwechsel keine Rolle. Offensichtlich spielt auch ein durch Fütterung oxidierter Fette verminderter Selenstatus bezüglich des Schilddrüsenhormonstoffwechsels keine Rolle.

Deshalb wurde angenommen, daß durch die Fütterung oxidierter Fette eine erhöhte Synthese und/oder eine erhöhte Ausscheidung von Schilddrüsenhormonen induziert wurde. Eine Erhöhung der Syntheserate oder Hormonausschüttung würde jedoch bei einer längeren Fütterung oxidierter Fette zu einem erhöhten Jod-Turnover führen, da Jod ein essentieller Bestandteil der Schilddrüsenhormone ist. Der Jod-Turnover der Schilddrüse wird jedoch nicht nur durch den Jodgehalt der Nahrung, sondern auch durch mehrere Mechanismen, die in der Schilddrüsenepithellzellen lokalisiert sind, beeinflußt (De la Vieja et al., 2000).

Aus diesem Grund wurde hier untersucht, inwiefern die durch oxidierte Fette veränderte Synthese oder Freisetzung der Schilddrüsenhormone bei unterschiedlicher Jodversorgung der Versuchstiere beeinflußt wird. Entgegen unserer Erwartung hatte die Jodversorgung, bei gleichzeitiger Fütterung oxidierter Fette, keinen Einfluß auf die Konzentration des gesamten und freien Thyroxin im Plasma. Die Fütterung der oxidierten Fette führte hingegen wieder zu einer deutlich erhöhten Konzentration dieser beiden Hormone in Plasma.

Die erhöhte Konzentrationen an gesamtem und freiem Thyroxin im Versuch von Eder und Stangl (2000) und die Ergebnisse vorliegender beiden Versuche könnten jedoch auch auf einen verschlechterten antioxidativen Status der Schilddrüse hindeuten. Bei thermischer Behandlung von Futterfetten entsteht eine Vielzahl primärer und sekundärer Lipidperoxidationsprodukte deren Konzentration von der Temperatur und der Zeit der Behandlung der Fette abhängt. Da die primären und sekundären Produkte in oxidierten Fetten nicht

getrennt vorkommen, wird die Interpretation der erhöhten Konzentration an gesamtem und freiem Thyroxin in Plasma bei Fütterung oxidierter Fette auf eine der jeweiligen Produktgruppen erschwert. Bei niedrigen Behandlungstemperaturen, unterhalb von 60°C, entstehen im Fett vorwiegend primäre Lipidperoxidationsprodukte, bei höheren Behandlungstemperaturen, oberhalb von 160°C, entstehen jedoch vorwiegend sekundäre Lipidperoxidationsprodukte (Frankel, 1998).

Die Fütterung oxidierter Fette führt bei den Versuchstieren zu oxidativem Streß, der mit einer erhöhten Peroxidation der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Zellmembran und Bildung von Lipidperoxidationsprodukten verbunden ist (Yoshida et al., 1989; Liu und Huang, 1995; Eder, 1999). Eine erhöhte Vitamin E-Versorgung verringert bei Ratten den toxischen Effekt der oxidierten Fetten durch die Senkung der Konzentration von Lipidperoxidationsprodukten in Geweben.

Aus diesen Gründen wurde im dritten Versuch der Einfluß verschieden oxidierten Fette, sowie der Einfluß verschiedener Konzentrationen an Vitamin E als wichtigen Antioxidant auf den Schilddrüsenhormonstoffwechsel geprüft. Insgesamt führten die verschiedenen oxidierte Fette alle zu einer deutlichen Erhöhung der Konzentration an gesamtem und freiem Thyroxin im Plasma. Das oxidierte Fett # 2 (erhitzt bei 105°C, 81 Stunden) führte vor dem Fett # 1 (erhitzt bei 50°C, 38 Tage) und Fett # 3 (erhitzt bei 190°C, 24 Stunden) zu der stärksten Erhöhung der Konzentrationen an gesamtem und freiem Thyroxin in Plasma. Dies deutet darauf hin, daß nicht nur primäre Lipidperoxidationsprodukte alleine, sondern auch sekundäre Lipidperoxidationsprodukte den Schilddrüsenhormon-stoffwechsel beeinflussen.

Es konnte allerdings kein Einfluß der Vitamin E-Versorgung auf die Konzentrationen der Schilddrüsenhormone nachgewiesen werden. Die Konzentration an Trijodthyronin und Thyrotropin in Plasma wurde weder durch die Fütterung oxidierter Fette noch durch die Vitamin E-Zulage beeinflusst.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten darauf hin, daß ein suboptimaler Selenstatus, eine erhöhte Vitamin E- und suboptimale Jodversorgung bei der Ausschüttung des gesamten und freien Thyroxins nach Fütterung oxidierter Fette offensichtlich keine Rolle spielen.

Die Freisetzung der Schilddrüsenhormone Thyroxin und Trijodthyronin erfolgt vorwiegend mit einer rezeptorabhängigen und/oder rezeptorunabhängigen Endopinozytose des Thyreoglobulins aus dem Follikel in die Schilddrüsenzelle (Van den Hove et al., 1982; Nasu und Sugawara, 1994; Bidey und Cowin, 1995; Marino und McCluskey, 2000) und anschließender Fusion mit primären Lysosomen (Dunn et al., 1991; Kostrouch et al., 1993; Dunn, 1995; Dunn et al., 1996; Mezgrhani et al., 1997; Chen et al., 1993; Marino et al., 1999;

Marino und McCluskey, 2000; Marino et al., 2000; Marino et al., 2000), wobei die Abspaltung des Thyroxins, Trijodthyronins, Dijodthyronins und Monojodthyronins erfolgt.

#### 4.4.2 Histologie der Schilddrüse

Die Schilddrüse besteht aus einschichtigangeordneten Schilddrüsenzellen, die uniform polarisiert und mit der apikalen Membran so ausgerichtet sind, daß mehrere Zellen nach innen einen Follikel bilden. Die Ausrichtung der Zellen ist insofern sehr wichtig, als die innere dem Follikel zugewandte (apikale) und äußere den Blutkapillaren zugewandte (basale) Membran verschiedene Funktionen ausüben. Auf der basolateralen Membran befinden sich TSH-Rezeptor,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -abhängige ATPase und der  $\text{Na}^+/\text{I}^-$ -Symporter (Bidey und Cowin, 1995; Kaliawat et al., 1995; Caillou et al., 1998), auf der inneren Membran befinden sich die Schilddrüsenperoxidase und ein Wasserstoffperoxid-Regenerationssystem (Corvilain et al. 1991).

Die Fütterung oxidiertes Fette führte in vorliegender Untersuchung zu einer Verringerung der Follikeldurchmesser und einer Erhöhung der Epithelzellen. Eine unzureichende Jodversorgung führte jedoch unabhängig von Fettart zu einer deutlichen Erhöhung der Epithelzellen und einer Verringerung der Follikeln. Fütterung oxidiertes Fette bei adäquater Jodversorgung führte zu einem ähnlichen histologischen Bild der Schilddrüse, wie die Fütterung von frischem Fett bei einer unzureichenden Jodversorgung. Der Einfluß des Jods auf die Histologie der Schilddrüse wurde bisher ausführlich diskutiert (Degrooth und Niepomniszcze, 1977; Beere et al., 1990; Thews und Vaupel, 1990; Koolman und Röhm, 1994; Bidey und Cowin, 1995; Suzuki et al., 1999; Rohen und Lütjen-Drecoll, 2000). Allgemein gilt, daß bei einer mangelnden Jodversorgung die Follikeldurchmesser verringert werden und die Epithelhöhen ansteigen. Hingegen bleiben bei einer normal funktionierenden Schilddrüse und einer adäquaten Jodversorgung die Follikeldurchmesser groß und die Epithelhöhen minimal. Über den Zusammenhang zwischen dem Follikeldurchmesser, der Epithelhöhe und der Aktivität der Schilddrüse wurde mehrfach berichtet (Bidey und Cowin, 1995; Bucher und Wartenburg, 1997; Tamura et al., 1998). Über den Einfluß von oxidierten Fette auf diese Parameter ist jedoch wenig bekannt. Die Resultate der vorliegenden Studie deuten jedoch darauf hin, daß die Aktivität der Schilddrüse durch die Fütterung mit oxidierten Fetten erhöht worden ist.

### 4.4.3 Schilddrüsenperoxidase

In der vorliegenden Studie wurde bei Fütterung oxidierter Fette ein deutlicher Anstieg der Genexpression der Schilddrüsenperoxidase festgestellt.

Diese Beobachtung könnte auf eine höhere Konzentration von  $H_2O_2$  in Schilddrüsenfollikeln hindeuten. Untersuchungen mit FRTL-5 Zellen (Leer et al., 1989; Corvilain et al., 1991; Bjorkman und Ekholm, 1992; Chen et al., 1993) zeigten erhöhte mRNA-Spiegel für die TPO bei erhöhten  $H_2O_2$ -Konzentrationen. Chen et al. (1993) berichten darüber hinaus über eine erhöhte Jodierungsrate von Thyreoglobulin durch eine erhöhte Aktivität der TPO, wenn exogenes  $H_2O_2$  in einer Konzentration von 0,1-0,5 mM zugefügt wurde. Hingegen fanden die selben Autoren bei einem Anstieg der  $H_2O_2$ -Konzentration über 5 mM eine Hemmung der Jodierungsrate des Thyreoglobulins. Der deutliche Anstieg der mRNA-Konzentration der TPO durch Fütterung des oxidierten Fettes deutet auf eine verstärkte Jodierung von Thyreoglobulin hin. Nakamura et al., 1989; Nakamura et al., 1991; Bidey und Cowin, 1995 führten eine effektivere Jodierung des Thyreoglobulins auf den Anstieg der TPO-Aktivität zurück. Es wird angenommen, daß dadurch der Gesamtanteil des Thyroxins im Thyreoglobulin erhöht wurde, das anschließend zu einem höheren Anteil des in Endopinozytose eingeschlossenen Thyroxins und daraus resultierenden erhöhten Thyroxinkonzentration im Plasma führte.

Nakamura et al. (1990) berichten über eine erhöhte katalytische Aktivität der TPO *in vitro* bei Zufuhr von Jodthyronin. Diese Reaktion war  $H_2O_2$ -abhängig mit absteigender Priorität  $T_4 > T_3 > T_2$ .

Zimmer et al. (1992), DePillis et al. (1997) und Fayadat et al. (1998, 1999, 2000) beobachteten bei ovariellen Zellen von Hamstern (CHO) eine Diskrepanz zwischen den Syntheseraten von TPO an endoplasmatischem Retikulum und dem Einbau von TPO in die Membran. In diesen Untersuchungen erreichten nur 2 % des synthetisierten TPO die Zellmembran, wobei die Zugabe von Hemmprekursoren einen geringeren Abbau von TPO in Zytoplasma und die erhöhte  $H_2O_2$ -Konzentration (10  $\mu$ M) die Einnistung der TPO um 65 % erhöhten.

Die *in vitro* Versuche zum Einfluß des  $H_2O_2$  auf den Schilddrüsenhormonstoffwechsel in FRTL-5 Zellen können die Bedingungen und dadurch die Art und den Grad der Beeinflussung des Metabolismus während eines *in vivo* Versuch nicht ausreichend wiedergeben, da  $H_2O_2$ -Konzentrationen von über 5 mM bei *in vivo* Versuchen nicht auftreten (Riou et al., 1999). Es wäre aber möglich, daß durch die Fütterung oxidierter Fette in der Schilddrüse das  $H_2O_2$ -

Regenerationssystem unabhängig vom Thyrotropin aktiviert wird und möglicherweise den Transport von TPO von endoplasmatischem Retikulum zur apikalen Membran hemmt.

