

Aus dem Institut für Tierernährung und Stoffwechselfysiologie
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchungen zum Einfluss
diätetischer Fette (MCT vs. LCT) auf die
Fettassimilation und die Pathogenese
der Insulinresistenz bei Ratten**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Dipl. oec. troph. **Berit Marten**
aus Wolfenbüttel
Kiel, 2005

Dekan: Prof. Dr. med. vet. S. Wolfram

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. vet. S. Wolfram

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Schrezenmeir

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2005

Gedruckt mit der Genehmigung des Dekans der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	IV
Verzeichnis der Abbildungen	VII
Verzeichnis der Tabellen	X
1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1. Adipositas, Diabetes mellitus und das Metabolische Syndrom	3
2.2. Interaktionen des Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsels	5
2.3. Insulinresistenz – fettinduzierte Insulinresistenz	8
2.4. Langkettige Fettsäuren und die Pathogenese der Insulinresistenz	12
2.4.1. Randle-Zyklus	13
2.4.2. Zelluläre Mechanismen zur Entstehung der Insulinresistenz	16
2.4.3. Exkurs – putative fettsäuretransportierende/-bindende Proteine	19
2.5. Molekularbiologische Ansätze zur Erklärung der fettinduzierten Insulinresistenz	23
2.5.1. Glucoseaufnahme und Insulinsignalkaskade	23
2.5.2. Fettsäureinduzierte Genexpression	25
2.6. Einsatz mittelkettiger Triglyceride zur Prävention der fettinduzierten Insulinresistenz?	28
2.4.1. Mittelkettige Triglyceride (MCT)	28
2.4.2. Verdauung und Assimilation von MCT verglichen mit LCT	29
2.4.3. MCT als funktionelles Lebensmittel	32
3. MATERIAL UND METHODEN	34
3.1. Versuchsaufbau	34
3.1.1. Tiere und Tierhaltung	36
3.1.2. Fütterung und Diäten	36
3.1.3. Verdaulichkeit der Versuchsdiäten	40
3.1.4. Gewebeentnahme	42

3.2.	Genexpression	42
3.2.1.	RNA-Extraktion	43
3.2.2.	Quantifizierung und Integrität der isolierten RNA	43
3.2.3.	Reverse Transkription	45
3.2.4.	Quantitative <i>real time</i> PCR	45
3.3.	Fettsäuremuster und Verteilung von U- ¹³ C-Palmitat	50
3.3.1.	Fettextraktion nach Folch	51
3.3.2.	Triglyceridbestimmung	52
3.3.3.	Gaschromatographische Bestimmung des Fettsäuremusters	52
3.3.4.	U- ¹³ C-Palmitatbestimmung am GC-Massenspektrometer	53
3.4.	Oraler metabolischer Toleranztest (OMTT)	54
3.4.1.	Operationstechnik	54
3.4.2.	Bestimmung von Glucose, Triglyceriden, Cholesterol und Insulin	56
3.4.3.	Auswertung postprandialer Plasmametabolite	57
3.5.	Bestimmung der Körperfettmasse	58
3.6.	Hyperinsulinämischer-euglycämischer Clamp (EHC) und intrapertonealer Glucosetoleranztest (IPGTT)	59
3.7.	Datenauswertung und Statistik	61
4.	ERGEBNISSE	62
4.1.	Gewichtsentwicklung	62
4.2.	Futtermverzehr	65
4.2.1.	Scheinbare Fettabsorption	66
4.2.2.	Scheinbare Energieabsorption	66
4.3.	Körperfettmasse der Ratten	67
4.4.	Organgewicht und Fettgehalt der Gewebe	68
4.4.1.	Lipidgehalt in ausgewählten Organen	69
4.4.2.	Triglyceridgehalt in ausgewählten Organen	72
4.5.	Fettsäuremuster der Gesamtlipid-, Triglycerid- und Phospholipidfraktion	73
4.5.1.	Gesamtlipidfraktion	73
4.5.2.	Triglyceridfraktion	78
4.5.3.	Phospholipidfraktion	80
4.6.	U- ¹³ C-Palmitatkonzentration der Gewebe	82
4.6.1.	Duodenum	82
4.6.2.	Leber	82

4.6.3.	Muskelgewebe	84
4.6.4.	Fettgewebe	85
4.6.5.	Anteil von U- ¹³ C-Palmitat an den Gesamtfettsäuren der Gewebe	87
4.7.	Muskuläre Expression von putativen Fettsäuretransportern	89
4.7.1.	H-FABP _c -Expression im M. soleus und M. gastrocnemius	90
4.7.2.	FAT/CD36-Expression im M. soleus und M. gastrocnemius	90
4.7.3.	FATP-Expression im M. soleus und M. gastrocnemius	91
4.8.	Expression von FAT/CD36 in der Dünndarmmucosa	92
4.9.	Plasmametabolite	93
4.9.1.	Nüchternphase	93
4.9.2.	Postprandiale Phase	94
4.10.	Glucoseinfusionsrate während des EHC und Glucose-/Insulin-Antwort nach dem IPGTT	97
5.	DISKUSSION	100
5.1.	Einfluss von Hochfettdiäten auf die Insulinsensitivität und das Körpergewicht	100
5.2.	Aspekte der zellulären Aufnahme und Metabolisierung von Fettsäuren	103
5.2.1.	Einfluss von Hochfettdiäten auf die zelluläre Fettsäureaufnahme	104
5.2.2.	Einfluss von Hochfettdiäten auf die zelluläre Fettsäuremetabolisierung	109
5.3.	Einfluss von Hochfettdiäten auf das Fettsäuremuster der Gewebe	113
5.4.	Einfluss von Hochfettdiäten auf postprandiale Plasmametabolite nach einer fettreichen Testmahlzeit	115
5.5.	Weiterführende Aspekte zur Insulinresistenz	116
5.6.	Übertragbarkeit der Studienergebnisse auf den Menschen	117
6.	ZUSAMMENFASSUNG	119
7.	SUMMARY	121
	Literaturverzeichnis	123
	Anhang	143
	Danksagung	152
	Lebenslauf	153

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria
ACBP	Acyl-CoA-bindendes Protein
ACS	Acyl-CoA-Synthetase
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ASP	<i>acylation stimulating protein</i> , Acylierungs-stimulierendes Protein
AspAT	(mitochondriale) Aspartam-Aminotransferase (identisch mit FABPpm)
AUC	<i>area under the curve</i> , Fläche unterhalb der Kurve
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMI	<i>body mass index</i>
bp	Basenpaare
c	Cytosol
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary DNA</i>)
ChREBP	<i>carbohydrate response element binding protein</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
CPT	Carnitinpalmitoyltransferase
D	Duodenum
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
D ₂ O	deuteriertes Wasser
EDTA	Dinatriumdihydrogenethylendiamintetraacetat
EHC	euglycämischer-hyperinsulinämischer Clamp
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fa	abdominales Fettgewebe
FA	<i>fatty acid</i> , Fettsäure
FABP	<i>fatty acid binding protein</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein

FAT/CD36	<i>fatty acid translocase</i>
FATP	<i>fatty acid transport protein</i>
FFA	<i>free fatty acids</i> , freie Fettsäuren
FFM	fettfreie Masse
FM	Fettmasse
FP	<i>forward primer</i>
Fr	retroperitoneales Fettgewebe
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSME	Fettsäuremethylester
GC-MS	Gaschromatograph-Massenspektrometer
GIR	Glucoseinfusionsrate
Glc	Glucose
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HGP	hepatische Glucoseproduktion
HNF-4	<i>hepatic nuclear factor 4</i>
HSL	hormonsensitive Lipase
IDF	<i>international diabetes federation</i>
IL	Ileum
IPGTT	intraperitonealer Glucose-Toleranztest
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
J	Jejunum
KG	Körpergewicht
LF	<i>low fat</i> , Niedrigfett (Diät)
LCFA	<i>long chain fatty acids</i> , langkettige Fettsäuren
LCT	<i>long chain triglycerides</i> , langkettige Triglyceride
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPL	Lipoproteinlipase
LXR	<i>liver x receptor</i>
MCFA	<i>medium chain fatty acids</i> , mittelkettige Fettsäuren
MCT	<i>medium chain triglycerides</i> , mittelkettige Triglyceride
MUFA	<i>mono-unsaturated fatty acids</i> , einfach ungesättigte Fettsäuren
MG	<i>Musculus gastrocnemius</i>
MOPS	3-Morpholino-1-Propansulfonsäure
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
MS	<i>Musculus soleus</i>

NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NEC	<i>no enzyme control</i>
NTC	<i>no template control</i>
OD	optische Dichte (Maß für die Lichtdurchlässigkeit einer Probe)
OMTT	oraler metabolischer Toleranztest (fettreiche Testmahlzeit)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Ketten-Reaktion
PI	Phosphatidylinositol
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
pm	Plasmamembran
pp	postprandial
PPAR	<i>peroxisome proliferator activated receptor</i>
PPRE	<i>peroxisome proliferator response element</i>
PUFA	<i>poly-unsaturated fatty acid</i> , mehrfach ungesättigte Fettsäure
rRNA	Ribosomale-RNA
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROX	5-Carboxy-X-Rodamin
RP	<i>reverse primer</i>
RXR	<i>retinoic x receptor</i>
S	<i>Svedberg</i> , Einheit des Sedimentationskoeffizienten bei den Ribosomuntereinheiten (z.B. 18S-rRNA, 28S-rRNA)
SHR-Ratten	<i>spontaneously hypertensive rats</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element binding protein</i>
TBW	<i>total body water</i> , Gesamtkörperwasser
TG	Triglyceride (Triacylglycerol)
tRNA	Transfer-RNA
UTP	Desoxyuridintriphosphat
V.	Vena
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
WHO	<i>world health organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
wt/wt	<i>wet weight</i> (Frischmasse der Organe)

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abbildung 1:	Vereinfachtes Schema zur Wirkung von Insulin als anaboles Hormon auf den Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel	6
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Folgen einer Insulinresistenz in Leber, Skelettmuskel und Fettgewebe	9
Abbildung 3:	Vereinfachtes Schema des zellulären Fettsäuremetabolismus.....	19
Abbildung 4:	Hypothetisches Modell zur Beteiligung von fettsäuretransportierenden und -bindenden Proteinen bei der Fettsäureaufnahme in eukaryotische Zellen	22
Abbildung 5:	Wirkung von Fettsäuren auf die Insulinsignalkaskade	24
Abbildung 6:	Grundzüge der Regulation der Genexpression durch Fettsäuren	27
Abbildung 7:	Aufbau einer TaqMan [®] -Sonde.....	46
Abbildung 8:	Prinzip des TaqMan [®] -Assays während der <i>real time</i> PCR.....	48
Abbildung 9:	Beispielhafte logarithmische Darstellung eines Amplifikationsplots und einer Standardkurve	49
Abbildung 10:	Einschnittstelle in der ventralen Halsregion der Ratte zum Freipräparieren der A. carotis	55
Abbildung 11:	Arterienkatheter mit dorsaler Austrittsstelle im Nacken der Tiere.....	55
Abbildung 12:	Gewichtsentwicklung der Ratten (Experiment A-D).....	62
Abbildung 13:	Gewichtszunahme der Ratten in den drei Versuchsgruppen aus den einzelnen Experimenten.....	63
Abbildung 14:	Tägliche Futtermittelaufnahme der Ratten (Experiment B-a)	65
Abbildung 15:	Lipidgehalt im M. gastrocnemius und M. soleus (Experiment B-a) ...	69
Abbildung 16:	Lipidgehalt in der Mucosa des Duodenums, proximalen Jejunums, distalen Jejunum und Ileums nach 4-wöchiger Fütterungsperiode und 12-stündigem Futterentzug (Experiment B-a) bzw. nach 4-wöchiger Fütterungsperiode und einmaliger Gabe des OMTT (Experiment B-b)	71
Abbildung 17:	Fettsäuremuster in der Triglyceridfraktion von Leber, M. soleus und abdominalem Fettgewebe der Ratten nach 4-wöchiger Fütterung der Versuchsdiäten (Experiment B-a)	79
Abbildung 18:	Fettsäuremuster in der Phospholipidfraktion von M. soleus und Herzmuskel der Ratten nach 4-wöchiger Fütterung der Versuchsdiäten (Experiment B-a).....	81
Abbildung 19:	Anreicherung der U- ¹³ C-Palmitinsäure in der Mucosa des Duodenums nach chronischer (Experiment B-a) und einmaliger Applikation des Markers (Experiment B-b)	83
Abbildung 20:	Anreicherung der U- ¹³ C-Palmitinsäure in der Leber nach chronischer (Experiment B-a) und einmaliger Applikation des Markers (Experiment B-b).....	83

Abbildung 21: Anreicherung der U- ¹³ C-Palmitinsäure im M. soleus und M. gastrocnemius nach chronischer (Experiment B-a) und einmaliger Applikation des Markers (Experiment B-b)	84
Abbildung 22: Anreicherung der U- ¹³ C-Palmitinsäure im abdominalen und retroperitonealen Fettgewebe nach chronischer (Experiment B-a) und einmaliger Applikation des Markers (Experiment B-b)	86
Abbildung 23: Expression von H-FABP _c im M. soleus und M. gastrocnemius	90
Abbildung 24: Expression von FAT/CD36 im M. soleus und M. gastrocnemius	91
Abbildung 25: Expression von FATP im M. soleus und M. gastrocnemius	91
Abbildung 26: Expression von FAT/CD36 im Duodenum	92
Abbildung 27: Expression von FAT/CD36 im Ileum	93
Abbildung 28: Postprandiale Verläufe der Plasmaglukosekonzentration und AUC nach Gabe des OMTT	94
Abbildung 29: Postprandiale Plasmainsulinkonzentration nach Gabe des OMTT	95
Abbildung 30: Postprandiale Verläufe der Plasma-TG-Konzentration, AUC und maximaler Triglyceridanstieg nach Gabe des OMTT	96
Abbildung 31: Glucoseinfusionsrate während des hyper-insulinämischen-euglycämischen Clamps nach 4-wöchiger Fütterung der Versuchsdiäten	97
Abbildung 32: Verläufe der Plasmaglukosekonzentration und AUC nach intraperitonealem Glucosetoleranztest (IPGTT)	98
Abbildung 33: Plasmainsulinkonzentration nach intraperitonealem Glucosetoleranztest (IPGTT)	99
Abbildung A1: Wässrige LCT-Fettemulsion	148
Abbildung A2: Fettsäuremuster in der Triglyceridfraktion des proximalen und distalen Jejunums der Ratten nach der Fütterungsperiode und dem nächtlichen Fasten (Experiment B-a)	148
Abbildung A3: Fettsäuremuster in der Triglyceridfraktion des M. gastrocnemius, des Herzmuskels und des retroperitonealen Fettgewebes der Ratten nach der Fütterungsperiode und dem nächtlichen Fasten (Experiment B-a)	149
Abbildung A4: Fettsäuremuster in der Phospholipidfraktion des proximalen und distalen Jejunums sowie der Leber der Ratten nach der Fütterungsperiode und dem nächtlichen Fasten (Experiment B-a)	150
Abbildung A5: Fettsäuremuster in der Phospholipidfraktion des M. gastrocnemius der Ratten nach der Fütterungsperiode und dem nächtlichen Fasten (Experiment B-a)	151

VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tabelle 1:	Überblick über die Rattenexperimente	34
Tabelle 2:	Zusammensetzung der Versuchsdiäten.....	37
Tabelle 3:	Fettsäuremuster der Versuchsdiäten	38
Tabelle 4:	Fettsäuremuster des OMTT	39
Tabelle 5:	Komponenten des Reaktionsmixes für die Reverse Transkription.....	45
Tabelle 6:	Primer- und Sondensequenzen von FATP, H-FABP _c und FAT/CD36 ...	47
Tabelle 7:	Gewichtsentwicklung der Ratten in den Kieler Experimenten.....	64
Tabelle 8:	Fett- und Energiebilanz der Ratten (Experiment B-a)	67
Tabelle 9:	Gesamtkörperwasser, fettfreie Masse und Fettmasse der Ratten (Experiment D)	68
Tabelle 10:	Lipidgehalt der Organe (Experiment B-a)	69
Tabelle 11:	Triglyceridkonzentration der Gewebe (Experiment B-a)	73
Tabelle 12:	Fettsäuremuster der Gesamtlipidfraktion der Mucosa des Duodenums, der Leber, des M. soleus, des M. gastrocnemius, des abdominalen Fettgewebes und des retroperitonealen Fettgewebes der Ratten nach 12-stündigem Futterentzug (Experiment B-a)	74
Tabelle 13:	Fettsäuremuster der Gesamtlipidfraktion der Mucosa des Duodenums, der Leber, des M. soleus und des M. gastrocnemius der Ratten fünf Stunden nach Gabe des OMTT (Experiment B-b)	76
Tabelle 14:	Anteil der U- ¹³ C-Palmitinsäure an der Gesamtfettsäurekonzentration der Gewebe nach chronischer Applikation des Markers mit den Versuchsdiäten (Experiment B-a).....	88
Tabelle 15:	Anteil der U- ¹³ C-Palmitinsäure an der Gesamtfettsäurekonzentration der Gewebe nach einmaliger Applikation des Markers mit dem OMTT (Experiment B-b).....	89
Tabelle 16:	Nüchternkonzentrationen der Plasmametabolite (Experiment C)	94
Tabelle A1:	Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Kits	143
Tabelle A2:	Geräte	145
Tabelle A3:	Puffer und Lösungen	146
Tabelle A4:	Zusammensetzung der Basisdiät.....	146

1. Einleitung und Problemstellung

Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 sind Zivilisationskrankheiten im Kontext des Metabolischen Syndroms, deren kontinuierlich ansteigende Prävalenz in den westlichen Industriestaaten neben genetischen Einflüssen zum erheblichen Teil auf Umweltfaktoren zurückzuführen ist. Die Insulinresistenz, eine verminderte Ansprechbarkeit des Körpers auf die Wirkung des Hormons Insulin, ist ein Kerncharakteristikum des Metabolischen Syndroms. Obwohl Insulin als Bindeglied zwischen den Erkrankungen bekannt ist, sind die pathophysiologischen Abläufe der Entstehung einer Insulinresistenz noch weitgehend ungeklärt. Bei der Entstehung der Insulinresistenz spielt die Ernährung eine entscheidende Rolle. So ist heutzutage bekannt, dass Diäten mit einem hohen Anteil an langkettigen Fettsäuren zur Entstehung der Insulinresistenz beitragen. Bei der Erforschung der Pathogenese der Insulinresistenz gilt dementsprechend den freien Fettsäuren als Mediatoren des Glucose- und Fettstoffwechsels ein besonderes Interesse. Zur Prävention von Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 werden Modifikationen der Ernährung und körperliche Bewegung gefordert, um dem wachsenden Gesundheitsproblem und den damit verbundenen Kosten entgegenzuwirken.

Die mit bestimmten Hochfettdiäten gefütterte Ratte, welche nach der mehrwöchigen diätetischen Behandlung durch das Auftreten einer Insulinresistenz und Triglyceridablagerungen in der Skelettmuskulatur gekennzeichnet ist, ist als Tiermodell für das Metabolische Syndrom anerkannt [1]. Die dabei eingesetzten diätetischen Fette enthalten ausschließlich langkettige Fettsäuren. Da nicht alle langkettigen Fettsäuren die gleiche Wirkung bei der Entstehung einer Insulinresistenz ausüben [2], muss bei der Applikation der Fettsäuren zwischen dem Grad der Sättigung und bei den mehrfach ungesättigten Fettsäuren nach Zuordnung zur ω 3- bzw. ω 6-Familie unterschieden werden. Insbesondere für die langkettigen gesättigten Fettsäuren wird eine negative Wirkung auf die Insulinsensitivität vermutet [2-6].

Beim genaueren Betrachten der Fettsäurezusammensetzung der Hochfettdiäten, die bei Ratten zur Entstehung einer Insulinresistenz führen [2;7], wird ersichtlich, dass die eingesetzten Nahrungsfette häufig Pflanzenöle mit einem überwiegenden Anteil langkettiger ungesättigter Fettsäuren waren. Die „Hochfettdiät mit gesättigten Fettsäuren“ bei Storlien et al. [2] enthielt beispielsweise 13,6 Gewichtsprozent Talg und

20,3 Gewichtsprozent Distelöl, so dass die Diät insgesamt lediglich 19 Energieprozent in Form von gesättigten Fettsäuren, jedoch 12 Energieprozent aus einfach ungesättigten und 28 Energieprozent aus mehrfach ungesättigten langkettigen Fettsäuren enthielt. Um die Bedeutung langkettiger gesättigter Fettsäuren bei der Entstehung einer Insulinresistenz besser charakterisieren zu können, wurde in der vorliegenden Studie ein diätetisches Fett eingesetzt, dessen Fettsäuremuster zu 75 Gewichtsprozent aus langkettigen gesättigten Fettsäuren bestand. Weiterhin wurde untersucht, ob eine Substitution dieser langkettigen gesättigten Fettsäuren durch mittelkettige gesättigte Fettsäuren der Entstehung einer Insulinresistenz mit den damit einhergehenden pathophysiologischen Veränderungen entgegenwirken kann. Dieses Grunddesign der Studie ermöglicht die Erfassung des Einflusses der Kettenlänge gesättigter Fettsäuren bei Aufnahme von Hochfettdiäten auf die Entstehung einer Insulinresistenz sowie die Untersuchung der pathophysiologisch relevanten systemischen und zellulären Veränderungen bei der Ratte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Hypothese zu prüfen, ob eine Substitution von langkettigen gesättigten Fettsäuren durch mittelkettige gesättigte Fettsäuren in einer Hochfettdiät bei Ratten zu einer verminderten Insulinresistenz führt und in wieweit sich dieses durch eine veränderte Fettassimilation begründen lässt. Hierfür wurde u.a. (1) die Expression von putativen Fettsäuretransportern im Skelettmuskel und der Dünndarmmucosa auf transkriptioneller Ebene quantifiziert, (2) das Fettsäuremuster der Triglycerid- und Phospholipifractionen der Gewebe analysiert, (3) die Anreicherung einer stabil markierten langkettigen gesättigten Fettsäure in den Geweben nach der chronischen Applikation mit dem Futter bzw. nach der einmaligen Gabe mit einer fettreichen Testmahlzeit untersucht, (4) die postprandialen Verläufe von Plasmametaboliten verifiziert und (5) die Insulinsensitivität der hochfettgefütterten Tiere ermittelt.

2. Literaturübersicht

Als Zivilisationskrankheiten sind abdominale Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2, Hypertonie und Dyslipidämie von großer sozioökonomischer Bedeutung. Adipositas und Typ 2-Diabetes sind mit einer verminderten Insulinwirkung (Insulinresistenz) assoziiert und auch Dyslipidämien und Hypertonie werden mit einer Insulinresistenz bzw. einer Hyperinsulinämie in Verbindung gebracht [8-11].

2.1. Adipositas, Diabetes mellitus und das Metabolische Syndrom

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind weltweit über eine Milliarde Erwachsene übergewichtig, davon 300 Millionen adipös. Die Anzahl der übergewichtigen Erwachsenen hat sich in den USA seit 1980 verdreifacht [12]. In Deutschland sind nach Schätzungen der MONICA-Studie (*multinational monitoring trends and determinants in cardiovascular disease Augsburg*) ca. 20 % der Erwachsenen adipös [13], wobei die direkten und indirekten Kosten der Adipositas auf 5,7 Millionen Euro geschätzt werden und mit 4,3 % das nationale Gesundheitssystem belasten [14]. Die Klassifizierung von Übergewicht und Adipositas erfolgt in der Regel über den BMI (*body mass index*), der als Quotient aus Körpergewicht (kg) und quadrierter Körpergröße (m²) berechnet wird. Personen mit einem BMI > 25 kg/m² gelten als übergewichtig, Personen mit einem BMI > 30 kg/m² als adipös. Übergewicht und Adipositas führen zu systemischen Veränderungen, welche wiederum in kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes mellitus Typ 2 resultieren können. So sind beispielsweise ungefähr 90 % der Typ 2-Diabetiker übergewichtig oder adipös [12].

Neben Adipositas stellt auch Diabetes mellitus Typ 2 (ca. 90 % der diagnostizierten Diabetesfälle) ein wachsendes Gesundheitsproblem dar, wobei zwischen beiden ein enger Zusammenhang zu bestehen scheint. Die Anzahl der erwachsenen Personen mit diagnostiziertem Diabetes mellitus betrug nach Angaben der WHO 1985 weltweit 30 Millionen, 1995 135 Millionen und 2000 bereits 177 Millionen. Im Jahr 2025 werden voraussichtlich über 300 Millionen Menschen unter Diabetes und deren Begleiterkrankungen leiden, welches einer Zunahme von 122 % vom Jahr 1995 bis 2025 entspricht [15;16]. In Deutschland lag die Prävalenz des Typ 2-Diabetes nach Angaben des statistischen Bundesamtes im Jahr 1998 bei 4,2 % [17]. Das entspricht

etwa 3,5 Millionen diagnostizierter Patienten. Die Kosten zur Behandlung dieser chronischen Erkrankung, welche im Rahmen der CORE-2-Studie (*Costs of Diabetes in Europe – Type 2*) u.a. in Deutschland ermittelt wurden, lagen 1998 bei 16,1 Mrd. € [18]. Mit 2,6 % wird Diabetes in Deutschland als Todesursache stark unterschätzt, da viele Todesfälle indirekt mit Diabetes in Verbindung stehen. So sterben beispielsweise 57 % der Männer und 62 % der Frauen mit einem Typ 2-Diabetes an kardiovaskulären Erkrankungen [19], der häufigsten Todesursache in Deutschland, welches in Deutschland in der Statistik der Todesursachen nicht als Diabetes klassifiziert wird [20].

Primärpräventionen zur Vermeidung der Entstehung von Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 werden von der WHO und der IDF (*International Diabetes Federation*) gefordert, um der ansteigenden Prävalenz entgegenwirken und die nationalen Gesundheitsbudgets entlasten zu können. Zu den möglichen Primärpräventionsmaßnahmen zählen „Lifestyle-Modifikationen“ wie beispielsweise eine adäquate Diät und eine erhöhte physische Aktivität [21].

Insgesamt können Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2, Hypertonie und Dyslipidämien mit den damit einhergehenden metabolischen Veränderungen unter dem Begriff des „Metabolischen Syndroms“ zusammengefasst werden, welcher 1923 erstmals beschrieben und 1988 von Reaven mit dem „Syndrom X“ betitelt wurde [9]. Aber auch Synonyme wie das „Insulin-Resistenz-Syndrom“ [22;23] und das „Tödliche Quartett“ [24] sind in der Literatur zu finden. Bislang existieren für das Metabolische Syndrom zwei international akzeptierte Definitionen. Nach Definition der WHO liegt das Metabolische Syndrom bei einer Person vor, die einen Diabetes mellitus Typ 2, eine gestörte Glucosetoleranz (*impaired glucose tolerance*, IGT), erhöhte Nüchtern-Glucosewerte (*impaired fasting glucose*, IFG) oder eine Insulinresistenz aufweisen und dazu zwei oder mehr der folgenden zusätzlichen Symptome aufweisen [25]:

- Bluthochdruck ($\geq 140/90$ mmHg)
- Hyperlipidämie: erhöhte Triglyceridkonzentration ($\geq 1,7$ mmol/l, 150 mg/dl) und/oder erniedrigte HDL-Cholesterolspiegel (Männer $< 0,9$ mmol/l, 35 mg/dl; Frauen $< 1,0$ mmol/l, 39 mg/dl)
- Abdominale Adipositas (Taille/Hüft-Umfang Männer $> 0,90$; Frauen $> 0,85$) und/oder BMI > 30 kg/m²

- Mikroalbuminurie (Albuminausscheidung im Urin $\geq 20 \mu\text{g}/\text{min}$ oder Albumin/Creatinin-Verhältnis $\geq 30 \text{ mg}/\text{g}$)

Die Definition der WHO von 1998 wurde im Nachhinein teilweise kritisiert, weil beispielsweise eine Mikroalbuminurie bei Nichtdiabetikern ungewöhnlich ist [26] oder der Nachweis einer Insulinresistenz, welche nach der WHO unter hyperinsulinämischen-euglycämischen Bedingungen untersucht werden soll, für die Praxis zur epidemiologischen Erfassung des Metabolischen Syndroms nicht praktikabel ist. Aus diesem Grund veröffentlichte die Expertenkommission des Nationalen Cholesteroll-Bildungsprogramms in Amerika (NCEP) in ihrem dritten „*adult treatment panel*“ (ATP III) 2001 eine neue, in der Praxis gut akzeptierte Definition („*working definition*“) des Metabolischen Syndroms [27]. Nach dieser Definition wird bei einer Person das Metabolische Syndrom diagnostiziert, wenn drei oder mehr der folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Erhöhte Nüchtern-Plasmaglukosewerte ($\geq 6,1 \text{ mmol}/\text{l}$, $110 \text{ mg}/\text{dl}$)
- Abdominale Adipositas (Taillenumfang Männer $> 102 \text{ cm}$; Frauen $> 88 \text{ cm}$)
- Hypertriglyceridämie ($\geq 1,695 \text{ mmol}/\text{l}$, $150 \text{ mg}/\text{dl}$)
- Erniedrigte HDL-Cholesterolspiegel (Männer $< 1,036 \text{ mmol}/\text{l}$, $40 \text{ mg}/\text{dl}$; Frauen $< 1,295 \text{ mmol}/\text{l}$, $50 \text{ mg}/\text{dl}$)
- Bluthochdruck ($\geq 130/85 \text{ mmHg}$)

Bereits die Definitionen des Metabolischen Syndroms zeigen, dass neben einem gestörten Glucosestoffwechsel, wie er zum Beispiel beim Typ 2-Diabetes auftritt, auch ein gestörter Fettstoffwechsel von großer Bedeutung ist [28]. So sind neben erhöhten Nüchternglukosewerten und einer gestörten Glucosetoleranz auch Abnormalitäten des Lipidstoffwechsels, wie beispielsweise eine Hypertriglyceridämie und erniedrigte HDL-Spiegel Diagnosekriterien. Auch eine erhöhte postprandiale Triglyceridantwort (*TG response*) auf eine standardisierte fettreiche Mahlzeit wird schon häufig im frühen Stadium des Metabolischen Syndroms detektiert, wenn eine gestörte Glucosetoleranz noch nicht zu erkennen ist, jedoch bereits erhöhte Nüchterninsulinspiegel und eine verminderte Insulinsensitivität vorliegen [8;29;30].

2.2. Interaktionen des Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsels

Die Interaktionen des Lipid- und Glucosestoffwechsels werden maßgeblich durch die weitreichenden Wirkungen von Insulin vermittelt. Unter normalen Umständen wird

Insulin als Folge auf eine gemischte Mahlzeit - in westlichen Nationen befinden sich die Menschen durch ihre Mahlzeitenabfolge nahezu ausschließlich im postprandialen Zustand [1] - von den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas in die Zirkulation sezerniert. Als anaboles Hormon ist Insulin u.a. für die Glucoseaufnahme und den Glucosemetabolismus, sowie für die Fettsäureaufnahme und den Lipidmetabolismus in den Zielgeweben verantwortlich. Abbildung 1 gibt ein vereinfachtes Schema zur Wirkung von Insulin auf den Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel in den hinsichtlich des Energiewechsels wichtigsten Geweben des Körpers wieder.

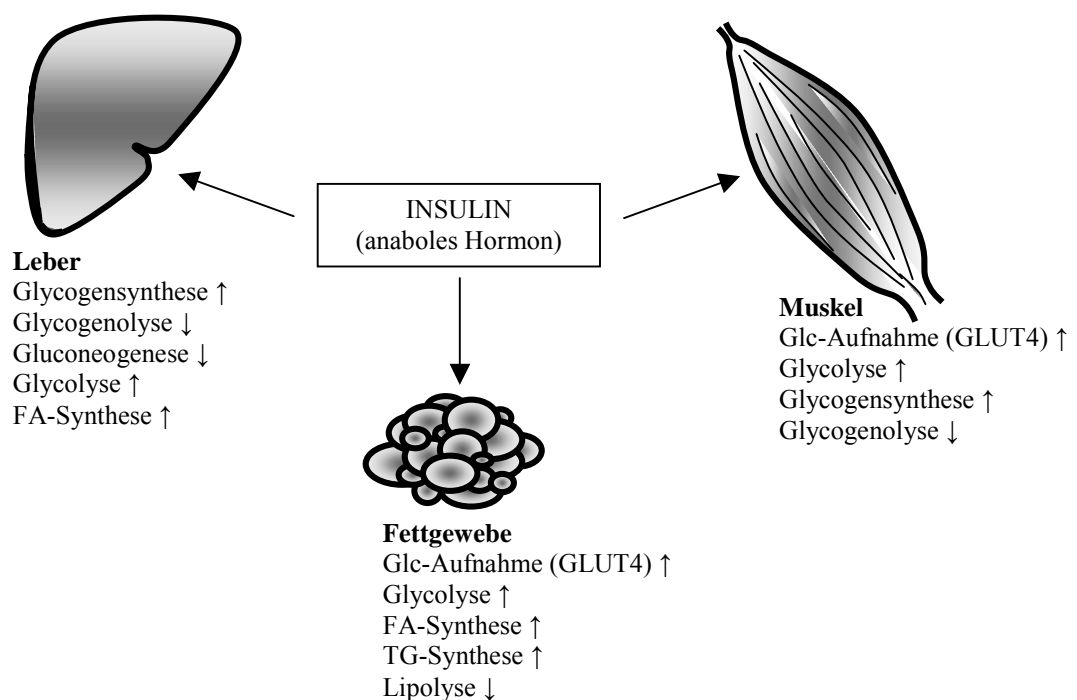


Abbildung 1: Vereinfachtes Schema zur Wirkung von Insulin als anaboles Hormon auf den Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel

Nach der Insulinsekretion als Folge auf eine gemischte Mahlzeit führt Insulin u.a. in der Leber zu einer verstärkten Glycogensynthese und zu einer Hemmung der Gluconeogenese. Darüber hinaus wird die hepatische Glycolyse beschleunigt und vermehrt Fettsäuren (FA) synthetisiert. Im Skelettmuskel und Fettgewebe kommt es durch Insulin zu einer verstärkten Aufnahme von Glucose (Glc) über den insulinabhängigen Glucosetransporter GLUT 4 und einer Stimulierung „Glucose-verbrauchender“ Prozesse (Glycolyse, Glycogensynthese, Fettsäuresynthese, Lipogenese) bzw. einer Hemmung „Glucose- bzw. Energie-liefernder“ Prozesse (Glycogenolyse, Lipolyse), weitere Erläuterungen im Text.

Postprandial stimuliert Insulin u.a. den extrazellulären Triglyceridabbau über eine Induktion der Lipoproteinlipase (LPL), so dass die aus Lipoproteinen freigesetzten freien Fettsäuren, ebenso wie die Glucose aus der Nahrung, v.a. vom adipösen Gewebe aufgenommen und dort zu Triglyceriden verestert werden. Die Lipoproteinlipase (LPL), welche v.a. im Kapillarendothel lokalisiert ist, ist für die extrazelluläre Hydrolyse von

Triglyceriden und eine zielgerichtete Fettsäureaufnahme in die extrahepatischen Gewebe verantwortlich. Die Rate der Fettsäureaufnahme aus der Zirkulation in die peripheren Gewebe ist proportional zur LPL-Gewebeaktivität [31]. Substrate der LPL sind Triglyceride, welche v.a. über triglyceridreiche Chylomikronen und VLDL (*very low-density lipoproteins*) zu den extrahepatischen Geweben gelangen. Weiterhin unterdrückt Insulin im Fettgewebe durch die Hemmung der hormonsensitiven Lipase (HSL) den Abbau von Triglyceriden und die Freisetzung von freien Fettsäuren in die Zirkulation. In der Skelettmuskulatur führt Insulin im postprandialen Zustand neben einer gesteigerten Glucoseaufnahme zu einer vermehrten Glycogensynthese. Im Gegensatz zum peripheren Fett- und Muskelgewebe erfolgt die Glucoseaufnahme in die Leber insulinunabhängig. Im Hepatozyten kommt es als Folge auf eine gemischte Mahlzeit zu einer vermehrten Glycogensynthese und verminderten Glycogenolyse sowie parallel zu einer verminderten Gluconeogenese über eine Hemmung der Pyruvat-Carboxylase. Bedingt durch eine beschleunigte Glycolyse, eine Hemmung der hormonsensitiven Lipase (HSL) sowie eine Aktivierung der Acetyl-CoA-Carboxylase und Fettsäuresynthese erfolgt zudem eine erhöhte hepatische Fettsäure- und Triglyceridsynthese im postprandialen Zustand.

Bei den insulinempfindlichen Geweben (Gewebe, deren Stoffwechsel durch Insulin direkt beeinflusst wird) sind neben der Leber, dem zentralen Organ im Intermediärstoffwechsel, welche wesentlich zur Glucosehomöostase im Organismus beiträgt, insbesondere die Muskulatur und das Fettgewebe von Bedeutung, da diese sich zum einen durch eine insulinabhängige Glucoseaufnahme auszeichnen und zum anderen den größten Teil der Körpermasse darstellen. Die Skelettmuskulatur ist der Hauptort der insulinstimulierten Glucoseaufnahme [32]. Beim Muskelgewebe wird dabei zwischen verschiedenen Muskelfasertypen mit unterschiedlichen Stoffwechselkapazitäten differenziert. Neben den langsamen, aber ausdauernden „Typ 1-Fasern“ mit einem hohen Mitochondrien- und Myoglobingehalt gibt es helle „Typ 2-Fasern“ mit einer hohen Kontraktions- und Erschlaffungsgeschwindigkeit. Die Typ 1-Fasern zeichnen sich durch einen oxidativen Stoffwechsel (Fettsäureoxidation) aus. Der rote M. soleus besteht beispielsweise hauptsächlich aus diesen langsamen oxidativen Typ 1-Fasern sowie aus Typ 2a-Fasern mit oxidativer Kapazität. Der weiße Teil des M. gastrocnemius hingegen enthält hauptsächlich schnelle Typ 2b-Fasern, welche ihre Energie überwiegend aus der Glycolyse gewinnen. In Tierstudien wurde gezeigt, dass

die Akkumulation von Triglyceriden im Skelettmuskel mit einer verminderten Insulinsensitivität (peripheren Glucoseaufnahme) assoziiert ist und dass hochfettgefütterte Ratten nach der Entstehung einer hepatischen Insulinresistenz mit einem erhöhten hepatischen Triglyceridausstrom eine muskuläre Insulinresistenz mit erhöhter Triglyceridakkumulation im Muskel entwickelten [2;7;33-35]. Auch in Humanstudien konnte ein Zusammenhang zwischen intramyocellulären Triglyceridgehalt und Insulinresistenz nachgewiesen werden [36-38].

Neben der Skelettmuskulatur ist auch das Fettgewebe ein äußerst stoffwechselaktives Organ und nicht nur Ort für die Triglyceridspeicherung. Darüber hinaus weisen einzelne Fettdepots unterschiedliche Stoffwechselaktivitäten auf [39;40]. Das intraabdominale Fettdepot hat einen hohen, das subkutane abdominale Fettdepot einen mittleren und die glutealen-femorale Fettdepots einen geringen Triglyceridumsatz [41]. Vague [42] unterschied bereits 1947 zwischen der androgenen und gynoiden Fettverteilung (androgen: Fettverteilung in der Abdominalregion, Wortbedeutung (griechisch) „Mann“; gynoid: Fettverteilung in der Hüft- und Oberschenkelregion, Wortbedeutung (griechisch) „Frau“) beim Menschen und erkannte, dass die androide Fettverteilung mit chronischen Erkrankungen wie beispielsweise Typ 2-Diabetes und Atherosklerose assoziiert ist [43] und dies zu einer höheren Mortalität führt [44-46]. Personen mit einer gynoiden Fettverteilung haben hingegen ein geringeres Risiko. Im Abdomen finden sich u.a. intraperitoneale und retroperitoneale Fettdepots [47;48]. Die viszeralen Fettdepots (omental und mesenterisch) sind von besonderem Interesse, da dort freigesetzte freie Fettsäuren direkt über die Portalvene in die Leber gelangen und somit den hepatischen Stoffwechsel unmittelbar beeinflussen können [49]. Weiterhin wurde festgestellt, dass isolierte viszerale Adipozyten eine höhere Lipolyserate und eine höhere Stimulierbarkeit durch Katecholamine aufweisen, wohingegen subkutane Adipozyten effizienter auf die Wirkung von Insulin reagieren [49;50]. Bei Ratten [51], nicht jedoch beim Menschen [52], wird zudem die hormonsensitive Lipase (HSL) in intra-abdominalen Adipozyten stärker exprimiert als in subkutanen.

2.3. Insulinresistenz – fettinduzierte Insulinresistenz

Obwohl die breite Symptomatik des Metabolischen Syndroms nicht durch eine einzige Ursache erklärt werden kann, wird eine Hyperinsulinämie im nüchternen sowie postprandialen Zustand als Bindeglied der metabolischen Störungen vermutet [53] und

daher die Insulinresistenz als zentrale Hypothese der Pathophysiologie des Metabolischen Syndroms betrachtet [29]. Eine verminderte Wirkung von Insulin auf die o.g. Zielorgane ist als eine Insulinresistenz definiert [1] und kann zu schwerwiegenden Stoffwechselstörungen führen. Einen wesentlichen Beitrag zur experimentellen Erfassung der Insulinwirkung *in vivo* leisteten de Fronzo et al. [54] mit der Einführung der Glucose-Clamp-Technik. Die durch eine Insulinresistenz bedingten Stoffwechseleränderungen der Leber, des Skelettmuskels und des Fettgewebes sind schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Die jeweiligen Effekte (Pfeile) sind dabei im Vergleich zu Abbildung 1 (Seite 6) zu verstehen.

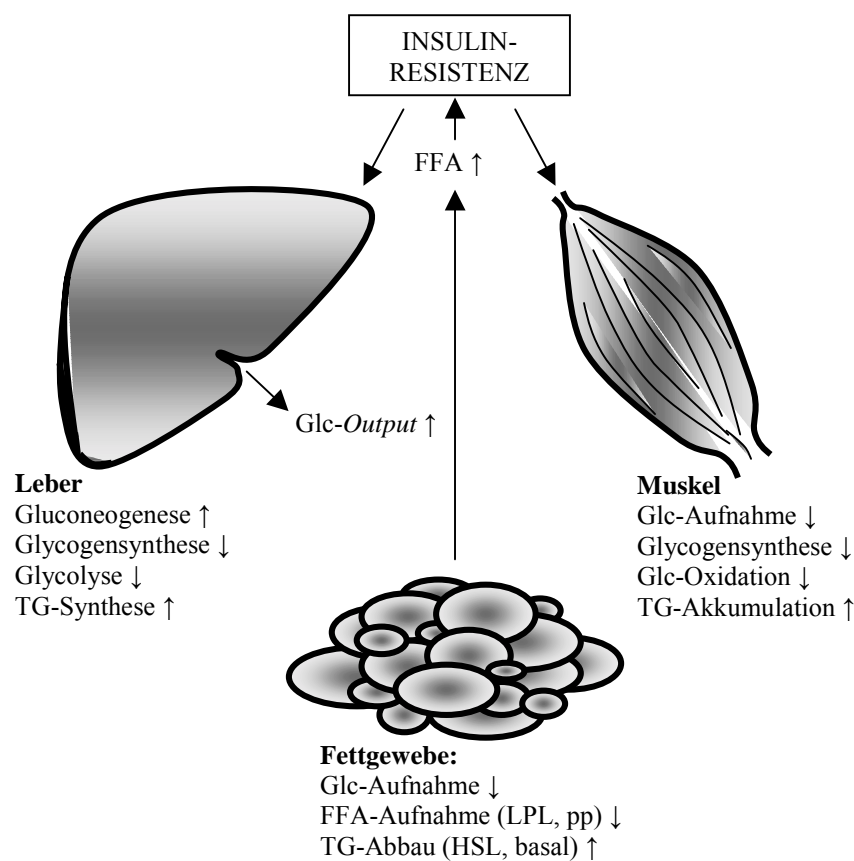


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Folgen einer Insulinresistenz in Leber, Skelettmuskel und Fettgewebe

Eine Insulinresistenz ist häufig mit einer Erhöhung zirkulierender freier Fettsäuren (FFA) assoziiert, welches im Nüchternzustand aus einer verminderten insulinstimulierten Suppression der hormonsensitiven Lipase (HSL) und einem verstärkten Abbau von Triglyceriden (TG) im Fettgewebe, sowie im postprandialen Zustand (pp) aus einem verminderten extrazellulären Abbau von TG resultiert. Die Leber weist im insulinresistenten Zustand eine verminderte Glycogensynthese und Glycolyse und eine verstärkte Gluconeogenese auf, infolgedessen bei hochfettgefütterten Ratten eine erhöhte hepatischen Freisetzung von Glucose (*Glc-Output*) nachgewiesen werden konnte [33]. Im Skelettmuskel kommt es zu einer verminderten Aufnahme von Glucose (Glc) sowie zu einer reduzierten Glycogensynthese und Glucoseoxidation. Weiterhin ist eine Insulinresistenz mit einer verstärkten Einlagerung von Triglyceriden (TG) in nicht-adipösem Gewebe (z.B. Skelettmuskulatur und Leber) gekennzeichnet (weitere Erläuterungen im Text).