#### 4.4.4 Einfluß von Thyrotropin auf die Schilddrüsenaktivität

Der Einfluß von Thyrotropin auf die Aktivität der Schilddrüsenzellen ist vielseitig. Durch die Kopplung des Thyrotropin an den Thyrotropin-Rezeptor werden die cAMP-Synthese und die regulierende Phosphorylierung (durch A-Kinase) der Schilddrüsentranskriptionsfaktoren (TTF-1), die Expression von TPO, GSH-Px, Na<sup>+</sup>/J-SYM, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Thyreoglobulin stimuliert (Dumont et al., 1984; Weiss et al., 1984a, Weiss et al., 1984b; Davies et al., 1987; Ossendrop et al., 1989; Nagayama et al., 1989; Nilson et al., 1990; Akamizu et al., 1990; Leer et al., 1990; Maenhaut et al., 1991; Watanabe et al., 1991; Civitareale et al. 1993; Pressley et al., 1995; Endo et al., 1997; Ohmori et al., 1998; Riedel, et al., 2001). In Studien mit Thyrotropin induzierter Hyperthyreose an FRTL-5 Zellen (Beere et al., 1989; Bjorkman und Ekholm, 1992) wurde eine erhöhte Wasserstoffperoxid-produktion, gleichzeitig jedoch auch eine erhöhte Ausscheidung von gesamtem und freiem Thyroxin festgestellt. Gleichzeitig wurde in *in vitro* Studien gezeigt, daß das Thyrotropin die Expression seines eigenen Rezeptors stimuliert (Vassart, 1991).

Da die oxidierte Fette in vorliegender Studie zu keinen erhöhten Konzentrationen von Thyrotropin führten, ist anzunehmen, daß die Aktivierung der Schilddrüsenzellen über einen Thyrotropin-unabhängigen Mechanismus erfolgte.

#### 4.4.5 Glutathionperoxidase

Die Fütterung des oxidierten Fettes führte in der vorliegender Studie zu deutlich höheren mRNA-Konzentration der GSH-Px in der Schilddrüse. Bjorkman und Ekholm (1995) und ebenso Ekholm und Bjorkman (1997) beobachten in FRTL-5- und Schweineschilddrüsen-Zellen eine erhöhte Aktivität der GSH-Px, wenn exogenes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Konzentration von 0,01 mM zugeführt wurde. Da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das Substrat für die Glutathionperoxidase ist, könnte eine erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration als Ursache vermutet werden.

Das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann unter dem Einfluß verschiedener Faktoren in der Schilddrüsenzelle in sogenannten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Regenerierungssystem produziert werden. Seine Bildung ist ATP- und Ca<sup>2+</sup>-abhängig (Corda et al., 1985; Nakamura et al., 1987, Nakamura et al., 1989). Es wurde gezeigt, daß die NADPH-Oxidase in der Plasmamembran der Schweineschilddrüse und



Mausschilddrüsenzellen in Produktion von  $O_2^-$ , als Ausgangssubstrat für das  $H_2O_2$  und so auch bei der Synthese des  $H_2O_2$  eine Schlüsselrolle spielt (Nakamura et al., 1989; Verma et al., 1990). Corvilain et al. (1991) berichteten weiter, daß die Hemmung des Pentosephosphatweges zu einer geringeren NADPH-Konzentration und weiterhin zu einer Hemmung der  $H_2O_2$ -Bildung und gleichzeitig zu einer geringeren Jodierung der Thyreoglobulin in der Schilddrüse von Hunden führt. Dieselben Autoren beobachteten auch bei erhöhten  $H_2O_2$ -Konzentration eine gesteigerte Aktivität der GSH-Px. Die Befunde dieser Studie deuten darauf hin, daß die Fütterung oxidiertes Fette zu einer erhöhten  $H_2O_2$ -Produktion führen könnte und dadurch die Genexpression der TPO und GSH-Px indirekt erhöht wurde.

#### 4.4.6 Natrium/Jodid-Symporter

In den vorliegenden Untersuchungen wurde gezeigt, daß die Fütterung oxidiertes Fette unabhängig von der Jodzufuhr zu einem extremen Abfall der Genexpression des  $Na^+/J^-$ -SYM führte. Die unzureichende Jodversorgung führte hingegen unabhängig von Fett zu einem deutlichen Anstieg der Genexpression des  $Na^+/J^-$ -SYM.

Der  $Na^+/J^-$ -SYM transportiert das Jodidion in die Epithelzellen der Schilddrüse und in die Zellen der Milchdrüse. Dieser Transport ist  $Na^+$ -abhängig, beruht auf einem Elektrochemischengradient der Membran, wird durch  $SCN^-$ - und  $ClO_4^-$ -Ionen gehemmt und ist cAMP-abhängig (Obici et al., 1991; Carrasco, 1993; Gerard, 1994; Taurog et al., 1996; Yoshida et al., 1997; Yoshida et al., 1998a). Mit einem Jodidion werden zwei oder mehr Natrium-Ionen in die Epithelzelle transportiert (Bidey und Cowin, 1995; Yoshida et al., 1997).

Die Expression des  $Na^+/J^-$ -SYM und der Jodid-Transport wird in der Schilddrüse durch die erhöhte TSH gesteigert (Davies et al., 1989; Nilsson et al., 1990; Carrasco, 1993; Kaminsky et al., 1994; Kogai et al., 1997; Saito et al., 1997; Endo et al., 1997; Ohmori et al., 1998; Riedel et al., 2001a; Riedel et al., 2001b). Die erhöhte Thyreoglobulinkonzentration in Zytoplasma der Schilddrüsenzelle (Suzuki et al., 1999; Nakazato et al., 2000), sowie erhöhte Di- und Monojodthyrosinkonzentration hemmen den Jodidtransport in FRTL-5 und humanen Schilddrüsenzellen (Nasu und Sugawara, 1994). Die erhöhte  $H_2O_2$ -konzentration in Medium hemmt unter anderem auch den Jodidtransport und die Expression des  $Na^+/J^-$ -SYM (Sugawara et al., 1990; Bjorkman und Ekholm, 1992; Chen et al., 1993). Durch erhöhte Retinoesäurekonzentration im Medium wird der  $Na^+/J^-$ -SYM in Schilddrüsenkrebszellen FTC-133 und FTC-238 (Schmutzler et al., 1997) und ebenso in MCF-7 Brustkrebszellen

stimuliert (Nagataki und Yokoyama, 1996 und Kogai et al., 2000). Auch Smanik et al. (1997), Tong et al. (1997) und Lazar et al. (1999) berichten von sehr niedriger Expression des Na<sup>+</sup>/J<sup>-</sup>-SYM in verschiedenen Schilddrüsenkarzinomen. Die Aktivität und die Expression des Na<sup>+</sup>/J<sup>-</sup>-SYM wird durch niedrigere Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Aktivität negativ beeinflusst (Bagchi und Fawcett, 1973; Saito et al., 1982; O'Neill et al., 1987; Fowler et al., 1989; Carrasco, 1993; Bidey und Cowin, 1995; Eskandari et al., 1997; Ulianich et al., 1999; Nakazato et al., 2000; Riedel et al., 2001). Durch eine erhöhte Jodkonzentration in Medium wird der Jodidtransport in die FRTL-5 gehemmt (Carrasco, 1993). Die erhöhte Expression von Na<sup>+</sup>/J<sup>-</sup>-SYM bei joddefizitärer Versorgung beobachteten neben Carrasco (1993) auch Venezian et al. (1989), Beere et al. (1990), Gruffat et al. (1992), Goldstein et al. (1992 und 1995), Spitzweg und Heufelder (1998), Venkataraman et al. (1999), Schröder-van der Elst et al. (2001) und Eng et al. (2001). Es ist anzunehmen, daß durch die Fütterung oxidiertes Fett eine höhere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration, eine höhere Aktivität der TPO vorliegen und dadurch ein schnellerer Jod-Turn-over stattgefunden hat. Da auch höhere Plasmakonzentrationen an gesamtem und freiem Thyroxin festgestellt wurden, ist ebenso anzunehmen, daß die Thyreoglobulin-, Dijodthyrosin- und Monojodthyrosinkonzentration in der Schilddrüsenzelle angestiegen sind. Dadurch könnte der extreme Abfall in Expression des Na<sup>+</sup>/J<sup>-</sup>-SYM bei Fütterung oxidiertes Fett erklärt werden.

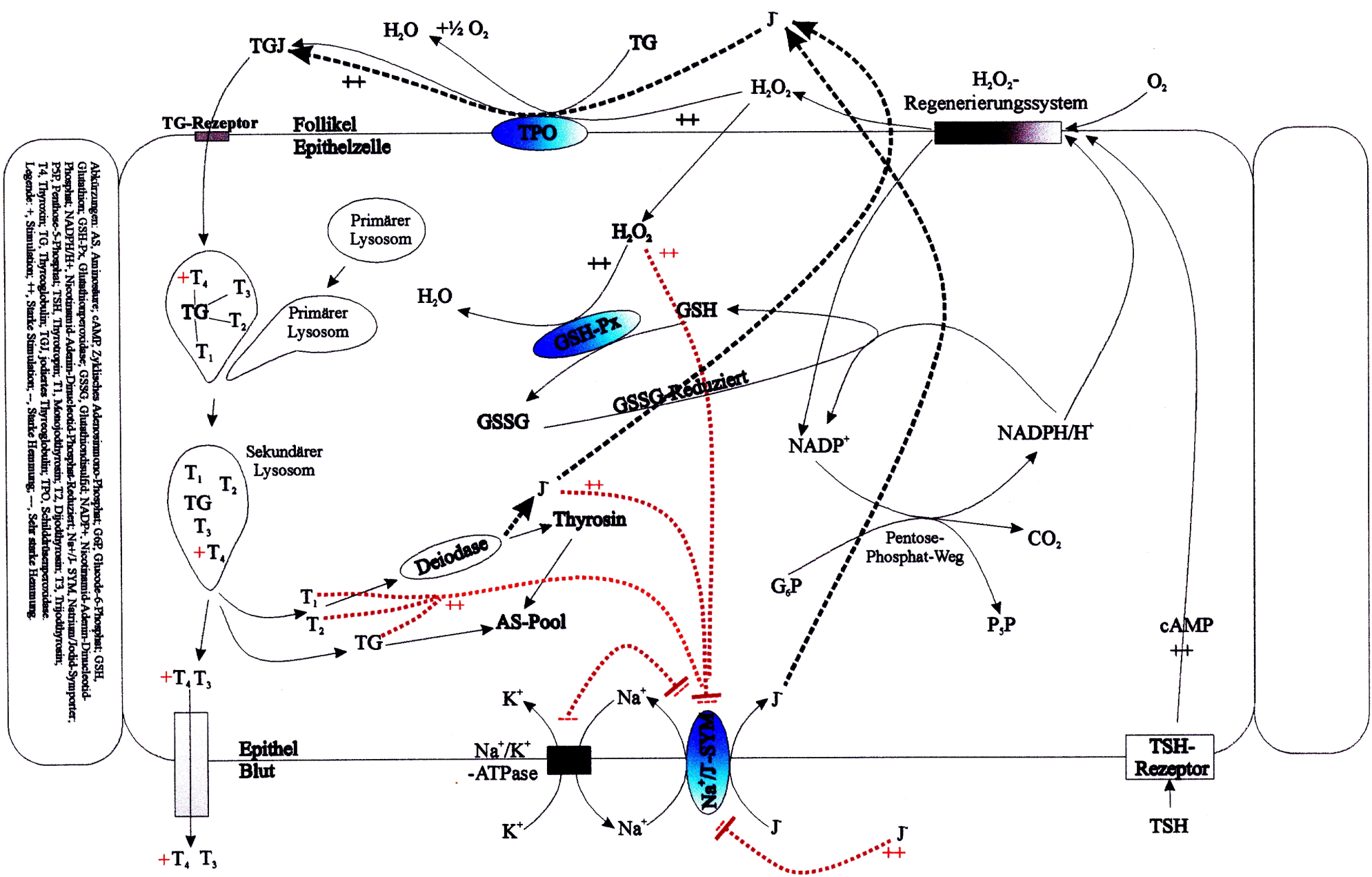
#### **4.4.7 Einfluß oxidiertes Fett auf den Schilddrüsenhormonstoffwechsel**

Die erhöhte Selen- und Vitamin E-Versorgung hatte keinen Einfluß auf die Konzentrationen an gesamtem und freiem Thyroxin. Anhand dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß durch Fütterung oxidiertes Fett veränderte Schilddrüsenfunktion nicht primär auf die Veränderung des antioxidativen Status der Schilddrüse zurückzuführen ist. Weiterhin ist zu vermuten, daß die Fütterung oxidiertes Fett das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Regenerierungssystem aktiviert. Als Folge erhöhter Konzentration an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ergäben sich erhöhte Expressionen der TPO und GSH-Px in der Schilddrüse. Die erhöhte Expression der TPO könnte tatsächlich zu einer gesteigerten Jodierung des Thyreoglobulins führen. Der erhöhte Anteil des Thyroxins im Thyreoglobulin könnte zu einer erhöhten Konzentration an Thyroxin im Schilddrüsenepithel führen, was in dem Schilddrüsenautoregulationssystem ein Fehlsignal im Jodhaushalt der Schilddrüse darstellen könnte.