Die pathologischen Veränderungen einer Insulinresistenz sind nachfolgend am Beispiel von adipösen Personen dargestellt, weil Adipositas meistens in Kombination mit einer Insulinresistenz und dem Metabolischen Syndrom co-existiert [55]. Im Nüchternzustand werden freie Fettsäuren durch den Triglyceridabbau in den Adipozyten unter Beteiligung der cAMP-abhängigen hormonsensitiven Lipase (HSL) in die Zirkulation abgegeben, wobei bei adipösen im Vergleich zu nicht-adipösen Personen, bedingt durch die erhöhte absolute Fettmasse, vermehrt Fettsäuren aus dem Fettgewebe in die Zirkulation abgegeben werden [56]. Daher können bereits im frühen Stadium der Insulinresistenz häufig erhöhte FFA-Nüchternspiegel bei adipösen Personen nachgewiesen werden [8]. Als Reaktion auf eine gemischte Mahlzeit kann bei adipösen Personen, bedingt durch eine Hemmung der Lipoproteinlipase (LPL), ein verminderter extrazellulärer Abbau von Triglyceriden stattfinden, d.h. die Triglycerid-*Clearance* kann bei diesen Personen „insulin-resistent“ sein, wodurch als Charakteristikum eine erhöhte postprandiale Lipidämie (v.a. Triglyceride) auftritt [57]. Diese spiegelt sich in einem verlängerten Vorhandensein von diätetischen Fettsäuren in der Zirkulation wider [58] und resultiert in einer vermehrten Aufnahme dieser Fettsäuren in andere Gewebe, wie beispielsweise Leber und Skelettmuskulatur, wo diese letztendlich in Form von Triglyceriden akkumulieren. Weiterhin sind adipöse verglichen mit nicht-adipösen Personen nicht in der Lage, den Fettsäureausstrom aus dem Fettgewebe im postprandialen Zustand zu unterdrücken, da die Hemmung der HSL im Fettgewebe durch Insulin nicht oder ungenügend erfolgt [57]. Neben der erhöhten Triglyceridakkumulation in der Skelettmuskulatur kommt es im insulinresistenten Muskel zu einer reduzierten zellulären Glucoseaufnahme, einer reduzierten Glycogensynthese und einer verminderten Glucoseoxidation. Die molekularbiologischen Mechanismen der reduzierten zellulären Glucoseaufnahme werden in Kapitel 2.5.1. detaillierter beschrieben. In der Leber kommt es im insulinresistenten Zustand zu einer vermehrten Gluconeogenese, einer verminderten Glycogensynthese und einer verminderten Glycolyse, welches sich, zumindest im Rattenmodell der fettinduzierten Insulinresistenz [33], in einem gesteigerten Glucoseausstrom äußert. Der erhöhte Fluss von freien Fettsäuren zur Leber führt darüber hinaus zu einer gesteigerten hepatischen Triglyceridsynthese [59]. Weiterhin kommt es – zusätzlich bedingt durch einen verminderten hepatischen Abbau von Apolipoprotein B – zu einer Überproduktion von triglyceridreichen VLDL-Partikeln,

welche in der Zirkulation zu einem vermehrten Vorkommen von atherogenen kleinen, dichten LDL-Partikeln (*low density lipoprotein*) führen [60;61].

Während bei der Einführung des Konzepts der Insulinresistenz hauptsächlich Störungen des Glucosestoffwechsels betrachtet wurden, trat später vermehrt das Fettgewebe und der Fettstoffwechsel in den Mittelpunkt der Betrachtung [22;28;47;62]. Die starke Assoziation zwischen abdominalen (zentraler) Adipositas und Insulinresistenz und die Tatsache, dass viele adipöse Personen erhöhte Plasmaspiegel von freien Fettsäuren und Triglyceriden aufweisen, unterstützt diese Überlegung [40]. Allerdings ist der kausale Zusammenhang zwischen Abnormalitäten des Lipidstoffwechsels und einer verminderten Insulinsensitivität nicht eindeutig geklärt. Humanexperimente [63-65] und Studien mit Ratten [66-69] haben gezeigt, dass akute Infusionen von Triglyceriden – meist in Kombination mit Heparin, welches die LPL aktiviert und zur Erhöhung der FFA-Spiegel im Plasma führt – im euglycämischen oder hyperinsulinämischen euglycämischen Clamp nach einigen Stunden zu einer reduzierten Gesamtkörperglucoseaufnahme – als Charakteristikum der Insulinresistenz – führen. Allerdings ist diese durch transient erhöhte FFA-Plasmaspiegel reduzierte Gesamtkörperglucoseaufnahme noch nicht als pathophysiologisch einzustufen. So zeigten beispielsweise Boden et al. [63] bei gesunden Probanden unter hyperglycämischen Bedingungen, dass eine durch Lipidinfusion anfänglich induzierte Insulinresistenz nach 48 Stunden, wahrscheinlich bedingt durch eine vermehrte Insulinsekretion, kompensiert werden konnte.

Im Zusammenhang mit einer fettinduzierten Insulinresistenz ist neben der durch akute Lipid-/Hepatininfusionen beschriebene transiente Insulinresistenz auch eine durch Mahlzeiten induzierte Insulinresistenz beschrieben worden. So führt die mehrwöchige Fütterung von Hochfettdiäten bei Ratten zur Entstehung einer Insulinresistenz [2;7;34;70;71]. Hierbei scheint eher die Art der eingesetzten Fettsäuren als die Menge des verabreichten Fettes von Bedeutung zu sein. Storlien et al. [2] untersuchten mit Hilfe der Gesamtkörperglucoseaufnahme während eines euglycämischen-hyperinsulinämischen Clamps die Insulinsensitivität bei Ratten nach 30-tägiger Fütterung von Hochfettdiäten. Die Hochfettdiäten unterschieden sich im Grad der Sättigung (gesättigt, einfach ungesättigt, mehrfach ungesättigt) und der Position der Doppelbindungen (ω -3, ω -6, ω -9) der enthaltenen Fettsäuren. Gesättigte (Talg und Distelöl), einfach ungesättigte ω -9 (Olivenöl) und mehrfach ungesättigte ω -6 (Distelöl) Fettsäuren führten zur Ausbildung einer Insulinresistenz. Die Substitution der mehrfach

ungesättigten ω -6 Fettsäuren durch 11 % mehrfach ungesättigte langkettige ω -3 Fettsäuren aus Fischöl hingegen führte zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität. Die Substitution der mehrfach ungesättigten ω -6 Fettsäuren durch kürzerkettige ω -3 Fettsäuren (α -Linolensäure, 18:3 ω -3) führte dagegen zu keiner verbesserten Insulinwirkung, jedoch zu einer kompletten präventiven Wirkung bei der gesättigten Fettsäure-Diät [2;72]. Der durchschlagende Effekt der Fischölsupplementation bei hochfettgefütterten Ratten konnte in Humanstudien hingegen nicht überzeugend bestätigt werden [73-75].

Kraegen et al. [7] untersuchten die gewebespezifische Entstehung der Insulinresistenz nach der 3-tägigen bzw. 3-wöchigen Fütterung einer Hochfettdiät (im Gegensatz zu einer stärkereichen Diät) bei erwachsenen Wistar-Ratten. Drei Tage und 3 Wochen nach der Fütterung der Hochfettdiät konnte in einem hyperinsulinämischen-euglycämischen Clamp eine fehlende Hemmung des physiologisch durch Insulin supprimierten hepatischen *Glucoseoutputs* bei den Ratten nachgewiesen werden. Eine eingeschränkte insulinvermittelte periphere Glucoseaufnahme in den Skelettmuskel war hingegen erst nach 3 Wochen nachweisbar. Über die Aufnahme von 2-Desoxyglucose, einem nicht-metabolisierbaren Glucosederivat, konnten die Autoren darüber hinaus zeigen, dass das Fettgewebe - nicht jedoch das Muskelgewebe - nach 3 Tagen eine reduzierte Glucoseaufnahme, d.h. eine verminderte Insulinsensitivität, aufwies. Auch eine Akkumulation von Triglyceriden im Skelettmuskel der Tiere war erst nach 3 Wochen nachzuweisen. Zusammenfassend stellten die Autoren fest, dass die Fütterung von Hochfettdiäten mit langkettigen Fettsäuren zur Induktion einer Insulinresistenz führt, welche zuerst in der Leber und dem Fettgewebe und erst dann im Skelettmuskel nachweisbar ist, wobei die Veränderungen im Skelettmuskel mit einer Triglyceridakkumulation einhergehen [7]. Auf die pathophysiologischen Interaktionen zwischen langkettigen freien Fettsäuren, Glucosestoffwechsel und Insulinresistenz wird im folgenden Kapitel detaillierter eingegangen.

2.4. Langkettige Fettsäuren und die Pathogenese der Insulinresistenz

Freien Fettsäuren (FFA) wird heute eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Insulinresistenz beigemessen. So zeigen Humanstudien, dass (a) viele adipöse Personen erhöhte Plasmaspiegel von FFA haben und (b) akut sowie (c) chronisch erhöhte FFA-

Plasmaspiegel zur Ausbildung einer Insulinresistenz führen [9;63-65;76;77]. Zudem bewirkte eine 12-stündige Senkung der erhöhten FFA-Plasmaspiegel bei adipösen Personen eine Normalisierung der Insulinsensitivität und bei adipösen Typ 2-Diabetikern eine verbesserte Insulinsensitivität [78]. Boden et al. [65] konnten zeigen, dass transient erhöhte FFA-Plasmaspiegel (< 2 h) die periphere Glucoseaufnahme, die Glycogensynthese und die Glycolyse bei Diabetespatienten hemmt. Roden et al. [64] detektierten zusätzlich zu einer – durch transient erhöhte FFA-Spiegel (< 3 h) – reduzierten Gesamtkörperglucoseaufnahme eine erniedrigte Glucoseoxidation und eine reduzierte Glycogensynthese im Muskel von gesunden Probanden. Auch im Rattenexperiment konnte nach einer Triglycerid-/Heparininfusion eine fettsäureinduzierte Hemmung der insulinstimulierten Glucoseaufnahme und eine Reduktion der insulinvermittelten Glycogensynthese nachgewiesen werden [68].

Obwohl transient und kontinuierlich erhöhte Plasmaspiegel von FFA zur peripheren Insulinresistenz führen, können allerdings viele Personen dieses durch einer erhöhte Insulinsekretion kompensieren. Boden et al. [76] vermuten, dass freie Fettsäuren zu 30 - 50 % die basale Insulinsekretion stimulieren und somit die glucosestimulierte Insulinsekretion unterstützen. Diese insulinstimulierende Wirkung der freien Fettsäuren führt dazu, dass die Mehrzahl der übergewichtigen Personen trotz einer Insulinresistenz keinen Diabetes mellitus Typ 2 entwickeln, sondern lediglich Personen mit einer genetischen Prädisposition für diese Erkrankung [79].

Zur Bedeutung der Fettsäuren bei der Entstehung einer Insulinresistenz, insbesondere im Skelettmuskel (periphere Insulinresistenz) und in der Leber (hepatische Insulinresistenz), werden verschiedene Mechanismen postuliert. Neben dem „Glucose-Fettsäure-Zyklus“ von Randle [80], der nur bedingte Gültigkeit besitzt (siehe Kapitel 2.4.1.), wurden insbesondere von der Arbeitsgruppe Kraegen et al. [66] zelluläre Mechanismen postuliert (siehe Kapitel 2.4.2.), welche zur Entschlüsselung der Pathogenese einer Insulinresistenz beitragen könnten.

2.4.1. Randle-Zyklus

Der Einfluss freier Fettsäuren auf den Glucosestoffwechsel scheint hinreichend belegt. Interaktionen zwischen Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel wurden bereits 1963 von

Randle et al. [80] am isolierten perfundierten Rattenherzen und am Zwerchfell der Ratte untersucht und als sogenannter „Glucose-Fettsäure-Zyklus“ beschrieben. Die von den Autoren aufgestellte Hypothese lautete, dass die erhöhte Verfügbarkeit und Oxidation von freien Fettsäuren die Glucoseoxidation und damit die Glucoseaufnahme in Muskelzellen hemmt. Diese Hypothese beruht auf einer Substratkompetition, bei welcher die Metabolite einer erhöhten Fettsäureoxidation die 6-Phosphofruktokinase, die Hexokinase und die Pyruvatdehydrogenase hemmen. Durch die erhöhte Acetyl-CoA-Konzentration soll (a) die Pyruvatdehydrogenase phosphoryliert und damit inhibiert werden und (b) über den Citratzyklus eine erhöhte Citratproduktion bewirkt werden, welche allosterisch die Aktivität der 6-Phosphofruktokinase hemmen soll. Daraus soll eine erhöhte Glucose-6-Phosphatkonzentration resultieren, welche die Hexokinase hemmen und somit zu einem erhöhten intrazellulären Glucoseanstieg beitragen, welcher wiederum die Glucoseaufnahme in die Muskelzellen hemmen soll [80-82].

Die von Randle [80] aufgestellte Hypothese wurde in späteren Studien teilweise bestätigt, allerdings stehen auch Studienergebnisse im Widerspruch zu der Hypothese, so dass insgesamt die von Randle [80] aufgestellte Hypothese heute lediglich bedingte Gültigkeit besitzt. Hirabara et al. [83] zeigten im isolierten M. soleus von Wistar-Ratten, dass die Inkubation physiologischer Konzentrationen Palmitat (50 und 100 μM) in Kombination mit Insulin (10 mU/ml) die insulinstimulierte Glycogensynthese akut erhöhte und die Glycolyse hemmte. Im scheinbaren Widerspruch zur Randle-Hypothese steht allerdings, dass trotz einer gehemmten Glycolyse keine verminderte Glucoseaufnahme in den isolierten M. soleus der Ratten erfolgte [83].

Auch in Rattenstudien konnte *in vivo*, beispielsweise von Kim et al. [84], gezeigt werden, dass die Fütterung einer Hochfettdiät anfänglich zu einer durch Insulin stimulierten Glycogensynthese und erhöhten Konzentration von Glucose-6-Phosphat und einer reduzierten Glycolyse im Skelettmuskel führte. Zudem war nach 2-wöchiger Fütterung eine reduzierte insulinvermittelte Glucoseaufnahme in die Skelettmuskulatur der Ratten nachweisbar. Die durch die Hochfettfütterung oder durch Lipidinfusionen anfänglich stimulierte Glycogensynthese nimmt allerdings im Laufe der Zeit ab [7;82;84;85]. In einer Studie mit hochfettgefütterten Ratten führte darüber hinaus die akute pharmakologische Inhibition der Fettsäureoxidation mit Etomoxir, einem spezifischen Hemmer der Carnitinpalmitoyltransferase 1 (CPT1), dem Schlüsselenzym des LCFA-CoA-Transports ins Mitochondrium [86], zu einer verbesserten

Insulinwirkung im Sinne einer erhöhten Glucoseaufnahme in den Skelettmuskel, hatte jedoch keinen Effekt auf die verringerte insulinstimulierte Glycogensynthese und die erniedrigte Aktivität der Glycogensynthase im Skelettmuskel der Tiere [33].

Es scheint gesichert, dass erhöhte Plasmaspiegel von FFA innerhalb kürzester Zeit die Kohlenhydratoxidation hemmen. Ob dies jedoch die zelluläre Glucoseaufnahme beeinflusst und primär zur Induktion einer Insulinresistenz beiträgt, wird angezweifelt. In einigen Studien konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die insulinstimulierte Glucoseaufnahme für Stunden unbeeinflusst blieb, auch wenn die Kohlenhydratoxidation bereits maximal inhibiert war bzw. dass die Triglycerid-/Heparininfusion über mindestens 3 Stunden infundiert werden musste, bevor eine fettinduzierte Hemmung der Gesamtkörperglucoseaufnahme auftrat [64;65;77;85;87].

Diese Erkenntnisse führten zu der Annahme, dass neben dem Randlezyklus noch weitere Effekte existieren, über welche ein erhöhtes Angebot von freien Fettsäuren zur Entstehung der Insulinresistenz beitragen könnte. Roden et al. [64] fanden bei gesunden Probanden nach einer akuten Lipid-/Heparininfusion neben einer reduzierten Gesamtglucoseaufnahme, eine reduzierte Glucoseoxidation und eine reduzierte Glycogensynthese, jedoch - im Gegensatz zur Annahme von Randle - einen geringeren Anstieg der Glucose-6-Phosphatkonzentration im Muskel der Probanden, im Vergleich zu einer Glycerolinfusion. Aufgrund dieser Ergebnisse stellten die Autoren die Hypothese auf, dass der von Randle postulierte Mechanismus der Hexokinasehemmung infolge einer Glucose-6-Phosphatanreicherung im Muskel nicht zutrifft und stattdessen eine hemmende Wirkung der FFA auf den Glucosetransport und/oder die Glucosephosphorylierung wahrscheinlich ist [64]. Dresner et al. [88] demonstrierten darüber hinaus in humanen Muskelbiopsieproben nach einer 5-stündigen Lipid-/Heparininfusion mit anschließendem hyperinsulinämischen-euglycämischen Clamp neben einem verminderten Glucose-6-Phosphatanstieg eine erniedrigte intrazelluläre Glucosekonzentration, welche darauf hindeutet, dass die Glucoseaufnahme und nicht die Phosphorylierung von Glucose den zentralen Schritt darstellt, über welchen freie Fettsäuren den Glucosestoffwechsel beeinflussen.

Dass nicht nur Fettsäuren einen Einfluss auf den Glucosestoffwechsel ausüben, sondern auch *vice versa* eine erhöhte Glucoseverfügbarkeit und -oxidation die Lipidoxidation hemmt, wurde von Wolfe und seinen Mitarbeitern als „reverser Glucose-Fettsäure-

Zyklus“ bezeichnet [89;90]. So wurde beispielsweise gezeigt, dass eine chronische Glucoseinfusion, die einen 3-fach erhöhten basalen Glucoseturnover erzeugte, zu einer Insulinresistenz führte, wobei die Konzentration an Malonyl-CoA, einem Inhibitor der Fettsäureoxidation, anstieg und in Folge dessen ein erhöhter Gehalt an Triglyceriden und freien Fettsäuren im Skelettmuskel und der Leber der Ratten auftrat [90-92].

2.4.2. Zelluläre Mechanismen zur Entstehung der Insulinresistenz

Die kausale Beziehung zwischen Störungen des Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsels ist noch nicht geklärt. Die Akkumulation von Triglyceriden im Skelettmuskel bei hochfettgefütterten Ratten könnte, über bislang noch nicht vollständig bekannte Mechanismen, in die u.a. aus Triglyceriden freigesetzte Fettsäuren und deren aktivierte Derivate (Acyl-CoA) involviert sind [70], zu einer Einschränkung der insulinstimulierten Glucoseaufnahme in den Skelettmuskel führen [7;33;34;93]. So war die bei Ratten während eines hyperinsulinämischen Clamps nach 3 - 5 Stunden oder die durch Hochfettdiäten induzierte Insulinresistenz nicht nur mit erhöhten Triglyceridkonzentrationen, sondern auch mit erhöhten Gehalten an langkettigen Acyl-CoA (LCFA-CoA) im Skelettmuskel vergesellschaftet [33;34;69;70;94]. Auch bei einer durch chronische Glucoseinfusionen erzeugten Insulinresistenz kam es zu einer LCFA-CoA-Akkumulation im Muskel, die wahrscheinlich durch eine Malonyl-CoA-bedingte Hemmung der Carnitinpalmityltransferase 1 ausgelöst wurde [92;95]. Darüber hinaus erhöhte eine durch Etomoxir gehemmte Fettsäureoxidation die Glucoseaufnahme in den oxidativen und glykolytischen Muskel bei hochfettgefütterten insulinresistenten Ratten [33].

Faktoren, die zur Fettanreicherung im Muskel führen könnten, wären eine erhöhte Aufnahme von Fettsäuren in die Muskelzelle bei erhöhtem basalen Plasmaspiegel von freien Fettsäuren oder postprandial erhöhten Triglyceridspiegeln und/oder eine eingeschränkte muskuläre Fettsäureoxidation. Mechanismen über welche eine muskuläre Fettakkumulation die Insulinsensitivität des Muskels beeinflussen könnte, sind nach Kraegen et al. [1;66]:

- eine reduzierte Glucoseoxidation, welche nach Randle durch die mitochondriale Fettsäureoxidation beeinflusst wird (siehe Kapitel 2.4.1.)

- eine erhöhte Konzentration langkettiger aktivierter Fettsäuren (LCFA-CoA), welche über eine veränderte Substratverfügbarkeit und allosterische Regulation Enzymaktivitäten beeinflussen könnten
- eine erhöhte Konzentration von Malonyl-CoA, welches über eine Hemmung der CPT1 die mitochondriale Aufnahme von LCFA-CoA inhibiert
- eine erhöhte Konzentration von weiteren Fettsäuremetaboliten, welche die intrazelluläre Insulinsignalkaskade (siehe Kapitel 2.5.1.) beeinflussen könnten, wie z.B. Diacylglycerol (DAG), welches über eine Aktivierung der Proteinkinase K (PKK) die Insulinsignalkaskade beeinflusst, oder Ceramide, welche die Proteinkinase B (PKB) und die Glycogensynthese hemmen
- eine durch Fettsäuren oder Fettsäuremetabolite veränderte Genexpression (siehe Kapitel 2.5.2.)
- oder humorale Signale

Ein verminderter Gehalt an langkettigen mehrfach ungesättigten ω 3-Fettsäuren (20:5 und 22:6) in der Phospholipidfraktion der Gewebe könnte ebenfalls zur Entstehung einer Insulinresistenz durch Hochfettdiäten beitragen, denn die Addition von Fischölen zu einer Insulinresistenz-induzierenden Hochfettdiät führte in der Studie von Storlien et al. [2] zu einem höheren Gehalt dieser langkettigen mehrfach ungesättigten ω 3-Fettsäuren in der Phospholipidfraktion der roten oxidativen Muskulatur (M. soleus und M. quadriceps), welches wiederum eng mit einer höheren Insulinsensitivität der Ratten, d.h. einer erhöhten insulinstimulierten Glucosemetabolisierung korreliert war.

Da bei mit Hochfettdiäten gefütterten, verglichen mit stärkereich gefütterten, Ratten neben einer erhöhten muskulären Triglyceridakkumulation auch eine erhöhte hepatische Triglyceridkonzentration nachzuweisen ist [96], könnte auch in der Leber ein erhöhter Gehalt an Fettsäuren oder deren Derivaten zur hepatischen Insulinresistenz beitragen. Zum einen ist bekannt, dass Fettsäuren zu einer verminderten hepatischen *Insulin clearance* [97] führen. Zum anderen haben *in vitro*-Studien gezeigt, dass freie Fettsäuren die hepatische Gluconeogenese stimulieren [98-100]. Bezüglich der hepatischen Glucosefreisetzung (HGP, *hepatic glucose production/output*) besteht allerdings kein einheitliches Bild. Eine erhöhte Glucoseproduktion der Leber infolge einer fehlenden Supprimierung der Gluconeogenese wird wahrscheinlich durch die

fettsäurestimulierte Insulinsekretion und damit durch eine insulinstimulierte Suppression der Glycogenolyse weitestgehend kompensiert [79;101], so dass der hepatische Glucoseausstrom beim Menschen unverändert bleibt. Bei Hochfettdiät-gefütterten insulinresistenten Ratten kommt es hingegen nach 3 Wochen zu einer eingeschränkten insulininduzierten Suppression des hepatischen Glucoseausstroms [7;33]. Um zu testen, ob eine Hemmung der Fettsäureoxidation den hepatischen Glucoseoutput über eine Reduktion der Gluconeogenese reduziert, wurde hochfettgefütterten insulinresistenten Ratten Etomoxir injiziert [33]. Entgegen den Erwartungen konnte keine Hemmung der HGP beobachtet werden. Allerdings kam es während der Etomoxirbehandlung zu einer 48-prozentigen Depletion der hepatischen Glycogenspeicher [33]. Auch in Humanstudien mit Typ 2-Diabetikern schlug der Versuch fehl, durch eine Hemmung der Gluconeogenese mit Ethanol die HGP zu reduzieren [102]. Diese Befunde legen nahe, dass eine erhöhte hepatische Glycogenolyse also ebenfalls zu der durch FFA inhibierten insulinvermittelten Suppression der hepatischen Glucoseproduktion beiträgt [33;103].

Neben einer erhöhten zellulären Fettsäureaufnahme kann ein veränderter intrazellulärer Lipidmetabolismus zur Fettanreicherung in Leber und Muskel führen. In Abbildung 3 ist der zelluläre Lipidmetabolismus vereinfacht dargestellt. Bei der zellulären Aufnahme von Fettsäuren aus der Zirkulation wird neben der passiven Diffusion ein proteinvermittelter Transportmechanismus, insbesondere für langkettige Fettsäuren, diskutiert (siehe Kapitel 2.4.3.). Im Cytoplasma der Zellen können die langkettigen Fettsäuren durch cytosolische Acyl-CoA-Synthetasen in LCFA-CoA überführt werden, die dann zu Mono-, Di- und Triglyceriden verestert, in Membranphospholipide eingebaut oder mit Hilfe der Carnitinpalmitoyltransferase 1 und 2 (CPT1 und 2) ins Mitochondrium transportiert und über die β -Oxidation zur Energiegewinnung herangezogen werden [104]. Der Transport der langkettigen Fettsäuren durch die Mitochondrienmembran ist der limitierende Schritt der Fettsäureoxidation. Eine erhöhte Konzentration von Malonyl-CoA hemmt die CPT1 und führt nachfolgend zu einer reduzierten Fettsäureoxidation [105;106]. Neben der mitochondrialen β -Oxidation trägt die β -Oxidation über die Acyl-CoA-Oxidase (AOX) in den Peroxisomen bis zu 20 % zur Oxidation von Fettsäuren bei, insbesondere von langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren [107].

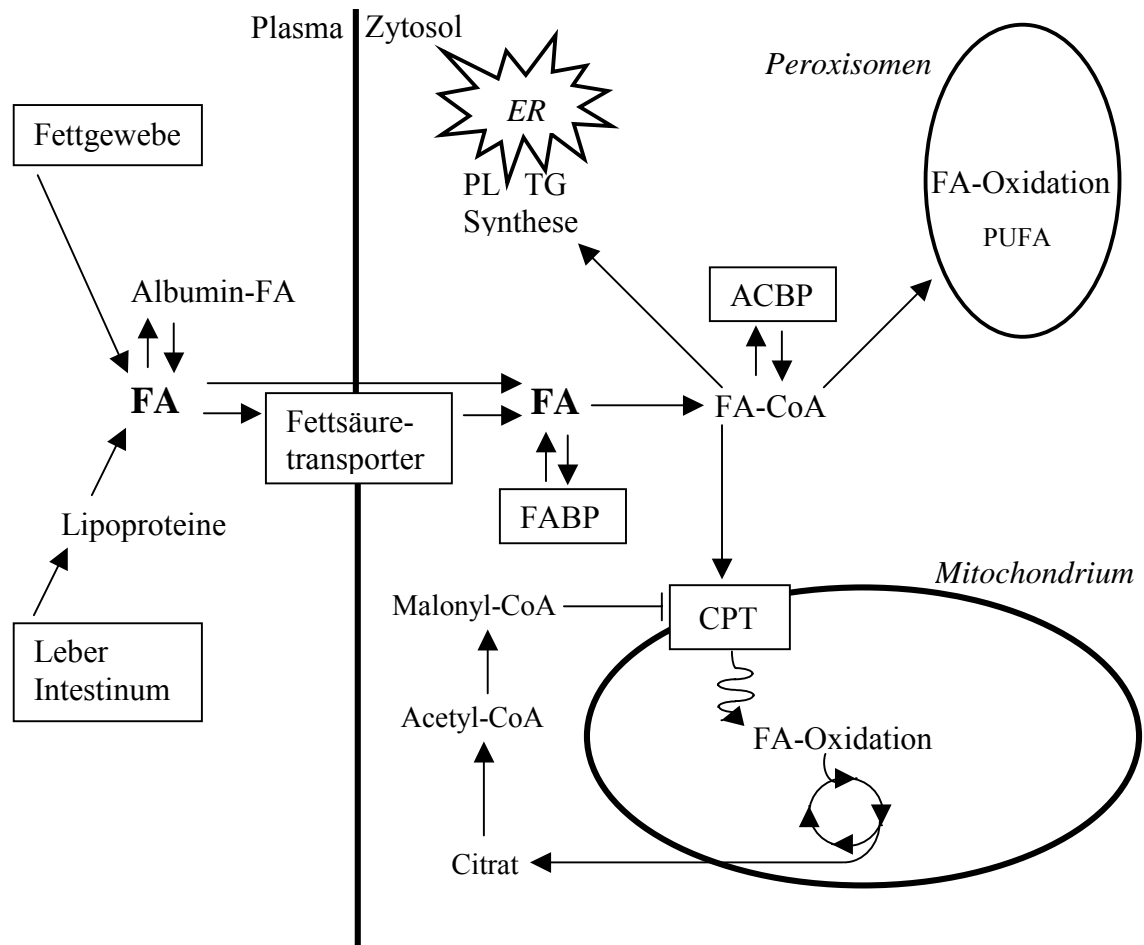


Abbildung 3: Vereinfachtes Schema des zellulären Fettsäuremetabolismus

Fettsäuren (FA) können durch passive Diffusion oder mit Hilfe von putativen Fettsäuretransportern in die Zelle aufgenommen werden und dort in verschiedene Stoffwechselwege einmünden (*intracellular trafficking*). Fettsäurebindende Proteine (FABP) bzw. Acyl-CoA-bindende Proteine (ACBP) fungieren als Puffer im Cytoplasma der Zelle. Am endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgt die Synthese von Triglyceriden (TG) und Phospholipiden (PL). Über das Carnitinpalmitoyltransferasesystem (CPT) gelangen aktivierte Fettsäuren für die β -Oxidation in das Mitochondrium. Eine erhöhte Malonyl-CoA-Konzentration hemmt diesen Transportprozess. Auch in den Peroxisomen erfolgt die Fettsäureoxidation, vornehmlich langkettiger ungesättigter Fettsäuren (PUFA), weitere Erläuterungen im Text.

2.4.3. Exkurs – putative fettsäuretransportierende/-bindende Proteine

Da eine verstärkte Aufnahme von langkettigen Fettsäuren in die Skelettmuskulatur zu einer muskulären Triglyceridakkumulation führen kann und diese stark mit der Entstehung einer Insulinresistenz assoziiert ist (vgl. vorheriges Kapitel), soll im folgenden Exkurs die proteinvermittelte zelluläre Aufnahme von Fettsäuren näher beschrieben werden, um das Konzept der (putativen) fettsäuretransportierenden/-bindenden Proteine zu erläutern.

Die Aufnahme von Fettsäuren in die Zelle erfolgt durch passive Diffusion und einen proteinvermittelten Prozess. Inwieweit Fettsäuren ausschließlich über passive Diffusion,

die Phospholipidmembranen durchdringen [108;109] bzw. inwieweit fettsäuretransportierende Proteine in die Regulation der Fettsäureaufnahme involviert sind, ist Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen. Die geringe Löslichkeit von Fettsäuren in wässrigem Milieu und die hohe Affinität der fettsäurebindenden und putativen fettsäuretransportierenden Proteine zu Fettsäuren [110;111] führte zu der Hypothese einer proteinvermittelten zellulären Fettsäureaufnahme. Zu den putativen Fettsäuretransportern zählen die Fettsäuretranslokase (*fatty acid translocase*, FAT/CD36), das in der Plasmamembran lokalisierte fettsäurebindende Protein (*fatty acid binding protein*, FABP_{pm}) und die fettsäuretransportierenden Proteine (*fatty acid transport proteins*, FATP). Aber auch das cytosolische fettsäurebindende Protein (FABP_c) kann in den Aufnahmeprozess der Fettsäuren involviert sein, indem es intrazellulär eine schnelle Desorption der an die Phospholipidmembran adsorbierten Fettsäuren ermöglicht und gleichzeitig die Konzentration an freien Fettsäuren im Cytosol niedrig hält und den Transfer von Fettsäuren zu den Orten der weiteren Fettsäureassimilation vermittelt [112].

Die Aufnahmekinetik von Fettsäuren in Hepatozyten, Adipozyten, intestinale Mucosazellen, Cardiomyozyten und Skelettmuskel-Myozyten weist einen konzentrationsabhängigen Verlauf auf, welcher nach einer steil linearen Anfangsphase nach unten von der Linearität abweicht (Sättigung), um dann wieder in einem linearen Anstieg mit geringer Steigung überzugehen, so dass eine proteinvermittelte Fettsäureaufnahme vermutet werden kann [110;113-117]. Die Hypothese einer „Carrier“-vermittelten Diffusion vertreten auch Abumrad et al. [118], da weitere Befunde für einen proteinvermittelten Fettsäureaufnahmeprozess sprechen. Diese umfassen neben der kompetitiven Hemmung der Fettsäuren beim Aufnahmeprozess [119], die Hemmung der Fettsäureaufnahme durch Applikation spezifischer Antikörper, durch Inhibitoren von Anionenaustauschprozessen oder durch vorherige partielle Proteinverdauung der Zellen [118;120-122]. Die Überexpression von putativen fettsäuretransportierenden Proteinen (*gain-of-function*-Modelle) zeigte darüber hinaus in verschiedenen Zelltypen eine erhöhte Fettsäureaufnahme [112]. An *loss-of-function* (Gen-*knockout*)-Modellen lässt sich die Beteiligung des proteinvermittelten Fettsäuretransports in peripheren Zielzellen ebenfalls zeigen. FAT/CD36-deletierte Mäuse weisen beispielsweise erhöhte Plasmaspiegel von freien Fettsäuren, Triglyceriden und Cholesterol sowie eine eingeschränkte Fettsäureaufnahme in das Fettgewebe und die Herz- sowie Skelettmuskulatur bei einer normalen

Fettsäureaufnahme in die Leber und die intestinale Mucosa auf [123;124]. Auch beim Menschen sind bestimmte Polymorphismen des FATP1-Gens, welches hauptsächlich im Muskel- und Fettgewebe exprimiert wird, mit Störungen des Fettstoffwechsels, wie z.B. einer erhöhten postprandialen Lipidämie mit erhöhten Triglyceridspiegeln und kleinen dichten LDL-Partikeln assoziiert [125].

FAT/CD36 ist ein ca. 80-kD großes intergnales Membranprotein, welches wahrscheinlich zwei Transmembrandomänen, kurze N- und T-terminale intrazelluläre Domänen und eine extrazelluläre glycosylierte Schleife aufweist [126;127]. Wahrscheinlich beschleunigt FAT/CD36 die Fettsäuredissoziation von Albumin und erleichtert die Diffusion über einen sog. *flip-flop*-Mechanismus [110]. Interessanterweise weist FAT/CD36 Homologien zum Lipoproteinrezeptor SR-B1 (*scavenger receptor B1*) auf [128], der bevorzugt oxidierte LDL-Partikel bindet [129]. FAT/CD36 wird in Geweben mit hoher Fettassimilation (Fett-, Muskelgewebe, Herz und Intestinum) nicht jedoch in Geweben mit geringer oder keiner Fettsäureoxidation (z.B. Gehirn) exprimiert [118;127]. Im Muskelgewebe dominiert die Expression in den roten oxidativen Fasern und Muskelkontraktionen erhöhen die FAT/CD36-Expression [130]. Darüber hinaus kann Insulin die Translokation von FAT/CD36 an die Zelloberfläche beeinflussen [131].

FABP_{pm} ist ein ca. 40-kD großes Protein, welches wahrscheinlich peripher an der Außenseite der Zellmembran mit einem hydrophoben Schwanz in der Membran verankert ist [122;132]. Durch den Einsatz von Antikörpern gegen FABP_{pm} konnte eine bis zu 67-prozentige Reduktion der Fettsäureaufnahme in verschiedenen Zellentypen, wie beispielsweise Cardiomyozyten, Skelettmuskel-Myozyten, intestinalen Mucosazellen und Adipozyten, hervorgerufen werden [114-116;120;122]. Aufgrund der hohen Affinität zu (langkettigen) Fettsäuren wird vermutet, dass FABP_{pm} wahrscheinlich die Fettsäuredissoziation von Albumin und damit die Diffusion von Fettsäuren durch die Phospholipidmembran erleichtert [110].

Fettsäuretransportierende Proteine (FATP) sind ca. 63-kD große Membran-assoziierte Proteine, die entgegen vorherigen Vorstellungen [133] wahrscheinlich lediglich eine Transmembrandomäne aufweisen [134]. Die Moleküle sind überwiegend zur cytoplasmatischen Seite ausgerichtet, weisen zwei Membranschleifen im inneren Blatt der Zellmembran auf und besitzen einen hochkonservierten, nicht-membranassoziierten Bereich mit einer AMP-Bindungsstelle [134], über die wahrscheinlich die Enzymaktivität der Proteine – eine Acyl-CoA-Synthetase (ACS)-Aktivität – vermittelt

ist [110;135]. Durch diese ACS-Aktivität sind FATP in der Lage, insbesondere Fettsäuren der Kettenlänge C16 bis C24 zu aktivieren [116;119;136]. Der kurze N-terminale Bereich liegt außerhalb der Membran und ist variabel. Dies könnte darauf hindeuten, dass so über spezifische Signale eine differenzierte subzelluläre Verteilung der FATP zu der Plasmamembran, den Peroxisomen und dem endoplasmatischen Retikulum ermöglicht wird [110;137]. Insbesondere die ACS-Aktivität und die anschließende Abgabe der aktivierten Fettsäuren an cytosolische Acyl-CoA-bindende Proteine (ACBP) begünstigt wahrscheinlich den Fettsäureeinstrom in die Zellen [110;138].

In Abbildung 4 ist ein hypothetisches Modell zur Beteiligung von fettsäuretransportierenden und -bindenden Proteinen bei der Fettsäureaufnahme in eukaryotische Zellen dargestellt [139].

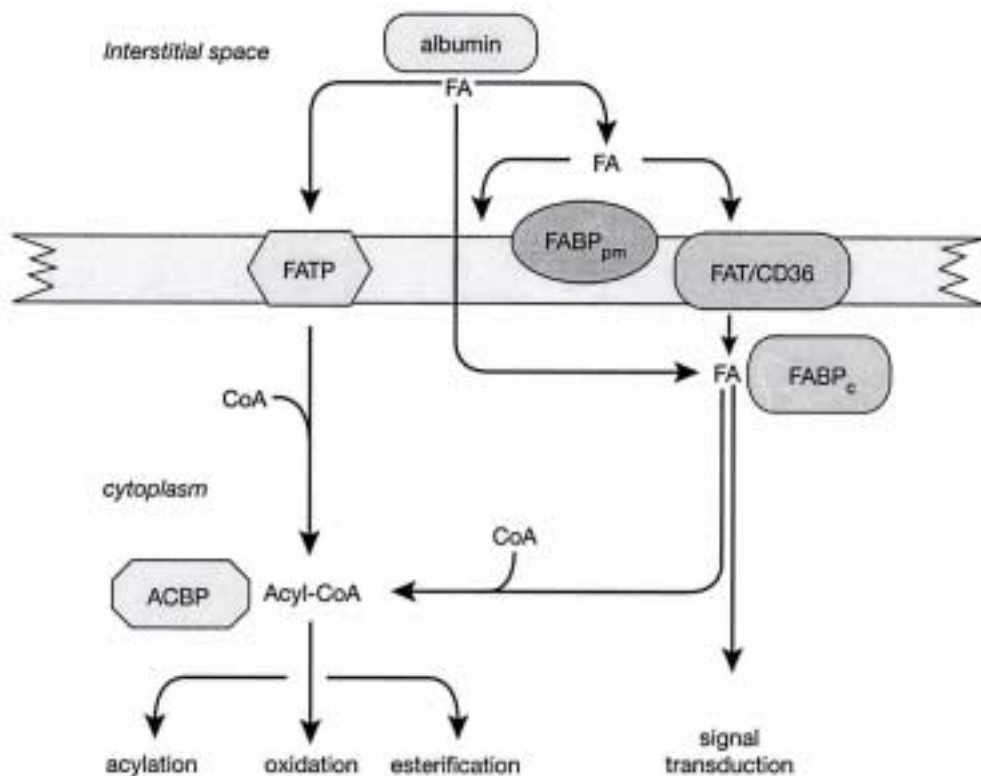


Abbildung 4: Hypothetisches Modell zur Beteiligung von fettsäuretransportierenden und -bindenden Proteinen bei der Fettsäureaufnahme in eukaryotische Zellen

Nach der Dissoziation der FA von Albumin können diese über passive Diffusion oder einen erleichterten Transportmechanismus mit Hilfe von membranständigen Proteinen (FATP, FABP_{pm}, FAT/CD36) in das Cytoplasma der Zielzellen gelangen. Auf der Innenseite der Plasmamembran können FA oder deren CoA-Derivate an cytosolische Proteine (FABP_c bzw. ACBP) binden (Quelle [139], weitere Erläuterungen im Text).

2.5. Molekularbiologische Ansätze zur Erklärung der fettinduzierten Insulinresistenz

Bei den Hypothesen zur Entstehung einer Insulinresistenz werden molekulare Wirkmechanismen postuliert, über welche freie Fettsäuren oder deren Derivate einen Einfluss auf die physiologischen Abläufe im Organismus nehmen und somit zu pathophysiologischen Veränderungen führen können. Neben dem molekularen Wirkungsmechanismus von Insulin, welcher zumindest teilweise durch die Insulinsignalkaskade in den Zielzellen vermittelt wird (siehe Kapitel 2.5.1.) wird auch die Interaktion von Fettsäuren oder deren Derivaten und Transkriptionsfaktoren im Zellkern der Zielzellen, d.h. die direkte Beeinflussung der Genexpression durch Nahrungsfette (siehe Kapitel 2.5.2.) diskutiert.

2.5.1. Glucoseaufnahme und Insulinsignalkaskade

Die Glucoseaufnahme in das Muskel- und Fettgewebe, welche über den insulinsensitiven Glucosetransporter 4 (GLUT 4) erfolgt [96], ist von besonderem Interesse, da die Translokation dieses Glucosetransporters durch Insulin reguliert wird. Die Wirkung von Insulin auf die Zielzellen erfolgt über die sogenannte Insulinsignalkaskade. Der in der Plasmamembran verankerte tetramere Insulinrezeptor (IR) ändert nach der Bindung eines Insulinmoleküls seine Konformation und ermöglicht somit über eine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität die Autophosphorylierung von Tyrosylresten des Rezeptors, welche wiederum zur Bindung und Phosphorylierung von intrazellulären Adaptor- und Signalproteinen führen und so zur intrazellulären Weiterleitung des Insulinsignals beitragen. Freie Fettsäuren oder deren Derivate können durch Interaktionen mit Signalmolekülen der Insulinsignalkaskade direkt oder indirekt die insulinvermittelte Glucoseaufnahme in periphere Zielzellen beeinflussen (siehe Abbildung 5).