Die Fütterung oxidiertes Fett führte zu einer deutlich niedrigeren mRNA-Konzentration des Na<sup>+</sup>/J<sup>-</sup>-SYM, offensichtlich durch eine erhöhte Konzentration an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ein verstärktes Jodieren des Thyreoglobulins, einer erhöhten Jodkonzentration in den Epithelzellen der

Schilddrüse und einer geringeren Aktivität der Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. Es wird angenommen, daß der Überschuß an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer erhöhten mRNA-Konzentration an GSH-Px führte (*Abbildung 6, Tabelle 43*).

Insgesamt zeigt die vorliegende Studie, daß die Fütterung oxidiertes Fette zu einer Erhöhung des gesamt und freien Thyroxins im Plasma hauptsächlich durch Veränderungen der Expressionen wichtiger Enzyme der Schilddrüse erfolgen könnte. Die Aktivität dieser Enzyme und die tatsächliche Synthese oder Freisetzung der Schilddrüsenhormone konnten aus technischen Gründen in vorliegender Studie nicht ermittelt werden. So bleiben noch viele Fragen, die komplexe Zusammenhänge der Synthese und der Freisetzung der Schilddrüsenhormone und deren Regulierung betreffen offen. Um diese aufzuklären bedarf es weiteren Untersuchungen auch mit verbesserten Zellkultursystemen, die den physiologischen Bedingungen im Tier ähneln.



Abkürzungen: AS: Aminosäure; cAMP: Zykliches Adenosinmono-Phosphat; G6P: Glucose-6-Phosphat; GSH: Glutathion; GSH-Px: Glutathionperoxidase; GSSG: Glutathiondisulfid; NADP<sup>+</sup>: Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat; NADPH/H<sup>+</sup>: Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Reduziert; Na<sup>+</sup>/J-SYM: Natrium/Jodid-Symporter; P3P: Pentose-5-Phosphat; TSH: Thyrotropin; T1, M: Moniodthyronin; T2, D: Diiodthyronin; T3, T: Triiodthyronin; T4: Thyroxin; TG: Thyroglobulin; TGJ: jodiertes Thyroglobulin; TPO: Schilddrüsenperoxidase.  
 Legende: +: Stimulation; ++: Starke Stimulation; -: Senke Hemmung; ---: Sehr starke Hemmung.

Abbildung 6: Wirkungsmechanismen oxidierter Fette auf Schilddrüsenhormonsynthese-Hypothese

Tabelle 43: Einflußfaktoren des Schilddrüsenhormonstoffwechsels

Einflußfaktor	mRNA-Konzentration			Aktivität	Plasmakonzentration		Autor
	TPO	GSH-Px	Na <sup>+</sup> /J-SYM	Na <sup>+</sup> /J-SYM	T <sub>4</sub>	fT <sub>4</sub>	
Lipidperoxidationsprodukte	↑↑	↑↑	↓↓↓		↑↑	↑↑	Vorliegende Studie
Jodmangel	↑↑	↑↑	↑↑↑		o*	o*	Vorliegende Studie
			↑↑↑	↑↑↑	↓		Carrasco (1993), Beere et al. (1993), Gruffat et al. (1992), Goldstein (1995), Eng et al. (2001)
TSH	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑		Davies et al. (1989), Endo et al. (1997), Ohmori et al. (1998)
TG, T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub> , T <sub>3</sub> und T <sub>4</sub> in Epithelzelle			↓	↓			Suzuki et al. (1999), Nakazato et al. (2000)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> < 1 mM	↑	↑	↑				Leer et al. (1989), Corvilain et al. (1991), Bjorkman und Ekholm (1992), Chen et al. (1993)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> > 5 mM	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓			Chen et al. (1993), Sugawara et al. (1990)

Abkürzungen: GSH-Px, Glutathionperoxidase; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Wasserstoffperoxid; Na<sup>+</sup>/J-SYM, Natrium/Jodid-Symporter; T<sub>1</sub>, Monojodthyronin; T<sub>2</sub>, Dijodthyronin; T<sub>3</sub>, Trijodthyronin; fT<sub>4</sub>, freies Thyroxin; T<sub>4</sub>, gesamtes Thyroxin; TG, Thyreoglobulin; TPO, Schilddrüsenperoxidase; TSH, Thyrotropin.

Legende: ↑↑, starke Stimulation; ↑↑↑, sehr starke Stimulation; ↓↓, starke Hemmung; ↓↓↓, sehr starke Hemmung; o\*, ohne Einfluß bei suboptimaler Jodversorgung und acht wöchiger Fütterung der Diät.

## 5 Zusammenfassung

Thermisch behandelte Fette enthalten erhöhte Konzentrationen an primären und sekundären Lipidperoxidationsprodukten, die im tierischen Organismus vielfältige physiologische Wirkungen hervorrufen. Aus vorangegangenen Untersuchungen an Ratten und Miniaturschweinen ist bekannt, daß durch die Fütterung erhitzter Fette nicht nur das antioxidative Schutzsystem der Tiere beeinflußt wird, sondern auch der Lipidstoffwechsel. Neben einer Senkung der Triglyceridkonzentrationen in Plasma und Leber wurde auch eine Erhöhung der Konzentrationen an Schilddrüsenhormonen im Plasma, insbesondere des Thyroxins festgestellt. Die Wirkungsmechanismen dieser teilweise überraschenden Veränderungen sind bislang noch nicht vollständig geklärt. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war, die Wirkungen oxidiertes Fette auf den Schilddrüsenhormonstoffwechsel und den Lipidstoffwechsel näher zu beleuchten.

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt drei Versuche durchgeführt, in denen männliche Sprague-Dawley Ratten als Modelltiere verwendet wurden. Die Ratten wurden restriktiv über 6 bzw. 8 Wochen mit halbsynthetischen Diäten gefüttert, die entweder Kontrollfette oder oxidierte Fette enthielten.

Als Kontrollfett wurden frische Fette (ein Sonnenblumenöl/Schweineschmalz- und ein Sonnenblumenöl/Palmöl-Gemisch) verwendet (Kontrollgruppen). Als Versuchsfett wurden identische Fette verwendet, die bei verschiedenen Temperaturen über verschiedene Zeiträume erhitzt worden waren (Versuchsgruppen). Als Maß für die Oxidation der ungesättigten Fettsäuren wurden die Peroxidzahl, die Säurezahl und die Konzentration an Thiobarbitusäure-reaktiven Substanzen sowie die Fettsäurezusammensetzung der verwendeten Fette herangezogen.

Im ersten Versuch wurde das Fett über einen Zeitraum von 6 Wochen bei einer Temperatur von 50°C erhitzt. In diesem Versuch wurde außerdem die Selenkonzentration variiert, da Selen eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der Schilddrüsenhormone und im antioxidativen Schutzsystem spielt.

Im zweiten Versuch wurde das Fett über einen Zeitraum von 5 Wochen bei einer Temperatur von 55°C erhitzt. Neben der Art des Fettes wurde die Jodkonzentration variiert, um zu überprüfen, welche Auswirkung erhitzte Fette bei Jodmangel haben.

Im dritten Versuch wurden die Diätfette bei drei verschiedenen Temperaturen über unterschiedliche Zeiträume thermisch behandelt. Das Fett # 1 wurde über den Zeitraum von 5 Wochen einer Temperatur von 50°C ausgesetzt. Die entsprechenden Werte waren für Fett # 2

81 Stunden und 105°C sowie für Fett # 3, 24 Stunden und 190°C. Neben der Art des Fettes wurde die Vitamin E-Konzentration variiert, um zu überprüfen, ob Vitamin E die Auswirkung thermisch behandelter Fette auf den Schilddrüsenhormonstoffwechsel beeinflussen kann.

Im ersten Versuch wurden die Selenkonzentrationen in Plasma und Leber, die Aktivität der selenhaltigen Glutathionperoxidase (GSH-Px) im Plasma, die Konzentrationen von gesamtem Thyroxin (T<sub>4</sub>), freiem Thyroxin (fT<sub>4</sub>), Trijodthyronin (T<sub>3</sub>) und Thyrotropin (TSH) im Plasma, die Triglyceridkonzentrationen in Plasma, Lipoproteinen und Leber, sowie die Aktivität der lipogenen Enzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) und Fettsäuresynthetase (FsS) in der Leber bestimmt. Zusätzlich wurde die Genexpression der lipogenen Enzyme mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht.

Im zweiten Versuch wurden hauptsächlich die Parameter des Schilddrüsenhormonstoffwechsels untersucht. Im Plasma wurden die Konzentrationen an T<sub>4</sub>, fT<sub>4</sub>, T<sub>3</sub> und TSH gemessen. An Schilddrüsen Schnitten wurden Follikeldurchmesser und Epithelhöhe gemessen. Außerdem wurde in den Schilddrüsen die Genexpression von Schilddrüsenperoxidase (TPO), Natrium/Jodid-Symporter (Na<sup>+</sup>/J<sup>-</sup>-SYM) und Glutathionperoxidase (GSH-Px) über semiquantitativer RT-PCR untersucht.

Im dritten Versuch wurden lediglich die Konzentrationen der Schilddrüsenhormone im Plasma ermittelt.

Die Selen- und Jodzulage sowie erhöhte Vitamin E-Versorgung hatten keinen Einfluß auf die Gewichtsentwicklung und Endgewichte der Ratten. Hingegen wurden bei der Fütterung oxidierter Fette etwas geringere Endgewichte der Ratten erzielt.

Erhitztes Fett führte zur Senkung der Triglyceridkonzentration in Plasma, Lipoproteinen geringer Dichte und Leber. Die verminderten Aktivitäten der lipogenen Enzyme FsS und G6PDH und verminderte relative Expression der Gene dieser Enzyme zeigten deutlich, daß die Fettsäuresynthese in der Leber auf der Ebene der Genexpression gehemmt wurde. Eine suboptimale Versorgung mit Selen und Jod hatte keinen Einfluß auf den Lipidstoffwechsel. Die Fütterung oxidierter Fette führte in allen drei Versuchen zu einer deutlichen Steigung der Plasmakonzentration an T<sub>4</sub> und fT<sub>4</sub>. Im dritten Versuch wurde dieser Effekt beim Fett # 2 am stärksten. Dies deutet drauf hin, daß nicht nur primäre, sondern auch sekundäre Lipidperoxidationsprodukte die Plasmakonzentration an T<sub>4</sub> und fT<sub>4</sub> erhöhen. Die Unterschiede in der Selen-, Jod- und Vitamin E-Versorgung hatten keinen Einfluß auf die Plasmakonzentration an T<sub>4</sub> und fT<sub>4</sub>. Weder die Art der Behandlung der oxidierten Fette, noch

die Höhe der Selen-, Jod- bzw. Vitamin E-Versorgung der Versuchstiere hatten einen Einfluß auf die Plasmakonzentration an  $T_3$  und TSH.

Die Fütterung oxidiertes Fett induziert auch einen Anstieg der Epithelzellhöhe sowie eine Verringerung der Follikeldurchmesser in der Schilddrüse. Moderater Jodmangel führte bei Fütterung frischer Fette erwartungsgemäß zu einer Senkung der Plasmakonzentration an  $T_4$ . Hingegen führte die Fütterung oxidiertes Fett auch bei moderatem Jodmangel zu einem Anstieg der  $T_4$ -Konzentration im Plasma, so daß das Niveau adäquater Jodversorgung erreicht wurde. Die Höhe der Epithelzellen war durch den Jodmangel erwartungsgemäß erhöht, bei Fütterung oxidiertes Fett wurde sie noch zusätzlich gesteigert. Der Durchmesser der Schilddrüsenfollikel wurde durch den Jodmangel erwartungsgemäß verringert, bei Fütterung oxidiertes Fett wurde er noch zusätzlich verringert. Die Fütterung oxidiertes Fett führte in der Schilddrüse zu einer erhöhten relativen Expression der die Enzyme TPO und GSH-Px codierenden Gene und zu einer extrem geringen Expression des codierenden Gens für den  $Na^+/J^-$ -SYM. Auf die Expression der TPO- und GSH-Px-Gene hatte die Jodversorgung keinen Einfluß. Hingegen wurde die Expression des  $Na^+/J^-$ -SYM durch moderaten Jodmangel unabhängig von der Art des Fettes stimuliert.

Die Fütterung des oxidiertes Fettes verschlechterte den Selenstatus der Versuchstiere. Bei Tieren mit suboptimaler Selenversorgung wurde dieser Effekt noch verstärkt. Dieser Effekt war bei knapper Selenversorgung stärker als bei ausreichender Selenversorgung. Die Ergebnisse zeigen insgesamt, daß bei Fütterung oxidiertes Fett der Selenbedarf bei der Ratte erhöht wird.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie beweisen, daß die verminderte Triglyceridkonzentrationen in Plasma und Leber auf eine gehemmte eigene Lipidsynthese zurückzuführen sind. Diese Hemmung beruht auf einer verminderten genetischen Expression. Es konnte gezeigt werden, daß die Expression der Gene lipogener Enzyme von Selenversorgung unabhängig ist.

Es konnte außerdem gezeigt werden, daß oxidiertes Fett die Schilddrüsenfunktion stimulieren. Durch Fütterung oxidiertes Fett wurden wahrscheinlich größere Mengen an Thyroxin synthetisiert und in das Blut freigesetzt, möglicherweise als Folge eines verstärkten Jodierens des Thyreoglobulins durch die TPO. Die Synthese und Sekretion des  $T_4$  bei Fütterung oxidiertes Fett ist offensichtlich von der Vitamin E-Versorgung unabhängig.



## Summary

Thermally oxidized fats contain a large number of primary and secondary lipid peroxidation products which are known to affect animal metabolism in several ways. Recent studies in rats and miniature pigs demonstrated that feeding diets with thermally treated oils influences not only the antioxidant defence system but also the lipid metabolism. Feeding diets with oxidized oils lowered the concentrations of triglycerides in plasma and liver. Furthermore, feeding diets with oxidized oils increases the concentrations of free and total thyroxine in plasma. The mechanism by which oxidized fats raise plasma thyroxine levels and lower plasma and liver triglyceride levels is not fully understood.

In the present study, three experiments with male Sprague-Dawley rats were carried out. The rats were fed restricted amounts of diets with fresh or thermally oxidized fats.

As control fats the fresh fats (sunflower oil/lard and sunflower oil/palm oil mixtures) were used. Oxidized fats used in the experiments were identical to control fats but thermally treated at different temperatures over different periods. Peroxide value, acid value, concentrations of thiobarbituric acid reactive substances and also the fatty acid composition of the dietary fats were considered as a measure of oxidation of unsaturated fatty acids.

In the first experiment, the fats were prepared by heating at 50 °C over a period of 6 weeks. Selenium concentrations was varied because of its important role in antioxidant defence system and in the metabolism of thyroid hormones.

In the second experiment, the fats were prepared by heating at 55 °C over a period of 5 weeks. In that experiment the concentrations of iodine was varied to study the effects of oxidized fats on the thyroid metabolism in the state of iodine deficiency.

In the third experiment the fats were prepared at different temperatures over different periods. The fat # 1 was prepared by heating at 50 °C over a period of 5 weeks, the fat # 2 at 105 °C over 81 hours and the fat # 3 at 190 °C over 24 hours. Besides the fat also vitamin E concentrations of the diets were varied to investigate whether the effects of oxidized fats on thyroid hormone metabolism are dependent on the vitamin E supply.

In the first experiment the selenium concentrations in plasma and liver, the activity of selenium dependent glutathione peroxidase (GSH-Px) in plasma, total and free thyroxine ( $T_4$  and  $fT_4$ ) triiodthyronine ( $T_3$ ) and thyroid stimulating hormone (TSH) concentrations in plasma, the triglyceride concentration in plasma, lipoproteins and liver and also the activities of lipogenic enzymes glucose-6-phosphate dehydrogenase and fatty acid synthetase were measured.

In the second experiment, analysis was focused on thyroid hormone metabolism. The concentrations of T<sub>4</sub>, fT<sub>4</sub>, T<sub>3</sub> and TSH were measured. The follicle diameter and the height of follicular cells were measured in thyroid slices. Furthermore, the gene expression of thyroid peroxidase (TPO), sodium/iodide symporter (Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>-SYM) and GSH-Px in the thyroid were measured by semi quantitative RT-PCR.

In the third experiment, the concentrations of thyroid hormones were measured.

The selenium, iodine and Vitamin E supplementation had no effect on body weight development and final body weight of rats. On the other hand, the final body weight of rats was decreased by thermally oxidised oils at lower vitamin E supplementation.

Feeding of the diets with oxidized fats results in a decrease of triglyceride concentrations in plasma, lipoproteins and liver. The decreased activity of lipogenic enzymes FAS and G6PDH and decreased gene expression of both enzymes showed that the fatty acid synthesis is lowered due to lowered gene expression of lipogenic enzymes. The suboptimal selenium and iodine status did not influence the lipid metabolism.

The rats fed all types of oxidized fats in all three experiments had higher concentrations of T<sub>4</sub> and fT<sub>4</sub> in plasma than rats fed the equivalent diets with fresh oil. In third experiment the concentration of T<sub>4</sub> and fT<sub>4</sub> were strongest increased by fat # 2. This indicates that not only primary, but also secondary lipid peroxidation products elevate the plasma concentrations of T<sub>4</sub> and fT<sub>4</sub>. Different selenium, iodine and vitamin E supply had no influence on T<sub>4</sub> and fT<sub>4</sub> concentration in plasma. Different thermally oxidation of fats, selenium, iodine and vitamin E supply had no effect on plasma T<sub>3</sub> and TSH concentrations.

Feeding oxidized fats on rats induces elevation of the follicular cell height and reduces the follicle diameter in the thyroid. As expected, moderate iodine deficiency lowered the concentration of T<sub>4</sub> in plasma, increased the follicular cell height and lowered the follicle diameter in the thyroid. Feeding of the diets with oxidized fats elevated T<sub>4</sub> and fT<sub>4</sub> concentrations in plasma regardless to iodine deficiency. Further more, feeding oxidized fats increased the effect of iodine deficiency such as elevating of follicular cell high and decreasing of follicle diameter. Feeding oxidized fats elevated also gene expression of TPO and GSH-Px and markedly decreased the gene expression of Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>-SYM in the thyroid. Iodine supply had no effect on the expression of TPO and GSH-Px genes. On the other hand, expression of Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>-SYM was stimulated by iodine deficiency independent of fat source.

Feeding oxidized fats reduced the selenium status in rats. This effect of oxidized fats was stronger in rats fed low selenium diets than in rats fed selenium-adequate diets. Thus, this study indicates that the feeding oxidized fats increased selenium requirement of rat.

The results of this study shows that the reduced triglyceride concentrations in plasma and liver are due to impaired gene expression of lipogenic enzymes but not to reduced selenium status induced by oxidized fats.

Furthermore this study indicates that oxidized fats stimulate the thyroid function probably as consequence of increased thyroxine secretion to blood as function of higher iodination of the thyreoglobulin through TPO. This phenomena might not be due to oxidative stress of thyroid or reduced selenium status induced by oxidized fats.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akamizu, T.; Ikuyama, S.; Saji, M.; Kosugi, S.; Kozak, C.; McBride, O. W. und Kohn, L. D. (1990). Cloning, chromosomal assignment, and regulation of the rat thyrotropin receptor: expression of the gene is regulated by thyrotropin, agents that increase cAMP levels, and thyroid autoantibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** (15): 5677-5681
- Arthur, J. R.; Nicol, F.; Mitchell, J. H. und Beckett, G. J. (1997). Selenium and iodine deficiencies and selenoprotein function. *Biomed. Environ. Sci.* **10** (2-3): 129-135
- Bagchi, N. und Fawcett, D. M. (1973). Role of sodium ion in active transport of iodide by cultured thyroid cells. *Biochim. Biophys. Acta* **318** (2): 235-251
- Balz, M.K.; Schulte, E. und Thier, H.-P. (1993). Simultaneous Determination of  $\alpha$ -Tocopheryl Acetate, Tocopherols and Tocotrienols by HPLC with Fluorescence Detection in Foods. *Fat. Sci. Technol.* **95** (6): 215-220
- Beere, H. M.; Tomlinson, S. und Bidey, S. P. (1990). Iodide autoregulation of functional and morphological differentiation events in the FRTL-5 rat thyroid cell strain. *J. Endocrinol.* **124** (1): 19-25
- Bermano, G.; Arthur, J. R. und Hesketh, J. E. (1996a). Role of the 3' untranslated region in the regulation of cytosolic glutathione peroxidase and phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene expression by selenium supply. *Biochem. J.* **320** (Pt 3): 891-895
- Bermano, G.; Arthur, J. R. und Hesketh, J. E. (1996b). Selective control of cytosolic glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase mRNA stability by selenium supply. *FEBS Lett.* **387** (2-3): 157-160
- Bermano, G.; Nicol, F.; Dyer, J. A.; Sunde, R. A.; Beckett, G. J.; Arthur, J. R. und Hesketh, J. E. (1995). Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *Biochem. J.* **311** (Pt 2): 425-430
- Bidey, S.P. und Cowin, A.J. (1995). Regulation of Hormonogenesis in the normal Thyroid Gland. In: Rayner, D.C. und Champion, B.R.: *Thyroid Autoimmunity*. New York-Berlin, Springer. 2-43
- Bjorkman, U. und Ekholm, R. (1992). Hydrogen peroxide generation and its regulation in FRTL-5 and porcine thyroid cells. *Endocrinol.* **130** (1): 393-399
- Bjorkman, U. und Ekholm, R. (1995). Hydrogen peroxide degradation and glutathione peroxidase activity in cultures of thyroid cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **111** (1): 99-107

- Blanc, P., Revol, A. und Pacheco, H. (1992). Chronical ingestion of oxidised oil in the rat: Effect on lipid composition and on cytidyl transferase activity in various tissues. *Nutr. Res.* **12**: 833-844
- Böck (1989). Färben. In: Böck, P.: *Romeis Mikroskopische Technik*. München, Urban und Schwarzenberg. 181-304
- Bonanome, A. und Grundy, S. M. (1988). Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *N. Engl. J. Med.* **318** (19): 1244-1248
- Borsting, C.F.; Engberg, R.M.; Jakobsen, K., Jensen, S.K. und Andersen, J.O. (1994). Inclusion of oxidised fish oil in mink diets. 1. The influence on nutrient digestibility and fatty-acid accumulation in tissues. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* **72**: 132-145
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of Protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 255-260
- Brussaard, J. H.; Dallinga-Thie, G.; Groot, P. H. und Katan, M. B. (1980). Effects of amount and type of dietary fat on serum lipids, lipoproteins and apolipoproteins in man. A controlled 8-week trial. *Atherosclerosis* **36** (4): 515-527
- Bucher, O. (1938). Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Fixiermittel auf das Verhalten des Schilddrüsenkoloids. *Z. Zellforsch.* **28**: 359
- Burk, R.F. und Hill, K.E. (1993). Regulation of selenoproteins. *Annu. Rev. Nutr.* **13**: 65-81
- Burton, G.W. und Ingold, K.U. (1989). Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **570**: 7-22
- Butte, W.; Kirsch, M. und Denker, J. (1983). The determination of pentachlorophenol and tetrachlorophenols in wadden sediment and clams (*Mya arenaria*) using triethylsulfonium hydroxide for extraction and pyrolytic ethylation. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **13** (2): 141-153
- Caillou, B.; Troalen, F.; Baudin, E.; Talbot, M.; Filetti, S.; Schlumberger, M. und Bidart, J. M. (1998).  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  symporter distribution in human thyroid tissues: an immunohistochemical study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83** (11): 4102-41026
- Campos-Barros, A.; Meinhold, H.; Walzog, B. und Behne, D. (1997). Effects of selenium and iodine deficiency on thyroid hormone concentrations in the central nervous system of the rat. *Eur. J. Endocrinol.* **136** (3): 316-323
- Carrasco, N. (1993). Iodide transport in the thyroid gland. *Biochim. Biophys. Acta* **1154** (1): 65-82