Bei Ratten führte eine durch Lipidinfusionen induzierte Insulinresistenz zu einer reduzierten Aufnahme von 2-Desoxyglucose in die Skelettmuskulatur [67], was durch eine herabgesetzte Insulinwirkung und Veränderungen in der Insulinsignalkaskade bedingt sein könnte. So konnte gezeigt werden, dass im Stadium der Insulinresistenz die Tyrosinphosphorylierung einiger Signalproteine einschließlich des Insulinrezeptors reduziert ist [140]. Darüber hinaus steht die fettinduzierte Insulinresistenz im Muskel der Ratte mit einer Reduktion der Phosphorylierung von Tyrosylresten des

Insulinrezeptorsubstrats (IRS)-1, mit einer Reduktion der insulinstimulierten IRS-1-assoziierten Phosphatidylinositol (PI) 3-Kinaseaktivität und mit einer 4-fachen Aktivierung der PKC θ , einer Hauptisoform der Proteinkinase C im Skelettmuskel, in Verbindung [67]. Auch eine Aktivierung von PKC ϵ und δ konnte im Skelettmuskel von insulinresistenten, mit Hochfettdiäten gefütterten Ratten nachgewiesen werden [96;141].

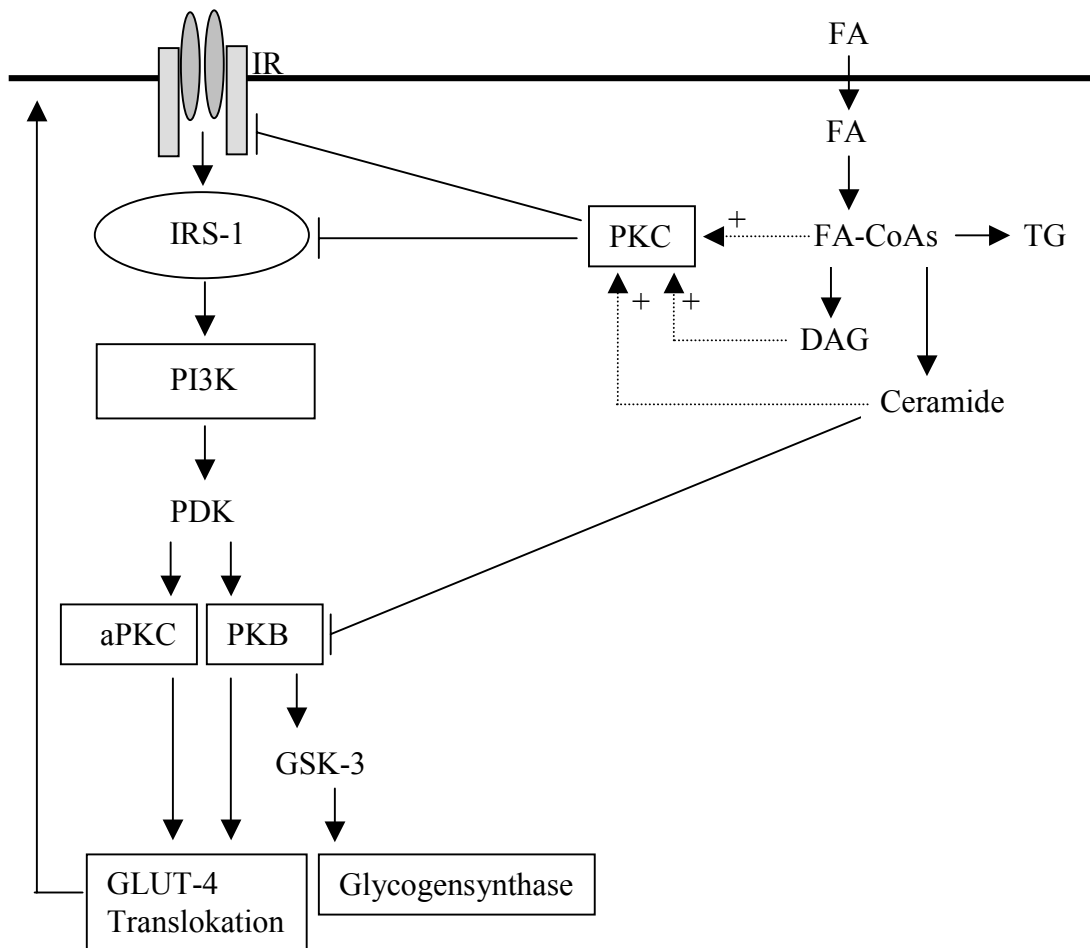


Abbildung 5: Wirkung von Fettsäuren auf die Insulinsignalkaskade

Fettsäuren (FA) können nach der Aufnahme in die Zelle über Acyl-CoA (FA-CoA) oder Fettsäurederivate (DAG, Ceramide) Proteinkinase C-Isoformen (PKC) aktivieren bzw. die Proteinkinase B (PKB) hemmen und dadurch die Insulinsignalkaskade und anschließend die GLUT-4-Translokation und damit die zelluläre Glucoseaufnahme beeinflussen. IR (Insulinrezeptor), IRS-1 (Insulinrezeptorsubstrat-1), PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase), PDK (Phosphatidylinositol-abhängige Kinase), aPKC (atypische Proteinkinase C), GSK-3 (Glycogensynthase-3-Kinase), GLUT-4 (Glucosetransporter-4), TG (Triglyceride/Triacylglyceride), DAG (Diacylglyceride). Abbildung modifiziert nach [66;140;142], weitere Erläuterungen im Text.

Die im Muskel von insulinresistenten Tieren häufig detektierte Aktivierung vieler spezifischer PKC-Untereinheiten zeigt, dass eine intrazelluläre Anhäufung von Fettsäurederivaten einen wichtigen Stimulus für die PKC-Aktivierung darstellt

[141;142]. So können LCFA-CoA direkt oder indirekt über Diacylglycerole (DAG) die PKC-Isoformen aktivieren [143-145]. Neben der verminderten Phosphorylierung von Tyrosylresten sind einige Proteinkinase C-Isoformen, z.B. PKC θ , in der Lage Serin- oder Threoninreste von Signalproteinen, beispielsweise von IRS-1, zu phosphorylieren um dadurch die Insulinwirkung, beispielsweise die Aktivität der PI 3-Kinase, herabzusetzen [146]. Auch Ceramide, die aus Palmitoyl-CoA synthetisiert werden [142;147], können den Insulinsignalweg in späteren Abschnitten der Signalkaskade durch eine Dephosphorylierung und damit Inaktivierung der Proteinkinase B (PKB) beeinflussen. So weisen insulinresistente Tiere einen erhöhten Gehalt an Ceramiden in insulinempfindlichen Geweben auf [148]. In Zellkulturstudien (3T3-L1-Adipozyten) konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit einem membrangängigen Ceramid die insulinstimulierte Glucoseaufnahme durch eine 50-prozentige Reduktion der Translokation des Glucosetransporters GLUT 4 und eine reduzierte PKB-Aktivität hemmte [149]. Dieser Mechanismus war unabhängig von Änderungen der insulinstimulierten Phosphorylierung von IRS-1 oder der Aktivierung der PI 3-Kinase [150-152]. Darüber hinaus wurde nach einer Palmitatinkubation bei murinen Muskelzellen (C2C12) ein erhöhter Gehalt an Ceramiden und eine erniedrigte PKB-Phosphorylierung nachgewiesen [150]. Im isolierten Skelettmuskel (M. soleus) von Ratten führte die Inkubation von physiologischen Palmitatkonzentrationen in Kombination mit Insulin zu einer verminderten Phosphorylierung von IRS-1/2 und der PKB [1]. Neben einer Palmitatinkubation führte auch eine Inkubation mit Stearinsäure, nicht jedoch mit Ölsäure, in Zellkulturstudien mit Myozyten zu einer reduzierten Aufnahme von 2-Desoxyglucose [153]. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass spezielle LCFA-CoA wichtige Mediatoren der Insulinsignalkaskade beeinträchtigen und dass dies einen möglichen Mechanismus darstellt, über welchen chronisch erhöhte FFA-Spiegel zur Entstehung der Insulinresistenz beitragen. Die genauen Wirkmechanismen der einzelnen Fettsäuren und Fettsäurederivate sowie die Suche nach deren spezifischen Wirkorten in der Insulinsignalkaskade sind momentan Gegenstand intensiver Forschung.

2.5.2. Fettsäureinduzierte Genexpression

Fettsäuren oder deren Derivate können darüber hinaus die Expression von Genen, welche beispielsweise in den Glucose- und insbesondere in den Fettstoffwechsel

involviert sind, beeinflussen [154-156]. Mit der Identifizierung von Fettsäure-aktivierbaren Kernrezeptoren (*fatty acid-activated receptors*), wie beispielsweise des *peroxisome proliferator activated receptor α* (PPAR α) im Jahr 1990 [157], war ein mechanistischer Zusammenhang zwischen Lipiden und der Genexpression gefunden.

Peroxisome proliferator activated receptors (PPAR), *liver X receptor* (LXR) und *hepatic nuclear factor 4* (HNF-4) gehören zur Superfamilie der Steroid- und Thyroidhormon-Kernrezeptoren [158;159]. Die Bindung von Fettsäuren an diese Rezeptoren im Zellkern führt zu deren Konformationsänderung und damit zu einer veränderten Aktivität und/oder einem veränderten Vorkommen dieser am Wirkort [160;161]. Mechanismen über welche Fettsäuren oder deren Derivate die Expression von Genen beeinflussen können, sind schematisch in Abbildung 6 dargestellt. Neben der transkriptionellen und post-transkriptionellen Regulation der Expression von Transkriptionsfaktoren *per se* können Fettsäuren oder deren Derivate auch als Liganden an die Transkriptionsfaktoren binden. Dadurch bedingte Konformationsänderungen können wiederum die Bindung von Homo- oder Heterodimerkomplexen an spezifische DNA-Motive auf Zielgenen beeinflussen und somit regulierend auf die Expression von Zielgenen einwirken.

Die *Peroxisome proliferator activated receptors* (PPAR) mit den drei Isoformen α , δ (auch als β bezeichnet) und γ sind gut charakterisiert [162]. Es konnte gezeigt werden, dass Fettsäuren (gesättigte und mehrfach ungesättigte) potente Liganden von PPAR sind. Durch die anschließende Bindung des mit Liganden beladenen Heterodimerses PPAR/RXR (*retinoic X receptor*) an spezifische DNA-Sequenzen (PPRE, *peroxisome proliferator-responsive elements*) in regulatorischen Regionen von Genen können Fettsäuren die Transkription dieser Gene regulieren [162]. Da bei Mäusen nach Deletion des PPAR α der hemmende Effekt von PUFA beispielsweise auf die Expression der Fettsäuresynthase und der Pyruvatkinase jedoch bestehen blieb [163;164], scheinen weitere Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der Genexpression durch Fettsäuren involviert zu sein. So wurden beispielsweise für LXR α und β langkettige Fettsäuren als Liganden identifiziert [165] und auch HNF-4 α bindet mit hoher Affinität LCFA-CoA [166]. Interessant bei HNF-4 α ist, dass gesättigte Acyl-CoA die Aktivität steigern, wohingegen die Bindung von PUFA-CoA zu einer Hemmung der Transkriptionsaktivität führt [167]. Weiterhin konkurriert HNF-4 α als Homodimer mit dem PPAR/RXR-Heterodimer um DNA-Motive bei verschiedenen Zielgenen [163;168].

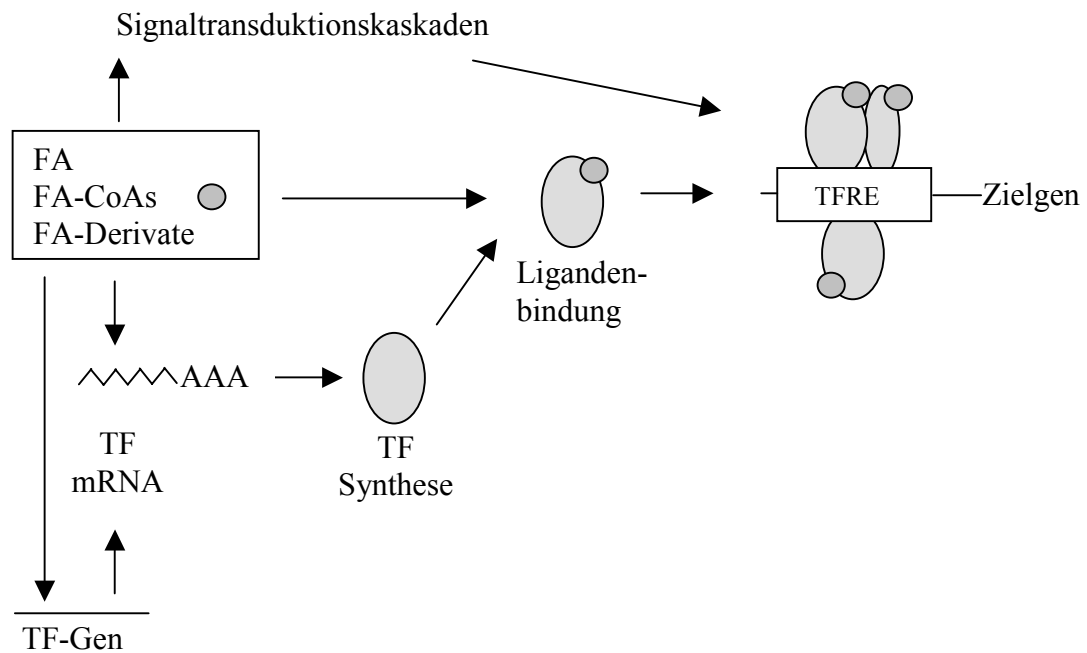


Abbildung 6: Grundzüge der Regulation der Genexpression durch Fettsäuren

Fettsäuren (FA), Acyl-CoA (FA-CoA) oder Fettsäurederivate können die Transkription von Genen über mehrere Mechanismen regulieren: Die Signaltransduktionskaskade kann beispielsweise durch Phosphorylierungen modifiziert werden. Weiterhin kann die mRNA-Stabilität und Synthese von Transkriptionsfaktoren (TF) verändert sein (post-transkriptionelle Regulation). Und auch durch die Bindung an Transkriptionsfaktoren (TF) als Ligand und die Bildung und anschließende Bindung dieser Homo- oder Heterodimere an spezifische DNA-Motive von Zielgenen (TFRE, *transcription factor responsive element*) kann die Expression der Zielgene beeinflusst werden. Abbildung modifiziert nach [154], weitere Erläuterungen im Text.

Im Gegensatz zu den o.g. Transkriptionsfaktoren werden Fettsäuren oder deren Derivate nicht an das SREBP (*sterol regulatory element binding protein*) gebunden, verändern aber dennoch die Konzentration dieses Transkriptionsfaktors am Wirkort. Dieser liegt in einer inaktiven Vorstufe am endoplasmatischen Retikulum gebunden vor und wird erst nach proteolytischer Abspaltung der N-terminalen Domäne freigesetzt und im Kern wirksam [169;170]. Die SREBP-Isoform 1c erhöht v.a. die Expression von Genen der Fettsäure-, Triglycerid- und Phospholipidsynthese, wohingegen SREBP 1a und 2 Gene der Cholesterinsynthese aktivieren [169;170]. Darüber hinaus wurden bei einigen Genen „insulinsensitive“ Domänen (*insulin responsive elements*) und verwandte Bindungsdomänen für weitere zelluläre Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise ChREBP (*carbohydrate response element-binding protein*) identifiziert. Die Phosphorylierung dieses Transkriptionsfaktors über die AMP-abhängige Proteinkinase, verhindert dessen Bindung an DNA-Motive und senkt dadurch die transkriptionelle Aktivität [171]. So führen beispielsweise PUFA bei Hepatozyten zu einer erhöhten AMP-Konzentration und einer Aktivierung der AMP-Kinase und damit zu einer

verstärkten Phosphorylierung des ChREBP. Da ChREBP für die glucoseinduzierte Transkription des Pyruvatkinasegens verantwortlich ist [172], kann an diesem Beispiel die indirekt hemmende Wirkung von Fettsäuren auf die Glucoseoxidation durch eine transkriptionelle Regulation zumindest partiell erklärt werden. Insgesamt scheinen eine Vielzahl von Fettsäure-aktivierbaren Kernrezeptoren zu existieren, von denen noch lange nicht alle identifiziert wurden. Darüber hinaus sollte dieses Kapitel neben einem kleinen Überblick über einige dieser Transkriptionsfaktoren verdeutlichen, dass der mechanistische Zusammenhang zwischen Bindung der Fettsäuren und veränderter Genexpression sehr komplex mit wechselseitigen Interaktionen vonstatten geht und die Wirkung einzelner Fettsäuren auf diese Maschinerie unterschiedlich sein kann und noch lange nicht vollständig aufgeklärt ist.

2.6. Einsatz mittelkettiger Triglyceride zur Prävention der fettinduzierten Insulinresistenz?

Da die chronische Fütterung von Hochfettdiäten mit langkettigen Fettsäuren bei Ratten zur Induktion einer Insulinresistenz führt, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, inwieweit der Austausch langkettiger gesättigter Fettsäuren gegen mittelkettige gesättigte Fettsäuren zu einer möglichen Verhinderung der Ausbildung einer Insulinresistenz führen kann und inwieweit dieses aufgrund einer Veränderung ausgewählter metabolischer Parameter Rückschlüsse auf eine differenzielle Fettassimilation erlaubt.

2.4.1. Mittelkettige Triglyceride (MCT)

Mittelkettige Triglyceride (*medium chain triglycerides*, MCT) sind artifizielle Fette, die erstmals in den 50iger Jahren in der oralen und enteralen oder parenteralen Ernährung eingesetzt wurden, um Störungen des Lipidstoffwechsels (Malabsorption und Maldigestion) zu behandeln. Zu den mittelkettigen Fettsäuren (*medium chain fatty acids*, MCFA) zählen Capryl- (C8:0), Caprin- (C10:0) und Laurinsäure (C12:0). Vornehmlich Capryl- und Caprinsäure werden durch die Hydrolyse von Kokosöl mit anschließender Fraktionierung der Fettsäuren gewonnen und durch die Veresterung mit Glycerol mit oder ohne Katalysator zu mittelkettigen Triglyceriden synthetisiert [173;174]. Die MCT und MCFA unterscheiden sich hinsichtlich ihrer molekularen

Struktur und ihrer biologischen und metabolischen Eigenschaften von den LCT und LCFA (*long chain fatty acids*). Durch die geringere Kettenlänge und damit ein kleineres Verhältnis vom Kohlenwasserstoffrest zur Carboxylgruppe sind MCFA weniger energiedicht und relativ besser wasserlöslich als LCFA [175].

2.4.2. Verdauung und Assimilation von MCT verglichen mit LCT

Bereits bei der Verdauung bestehen Unterschiede zwischen MCT- und LCT-Fetten. Das geringere Molekulargewicht und die relativ bessere Wasserlöslichkeit der MCFA erleichtert die Wirkung der präduodenalen Lipase, wodurch es verglichen mit LCT-Fetten zu einer schnelleren und kompletteren Spaltung der MCT-Fette kommt [176;177]. Der Hauptteil der im Magen emulgierten Nahrungsfette (LCT und MCT) wird jedoch im Duodenum durch die Pankreaslipase unter Mithilfe der Co-Lipase hydrolysiert. Die durch die Pankreaslipase katalysierte Triglyceridhydrolyse führt im Wesentlichen zu β -Monoglyceriden und freien Fettsäuren, welche zusammen mit den konjugierten Gallensäuren und Phospholipiden Micellen bilden. Die v.a. an der Grenzfläche der Emulsionspartikel entstandenen Hydrolyseprodukte der Nahrungsfette werden so hauptsächlich als freie Fettsäuren und Monoacylglyceride resorbiert, in geringem Umfang können auch Diacylglyceride resorbiert werden. Im Gegensatz zu LCT-Fetten werden MCT-Hydrolysate schneller und effizienter resorbiert [178], wobei die Hydrolyse von MCT-Fetten auch bei Abwesenheit von konjugierten Gallensäuren erfolgen kann [179]. Eine mögliche Absorption von mittelkettigen Triglyceriden bei einem Pankreaslipasemangel ist ebenfalls beschrieben worden [180].

Resorbierte LCFA werden im Cytosol der Dünndarmmukosazellen durch Acyl-CoA-Synthetasen in Acyl-CoA, die metabolisch aktivierte Form von Fettsäuren, überführt und mit α -Glycerophosphat bzw. Monoacylglycerol reesterifiziert. Die neu synthetisierten Triglyceride werden in Chylomikronen eingebaut, durch Exocytose freigesetzt und v.a. über die Lymphe abtransportiert. Fettsäuren mit weniger als 12 C-Atomen werden hingegen nur in geringem Umfang in Chylomikronen eingebaut [181]. Dennoch konnten Swift et al. [182] in einer Humanstudie zeigen, dass ein Teil von mit der Nahrung aufgenommenen MCFA (13 %) in der Triglyceridfraktion der Chylomikronen nach einer 6-tägigen Intervention wiederzufinden war. Die simultane Gabe von MCT- und LCT-Fetten erhöht die lymphatische Konzentration von MCFA [183]. Im Unterschied zu LCFA werden die aus dem Darm resorbierten MCFA überwiegend als

freie Fettsäuren, schwach an Albumin gebunden, direkt über die Pfortader zur Leber transportiert, von der sie nahezu vollständig (80-100%) aufgenommen werden [184].