- Chait, A.; Nicoll, A. und Lewis, B. (1974a). Proceedings: Unsaturated fat and plasma triglyceride metabolism in man. *Clin. Sci. Mol. Med.* **46** (2): 12-13
- Chait, A.; Onitiri, A.; Nicoll, A.; Rabaya, E.; Davies, J. und Lewis, B. (1974b). Reduction of serum triglyceride levels by polyunsaturated fat. Studies on the mode of action and on very low density lipoprotein composition. *Atherosclerosis* **20** (2): 347-364
- Chao, P.M. und Huang, C.J. (2001). Activation of PPAR-alpha by dietary oxidised frying oil. *Ann. Nutr. Metab.* **45** (Suppl 1): 389
- Chen, G.; Pekary, A. E.; Sugawara, M. und Hershman, J. M. (1993). Effect of exogenous hydrogen peroxide on iodide transport and iodine organification in FRTL-5 rat thyroid cells. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* **129** (1): 89-96
- Chirgwin, J. M.; Przybyla, A. E.; MacDonald, R. J. und Rutter, W. J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18** (24): 5294-5299
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162** (1): 156-159
- Christensen, M. J. und Burgener, K. W. (1992). Dietary selenium stabilizes glutathione peroxidase mRNA in rat liver. *J. Nutr.* **122** (8): 1620-1626
- Christiansen, E. N.; Lund, J. S.; Rortveit, T. und Rustan, A. C. (1991). Effect of dietary n-3 and n-6 fatty acids on fatty acid desaturation in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **1082** (1): 57-62
- Civitareale, D.; Castelli, M. P.; Falasca, P. und Saiardi, A. (1993). Thyroid transcription factor 1 activates the promoter of the thyrotropin receptor gene. *Mol. Endocrinol.* **7** (12): 1589-1595
- Clarke, S. D.; Armstrong, M. K. und Jump, D. B. (1990). Dietary polyunsaturated fats uniquely suppress rat liver fatty acid synthase and S14 mRNA content. *J. Nutr.* **120** (2): 225-231
- Coors, U. (1991). Anwendung des Tocopherolmusters zur Erkennung von Fett- und Ölvermischungen. *Fat. Sci. Technol.* **93**: 519-526
- Conda, D.; Marcocci, C.; Kohn, L. D.; Axelrod, J. und Luini, A. (1985). Association of the changes in cytosolic Ca<sup>2+</sup> and iodide efflux induced by thyrotropin and by the stimulation of alpha 1-adrenergic receptors in cultured rat thyroid cells. *J. Biol. Chem.* **260** (16): 9230-9236

- Corvilain, B.; van Sande, J.; Laurent, E. und Dumont, J. E. (1991). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating system modulates protein iodination and the activity of the pentose phosphate pathway in dog thyroid. *Endocrinol.* **128** (2): 779-785
- Corvilain, B.; Contempre, B.; Longombe, A.O.; Goyens, P.; Gervy-Decoster, C.; Lamy, F.; Vanderpas, J.B. und Dumont, J.E. (1993). Selenium and the thyroid: How relationship was established. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**: 2445-2485
- Cunnane, S.C.; Huang, Y.S. und Manku, M.S. (1986). Triacylglycerol content of arachidonic acid varies inversely with total triacylglycerol in liver und plasma. *Biochim. Biophys. Acta* **876**: 183-186
- Dänicke, S.; Jeroch, H.; Simon, O. und Bedford, M.R. (1999). Interactions between dietary fat type and exogenous enzyme supplementation of broiler diets based on maize, wheat, triticale or barley. *J. Anim. Feed Sci.* **8**: 467-483
- D'Aquino, M.; Benedetti, P. C.; Di Felice, M.; Gentili, V.; Tomassi, G.; Maiorino, M. und Ursini, F. (1991). Effect of fish oil and coconut oil on antioxidant defence system and lipid peroxidation in rat liver. *Free Radic. Res. Commun.* **12-13** (1): 147-152
- D'Aquino, M.; Di Felice, M. und Tomassi, G. (1985). Vitamin E status and effects of thermoxidised fats on structural  $\alpha$ -tocopherol and fatty acid of different rat tissues. *Nutr. Rep. Int.* **32** (5): 1179-1186
- Davies, T. F.; Yang, C. und Platzer, M. (1987). Cloning the Fisher rat thyroid cell line (FRTL-5): variability in clonal growth and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response to thyrotropin. *Endocrinol.* **121** (1): 78-83
- De La Vieja, A.; Dohan, O.; Levy, O. und Carrasco, N. (2000). Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiol. Rev.* **80** (3): 1083-1105
- Degroot, L. J. und Niepomniszcze, H. (1977). Biosynthesis of thyroid hormone: basic and clinical aspects. *Metabolism* **26** (6): 665-718
- DePillis, G. D.; Ozaki, Si; Kuo, J. M.; Maltby, D. A. und Ortiz de Montellano, P. R. (1997). Autocatalytic processing of heme by lactoperoxidase produces the native protein-bound prosthetic group. *J. Biol. Chem.* **272** (14): 8857-8860
- Deutsch, J. (1995). Glucose-6-phosphat Dehydrogenase. In: Begmeyer, H.U.; Begmeyer, J. und Graßl, M.: *Methods of enzymatic analysis*. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft mbH
- DGF (1994a). Peroxidzahl.: Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen. Stuttgart, WVG. F-1, 3b (84)

- DGF (1994b). Säurezahl.: Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen. Stuttgart, WVG. C-V 2 (81)
- Dieber-Rotheneder, M.; Puhl, H.; Waeg, G.; Striegl, G. und Esterbauer, H. (1991). Effect of oral supplementation with D- $\alpha$ -tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. *J. Lipid. Res.* **32** (8): 1325-1332
- Dreyer, C.; Keller, H.; Mahfoudi, A.; Laudet, V.; Krey, G. und Wahli, W. (1993). Positive regulation of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome peroliverator-activated receptors (PPAR). *Biol. Cell* **77** (1): 67-76
- Dumont, J.; Roger, P. P.; Van Hauverswyn, B. (1984). Control of growth and differentiation by known intracellular signalling molecules in endocrine tissues: example of the thyroid gland. *Cyc. Nucl. Prot. Phos. Res.* **17**: 337-346
- Dunn, A. D.; Crutchfield, H. E. und Dunn, J. T. (1991). Proteolytic processing of thyroglobulin by extracts of thyroid lysosomes. *Endocrinol.* **128** (6): 3073-3080
- Dunn, J. T. (1995). Thyroglobulin, hormone synthesis and thyroid disease. *Eur. J. Endocrinol.* **132** (5): 603-604
- Dunn, J. T. (1996). Thyroglobulin: Chemistry and Biosynthesis. In: Braverman, L. E. und Utiger, R. D.: *Werner und Ingbar's The Thyroid*. Philadelphia, Lippcott-Raven Publishers. 85-95
- Eder, K. (1999). The effects of a dietary oxidized oil on lipid metabolism in rats. *Lipids* **34** (7): 717-725
- Eder, K. und Kirchgessner, M. (1994). The effect of zinc deficiency on erythrocyte membrane lipids of force-fed rats receiving a diet containing coconut oil or fish oil. *J. Trace Elem. Electrol. Health. Disease* **8**: 63-73
- Eder, K. und Kirchgessner, M. (1997a). The effect of a moderately oxidised soybean oil on lipid peroxidation in rat low-density lipoproteins at low and high dietary vitamin E levels. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* **78**: 230-243
- Eder, K. und Kirchgessner, M. (1997b). Zum Einfluß verschiedener Fette auf die Konzentration der Schilddrüsenhormone im Plasma beim Schwein. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* **77**: 149-152
- Eder, K. und Kirchgessner, M. (1998a). The effect of dietary vitamin E supply and a moderately oxidized oil on activities of hepatic lipogenic enzymes in rats. *Lipids* **33** (3): 277-283



- Eder, K. und Kirchgessner, M. (1998b). Vitamin E status and tissue fatty acid composition in rats fed a moderately oxidized soybean oil at low or high vitamin E supply. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* **79**: 80-91
- Eder, K. und Kirchgessner, M. (1999). The effect of a moderately thermoxidised dietary fat on the vitamin E status, the fatty acid composition of tissue lipids, and the susceptibility of low-density lipoproteins to lipid peroxidation in rats. *Fett/Lipid* **101** (5): 178-184
- Eder, K.; Kralik, A. und Kirchgessner, M. (1995). Effect on metabolism of thyroid hormones in deficient to subtoxic selenium supply levels. *Z. Ernährungswiss.* **34** (4): 277-283
- Eder, K. und Stangl, G. I. (2000). Plasma thyroxine and cholesterol concentrations of miniature pigs are influenced by thermally oxidized dietary lipids. *J. Nutr.* **130** (1): 116-121
- Ekholm, R. und Bjorkman, U. (1997). Glutathione peroxidase degrades intracellular hydrogen peroxide and thereby inhibits intracellular protein iodination in thyroid epithelium. *Endocrinol.* **138** (7): 2871-2878
- Endo, T.; Kaneshige, M.; Nakazato, M.; Ohmori, M.; Harii, N. und Onaya, T. (1997). Thyroid transcription factor-1 activates the promoter activity of rat thyroid Na<sup>+</sup>/I symporter gene. *Mol. Endocrinol.* **11** (11): 1747-1755
- Eng, P. H.; Cardona, G. R.; Previti, M. C.; Chin, W. W. und Braverman, L. E. (2001). Regulation of the sodium iodide symporter by iodide in FRTL-5 cells. *Eur. J. Endocrinol.* **144** (2): 139-144
- Engberg, R. M. und Borgsting, C. F. (1993). Inclusion of oxidised fish oil in mink diets. 2. The influence on performace and health considering histopathological, clinical-chemical, and haematological indices. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* **72**: 146-157
- Engberg, R. M.; Lauridsen, C.; Jensen, S. K. und Jakobsen, K. (1996). Inclusion of oxidized vegetable oil in broiler diets. Its influence on nutrient balance and on the antioxidative status of broilers. *Poult. Sci.* **75** (8): 1003-1011
- Eskandari, S.; Loo, D. D.; Dai, G.; Levy, O.; Wright, E. M. und Carrasco, N. (1997). Thyroid Na<sup>+</sup>/I symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J. Biol. Chem.* **272** (43): 27230-27238
- Esterbauer, H.; Jürgens, G; Quehenberger, O. und Koller, E (1987). Autooxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J. Lipid Res.* **28**: 495-509

- Esterbauer, H.; Striegl, G.; Puhl, H. und Rotheneder, M. (1989). Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free. Radic. Res. Commun.* **6** (1): 67-75
- Fayadat, L.; Niccoli-Sire, P.; Lanet, J. und Franc, J. L. (1998). Human thyroperoxidase is largely retained and rapidly degraded in the endoplasmic reticulum. Its N-glycans are required for folding and intracellular trafficking. *Endocrinol.* **139** (10): 4277-4285
- Fayadat, L.; Niccoli-Sire, P.; Lanet, J. und Franc, J. L. (1999). Role of heme in intracellular trafficking of thyroperoxidase and involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated at the apical surface of thyroid cells in autocatalytic covalent heme binding. *J. Biol. Chem.* **274** (15): 10533-10538
- Fayadat, L.; Siffroi-Fernandez, S.; Lanet, J. und Franc, J. L. (2000). Degradation of human thyroperoxidase in the endoplasmic reticulum involves two different pathways depending on the folding state of the protein. *J. Biol. Chem.* **275** (21): 15948-15954
- Fecher, P. A.; Goldmann, I.; Nagengast, A. (1998). Determination of iodine in food samples by inductively coupled plasma mass spectrometry after alkaline extraction. *J. Anal. Atomic. Spect.* **13**: 977-982
- Findlay, G.M.; Draper, H.H. und Bergan, J.G. (1970). Metabolism of l-<sup>14</sup>C-methyl linolate hydroperoxide in the rabbit. *Lipids* **5**: 970-975
- Fischer, W.C. und Whanger, P.D. (1977). Effect of selenium deficiency on vitamin E metabolism in Rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **23** (4): 273-280
- Foufelle, F.; Perdereau, D.; Gouhot, B.; Ferre, P. und Girard, J. (1992). Effect of diets rich in medium-chain and long-chain triglycerides on lipogenic-enzyme gene expression in liver and adipose tissue of the weaned rat. *Eur. J. Biochem.* **208** (2): 381-387
- Fowler, K.L.; Brown, C.G.; Collins, P.C. und Attrwill, C.K. (1989). Investigation on the relationship between TSH activateg Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase and iodine accomulation by rat FRTL-5 cells. *FRTL-5 Today. Proceedings of the first international workshop on characterisation and standardisation of an in vitro thyroid cell system., Udine, Excerpta Medica.*
- Frankel, E.N. (1989). The antioxidant and nutritional effect of tocopherols, ascorbic acid and beta-carotene in relation to processing of edile oils. *Bibl. Nutr. Dieta* **43**: 297-312
- Garg, M. L.; Thomson, A. B. und Clandinin, M. T. (1988). Effect of dietary cholesterol and/or omega 3 fatty acids on lipid composition and delta 5-desaturase activity of rat liver microsomes. *J. Nutr.* **118** (6): 661-668