In der Leber werden MCFA vornehmlich oxidiert und lediglich in geringem Umfang in Triglyceride eingebaut [181]. Durch die schnelle und umfangreiche Oxidation der MCFA [185] entsteht ein Überschuss an Acetyl-CoA, dem Endprodukt der β -Oxidation, welches in unterschiedliche Stoffwechselwege im Mitochondrium (Citratzyklus, Ketogenese, Fettsäureverlängerung) und im Cytosol (*de novo* Synthese von Fettsäuren und Cholesterol) eingeschleust werden kann [186].

Um in die β -Oxidation im Mitochondrium eingeschleust werden zu können, müssen Fettsäuren die Mitochondrienmembranen passieren. LCFA bzw. deren aktivierte Derivate (Acyl-CoA) können die innere Mitochondrienmembran nur über einen spezifischen Transportmechanismus, den Carnitin-*Shuttle*, passieren [187]. In Gegenwart der Carnitinpalmitoyltransferase 1 (CPT1) werden langkettige Acyl-CoA zu Acyl-Carnitin umgeestert und über einen Acyl-Carnitin/Carnitin-Austauschmechanismus in die Mitochondrienmatrix transferiert. Dazu erfolgt an der Innenseite der inneren Mitochondrienmembran eine erneute Umesterung des Fettsäurerestes von Acyl-Carnitin auf Coenzym A (CoA-SH) durch die Carnitinpalmitoyltransferase 2 (CPT2). Im Gegensatz dazu können MCFA Carnitin-unabhängig die Mitochondrienmembranen passieren [173], auch wenn Studien gezeigt haben, dass beispielsweise in der Leber Caprylsäure (C8:0) zu 10-20 % als Acyl-Carnitin ins Mitochondrium transportiert wird [188;189] und auch im Muskel MCFA Carnitin-abhängig in die Mitochondrien gelangen können [190]. Neben der mitochondrialen β -Oxidation ist eine peroxisomale β -Oxidation von MCFA zwar grundsätzlich möglich, jedoch aufgrund der geringen Aktivität des Schlüsselenzyms Acyl-CoA-Oxidase (AOX) für Fettsäuren mit weniger als 12 C-Atomen zu vernachlässigen [191].

Für MCT-Fette ist darüber hinaus ein ketogener Charakter beschrieben worden [192], da nach kurzzeitigen oder einmaligen Bolusgaben von MCT-Fetten eine erhöhte hepatische Ketogenese nachgewiesen werden konnte [193-195]. Darüber hinaus war bei Ratten die Konzentration von Ketonkörpern im Blut nach der Fütterung einer MCT-reichen Diät direkt proportional zur Menge der gefütterten MCT-Fette [196]. Die MCT-induzierte Ketogenese scheint allerdings bei längerfristigen MCT-Gaben nachzulassen. So konnten Crozier et al. [197] zeigen, dass die Langzeitgabe einer MCT-reichen Diät

bei Ratten zu einer Absenkung der MCT-bedingten Ketonämie führte, und auch in einer Humanstudie konnte keine erhöhte Plasmakonzentration von β -Hydroxybutyrat nach einer 30-tägigen Gabe einer MCT-reichen Kost, verglichen zu einer LCT-reichen Kost, nachgewiesen werden [198].

Auf zellulärer Ebene können geringe Mengen von MCFA in den Mitochondrien zu LCFA elongiert werden. Die mitochondriale Elongation von MCFA ist beispielsweise in Untersuchungen an isolierten Hepatozyten [199], in Rattenexperimenten [200] und Humanstudien mit Frühgeborenen, welche eine MCT-reiche Diät erhielten [201], beschrieben worden. Darüber hinaus kann auch ein geringer Prozentsatz von diätetischen MCFA in komplexe Lipide, z.B. nachgewiesen in Leber und Fettgewebe bei adulten und wachsenden Ratten, eingebaut werden [202;203]. Der Einbau von C8:0 ist dabei wesentlich weniger effizient als der Einbau von C10:0 [204;205]. Im Cytosol der Zellen können sich MCFA aufgrund ihres relativ hydrophilen Charakters unabhängig von spezifischen intrazellulären Bindungsproteinen, wie sie für LCFA in Kapitel 2.4.3. beschrieben wurden, bewegen. So wurde im Gegensatz zu LCFA, deren Affinität zu cytosolischem FABP direkt proportional zur Fettsäureaktivierung ist [206], beschrieben, dass MCFA nur minimal an cytosolische FABP gebunden und nahezu überhaupt nicht extramitochondrial aktiviert werden [206;207]. Eine für MCFA spezifische kurzkettige-Acyl-CoA-Synthetase ist lediglich in der Mitochondrienmatrix lokalisiert [208].

Durch einen Transfermechanismus, in den Citrat und das Carnitin-System involviert sind, kann Acetyl-CoA aus den Mitochondrien ins Cytosol transportiert werden und dort zur *de novo*-Synthese von Fettsäuren und Cholesterol dienen [174]. Unter normalen Bedingungen kommt es postprandial nach einer LCT-reichen Diät zu einer Reduzierung der *de novo* Fettsäuresynthese, weil das Schlüsselenzym der Fettsäuresynthese, die Acetyl-CoA-Carboxylase, durch physiologische Konzentrationen an langkettigen Acyl-CoA gehemmt wird [209]. Eine MCT-reiche Diät ist diesbezüglich weniger effizient [173]. Malonyl-CoA, das Endprodukt der Acetyl-CoA-Carboxylasereaktion, hemmt darüber hinaus die Carnitinpalmityltransferase 1 (siehe Abbildung 3), welches bei hohen Syntheseraten eine geringe Oxidation von LCFA und *vice versa* bedingt. MCFA entkoppeln diesen regulatorischen Kontrollmechanismus, weil sie zum einen, wie bereits oben beschrieben, Carnitin-unabhängig ins Mitochondrium gelangen und zum anderen die *de novo* Synthese von LCFA nur geringfügig hemmen. Somit können

MCFA simultan die β -Oxidation steigern und gleichzeitig die *de novo* Fettsäuresynthese in der Leber stimulieren [210]. Insgesamt wird durch MCFA die Aktivität lipogener Enzyme konzentrationsabhängig erhöht, so dass MCFA eine Tendenz zur Erhöhung der hepatischen Lipogenese aufweisen [211;212].

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die postprandiale TG-Antwort auf eine MCFA-reiche, im Vergleich zu einer LCFA-reichen Mahlzeit, schwächer ausfällt [213;214]. Borel et al. [215] konnten in einer Humanstudie mit männlichen Probanden zeigen, dass es nach Gabe einer MCT-Mahlzeit im Gegensatz zu einer LCT-Mahlzeit zu keinem postprandialen Anstieg der Chylomikrontriglyceride im Plasma der Probanden kam. Durch eine zweite LCT-haltige Mahlzeit, sechs Stunden nach der ersten Mahlzeit, wurde jedoch in der MCT-LCT-Gruppe eine signifikant höhere postprandiale Chylomikrontriglyceridkonzentration gefunden als in der LCT-LCT-Gruppe. Nach 12,5 Stunden war dementsprechend die Gesamtfläche unterhalb des postprandialen TG-Konzentrationszeitverlaufs als Maß für die postprandialen Chylomikrontriglyceride, in beiden Gruppen nahezu identisch [215]. Darüber hinaus konnte bei Ratten nach der Gabe von MCT-reichen Diäten oder MCT/LCT-haltigen Emulsion, im Vergleich zu LCT-reichen Diäten oder LCT-haltigen Emulsion, eine reduzierte Aktivität der LPL im Fettgewebe und Herzmuskel der Tiere nachgewiesen werden [216;217]. Demgegenüber stehen sowohl Tierexperimente [204;218;219] als auch Humanstudien [34;220-223], die erhöhte Nüchternspiegel von Triglyceriden und LDL-Cholesterol nach der Langzeitgabe von MCT-haltigen Diäten, verglichen mit LCT-haltigen Diäten, ermittelten. Dieses Phänomen könnte durch eine erniedrigte LPL-Aktivität in den peripheren Geweben, eine partiell veränderte Fettsäureelongation, eine vermehrte Fettsäure- und Triglyceridneusynthese in der Leber oder durch eine erhöhte hepatische VLDL-Sekretion erklärt werden [173;193;216;220;224].

2.4.3. MCT als funktionelles Lebensmittel

In der Nahrung besteht der größte Anteil der konsumierten Fettsäuren aus 12 oder mehr Kohlenstoffatomen, so dass mit der Nahrung fast ausschließlich langkettige gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren und kaum mittelkettige Fettsäuren aufgenommen werden. In der Literatur wurde die Substitution von LCFA durch MCFA zur diätetischen Gewichtsreduktion und damit zur Behandlung von Übergewicht diskutiert. Die

Argumente für bzw. gegen den Einsatz von MCFA zur Gewichtskontrolle werden u.a. ausführlich in dem Übersichtsartikel von Bach et al. [173] diskutiert und sollen hier nicht weiter ausgeführt werden.

Der Einsatz von MCFA zur möglichen Prävention der Entstehung einer Insulinresistenz im Kontext des Metabolischen Syndroms wurde in der vorliegenden Arbeit gewählt, da es neben der möglichen gewichtsreduzierenden Wirkung der MCFA Hinweise aus Human- und Rattenstudien gibt, die für eine Beeinflussung des Glucosetoffwechsels sprechen. So konnte bei Ratten eine leichte Tendenz zur Erhöhung des Insulinspiegels nach einer längerfristigen Gabe von MCT-reichen Diäten, verglichen mit LCT-reichen Diäten nachgewiesen werden [196;216;225]. Dieser Befund könnte auf einem direkten Effekt der MCFA und/oder der synthetisierten Ketonkörper auf die β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas beruhen [226]. Neben dieser hyperinsulinämischen und leicht hypoglycämischen Wirkung von MCT-Fetten konnte in Humanstudien darüber hinaus eine gesteigerte Glucosetoleranz nach Gabe von MCT-reichen Diäten nachgewiesen werden [198;227-229].





3. Material und Methoden

3.1. Versuchsaufbau

Im Rahmen des Projekts wurden mehrere Tierstudien mit identischer diätetischer Vorbehandlung an männlichen Wistar-Ratten (Stamm: HsdBrIHan:WIST) durchgeführt. Hierfür wurden die Ratten jeweils innerhalb einer Studie (n = 36) randomisiert auf drei Gruppen verteilt und über vier Wochen mit je einer der drei Versuchsdiäten gefüttert. Die in der Fütterungsperiode zur *ad libitum*-Aufnahme angebotenen Versuchsdiäten werden in Kapitel 3.1.2. detailliert beschrieben.

Eine Übersicht über die durchgeführten Tierexperimente und deren Zielsetzung gibt Tabelle 1 (detaillierte Versuchsbeschreibungen erfolgen in den nachfolgenden Kapiteln).

Tabelle 1: Überblick über die Rattenexperimente

Exp.	diät. Behandlung ¹⁾	Zielsetzung
A	_____	Genexpression x FATP, H-FABP _c , FAT (Muskel, Dünndarm)
B-a	_____  ²⁾	5 U-¹³C-Palmitat x <i>steady state</i> Konz. von LCFA in Geweben
B-b	_____  ³⁾ lipid load	1 U-¹³C-Palmitat x pp Verteilung von LCFA in Geweben (nach 5h)
C	_____  ³⁾ lipid load	pp Plasmametabolite (über 6 h) x Glucose, Insulin, Triglyceride, Cholesterol
D	_____  ⁴⁾ (ip)	D₂O x Körperfettmasse
E	_____	Clamp und IPGTT x Insulinsensitivität, Glucosemetabolisierung

¹⁾ alle Ratten wurden 4 Wochen mit den Versuchsdiäten gefüttert; ²⁾ an den letzten 5 Tagen der 4-wöchigen Fütterungsperiode erhielten die Ratten stabil markierte Palmitinsäure mit den Versuchsdiäten; ³⁾ am letzten Tag der 4-wöchigen Fütterungsperiode erhielten die Ratten eine fettreiche Testmahlzeit; ⁴⁾ am letzten Tag der 4-wöchigen Fütterungsperiode wurde den Ratten deuteriertes Wasser intraperitoneal injiziert; FATP = fettsäuretransportierendes Protein (*fatty acid transport protein*); FABP = fettsäurebindendes Protein (*fatty acid binding protein*); FAT = Fettsäuretranslokase (*fatty acid translocase*); U-¹³C-Palmitat = universell mit schwerem Kohlenstoff markierte Palmitinsäure; LCFA = langkettige Fettsäuren (*long chain fatty acids*); *lipid load* = fettreiche Testmahlzeit (oraler metabolischer Toleranztest, OMTT); X = Gewebeentnahme; pp = postprandial; ip = intraperitoneal; D₂O = Deuterium-markiertes Wasser (²H₂O); IPGTT = intraperitonealer Glucose Toleranztest

In **Experiment A** wurden die Ratten nach der 4-wöchigen Fütterungsperiode über Nacht gefastet, betäubt und rasch entblutet, um verschiedene Gewebe (siehe Kapitel 3.1.4.) für Genexpressionsanalysen zu gewinnen.

In **Experiment B-a** wurden die Ratten 4 Wochen mit den Versuchsdiäten gefüttert, allerdings erhielten die Tiere in den letzten 5 Tagen des Experiments mit den Versuchsdiäten stabil markierte Palmitinsäure (U-¹³C-Palmitat) als Marker für langkettige gesättigte Fettsäuren. Am Ende der Fütterungsperiode wurden die Tiere über Nacht gefastet, betäubt, rasch entblutet und verschiedene Gewebe (siehe Kapitel 3.1.4.) entnommen. Ziel der Studie war es, die „*steady state*“-Verteilung des applizierten Fettsäuremarkers in der Lipidfraktion der Gewebe zu bestimmen.

In **Experiment B-b**, welches das Experiment B-a ergänzt, wurden die Ratten für 4 Wochen mit den Versuchsdiäten gefüttert. Nach 12-stündigem Fasten wurde den Tieren am letzten Tag der Fütterungsperiode eine fettreiche Testmahlzeit (*lipid load*, oraler metabolischer Toleranztest, OMTT, siehe Seite 39) verabreicht, die markierte Palmitinsäure enthielt. Fünf Stunden nach Applikation des OMTT wurden die Tiere betäubt, rasch entblutet und verschiedene Gewebe (siehe Kapitel 3.1.4.) zur Bestimmung des Fettsäuremarkers in der Lipidfraktion entnommen. Unter diesen Bedingungen lässt sich die postprandiale Verteilung langkettiger gesättigter Fettsäuren die v.a. durch die Aufnahme in die Gewebe determiniert ist, erfassen.

In **Experiment C** wurden die Ratten für 4 Wochen mit den Versuchsdiäten gefüttert. Nach der Fütterungsperiode wurde den Ratten ein intra-arterieller Katheter implantiert. Nach einer 48-stündigen Erholungsphase und anschließender Verabreichung eines OMTT wurden in den darauffolgenden 6 Stunden die postprandialen Verläufe einzelner Plasmaparameter (Glucose, Insulin, Triglyceride, Cholesterol) bestimmt.

In **Experiment D** wurde den Tieren nach der 4-wöchigen Fütterungsperiode deuteriertes Wasser zur Bestimmung der Körperfettmasse intraperitoneal injiziert.

In **Experiment E** wurden die Ratten nach der 4-wöchigen Fütterungsperiode einem hyperinsulinämischen-euglycämischen Clamp unterzogen und die Ganzkörperinsulinsensitivität anhand der Glucoseinfusionsrate bestimmt. Weiterhin wurde mit zwei Tieren pro Gruppe nach der 4-wöchigen Fütterungsperiode und nach dem nächtlichen Fasten ein intraperitonealer Glucosetoleranztest (IPGTT) durchgeführt und die Plasmaverläufe von Glucose und Insulin über drei nachfolgende Stunden (3 Stunden postprandial) ermittelt.

3.1.1. Tiere und Tierhaltung

Die männlichen Wistar-Ratten wurden mit einem Gewicht von 225 - 249 g von der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Die im Rahmen des Versuchsvorhabens durchgeführten Tierexperimente einschließlich der durchgeführten Operationen wurden durch das Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein in Anlehnung an das geltende Tierschutzgesetz genehmigt.

Der klimatisierte Versuchsstall mit einer Raumtemperatur von 22 - 25 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 - 70 % unterlag einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus (Hellphase: 6-18 Uhr). Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Tiere einzeln in Drahtkäfigen gehalten. Um eventuellen räumlichen Einflussfaktoren entgegenzuwirken, wurden die Käfige mehrfach umgestellt.

Nach der Lieferung der Tiere und einer 5-tägigen Akklimatisierungsphase begannen die Fütterungsexperimente. Während der gesamten Studiendauer hatten die Tiere freien Zugang zu Trinkwasser und, wenn nicht anders beschrieben, zu den Versuchsdäten. Zur Gewichtserfassung der Ratten fanden wöchentliche Wägungen statt.

3.1.2. Fütterung und Diäten

Alle Ratten erhielten während der 4-wöchigen Fütterungsperiode nahezu isokalorische Diäten zur *ad libitum*-Aufnahme. Die Zusammensetzung der drei Versuchsdäten ist in Tabelle 2 dargestellt. Eine Gruppe erhielt eine Niedrigfett-Diät (*low fat*, LF) mit einem hohen Anteil an Maisstärke. Die LF-Diät enthielt 64 % der Energie in Form von Kohlenhydraten, 21 bzw. 15 Energieprozent entfielen auf Proteine bzw. Fett. In den beiden verbleibenden Gruppen wurden Hochfettdiäten eingesetzt (MCT bzw. LCT). Die zweite Gruppe bekam eine Hochfett-Diät mit überwiegend gesättigten mittelkettigen Fettsäuren (*medium chain triglycerides*, MCT) und die Ratten der dritten Gruppe erhielten eine Hochfett-Diät mit überwiegend gesättigten langkettigen Fettsäuren (*long chain triglycerides*, LCT). Die MCT- und LCT-Diäten enthielten 26 % der Energie in Form von Kohlenhydraten, 21 % in Form von Proteinen und 53 % in Form von Fett.

Die Energiedichte der LF- und MCT-Diät betrug 13,1 kJ/g Frischmasse (wt/wt, *wet weight*) und die der LCT-Diät 13,4 kJ/g Frischmasse. Mittels kalorimetrischer Bestimmung (Methodenbeschreibung siehe Kapitel 3.1.3.) wurden analytisch $14,4 \pm 0,1$ kJ/g Frischmasse für die LF-Diät, $14,9 \pm 0,3$ kJ/g Frischmasse für die MCT-Diät und $14,4 \pm 0,4$ kJ/g Frischmasse für die LCT-Diät ermittelt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Versuchsdiäten

Bestandteil	Diät (g)			Diät (MJ) ¹⁾		
	LF	MCT	LCT	LF	MCT	LCT
Experimentelles Fett						
MCT ²⁾	-	145,6	-	-	4,98	-
LCT ³⁾	-	-	128,8	-	-	5,08
Sojaöl	29,9	30,1	30,7	1,16	1,17	1,19
Lecithin	25,1	25,3	25,8	0,74	0,74	0,75
Maisstärke	462,9	175,1	178,5	7,94	3,00	3,06
Weizenkleie	30,5	30,7	31,3	0,42	0,42	0,43
Casein	151,9	152,8	155,8	2,61	2,62	2,67
Methionin	1,8	1,8	1,8	0,03	0,03	0,03
Gelatine	11,4	11,4	11,7	0,16	0,16	0,16
Vitaminmischung ⁴⁾	7,8	7,8	8,0			
Mineralstoffmischung ⁴⁾	40,1	40,3	41,1			
Wasser	238,6	379,1	386,5			
Summe (wt/wt)	1000,0	1000,0	1000,0	13,05	13,13	13,39

¹⁾ physikalischer Brennwert; ²⁾ Fettsäurezusammensetzung: 70% C8:0 + 30% C10:0 (Firma Unilever, Hamburg, Deutschland); ³⁾ Fettsäurezusammensetzung: 42% C16:0 + 52% C18:0 (Firma Unilever, Hamburg, Deutschland); ⁴⁾ Zusammensetzung der Basisdiät mit Inhaltsstoffen der bedarfsdeckenden Vitamin- und Mineralstoffmischungen (Firma Altromin, Lage, Deutschland) ist im Anhang in Tabelle A4 dargestellt; wt/wt = *wet weight* (Frischmasse)

Der kalkulatorische Fettgehalt der LF-Diät betrug 5,5 g/100g Frischmasse, der Fettgehalt der MCT-Diät 20,1 g/100g Frischmasse und der Fettgehalt der LCT-Diät 18,6 g/100g Frischmasse. Durch gravimetrische Bestimmungen im Anschluss an eine Extraktion nach Folch (Methodenbeschreibung siehe Kapitel 3.3.1.) wurden Fettgehalte von $6,9 \pm 0,3$, $19,9 \pm 0,8$ und $17,4 \pm 1,2$ g/100g Frischmasse in der LF-, MCT- und LCT-Diät ermittelt. Als Fettquellen wurden bei allen Diäten Sojaöl und Sojalecithin und bei den Hochfettdiäten zusätzlich das jeweilige experimentelle Fett zugesetzt. Sojaöl (Firma Rinatura, Stenwedde-Levern, Deutschland) wurde dem Futter zugesetzt, um den Bedarf an essentiellen Fettsäuren zu decken, Sojalecithin (EMULTOP, Firma Degussa Hamburg, Deutschland) wurde zur besseren Emulgierbarkeit der Versuchsfette, insbesondere des LCT-Fettes, eingesetzt. Das experimentelle Fett der beiden Hochfettdiäten lieferte 38 % der Energie der Diäten, 15 % der Energie lieferten das Sojaöl und Sojalecithin. Laut Herstellerangaben (Firma Unilever, Hamburg, Deutschland) bestanden die Fettsäuren des

MCT-Versuchsfettes, bezogen auf die Gesamtfettsäuren, zu 70 % aus Caprylsäure (C8:0) und zu 30 % aus Caprinsäure (C10:0) und die Fettsäuren des LCT-Versuchsfettes, bezogen auf die Gesamtfettsäuren, zu mindestens 42 % aus Palmitinsäure (C16:0) und zu mindestens 52 % aus Stearinsäure (C18:0). Das gaschromatographisch analysierte Fettsäuremuster der Versuchsdiäten (Methodenbeschreibung siehe Kapitel 3.3.3.) ist in Tabelle 3 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass in der MCT-Diät die Capryl- und Caprinsäure gewichtsmäßig dominierten und in der LCT-Diät die Palmitin- und Stearinsäure. Daraus abgeleitet ergibt sich folgende Fettsäurezusammensetzung der Versuchsfette: MCT mit 73 % Caprylsäure (C8:0) und 27 % Caprinsäure (C10:0) und LCT mit 44 % Palmitinsäure (C16:0) und 56 % Stearinsäure (C18:0).