- Gerard, C.; Rigot, V. und Penel, C. (1994). Chloride channel blockers inhibit the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter in thyroid follicles in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204** (3): 1265-1271
- Girard, J.; Perdereau, D.; Fougelle, F.; Prip-Buus, C. und Ferre, P. (1994). Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *Faseb. J.* **8** (1): 36-42
- Girotti, A.W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* **39**: 1529-1542
- Golstein, P.; Abramow, M.; Dumont, J. E. und Beauwens, R. (1992). The iodide channel of the thyroid: a plasma membrane vesicle study. *Am. J. Physiol.* **263** (3 Pt 1): C590-C597
- Golstein, P. E.; Sener, A. und Beauwens, R. (1995). The iodide channel of the thyroid. II. Selective iodide conductance inserted into liposomes. *Am. J. Physiol.* **268** (1 Pt 1): C111-C118
- Gromadzinska, J.; Sklodowska, M. und Wasowicz, W. (1988). Glutathione peroxidase activity, lipid peroxides and selenium concentration in various rat organs. *Biomed. Biochim. Acta* **47** (1): 19-24
- Gross, M.; Oertel, M. und Kohrle, J. (1995). Differential selenium-dependent expression of type I 5'-deiodinase and glutathione peroxidase in the porcine epithelial kidney cell line LLC- PK1. *Biochem. J.* **306** (3): 851-856
- Gruffat, D.; Venot, N.; Marriq, C. und Chabaud, O. (1992). Thyroid hormone synthesis in thyroglobulin secreted by porcine thyroid cells cultured on porous bottom chambers. Effect of iodide. *Endocrinol.* **131** (6): 2921-2927
- Gupta, R.P.; Verma, P.C. und Garg, S.L. (1997). Effect of experimental zinc deficiency on thyroid gland in guinea pigs. *Ann. Nutr. Metab.* **41**: 376-381
- Hagemann, P.; Rosenmund, K. (1989). *Histotechnik*. Stuttgart, S. Hirzel Verlag.
- Halliwell, B. und Gutteridge, J. M. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* **280** (1): 1-8
- Hara, A. und Radin, N. S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* **90** (1): 420-426
- Hartfiel, W. und Oberbach, H. (1990). Auswirkungen oxidierter Fettsäuren auf landwirtschaftliche Nutztiere bei Unterversorgung mit Vitamin E und Selen. *Fat. Sci. Technol.* **92** (2): 80-85
- Hayam, I. Cogan, U. und Mokady, S. (1995). Dietary oxidised oil and the activity of antioxidant enzymes and lipoprotein peroxidations in rats. *Nutrition Research* **15** (7): 1037-1044

- Hochgraf, E.; Mokady, S. und Cogan, U. (1997). Dietary oxidized linoleic acid modifies lipid composition of rat liver microsomes and increases their fluidity. *J. Nutr.* **127** (5): 681-686
- Hsu, S.C. und Huang, C.J. (2001a). Effect of high fat diets on the mRNA expression of PPAR-alpha and its target gene after fasting. *Ann. Nutr. Metab.* **45** (Suppl 1): 83
- Hsu, S.C. und Huang, C.J. (2001b). Effect of high safflower oil or fish oil diets on the mRNA expression of PPAR-alpha and its target gene after fasting. *Ann. Nutr. Metab.* **45** (Suppl 1): 92
- Huang, C. J., Cheung, N. S. und Lu, V. R. (1988). Effect of deteriorated frying oil and dietary protein levels on liver microsomal enzymes in rats. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* **65**: 1796-1803
- Iritani, N.; Hosomi, H.; Fukuda, H. und Ikeda, H. (1995). Polyunsaturated fatty acid regulation of lipogenic enzyme gene expression in liver of genetically obese rat. *Biochim. Biophys. Acta* **1255** (1): 1-8
- Jeroch, H.; Drochner, W. und Simon, O. (1999). Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere. Stuttgart, Eugen Ulmer.
- Jessup, W.; Rankin, S. M.; De Whalley, C. V.; Hoult, J. R.; Scott, J. und Leake, D. S. (1990). Alpha-tocopherol consumption during low-density-lipoprotein oxidation. *Biochem. J.* **265** (2): 399-405
- Jialal, I. und Grundy, S. M. (1992). Effect of dietary supplementation with alpha-tocopherol on the oxidative modification of low density lipoprotein. *J. Lipid. Res.* **33** (6): 899-906
- Jump, D.B.; Thelen, A. und Mater, M. (1999). Dietary polyunsaturated fatty acids and hepatic gene expression. *Lipids* **34** (Suppl): S209-S212
- Kaminsky, S. M.; Levy, O.; Salvador, C.; Dai, G. und Carrasco, N. (1994). Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symport activity is present in membrane vesicles from thyrotropin-deprived non-I<sup>-</sup>-transporting cultured thyroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** (9): 3789-3793
- Kanazawa, K.; Kanazawa, E. und Nataka, M. (1985). Uptake of secondary autoxidation products of linoleic acid by the rat. *Lipids* **20** (7): 412-419.
- Katzeff, H. L.; Yang, M. U.; Presta, E.; Leibel, R. L.; Hirsch, J. und Van Itallie, T. B. (1990). Calorie restriction and iopanoic acid effects on thyroid hormone metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* **52** (2): 263-266
- Kirchgessner, M.; Paulicks, B.R. und Eder, K. (1995). Zur Bedarf essentieller nähr- und Wirkstoffe. *Perspektywy Hodowli Zwierzatw Polsce*, Wroclaw.
- Kleinveld, H.A.; Hak-Lemmers, H.L.M.; Stalenhoef, A.F.H. und Demacker, P.N.M. (1992). Improved measurement of low density lipoprotein susceptibility to copper induced

- oxidation: Application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein. *Clin. Chem.* **38** (10): 2066-2072
- Kogai, T.; Endo, T.; Saito, T.; Miyazaki, A.; Kawaguchi, A. und Onaya, T. (1997). Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinol.* **138** (6): 2227-2232
- Kogai, T.; Schultz, J. J.; Johnson, L. S.; Huang, M. und Brent, G. A. (2000). Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF-7 breast cancer cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (15): 8519-8524
- Köhler, Th. (1995). General Aspects and Chances of Nucleic Acid Quantification by PCR. In: Köhler, Th.; Laßner, D.; Rost, A.K.; Thamm, B.; Pustowitz, B. und Remke, H.: Quantitation of mRNA by Polymerase Chain Reaction. Berlin Heidelberg, Springer Verlag. 3-14
- Kohrle, J.; Oertel, M. und Gross, M. (1992). Selenium supply regulates thyroid function, thyroid hormone synthesis and metabolism by altering the expression of the selenoenzymes Type I 5'-deiodinase and glutathione peroxidase. *Thyroidology* **4** (1): 17-21
- Koolman, J. und Röhm, K.-H. (1994). Taschenatlas der Biochemie. Stuttgart-New York, Georg Thieme Taschenatlas Verlag.
- Kostrouch, Z.; Bernier-Valentin, F.; Munari-Silem, Y.; Rajas, F.; Rabilloud, R. und Rousset, B. (1993). Thyroglobulin molecules internalized by thyrocytes are sorted in early endosomes and partially recycled back to the follicular lumen. *Endocrinol.* **132** (6): 2645-2653
- Kralik, A; Eder, K und Kirchgessner, M. (1995). Influence of Zinc and Selenium Deficiency on Parameters Relating to Thyroid Hormone Metabolism. *Horm. Metab. Res.* **28**: 223-226
- Lane, H. W.; Strength, R.; Johnson, J. und White, M. (1991). Effect of chemical form of selenium on tissue glutathione peroxidase activity in developing rats. *J. Nutr.* **121** (1): 80-86
- Lazar, V.; Bidart, J. M.; Caillou, B.; Mahe, C.; Lacroix, L.; Filetti, S. und Schlumberger, M. (1999). Expression of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84** (9): 3228-3234
- Lee, J.H.; Fukumoto, M.; Nishida, H.; Ikeda, I. und Sugano, M. (1989). The interrelated effect of n-6/n-3 and polyunsaturated/saturated rations of dietary fats on the regulation of lipid metabolism in rats. *J. Nutr.* **119**: 1893-1899

- Leer, L. M.; Ossendorp, F. A. und de Vijlder, J. J. (1990). TSH action on iodination in FRTL-5 cells. *Horm. Metab. Res. Suppl.* **23**: 43-46
- Lei, X. G.; Evenson, J. K.; Thompson, K. M. und Sunde, R. A. (1995). Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium. *J. Nutr.* **125** (6): 1438-1446
- Levander, O. A.; DeLoach, D. P.; Morris, V. C. und Moser, P. B. (1983). Platelet glutathione peroxidase activity as an index of selenium status in rats. *J. Nutr.* **113** (1): 55-63
- Leyton, J.; Drury, P.J. und Crawford, M.A. (1987). Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in the rat. *Br. J. Nutr.* **57**: 383-393
- Lin, F.J.; Tang, Y.L.; Wu, Y.J. und Hunag, C.J. (2001). Isoformes of liver microsomal cytochrome P-450 of rats fed oxidised frying oil. *Ann. Nutr. Metab.* **45** (Suppl 1): 389
- Liu, J. F. und Huang, C. J. (1995). Tissue  $\alpha$ -tocopherol retention in male rats is compromised by feeding diets containing oxidized frying oil. *J. Nutr.* **125** (12): 3071-3080
- Lowry, O. H. Rosenbrouggh, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275
- Maenhaut, C.; Roger, P. P.; Reuse, S. und Dumont, J. E. (1991). Activation of the cyclic AMP cascade as an oncogenic mechanism: the thyroid example. *Biochimie* **73** (1): 29-36
- Marino, M.; Chiovato, L.; Mitsiades, N.; Latrofa, F.; Andrews, D.; Tseleni-Balafouta, S.; Collins, A. B.; Pinchera, A. und McCluskey, R. T. (2000a). Circulating thyroglobulin transcytosed by thyroid cells in complexed with secretory components of its endocytic receptor megalin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85** (9): 3458-3467
- Marino, M.; Zheng, G.; Chiovato, L.; Pinchera, A.; Brown, D.; Andrews, D. und McCluskey, R. T. (2000b). Role of megalin (gp330) in transcytosis of thyroglobulin by thyroid cells. A novel function in the control of thyroid hormone release. *J. Biol. Chem.* **275** (10): 7125-7137
- Marino, M. und McCluskey, R. T. (2000c). Role of thyroglobulin endocytic pathways in the control of thyroid hormone release. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **279** (5): C1295-C1306
- Marino, M.; Zheng, G. und McCluskey, R. T. (1999). Megalin (gp330) is an endocytic receptor for thyroglobulin on cultured fisher rat thyroid cells. *J. Biol. Chem.* **274** (18): 12898-128904
- Marklund, S. und Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47** (3): 469-474

- Martin, J. C.; Joffre, F.; Siess, M. H.; Vernevaut, M. F.; Collenot, P.; Genty, M. und Sebedio, J. L. (2000). Cyclic fatty acid monomers from heated oil modify the activities of lipid synthesizing and oxidizing enzymes in rat liver. *J. Nutr.* **130** (6): 1524-1530
- Meinhold, H.; Campos-Barros, A.; Walzog, B.; Kohler, R.; Muller, F. und Behne, D. (1993). Effects of selenium and iodine deficiency on type I, type II and type III iodothyronine deiodinases and circulating thyroid hormones in the rat. *Exp. Clin. Endocrinol.* **101** (2): 87-93
- Mensink, R. P. und Katan, M. B. (1987). Effect of monounsaturated fatty acids versus complex carbohydrates on high-density lipoproteins in healthy men and women. *Lancet* **1** (8525): 122-125
- Mensink, R.P. und Katan, M.B. (1989). Effect of diet enriched with monounsaturated or polyunsaturated fatty acids on levels of low-density and high-density lipoprotein cholesterol in healthy women and men. *N. Eng. J. Med.* **321** (7): 436-441
- Mezgrhani, H.; Mziaut, H.; Courageot, J.; Oughideni, R.; Bastiani, P. und Miquelis, R. (1997). Identification of the membrane receptor binding domain of thyroglobulin. Insights into quality control of thyroglobulin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **272** (37): 23340-23346
- Minamoto, S.; Kanazawa, K.; Ashida, H. und Natake, M. (1988). Effect of orally administered 9-oxononanoic acid on lipogenesis in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **958** (2): 199-204
- Mitchell, J. H.; Nicol, F.; Beckett, G. J. und Arthur, J. R. (1997). Selenium and iodine deficiencies: effects on brain and brown adipose tissue selenoenzyme activity and expression. *J. Endocrinol.* **155** (2): 255-263
- Morel, D.W.; de la Llera-Moya, M. und Friday, K.E. (1994). Treatment of cholesterol-fed rabbits with dietary vitamins E and C inhibits lipoprotein oxidation but not development of atherosclerosis. *J. Nutr.* **124**: 2123-2130
- Mori, Y.; Nishikawa, M.; Toyoda, N.; Yonemoto, T.; Matsubara, H. und Inada, M. (1991). Iodothyronine 5'-deiodinase activity in cultured rat myocardial cells: characteristics and effects of triiodothyronine and angiotensin II. *Endocrinol.* **128** (6): 3105-3012
- Muggli, R. (1994). Physiological requirements of vitamin E as a function of the amount and type of polyunsaturated fatty acid. *World Rev. Nutr. Diet* **75**: 166-168
- Nagataki, S. und Yokoyama, N. (1996). Other Factors Regulating Thyroid Functions. In: Braverman, L.E. und Utiger, R.D.: *Werner and Ingbar's The Thyroid*. Philadelphia, Lippcot-Raven Publishers. 241-247

- Nagayama, Y.; Yamashita, S.; Hirayu, H.; Izumi, M.; Uga, T.; Ishikawa, N.; Ito, K. und Nagataki, S. (1989). Regulation of thyroid peroxidase and thyroglobulin gene expression by thyrotropin in cultured human thyroid cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **68** (6): 1155-1159
- Nakamura, Y.; Makino, R.; Tanaka, T.; Ishimura, Y. und Ohtaki, S. (1991). Mechanism of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in porcine thyroid cells: evidence for intermediary formation of superoxide anion by NADPH-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating machinery. *Biochemistry* **30** (20): 4880-4886
- Nakamura, Y.; Ogihara, S. und Ohtaki, S. (1987). Activation by ATP of calcium-dependent NADPH-oxidase generating hydrogen peroxide in thyroid plasma membranes. *J. Biochem. (Tokyo)* **102** (5): 1121-1132
- Nakamura, Y.; Ohtaki, S.; Makino, R.; Tanaka, T. und Ishimura, Y. (1989). Superoxide anion is the initial product in the hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in porcine thyroid plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **264** (9): 4759-4761
- Nakamura, M.; Yamazaki, I. und Ohtaki, S. (1990). Iodothyronine-induced catalatic activity of thyroid peroxidase. *J. Biochem. (Tokyo)* **108** (5): 804-810
- Nakane, T.; Asayama, K.; Koreda, K.; Hayashibe, U.; Uchida, N. und Nakazawa, S. (1998). Effect of selenium deficiency on cellular and extracellular glutathione peroxidases: immunochemical detection and mRNA analysis in rat kidney and serum. *Free Radic. Biol. Med.* **25** (4-5): 504-511
- Nakazato, M.; Chung, H. K.; Ulianich, L.; Grassadonia, A.; Suzuki, K. und Kohn, L. D. (2000). Thyroglobulin repression of thyroid transcription factor 1 (TTF-1) gene expression is mediated by decreased DNA binding of nuclear factor I proteins which control constitutive TTF-1 expression. *Mol. Cell Biol.* **20** (22): 8499-8512
- Nasu, M. und Sugawara, M. (1994). Exogenous free iodotyrosine inhibits iodide transport through the sequential intracellular events. *Eur. J. Endocrinol.* **130** (6): 601-607
- Nepokroeff, C. M.; Lakshmanan, M. R. und Porter, J. W. (1975). Fatty-acid synthase from rat liver. *Methods. Enzymol.* **35**: 37-44
- Nestel, P. J.; Connor, W. E.; Reardon, M. F.; Connor, S.; Wong, S. und Boston, R. (1984). Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man. *J. Clin. Invest.* **74** (1): 82-89
- Nilsson, M.; Bjorkman, U.; Ekholm, R. und Ericson, L. E. (1990). Iodide transport in primary cultured thyroid follicle cells: evidence of a TSH-regulated channel mediating iodide



- efflux selectively across the apical domain of the plasma membrane. *Eur. J. Cell. Biol.* **52** (2): 270-281
- NRC (1995). Nutrient requirements of the laboratory rat. In: Overton, J., Poos, M. I. und Backwell, D.: Nutrient requirements of laboratory animals, National Research Council, 4. th rev. ed., NAS. 11-79
- Obici, S.; al-Awqati, Q.; Avvedimento, E. V. und Gottesman, M. E. (1991). A replica filter assay for expression of ion transport proteins. *Am. J. Physiol.* **261** (4 Pt 1): C708-C712
- Ohmori, M.; Endo, T.; Harii, N. und Onaya, T. (1998). A novel thyroid transcription factor is essential for thyrotropin- induced up-regulation of Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene expression. *Mol. Endocrinol.* **12** (5): 727-736
- O'Neill, B.; Magnolato, D. und Semenza, G. (1987). The electrogenic, Na<sup>+</sup>-dependent I<sup>-</sup> transport system in plasma membrane vesicles from thyroid glands. *Biochim. Biophys. Acta* **896** (2): 263-274
- Orada, M.; Mijazawa, Z. und Kaneda, T. (1986). Distribution of <sup>14</sup>C after oral administration of (U-<sup>14</sup>C) labeled methyl linolate hydroperoxides and their secondary oxidation product in rats. *Lipids* **21**: 150-154
- Ossendorp, F. A.; Leer, L. M.; Bruning, P. F.; van den Brink, J. A.; Sterk, A. und de Vijlder, J. J. (1989). Iodination of newly synthesized thyroglobulin by FRTL-5 cells is selective and thyrotropin dependent. *Mol. Cell. Endocrinol.* **66** (2): 199-205
- Paglia, D.E. und Valentine, W.N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterisations of erythrocyte glutathion peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **40**: 158-169
- Palinski, W.; Rosenfeld, M. E.; Yla-Herttuala, S.; Gurtner, G. C.; Socher, S. S.; Butler, S. W.; Parthasarathy, S.; Carew, T. E.; Steinberg, D. und Witztum, J. L. (1989). Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (4): 1372-1376
- Pardun, H. (1976). Analyse der Nahrungsfette. Bestimmung der Peroxidzahl Wheeler, D. H. In: Kiermeier, F.: Grundlagen und Fortschritte der Lebensmitteluntersuchung und Lebensmitteltechnologie. Berlin und Hamburg, Verlag Paul Parey. 226-235
- Parthasarathy, S.; Khoo, J. C.; Miller, E.; Barnett, J.; Witztum, J. L. und Steinberg, D. (1990). Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: implications for dietary prevention of atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** (10): 3894-3898

- Pressley, T. A.; Higham, S. C.; Josen, L. A. und Mercer, D. W. (1995). Stimulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase by thyrotropin in cultured thyroid follicular cells. *Am. J. Physiol.* **268** (5 Pt 1): C1252-C1258
- Reaven, P.; Parthasarathy, S.; Grasse, B. J.; Miller, E.; Almazan, F.; Mattson, F. H.; Khoo, J. C.; Steinberg, D. und Witztum, J. L. (1991). Feasibility of using an oleate-rich diet to reduce the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **54** (4): 701-706
- Reeves, P. G.; Nielsen, F. H. und Fahey, G. C., Jr. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **123** (11): 1939-1951
- Riedel, C.; Dohan, O.; De la Vieja, A.; Ginter, C. S. und Carrasco, N. (2001a). Journey of the iodide transporter NIS: from its molecular identification to its clinical role in cancer. *Trends Biochem. Sci.* **26** (8): 490-496
- Riedel, C.; Levy, O. und Carrasco, N. (2001b). Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. *J. Biol. Chem.* **276** (24): 21458-21463
- Riou, C.; Tonoli, H.; Bernier-Valentin, F.; Rabilloud, R.; Fonlupt, P. und Rousset, B. (1999). Susceptibility of differentiated thyrocytes in primary culture to undergo apoptosis after exposure to hydrogen peroxide: relation with the level of expression of apoptosis regulatory proteins, Bcl-2 and Bax. *Endocrinol.* **140** (5): 1990-1997
- Ruz, M.; Codoceo, J.; Galgani, J.; Munoz, L.; Gras, N.; Muzzo, S.; Leiva, L. und Bosco, C. (1999). Single and multiple selenium-zinc-iodine deficiencies affect rat thyroid metabolism and ultrastructure. *J. Nutr.* **129** (1): 174-180
- Saedi, M.S.; Smith, C.G.; Frampton, J.; Chambers, I.; Harrison, P.R. und Sunde, R.A. (1988). Effect of selenium status on mRNA levels for glutathione peroxidase in rat liver. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **153** (2): 855-861
- Saito, K.; Yamamoto, K.; Takai, T. und Yoshida, S. (1982). The sodium-dependent iodide transport by phospholipid vesicles reconstituted with the thyroid plasma membrane. *J. Biochem. (Tokyo)* **92** (6): 2001-2007
- Saito, T.; Endo, T.; Kawaguchi, A.; Ikeda, M.; Nakazato, M.; Kogai, T. und Onaya, T. (1997). Increased expression of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82** (10): 3331-3336
- Scaccini, C.; Nardini, M.; D'Aquino, M. Gentili, V.; Di Felice, M. und Tomassi, G. (1992). Effect of dietary oils on lipid peroxidation and antioxidant parameters of rat plasma and lipoproteins fractions. *J. Lipid Res.* **33** (5): 627-633

- Schäfer, K. und Behne, D. (1985). Selenbestimmung in biologischen Proben mit Hydrid-AAS nach Nassaufschluss. Vergleich mit der Neutronenaktivierungsanalyse. *Kolloquium Atom. Spektr. Anal.* **1**: 375-384
- Schmutzler, C.; Winzer, R.; Meissner-Weigl, J. und Kohrle, J. (1997). Retinoic acid increases sodium/iodide symporter mRNA levels in human thyroid cancer cell lines and suppresses expression of functional symporter in nontransformed FRTL-5 rat thyroid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240** (3): 832-838
- Schröder-van der Elst, J. P.; van der Heide, D.; Kastelijm, J.; Rousset, B. und Obregon, M. J. (2001). The expression of the sodium/iodide symporter is up-regulated in the thyroid of fetuses of iodine-deficient rats. *Endocrinol.* **142** (9): 3736-3741
- Sefner, W. und Heller, P. (1979). Histometrische Untersuchungen an Schilddrüsen von Schweinen mit behandelten und unbehandelten Strumen unter besonderer Berücksichtigung der Bedeutung der Morphologischen Befunde für die Funktionsbeurteilung der Schilddrüse. *Arch. Exper. Vet.-Med.* **33**: 861-867
- Shillabeer, G.; Hornford, J.; Forden, J. M.; Wong, N. C. und Lau, D. C. (1990). Hepatic and adipose tissue lipogenic enzyme mRNA levels are suppressed by high fat diets in the rat. *J. Lipid. Res.* **31** (4): 623-631
- Sidwell, C. G., Salwin, H., Benca, M. und Mitchell, J. H. Jr. (1954). The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **31**: 603-606
- Smanik, P. A.; Ryu, K. Y.; Theil, K. S.; Mazzaferri, E. L. und Jhiang, S. M. (1997). Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. *Endocrinol.* **138** (8): 3555-3558
- Smit, J. G.; van der Heide, D.; van Tintelen, G. und Beynen, A. C. (1993). Thyroid function in rats with iodine deficiency is not further impaired by concurrent, marginal zinc deficiency. *Br. J. Nutr.* **70** (2): 585-592
- Sorvall (1997). Anleitung zur Trennung von Serum-Lipoprotein. *Sorvall News* **5**: 1
- Spitzweg, C. und Heufelder, A. E. (1998). The sodium iodide symporter: its emerging relevance to clinical thyroidology. *Eur. J. Endocrinol.* **138** (4): 374-375
- Stangl, G. I.; Kirchgessner, M.; Eder, K. und Reichlmayr-Lais, A.M. (1994a). Effect of dietary hyperlipidemic components and fish oil on concentrations of lipids in liver and liver fatty acid profile of rats. *Z. Ernährungswiss.* **33**: 195-206
- Stangl, G.I.; Eder, K.; Kirchgessner, M. und Reichlmayr-Lais, A.M. (1994b). Effect of dietary fish oil on serum lipids and lipoproteins of rats fed diets differing in cholesterol and fat. *Arch. Anim. Nutr.* **46**: 155-164