Tabelle 3: Fettsäuremuster der Versuchsdiäten

Fettsäure	Fettsäuremuster (g/100g Futter)		
	LF	MCT	LCT
C8:0	n.n.	8,55	n.n.
C10:0	n.n.	3,16	n.n.
C12:0	n.n.	0,05	0,04
C14:0	0,03	n.n.	0,15
C16:0	0,34	0,49	5,08
C16:1	n.n.	n.n.	n.n.
C18:0	0,12	0,16	5,95
C18:1	1,10	0,71	0,76
C18:2	3,26	2,18	2,17
C18:3	0,38	0,29	0,29
andere	n.n.	n.n.	0,10

C = Kohlenstoffatom; n.n. = nicht nachweisbar

Aufgrund des hohen Anteils der gesättigten langkettigen Fettsäuren im LCT-Fett, hatte dieses eine feste, flockenartige Konsistenz. Insbesondere wegen des hohen Gehalts an C18:0 in sn-2 Position im Triglycerid erwies sich das LCT-Fett in Vorversuchen als schwer verdaulich. Da selbst durch feinste Mahlung des LCT-Fettes keine zufriedenstellende Verdaulichkeit erreicht werden konnte, wurde das LCT-Fett schließlich in 80 °C warmem Wasser geschmolzen und emulgiert (siehe Abbildung A1

im Anhang), so dass die scheinbare Fettverdaulichkeit der LCT-Diät letztendlich von 70 % auf 90 % verbessert werden konnte. Die Herstellung der MCT-Diät erfolgte nach dem gleichen Verfahren. Die scheinbare Fettverdaulichkeit der MCT-Diät betrug 99 und die der LF-Diät 96 % (siehe Kapitel 4.2.1.).

In den Experimenten B-b und C wurde den Ratten nach Beendigung der 4-wöchigen Fütterungsperiode eine fettreiche Testmahlzeit (*lipid load*, oraler metabolischer Toleranztest, OMTT) verabreicht. Der Testtrunk, der aus dem Humanbereich stammt und dort zur Bestimmung postprandialer Plasmametabolite eingesetzt wird [230-232], enthält 1017 kcal und 58 g hauptsächlich gesättigte Fette, 75 g Kohlenhydrate, 30 g Proteine und 10 g Alkohol in einem Volumen von 500 ml. Mit 58 g macht der Fettanteil die Hälfte (51 %) der Energie des Trunks aus und die Summe der gesättigten Fettsäuren an den gesamten bestimmten Fettsäuren beträgt 75,08 %. Für die Rattenexperimente wurde der Testtrunk modifiziert, indem nach einer Gefrietrocknung ein 2-fach konzentrierter OMTT mit 2034 kcal/500ml erstellt wurde. Im folgenden wird der 2-fach konzentrierte OMTT vereinfacht nur noch als OMTT bezeichnet. Die Fettsäurezusammensetzung des OMTT ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Fettsäuremuster des OMTT

Fettsäure	Fettsäuremuster (%)¹⁾
C8:0	1,55
C10:0	3,64
C12:0	5,12
C14:0	14,25
C16:0	39,12
C16:1	1,48
C18:0	11,40
C18:1	19,73
C18:2	2,15
C18:3	0,32
andere	1,24

¹⁾ Prozent der gesamten bestimmten Fettsäuren

Das Experiment A (Genexpression) bildete im Bezug auf die LF-Gruppe insofern eine Ausnahme, als dass die Ratten der ersten Gruppe hier anstatt der Niedrigfett-Diät (LF) eine gemahlene Pellet-Diät der Firma Altromin (Lage, Deutschland) mit zugesetztem Wasser- und Sojalecithinanteil erhielten. Der Anteil des Stickstoff-freien Extrakts (Kohlenhydrate) an der Gesamtenergie dieser Diät betrug 54 %, der Anteil von Rohprotein 25 % und der Anteil von Rohfett 21 %. Die Energiedichte der LF-Diät in Experiment A lag bei 13,39 kJ/g Frischmasse und war damit ebenfalls nahezu isokalorisch zu den beiden verwendeten Hochfettdiäten.

3.1.3. Verdaulichkeit der Versuchsdiäten

Während der gesamten 4-wöchigen Fütterungsperiode des Experiments B-a wurde täglich der Futtermittelverzehr der Ratten erfasst. Zusätzlich wurde in der 3. Versuchswoche dieses Experiments der Kot der Tiere über 5 Tage gesammelt. In den getrockneten und gemahlene Faeces- und Futterproben wurde der Fettgehalt bestimmt (siehe unten), um Rückschlüsse auf die scheinbare Fettverdaulichkeit der drei Versuchsdiäten ziehen zu können. Des Weiteren wurde mittels eines Kalorimeters (IKA[®] C 4000, Firma IKA[®] Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) der physikalische Brennwert der Faeces- und Futterproben analysiert.

Die Analyse des Fettgehalts erfolgte nach der amtlichen Methode zur Bestimmung von Rohfett aus dem Handbuch der landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik [233]. Das Verfahren beruht auf einer Hydrolyse mit Salzsäure, einer Extraktion der filtrierten Proben mit Diethylether in einer Soxhlet-Apparatur und der gravimetrischen Erfassung des Etherextraktes nach Abdestillation des Lösungsmittels. Die scheinbare Fettabsorption (%) wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Scheinbare Fettabsorption (\%)} = \frac{[(\text{Fettaufnahme (g/5d)} - \text{fäkale Fettausscheidung (g/5d)}) / \text{Fettaufnahme (g/5d)}] \cdot 100$$

Die Brennwertbestimmung der Futter- und Faecesproben erfolgte im Kalorimeter durch das Verbrennen von gepressten, genau eingewogenen Pastillen unter definierten Bedingungen. Nach dem Schließen der Messzelle wurde in diese Sauerstoff bis zu einem Druck von 30 bar eingeleitet. Nach dem Erreichen der Arbeitstemperatur von 25 - 30 °C wurde die mit einem Zünddraht umwickelte Probe elektrisch gezündet und die

Temperaturerhöhung im Wassermantel des Kalorimetersystems gemessen. Da aus Schwefel und Stickstoff unter den herrschenden Bedingungen Schwefel- und Salpetersäure sowie Lösungswärme entstehen, wurden diese Einflussfaktoren als Korrekturfaktoren bei der Berechnung berücksichtigt. Der Rückstand der Probe wurde im Anschluss an die Verbrennung quantitativ in einem Becherglas aufgefangen, zum Vertreiben von Kohlendioxid aufgekocht, bei 50 - 60 °C nach Zusatz von Phenolphthaleinlösung mit einer Bariumhydroxidlösung titriert und die Gesamtmenge an gebildeter Schwefel- und Salpetersäure bestimmt. Zur Bestimmung der Salpetersäure wurde die titrierte Lösung nach Zugabe einer Natriumcarbonatlösung (0,2 mol/l) kurz aufgekocht. Der Überschuss an Natriumcarbonatlösung wurde durch Titration mit Salzsäure bestimmt.

Die Kalibrierung des Kalorimetersystems erfolgt durch das Verbrennen von Benzoesäure mit bekanntem Brennwert. Dabei wurde aus der Wärmemenge, die erforderlich ist, um die Temperatur des Kalorimetersystems um 1 °C zu erhöhen, die Wärmekapazität des Systems bestimmt. Da sich die Wärmekapazität des Kalorimeters komplex zusammensetzt, wird der sogenannte Wasserwert (W), als die dem Kalorimeter thermisch äquivalente Wassermenge, zur Berechnung der Verbrennungswärme (V) eingesetzt. Die Formel zur Berechnung des physikalischen Brennwertes (cal/g) lautet:

$$V = W \cdot (t_2 - t_1) - (a + b + c + d) / G$$

mit

W = Wasserwert

$$W = (v \cdot G) + (a + b + c) / (t_1 - t_2)$$

v = Brennwert der Benzoesäure (cal) mit bekanntem Brennwert von 6323 cal/g

G = Einwaage Messgut (g)

a = Brennwert der Schwefelsäure (cal)

$$[(\text{titrierte Bariumhydroxidmenge (ml)} \cdot \text{Faktor (0,94)}) - (20 - (\text{titrierte Salzsäuremenge (ml)} \cdot 1,25))] \cdot 3,6$$

b = Brennwert der Salpetersäure (cal)

$$(20 - (\text{titrierte Salzsäuremenge (ml)} \cdot 1,25)) \cdot 1,5$$

c = Brennwert des Drahtes (cal)

$$(\text{Länge des Drahtes vor der Verbrennung (12,5 cm)} - \text{Länge des Drahtes nach der Verbrennung}) \cdot 1,5$$

d = Brennwert der Kapsel (cal)

$$\text{Kapsel (g)} \cdot 4720,9668$$

$t_2 - t_1$ = Temperaturerhöhung nach Zünden der Probe (Δ °C)

Die Umrechnung von cal/g in J/g erfolgte mit dem Faktor 4,184.

3.1.4. Gewebeentnahme

Zum Betäuben der Ratten wurde den Tieren eine Mischung aus Xylazinhydrochlorid (10 mg/kg KG) und Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg KG) intraperitoneal injiziert. Das Töten der Tiere erfolgte im betäubten Zustand durch rasches Entbluten. Anschließend wurden repräsentative Gewebeproben in folgender Reihenfolge entnommen: Dünndarm (Duodenum, proximales Jejunum, distales Jejunum, Ileum), Leber (linker lateraler Lappen, mittig), Herz (linker großer Ventrikel, mittig), Muskelgewebe (M. soleus, MS, M. gastrocnemius, MG) und Fettgewebe (abdominal, Fa, retroperitoneal, Fr). Als Duodenum (D) wurden die ersten 10 cm des proximalen Dünndarms und als Ileum (IL) die letzten 10 cm des distalen Dünndarms definiert. Das dazwischenliegende Jejunum (J) wurde in ein proximales und distales Segment unterteilt. Zur Muscosagewinnung aus den Dünndarmsegmenten wurden diese der Länge nach aufgeschnitten, zur Entfernung von Chymusresten mit physiologischer NaCl-Lösung gespült und vorsichtig mit Papierhandtüchern abgetupft, um überschüssige Flüssigkeit und Mucus zu entfernen. Schließlich wurde die Mucosa vorsichtig mit einem Glasobjektträger abgeschabt.

Der rote M. soleus, welcher hauptsächlich Muskelfasern vom Typ I enthält, wurde komplett aus der Wade entnommen. Der M. gastrocnemius, welcher aus roten und weißen Muskelfaseranteilen besteht, wurde ebenfalls aus der Wade entnommen und anschließend lediglich der weiße Anteil des M. gastrocnemius mit überwiegend Muskelfasern des Typs IIb herauspräpariert.

Alle entnommenen Gewebeproben wurden innerhalb von 5 - 10 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.2. Genexpression

In Experiment A wurde nach der 4-wöchigen Fütterungsperiode die Expression von drei putativen Fettsäuretransportern auf Ebene der Transkription (mRNA-Konzentration) im roten M. soleus und im weißen M. gastrocnemius sowie von FAT/CD36 in der Mucosa von Duodenum und Ileum untersucht. Hierfür wurde die Gesamt-RNA aus den Geweben extrahiert, quantifiziert, auf Integrität und DNA-Kontaminationen überprüft, durch reverse Transkription in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und im Anschluss mit fluoreszenzmarkierten TaqMan-Sonden mittels *real time* PCR quantifiziert.

3.2.1. RNA-Extraktion

Um die RNA aus den Mucosaprobe n der intestinalen Segmente zu gewinnen, wurde der *RNeasy Mini Kit* der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Der Kit ist für die Isolation von Gesamt-RNA ausgelegt. Nach dem Zerkleinern und Homogenisieren der Gewebeprobe n (~30 mg) in einer β -Mercaptoethanol-haltigen (10 μ l/ml) Pufferlösung und nach der Zugabe von Ethanol (1:1 v/v), wurde dieses Homogenat auf eine *Silica-Gel*-Membran gegeben, an welche die RNA selektiv bindet. Nach dem Entfernen von Kontaminationen durch mehrere Waschschr itte und einer DNA-Verdauung mit einer Desoxyribonuclease (Firma Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde die RNA schließlich mit RNase-freiem Wasser aus der Membran eluiert und zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Extraktion der RNA aus den Muskelprobe n erfolgte in leicht abgeänderter Form mittels des *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kits* (Firma Qiagen, Hilden, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers. Nach dem Zerkleinern und Homogenisieren der Muskelprobe n in dem Lysepuffer wurden die Lösungen mit Proteinase K bei 55 °C für 20 min inkubiert und nach anschließender Zentrifugation der Überstand abgenommen. Nach Zugabe von Ethanol (1:1 v/v) wurden die gleichen Arbeitsschr itte wie oben beschrieben zur weiteren RNA-Extraktion durchgeführt.

3.2.2. Quantifizierung und Integrität der isolierten RNA

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch bei 260 nm (BioPhotometer, Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Bei einsträngiger RNA/DNA ergibt sich bei einer Konzentration von ~40 μ g/ml eine optische Dichte (OD) von 1. Die Reinheit der RNA-Probe n wurde durch den Absorptionsquotienten OD_{260}/OD_{280} ermittelt, welcher zwischen 1,8 und 2,1 liegen sollte, um noch vorhandene Verunreinigungen (Protein oder Phenol) ausschließen zu können. Ein Absorptionsquotient OD_{260}/OD_{230} unter zwei deutet auf Verunreinigungen mit Polysacchariden hin.

Für den Integritätsnachweis der isolierten RNA wurden 5 μ l der in Wasser eluierten RNA mit 10-fach konzentriertem 3-Morpholino-1-Propansulfonsäure-Puffer (10x MOPS, 5 μ l), 27-prozentigem Formaldehyd (8,8 μ l) und Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser (6,2 μ l) versetzt und bei 55 °C für 10 min inkubiert. Nach anschließender Zugabe von 5 μ l „Blaumarker“ (*loading dye*) wurden die Probe n auf ein Agarose-Formaldehyd-

Gel aufgetragen. Bei einer Spannung von 80-100 Volt für 15 min und 45 Volt für ca. 2 Stunden wandern die denaturierten ribosomalen RNA-Fragmente (rRNA) entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld und können durch Färbung mit Ethidiumbromid (1 µl/100 ml Gel) im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Schärfe und die Dicke der 18S- und 28S-rRNA-Banden gibt Auskunft über den Degradierungsgrad der extrahierten RNA. Idealerweise sollte das Verhältnis zwischen 28S-rRNA und 18S-rRNA 2:1 betragen und die Banden scharf abgetrennt zu erkennen sein. Nur undegradierete RNA wurde für die weiteren Analysen eingesetzt. Die für die gelelektrophoretische Auftrennung der RNA benötigten Chemikalien, Reagenzien und Puffer sind im Anhang in Tabelle A1 und A3 aufgeführt.

Zur Überprüfung von gegebenenfalls noch vorhandenen DNA-Kontaminationen wurde 2,5 µl der in Wasser eluierten RNA mit spezifischen Exon-überspannenden Primern (Firma MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland) für β-Aktin (*Forward Primer*: 5'-CCC TAA GGC CAA CCG TGA AAA GAT-3', 1663 - 1686; *Reverse Primer*: 5'-CAG CAC TGT GTT GGC ATA GAG GTC-3', 2756 - 2779) mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) amplifiziert. Die erwartete Länge des bei DNA-Verunreinigung vorliegenden Amplifikationsprodukts betrug 1117 bp. In jedem PCR-Lauf wurde eine Positivkontrolle (genomische DNA) und eine Negativkontrolle (DEPC-Wasser) parallel amplifiziert. Das PCR-Programm war nach vorangegangener Temperaturoptimierung (*Gradienten-PCR*) folgendermaßen programmiert: Nach einem Aktivierungsschritt bei 95 °C für 2 min folgten 40 Zyklen mit (1) der DNA-Denaturierung (94 °C, 30 sek), (2) der Primerhybridisierung (60 °C, 30 sek) und (3) der Elongation (72 °C, 30 sek), bevor am Ende des Programms erneut bei 72 °C für 10 min die Polymerisationswirkung der Taq-Polymerase (Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland) ausgenutzt wurde. Auf einem 1,2-prozentigen Agarose-Gel konnten die amplifizierten DNA-Produkte im Anschluss, nach Zugabe von 5 µl Blaumarker (*loading dye*) und einer angelegten Spannung von 80 Volt für ca. 30 min während der Gelelektrophorese durch Ethidiumbromid (10 µl/100 ml Gel) im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Als DNA-Größenskala (*DNA-ladder*) wurde der *Lambda DNA/Eco130I (Styl)* Marker der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) eingesetzt. RNA-Proben mit noch vorhandenen DNA-Verunreinigungen wurden einer erneuten DNA-Verdauung unterzogen und abermals geprüft.

3.2.3. Reverse Transkription

Die aufgereinigte RNA wurde mittels des *TaqMan Reverse Transcription Reagents*-Kits der Firma ABI (Foster City, USA) in cDNA umgeschrieben. Zu dieser Erststrang-cDNA-Synthese wurde eine rekombinante reverse Transkriptase des *moloney murine leukemia virus* (MMLV) verwendet, welche im Vergleich mit der reversen Transkriptase des *avian myoblastosis virus* (AMV) längere cDNA-Transkripte liefert. Die eingesetzte Menge an Gesamt-RNA betrug 1 µg. Als Primer fungierten zufällige Hexamere (*random hexamere*), die an alle Arten von RNA (mRNA, rRNA, tRNA) binden. Die Komponenten des Reaktionsgemisches für die reverse Transkription sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Komponenten des Reaktionsmixes für die Reverse Transkription

	Volumen (µl)/Ansatz	Konzentration
RNase-freies Wasser	abhängig von der eingesetzten RNA-Menge ¹⁾	
10x RT-Puffer	10,0	1x
25 mM MgCl ₂	22,0	5,5 mM
DeoxyNTP-Mix	20,0	500 µM pro dNTP
Random Hexamere	5,0	2,5 µM
RNase-Inhibitor	2,0	0,4 U/µl
MultiScribe Reverse	6,25	3,125 U/µl
Transkriptase (50 U/µl)		
Total Volume	65,25	

¹⁾ 34,75 µl RNase-freies Wasser – RNA-Sample-Volumen in einer 100 µl-Reaktion; RT = reverse Transkription; dNTP = Desoxynukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); U = Unit

Das *Thermocycler*-Programm (Thermocycler, Firma Whatman Biometra, Göttingen, Deutschland) für die Erststrang-cDNA-Synthese umfasste folgende Schritte: Nach einer Primer-Inkubation bei 25 °C für 10 min folgte die reverse Transkription bei 37 °C für 60 min, bevor am Ende die reverse Transkriptase bei 95 °C für 5 min inaktiviert wurde. Die so hergestellte cDNA wurde für die weiteren Analysen bei -20 °C gelagert.

3.2.4. Quantitative *real time* PCR

Für die Zweitstrang-cDNA-Synthese wurden ausschließlich Reagenzien der Firma ABI (Foster City, USA) verwendet. Das *ABI Prism[®]7000 Sequence Detection System* erlaubt

die kontinuierliche Quantifizierung des Amplifikats, während die klassische RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion) lediglich eine Endpunktbestimmung ermöglicht. Die bei der *real time* PCR genutzte Information der frühen PCR-Zyklen eliminiert möglicherweise in späteren PCR-Zyklen auftretende störende Einflussfaktoren, wie beispielsweise eine Verknappung der Primer und Nukleotide oder eine geringere Aktivität der reversen Transkriptase, bedingt durch eine Produktakkumulation, welche zu einem verlangsamten linearen Wachstum bis hin zum Stillstand in der Plateauphase führen.

Eine weitere Besonderheit der *real time* PCR basiert auf dem Einsatz genspezifischer Sonden (TaqMan[®]-Sonden). Die Sonden (*minor groove binder*, MGB probes), welche in der Regel aus 15 - 20 Basen bestehen, sind am 5'-Ende kovalent mit einem fluoreszierenden Farbstoff (6-Carboxyfluorescein, FAM, *reporter dye*) und am 3'-Ende mit einem nicht-fluoreszierenden quenchenden Farbstoff (*quencher dye*, *non fluorescent quencher*, NFQ) gekoppelt, dessen Anregungsspektrum dem Emissionsspektrum des fluoreszierenden Farbstoffs entspricht. Bei intakter Sonde wird die Energie des fluoreszierenden Farbstoffs statt als Licht der entsprechenden Wellenlänge direkt an den nicht-fluoreszierenden quenchenden Farbstoff weitergegeben (Fluoreszenz/Förster-Resonanz-Energie-Transfer, FRET), so dass die Emission des fluoreszierenden Farbstoffs bei intakter Sonde unterdrückt wird (siehe Abbildung 7).