- Stangl, G.I.; Kirchgessner, M.; Reichlmayr, A.M. und Eder, K. (1994c). Serum lipids and lipoproteins from rats fed different dietary oils. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* **71**: 87-97
- Stangl, G.I.; Reichlmayr, A.M.; Eder, K. und Kirchgessner, M. (1993a). Effect of dietary fish oil on serum lipids and lipoproteins of rats fed a hyperlipidemic diet. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* **70**: 139-148
- Stangl, G.I.; Reichlmayr, A.M.; Eder, K. und Kirchgessner, M. (1993b). Effect of different dietary oils on liver fatty acid composition of rats. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* **70**: 207-215
- Sterchele, P.F.; Sun, H.; Peterson, R.E. und Vanden Heuvel, J.P. (1996). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  mRNA in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **326** (2): 281-289
- Sugawara, M.; Yamaguchi, D. T.; Lee, H. Y.; Yanagisawa, K.; Murakami, S.; Summer, C. N.; Johnson, D. G. und Levin, S. R. (1990). Hydrogen peroxide inhibits iodide influx and enhances iodide efflux in cultured FRTL-5 rat thyroid cells. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* **122** (5): 610-616
- Suzuki, K.; Mori, A.; Saito, J.; Moriyama, E.; Ullianich, L. und Kohn, L. D. (1999). Follicular thyroglobulin suppresses iodide uptake by suppressing expression of the sodium/iodide symporter gene. *Endocrinol.* **140** (11): 5422-5430
- Tamura, M.; Kimura, H.; Koji, T.; Tominaga, T.; Ashizawa, K.; Kiriya, T.; Yokoyama, N.; Yoshimura, T.; Eguchi, K.; Nakane, P. K. und Nagataki, S. (1998). Role of apoptosis of thyrocytes in a rat model of goiter. A possible involvement of Fas system. *Endocrinol.* **139** (8): 3646-3653
- Taurog, A. (1996). Hormone Synthesis. In: Braverman, L. E. und Utiger, R. D.: Werner und Ingbar's The Thyroid. Philadelphia, Lippcott-Raven Publishers. 47-84
- Thews, G. und Vaupel, P. (1990). *Vegetative Physiologie*. Berlin-Heidelberg, Springer.
- Tomlinson, J. E.; Nakayama, R. und Holten, D. (1988). Repression of pentose phosphate pathway dehydrogenase synthesis and mRNA by dietary fat in rats. *J. Nutr.* **118** (3): 408-415
- Tong, Q.; Ryu, K. Y. und Jhiang, S. M. (1997). Promoter characterization of the rat Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239** (1): 34-41
- Toyoda, H.; Himeno, S. und Imura, N. (1990). Regulation of glutathione peroxidase mRNA level by dietary selenium manipulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1049** (2): 213-215

- Ulianich, L.; Suzuki, K.; Mori, A.; Nakazato, M.; Pietrarelli, M.; Goldsmith, P.; Pacifico, F.; Consiglio, E.; Formisano, S. und Kohn, L. D. (1999). Follicular thyroglobulin (TG) suppression of thyroid-restricted genes involves the apical membrane asialoglycoprotein receptor and TG phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **274** (35): 25099-25107
- Utsunomiya, H.; Komatsu, N.; Yoshimura, S.; Tsutsumi, Y. und Watanabe, K. (1991). Exact ultrastructural localization of glutathione peroxidase in normal rat hepatocytes: advantages of microwave fixation. *J. Histochem. Cytochem.* **39** (9): 1167-1174
- Valenzuela, A. (1991). The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci.* **48** (4): 301-309
- van den Hove, M. F.; Couvreur, M.; de Visscher, M. und Salvatore, G. (1982). A new mechanism for the reabsorption of thyroid iodoproteins: selective fluid pinocytosis. *Eur. J. Biochem.* **122** (2): 415-422
- Vassart, G.; Parmentier, M.; Libert, F. (1991). Molecular genetics of the thyrotropin receptor. *Trends in Endocrinol. Metab.* **2**: 151-156
- Venezian, B.M.; Villone, G.; Lombardi, A.; Ingbar, S.H. und Tramontano, D. (1989). On the role of iodine on proliferation of FRTL-5 cells. FRTL-5 Today. Proceedings of the first international workshop on characterisation and standardisation of an in vitro thyroid cell system., Udine, Excerpta Medica. 187-188
- Venkataraman, G. M.; Yatin, M.; Marcinek, R. und Ain, K. B. (1999). Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na<sup>+</sup>/I symporter gene methylation status. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84** (7): 2449-2457
- Verma, S.; Kumar, P. G.; Laloraya, M.; Singh, A.; Nivsarkar, M. und Bharti, S. (1990). Discovery of a novel and alternate hydrogen peroxide generation machinery in the mammalian thyroid gland that modulates iodination of tyrosine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169** (1): 1-7
- Villette, S.; Bermano, G.; Arthur, J. R. und Hesketh, J. E. (1998). Thyroid stimulating hormone and selenium supply interact to regulate selenoenzyme gene expression in thyroid cells (FRTL-5) in culture. *FEBS Lett* **438** (1-2): 81-84
- Visser, T. J. (1996). Pathways of thyroid hormone metabolism. *Acta. Med. Austriaca* **23** (1-2): 10-16
- Visser, T. J.; Leonard, J. L.; Kaplan, M. M. und Larsen, P. R. (1982). Kinetic evidence suggesting two mechanisms for iodothyronine 5'- deiodination in rat cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79** (16): 5080-5084

- Watanabe, K.; Nakamura, A.; Suzuki, N.; Futaesaku, Y. und Hosoya, T. (1991). In vivo effect of thyrotropin on intracellular translocation of thyroid peroxidase in rat thyroid cells by an indirect immunofluorescence method. *Endocrinol. Jpn.* **38** (1): 89-95
- Weiss, S. J.; Philp, N. J.; Ambesi-Impiombato, F. S. und Grollman, E. F. (1984a). Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3',5'- monophosphate and dependent on protein synthesis. *Endocrinol.* **114** (4): 1099-1107
- Weiss, S. J.; Philp, N. J. und Grollman, E. F. (1984b). Effect of thyrotropin on iodide efflux in FRTL-5 cells mediated by  $\text{Ca}^{2+}$ . *Endocrinol.* **114** (4): 1108-1113
- Weiss, S. J.; Philp, N. J. und Grollman, E. F. (1984c). Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid. *Endocrinol.* **114** (4): 1090-1098
- Weiss, S. L.; Evenson, J. K.; Thompson, K. M. und Sunde, R. A. (1996). The selenium requirement for glutathione peroxidase mRNA level is half of the selenium requirement for glutathione peroxidase activity in female rats. *J. Nutr.* **126** (9): 2260-2267
- Yoshida, A.; Sasaki, N.; Mori, A.; Taniguchi, S.; Mitani, Y.; Ueta, Y.; Hattori, K.; Sato, R.; Hisatome, I.; Mori, T.; Shigemasa, C. und Kosugi, S. (1997). Different electrophysiological character of  $\text{I}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ , and  $\text{SCN}^-$  in the transport by  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  symporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231** (3): 731-734
- Yoshida, A.; Sasaki, N.; Mori, A.; Taniguchi, S.; Ueta, Y.; Hattori, K.; Tanaka, Y.; Igawa, O.; Tsuboi, M.; Sugawa, H.; Sato, R.; Hisatome, I.; Shigemasa, C.; Grollman, E. F. und Kosugi, S. (1998). Differences in the electrophysiological response to  $\text{I}^-$  and the inhibitory anions  $\text{SCN}^-$  and  $\text{ClO}_4^-$ , studied in FRTL-5 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1414** (1-2): 231-237
- Yoshida, H. und Kajimoto, G. (1989). Effect of dietary vitamin E on the toxicity of autoxidized oil to rats. *Ann. Nutr. Metab.* **33** (3): 153-161
- Zachara, B.A. (1992). Mammalian selenoproteins. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* **6** (3): 137-151
- Zimmer, K. P.; Hengst, K.; Carayon, P.; Bramswig, J. und Harms, E. (1992). Different concentrations of thyroid peroxidase and thyroglobulin in the nuclear envelope and the endoplasmic reticulum throughout the cytoplasm. *Eur. J. Cell. Biol.* **57** (1): 12-20

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, keine anderen als angegebenen Quellen und Hilfsmittel zur Anfertigung der Vorliegender Dissertation verwendet zu haben. Diese wissenschaftliche Arbeit habe ich selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt.

Die vorliegende Promotion wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität im In- und Ausland zur Bewerbung um einen Doktorgrad eingereicht. Bisher habe ich mich noch nicht um einen Doktorgrad beworben.

Peter Škufca

Halle/Saale, den 26.03.2002

## Lebenslauf

**Name:** Peter Škufca

**Anschrift:** Gütchen Straße 12  
06108 Halle/Saale

**Geburtsdatum / -ort:** 06.06.1971, Ljubljana, Slowenien

**Familienstand:** ledig

**Ausbildung:**

1978 Grundschule, Šlandrove Brigade, Domžale, Slowenien

1986-1989 Naturwissenschaftliches Gymnasium, Rudolf Maister Kamink, Slowenien

1991 - 1996 Studium der Landwirtschaft an der Biotechnischen Fakultät der Universität Ljubljana, Abschluß als Diplomagraringenieur-  
Fachrichtung Tierernährung  
Durchschnittsnote im Fach: 9.15  
Bewertung des Diploms: 9/9  
Thema der Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Verdaulichkeit des Kraftstoffutters bei kleinen Wiederkäuern“

1995 Einmonatiges Praktikum in Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG., Lage, NRW

Jan. 1997 - Apr. 1999 Mitarbeiter in Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG., Lage, NRW  
Luxuskonsumtion der Ratten in toxikologischen Experimenten, Entwicklung neuer umweltfreundlichen Systemen der Seuchenbekämpfung bei wildlebenden Tieren

Apr. 1997 - Promotionsstudent an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität

1999 Fachseminare: Marketing, Motivation der Mitarbeiter

Apr. 2000 - Hochschulfachzertifikat Marketing, AKAD, Leipzig-Rendsburg.

Sept. 1999 - März 2002 Stipendiat der Graduiertenförderung des Landes Sachsen Anhalt

**Wehrdienst:** September 1990 bis Juli 1991 Maribor, Slowenien

Halle/Saale, den 26.03.2002



## **Danksagung**

*Hier möchte ich all jenen danken, die zum Entstehen und Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.*

*An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Klaus Eder für die Überlassung des Themas, die Gewährung von experimentellen Arbeitsmöglichkeiten und für jede materielle und moralische Unterstützung am Institut für Ernährungswissenschaften danken. Dank gilt auch für sein ständiges Interesse am Fortgang der Arbeit, Kritik und besonders für ideenreiche Diskussionen sowie Anregungen zum Manuskript.*

*Danken möchte ich auch Frau Dr. Corinna Brandsch und Herrn Dr. Frank Hirche für die Betreuung bei der Vorbereitung und Durchführung der Versuche, dem Etablieren vielfältiger Methoden sowie für die fruchtbare Diskussionen und das kritische Lesen des Manuskriptes.*

*Mein Dank geht auch an Herrn Dr. Schäfer (FU Berlin) für die Messung von Selen und Herrn Dr. Ruick (Veterinäruntersuchungsamt Halle) für die Messung von Jod.*

*Mein Dank gilt weiterhin dem Land Sachsen-Anhalt (vertreten durch die Martin-Luther-Universität) für die finanzielle Unterstützung in den letzten zweieinhalb Jahren.*

*Besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und Melanie für die Unterstützung und Verständnis, die sie jederzeit für meine Arbeit aufgebracht haben.*

*Zuletzt danke ich auch jenen, die mich nicht unterstützen wollten, denn sie haben mich wahrscheinlich unbewußt weiter gebracht, als ich sonst zum heutigen Zeitpunkt wäre.*