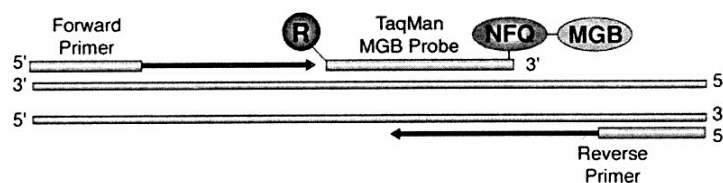


Abbildung 7: Aufbau einer TaqMan[®]-Sonde

R = *reporter dye*, fluoreszierender Farbstoff (FAM); NFQ = *non fluorescent quencher*, nicht fluoreszierender Farbstoff; MGB = *minor groove binder*-Sonde; weitere Erläuterungen im Text

Die verwendeten genspezifischen TaqMan[®]-Sonden wurden mit den entsprechenden Primern in einem „Assay-Mix“ von der Firma ABI (Foster City, USA) bezogen. Die RNA-Sequenzen der verwendeten Zielgene (FATP, H-FABP_c, FAT/CD36) wurden aus der Datenbank vom *National Center for Biotechnology and Information* (NCBI) entnommen (NM_053580, NM_024162, NM_031561). Nach einer ausführlichen *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)-Analyse zum Ausschluss von Homologien mit anderen Sequenzen der Datenbank wurden spezifische Sequenzen der Gene mit einer

Länge von ca. 200 bp in eine spezifische *Assay-by-Design* Software (Firma ABI, Foster City, USA) eingespeist und die Assays mit der Bedingung einer Exon-übergreifenden Sonde von der Firma ABI (Foster City, USA) synthetisiert. Die Primer- und Sondensequenzen für FATP, H-FABP_c und FAT/CD36 sind in Tabelle 6 dargestellt. Als endogene Kontrolle wurde 18S-rRNA verwendet, welche sich durch eine relativ konstante Expression auszeichnet. Primer und Sonden für die 18S rRNA wurden als *Assay-on-Demand* von der Firma ABI (Foster City, USA) bezogen.

Tabelle 6: Primer- und Sondensequenzen von FATP, H-FABP_c und FAT/CD36

Gen		Sequenzen	Genbank-Nr.
FATP	FP	TCC TAA GGC GGC CAT TGT G	NM_053580
	RP	CCG CAT GCT GTA GGA ATG GT	
	Sonde	CAC AGC AGG TAC TAC CGC	
H-FABP _c	FP	GAC GAG GTC ACA GCA GAT GA	NM_024162
	RP	CTG CAC ATG GAC CAG TTT GC	
	Sonde	TCA CGA CCG ACT TGA CC	
FAT/CD36	FP	ATT TCA TAC TGT GCT TGC AGA TCT AAG A	NM_031561
	RP	GGT TTT ACC AAA AAT GTA GCT AGT GCA T	
	Sonde	TCA TCC ACT ACT TAT TTT CC	

FATP = *fatty acid transport protein*; H-FABP_c = *fatty acid binding protein* (erstmalig im Herzmuskel (H) entdeckt, als FABP3-Gen beschrieben, im Cytosol (c) lokalisiert); FAT/CD36 = *fatty acid translocase* (85-prozentige Homologie der Aminosäuresequenz mit Leukozyten-Differenzierungs-Antigen CD36); FP = forward primer; RP = reverse primer

Der von der Firma ABI (Foster City, USA) bezogene universelle Mastermix enthielt u.a. eine thermostabile *AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase*, Deoxynukleotidtriphosphat (dNTP) mit Deoxyuridintriphosphat (UTP), einen passiven Referenzfarbstoff (ROX) und eine Uracil-N-Glycosylase (*AmpErase[®] UNG*). Die Uracil-N-Glycosylase verhindert die Reamplifikation von möglichen PCR-Kontaminationsprodukten, indem in einem ersten UNG-Inkubationsschritt der PCR vorhandene Uracilreste aus ein- oder doppelsträngiger DNA entfernt werden. Der passive interne Referenzfarbstoff (ROX) dient dazu, nicht-PCR-bedingte Fluoreszenzfluktuationen zu bereinigen.

Das PCR-Programm begann mit dem UNG-Inkubationsschritt bei 50 °C für 2 min, gefolgt von einem DNA-Polymerase-Aktivierungsschritt bei 95 °C für 10 min.

Anschließend wurden 40 Zyklen mit einer 15-sekündigen DNA-Denaturierung bei 95 °C und einer einminütigen Hybridisierung und Polymerisation bei 60 °C durchgeführt.

Während der PCR-Polymerisation wird die 5'-Nuklease-Aktivität der eingesetzten *AmpliTaq Gold*[®] DNA-Polymerase genutzt, um die hybridisierte TaqMan[®]-Sonde zu degradieren. Durch die Degradierung der Sonde wird die räumliche Assoziation zwischen fluoreszierendem Farbstoff (FAM) und quenchem Farbstoff (NFQ) aufgehoben (siehe Abbildung 8), so dass das Fluoreszenzsignal (520 - 530 nm für FAM) nun von einer CCD-Kamera detektiert werden kann. Die Fluoreszenzemission, welche proportional zur synthetisierten DNA-Menge ist, wird über entsprechende Algorithmen in die Auswertungs-Software (*ABI Prism 7000 SDS-Software*, Foster City, USA) eingespeist.

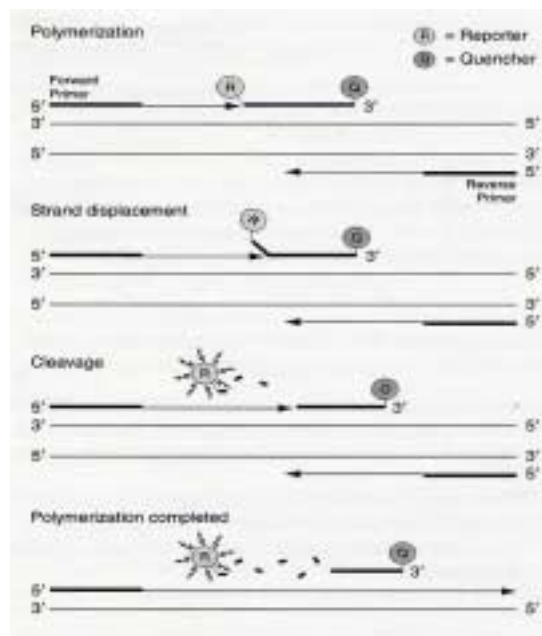


Abbildung 8: Prinzip des TaqMan[®]-Assays während der *real time* PCR

Die 5'-Nuklease-Aktivität der *AmpliTaq Gold*[®] DNA-Polymerase führt während der PCR-Polymerisation zum Ablösen der hybridisierten TaqMan[®]-Sonde vom cDNA-Strang. Hierdurch wird die räumliche Assoziation zwischen fluoreszierendem Farbstoff (R) und quenchem Farbstoff (Q) aufgehoben und das Fluoreszenzsignal, welches proportional zum gebildeten Amplifikationsprodukt ist, detektiert.

Die *real time* PCR wurde auf 96-well-Platten durchgeführt. Das Endvolumen je Vertiefung (*well*) betrug 30 µl. Auf einer 96-well-Platte wurden Standardreihen der zu untersuchenden Zielgene und der endogenen Kontrolle mit je 6 Verdünnungsstufen platziert. Die Standardreihen erstreckten sich über 4 Zehnerpotenzen bei dem Muskelgewebe (10^4 bis 10^1 ng) bzw. über 3 Zehnerpotenzen bei Verwendung der Darmmucosa (10^4 bis 10^2 ng). Neben den unbekanntenen Proben liefen zwei Negativkontrollen (NTC, *no template control*; NEC, *no enzyme control*) mit. Alle

Messungen erfolgten als Triplikate, so dass vorhandene Pipettierfehler ermittelt werden konnten.

Bei der Datenauswertung erfolgt die Korrektur der Emission des fluoreszierenden Farbstoffs (FAM) um die Emissionsintensität des passiven Referenzfarbstoffs (ROX). Dieses Verhältnis ist als R_n (*normalized reporter*) definiert. Der R_n^+ -Wert gibt die Emissionsintensität einer Probe an, welche cDNA enthält (*template*). Der R_n^- -Wert gibt die Emissionsintensität einer Probe an, welche keine cDNA enthält (*no template control*). Die Differenz aus R_n^+ und R_n^- (ΔR_n) gibt das spezifische Fluoreszenzsignal unter den jeweiligen PCR-Bedingungen wieder. Als Schwellenwert (*threshold*) oder C_t -Wert (*threshold cycle*) wird bei der *real time* PCR der Zyklus definiert, in dem erstmalig ein signifikanter Anstieg von ΔR_n aus dem Hintergrundrauschen detektiert werden kann. Die davor liegenden Zyklen werden als *Baseline* determiniert. Die C_t -Werte wurden dann gegen die logarithmische Ausgangskonzentration der RNA zur Erstellung der Standardkurve aufgetragen, mit deren Hilfe die unbekanntenen Proben quantifiziert wurden. Beispielhaft ist dieses in Abbildung 9 dargestellt.

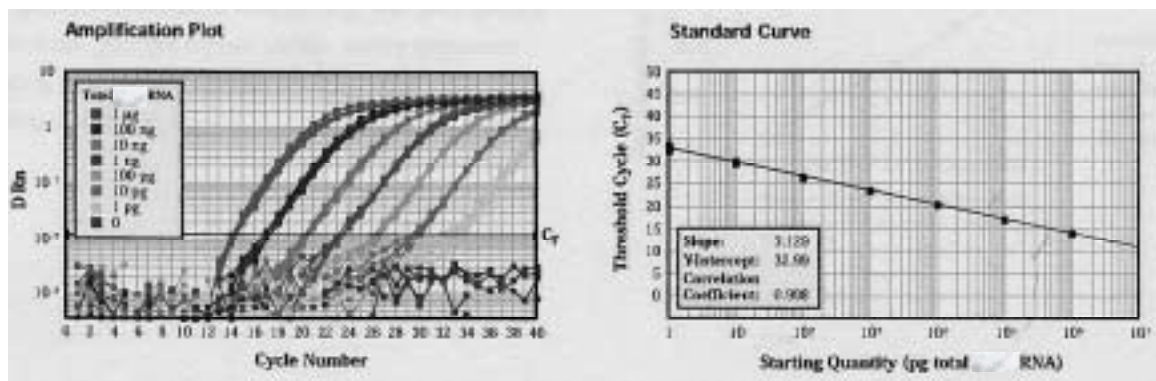


Abbildung 9: Beispielhafte logarithmische Darstellung eines Amplifikationsplots und einer Standardkurve

Aus dem Amplifikationsplot (1) der aufgetragenen Standardproben lassen sich im Schnittpunkt mit dem *Threshold* die C_t -Werte ableiten, in denen das Fluoreszenzsignal der Standardproben signifikant aus dem Hintergrund hervortritt. Anhand dieser C_t -Werte, welche für die Standardkurve (2) gegen die logarithmische Ausgangskonzentration der RNA aufgetragen werden, lassen sich die Proben mit unbekannter RNA-Konzentration quantifizieren.

Eine Standardkurvensteigung von -3,32 würde einer 100-prozentigen PCR-Effizienz mit einer Verdopplung des Amplifikationsproduktes pro Zyklus entsprechen.

Da in der vorliegenden Arbeit die Differenz zwischen der Steigung der Standardkurve der endogenen Kontrolle und derjenigen der Zielgene $> 0,1$ war, wurde die relative Standardkurvenmethode zur Quantifizierung der Genexpression verwendet. Die durch

das Fluoreszenzsignal detektierte und anhand der Standardkurve ermittelte Konzentration des Zielgens, dargestellt in willkürlichen Einheiten (*arbitrary units*), wurde durch die auf gleiche Weise ermittelte Konzentration der endogenen Kontrolle dividiert. Die so pro Tier erhaltene dimensionslose Verhältniszahl wurde in Gruppenmittelwerten zusammengefasst, welche wiederum zwischen den drei Versuchsgruppen (LF, MCT, LCT) verglichen wurden, um Aussagen über einer diätetische bedingte Änderung der Genexpression vornehmen zu können.

3.3. Fettsäuremuster und Verteilung von U-¹³C-Palmitat

In Experiment B-a wurden die Ratten mit den oben geschriebenen Versuchsdiäten gefüttert. Während der letzten 5 Tage des Experiments erhielten die Tiere mit der Diät universell mit schweren Kohlenstoffatomen (¹³C) markierte Palmitinsäure (U-¹³C₁₆-Palmitat, Reinheit 99 %, Firma Cambridge Isotope Laboratories, Andover, Massachusetts, USA) verabreicht. Zwei Tiere pro Gruppe erhielten in diesem Zeitraum die Versuchsdiäten ohne Zugabe der markierten Fettsäure, um die natürliche Anreicherung von U-¹³C-Palmitat bestimmen zu können. Um sicherzustellen, dass jedes Tier die gleiche Menge des stabilen Isotops mit dem Futter aufnahm, mussten die Tiere restriktiv – ausgehend von der Futterraufnahme des am wenigsten fressenden Tieres – gefüttert werden. Die Tiere erhielten in der letzten fünf Tagen des Experiments pro Tag 20 g Futter (62 - 64 kcal) mit einem U-¹³C-Palmitatgehalt von ca. 6 mg. Ziel der chronischen Fütterung mit der U-¹³C-Palmitinsäure war es, durch die 5-tägige Fütterung einen Gleichgewichtszustand (*steady state*) dieses Markers in den Geweben zu erzielen. Nach Tötung der Tiere wurden aus den o.g. Organen die Lipide extrahiert und in diesen die Konzentration des U-¹³C-Palmitats analysiert, um die Verteilung des applizierten Fettsäuremarkers als Repräsentant für langkettige gesättigte Fettsäuren bestimmen zu können.

In Experiment B-b wurden die Ratten für 4 Wochen mit den Versuchsdiäten gefüttert. Am letzten Tag des Experimentes erhielten alle Ratten eine fettreiche Testmahlzeit (oraler metabolischer Toleranztest, OMTT), in welche ebenfalls die universell mit schweren Kohlenstoffatomen (¹³C) markierte Palmitinsäure (U-¹³C₁₆-Palmitat) gemischt worden war. Zwei Tiere pro Gruppe erhielten den OMTT ohne Zugabe der markierten Fettsäure, um die natürliche Anreicherung des U-¹³C-Palmitats bestimmen zu können. Zu

Beginn der Hellphase des letzten Tages der Fütterungsperiode erhielten die Tiere 3 g des OMTT (23 kcal) in einer Petrischale angeboten, die innerhalb von 15 Minuten geleert wurde. Der U-¹³C-Palmitatgehalt dieser Testmahlzeit betrug ca. 15 mg. Fünf Stunden nach Applikation des OMTT wurden die Tiere zur Organentnahme getötet. Aus den o.g. Geweben wurden die Lipide extrahiert und in diesen die Konzentration des U-¹³C-Palmitats, als Marker für langkettig gesättigte Fettsäuren, bestimmt.

3.3.1. Fettextraktion nach Folch

Die Extraktion der Gesamtlipide aus den Gewebeproben erfolgte nach einer modifizierten Methode von Folch et al. [234]. Die bei -80 °C gelagerten Gewebeproben mit einem Gewicht von ca. 200 mg wurden in Zentrifugengläser eingewogen, in ein Eisbad verbracht und die 20-fache Menge an Chloroform/Methanol (CHCl₃/MeOH, 2:1 v/v) zur Probe gegeben. Dabei wurde nach der ersten Zugabe von 2 ml CHCl₃/MeOH das Gewebe mit einem Homogenator (Polytron Typ PT 10/35, Firma Kinematica GmbH, Luzern, Schweiz) homogenisiert, worauf erneut 2 ml CHCl₃/MeOH zum Homogenat gegeben wurden. Danach wurden 800 µl 0,58-prozentige NaCl-Lösung (~100 mmol/l) zum Homogenat gegeben und durch 5-minütige Zentrifugation (2300 x g) bei 4 °C eine vollständige Phasentrennung erreicht. Mit einer Pasteurpipette wurde die untere Phase entnommen und in zuvor ausgewogene und beschriftete Glaszentrifugengläser gegeben. Die obere wässrige Phase und das verbliebene Pellet wurden erneut extrahiert. Dazu wurden 2 ml CHCl₃/MeOH (5:1 v/v, Mischungsverhältnis der organischen Lösungsmittel in der unteren Phase) zugegeben. Nach der zweiten Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen wurde die untere Phase ebenfalls entnommen und in die Zentrifugengläser überführt. Im Anschluss wurde die chloroformhaltige Phase unter Vakuum bis zur Trockene eingengt (*Speed Vac Concentrator & Refrigerated Condensation Trap*, Firma Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, Deutschland). Das so erhaltene konzentrierte Lipidextrakt wurde zurückgewogen und zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Wägungen wurden mit einer Mikrowaage (Mettler AE 163, Firma Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland) durchgeführt.

3.3.2. Triglyceridbestimmung

Zur Bestimmung der Triglyceridkonzentration in den Geweben wurden die eingedampften Lipidextrakte in 2 ml Isopropanol (Firma Merk, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen und durch Erwärmung auf 70 °C im Wasserbad für 30 min und eine anschließende 30-minütige Ultraschallbehandlung vollständig gelöst. Für die enzymatische Bestimmung der Triglyceride wurden 20 µl der gelösten Probe mit 10 µl Tritonlösung (30 g/l, Firma Sigma, St. Louis, USA), 70 µl destilliertem Wasser und 500 µl Triglyceridreagenz (Firma Thermo Clinical Labsystems, Vantaa, Finnland) für 20 min bei 37 °C inkubiert und die Extinktion bei 510 nm nach Abzug des Leerwerts (20 µl Isopropanol + 10 µl Tritonlösung + 70 µl destilliertes Wasser + 500 µl Triglyceridreagenz) photometrisch bestimmt (Spektralphotometer Perkin Elmer 550 A, Firma Perkin Elmer, Wellesley, Massachusetts, USA). Die Tritonlösung diente zur Stabilisierung des Reaktionsgemisches. Die Wirkungsweise des Triglyceridreagenzes wird in Kapitel 3.4.2. beschrieben.

3.3.3. Gaschromatographische Bestimmung des Fettsäuremusters

Die Bestimmung des Fettsäuremusters der Triglycerid- und Phospholipidfraktionen der Gewebe wurde am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie der Universität Hamburg (Arbeitsgruppe Steinhart) im Rahmen einer Kooperation durchgeführt. Nach einer vergleichbaren Lipidextraktion der Gewebeproben, wurde die Triglycerid- und Phospholipidfraktion der Extrakte durch Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) nach einer modifizierten Methode von Kaluzny et al. [235] separiert. Die separierten Fraktionen wurden in n-Hexan inklusive eines internen Standards (Margarinsäure, 165 ng/µl Extrakt) aufgenommen. Die Bildung der Methylesterderivate der vorhandenen Fettsäuren erfolgte mittels 5-prozentiger methanolischer Kaliumhydroxidlösung (0,89 mol/l) bei 60 °C für 15 min. Zur Neutralisation wurde Magnesiumsulfatlösung (0,3 mol/l) eingesetzt. Die Hexanphase mit den Fettsäuremethylestern (FSME) wurde abgenommen und direkt in den Gaschromatographen (Agilent Technologies 6890 N, Firma Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA) injiziert, um die Fettsäuren qualitativ und quantitativ zu erfassen. Die Quantifizierung erfolgte über Eichgeraden mit acht unterschiedlichen Konzentrationen der entsprechenden FSME-Standards (siehe unten).

Für die chromatographische Auftrennung wurde eine 30 m x 0,32 mm BGB-Wax-Kapillarsäule (Firma BGB-Analytik, Anwil, Schweiz) mit einer Filmdicke von 0,25 µm verwendet. Das Temperaturprogramm begann mit einer Haltephase bei 90 °C für 3 min, gefolgt von einer Temperaturerhöhung auf 180 °C mit einer Erwärmung von 15 °C/min und einer Haltephase von 5 min, gefolgt von einer Temperaturerhöhung auf 235 °C mit einer Erwärmung von 5 °C/min und einer anschließenden Haltephase bei 235 °C für 7 min. Als Trägergas wurde Wasserstoff verwendet. Die Detektion erfolgte über einen Flammenionisationsdetektor (*flame ionization detector*, FID) bei 240 °C. Als FSME-Standards wurden „F.A.M.E. Mix C8-C24“ (Firma Supelco, Bellefonte, USA) sowie FSME von C20:4, cis-13,16-C22:2 und cis-4,7,10,13,16,19-C22:6 (Firma Sigma, St. Louis, USA) verwendet. Als interner Standard fungierte Heptadecansäure (C17:0, Firma Fluka Chemikalien, Taufkirchen, Deutschland).

3.3.4. U-¹³C-Palmitatbestimmung am GC-Massenspektrometer

Die Bestimmung der ¹³C-Palmitinsäurekonzentration in den Lipidextrakten der Gewebe wurde am A. I. Virtanen Institut im *Department* für Biotechnologie und Molekulare Medizin der Universität Kuopio (Finnland, Arbeitsgruppe Herzig) im Rahmen einer Kooperation nach gaschromatographischer Auftrennung der Lipidextrakte am Massenspektrometer vorgenommen. Hierfür diente ein Gaschromatograph (Agilent Technologies 6890, Firma Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA), welcher an ein Massenspektrometer (Agilent Technologies 5973N, Firma Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA) gekoppelt war. Für die chromatographische Auftrennung wurde eine 100 m x 0,25 mm SP-2560 Kapillarsäule (Firma Supelco, Bellefonte, USA) mit einer Filmdicke von 0,2 µm verwendet. Das Temperaturprogramm begann mit einer Haltephase bei 180 °C für 2 min, gefolgt von einer Temperaturerhöhung auf 240 °C mit einer Erwärmung von 3 °C/min und einer anschließenden Haltephase bei 240 °C für 8 min. Als Trägergas wurde Helium verwendet. Die Temperatur in der Interphase (*interface*) zwischen dem Gaschromatographen und dem Massenspektrometer wurde konstant bei 280 °C gehalten, die Temperatur der Ionisationskammer bei 230 °C und die der Massenfilter (Quadropol) bei 150 °C. Die Elektronenenergie der Ionisationsquelle betrug 70 eV. Als interner Standard diente Heptadecansäure (C17:0, Firma Sigma, St. Louis, USA). Weiterhin wurde ein Fettsäuremethylester-(FAME)-Mix und Fettsäuremethylester-(FAME)-Standards mit definierten FAME-Konzentrationen (FAME

Standard RM-6, Firma Supelco Bellefonte, USA) eingesetzt. Zur Kalibrierung des Massenspektrometers diente eine Standardkurve der U-¹³C-Palmitinsäure (Firma Camebridge Isotope Laboratories, Andover, USA). Die FAME und ihre Ionen wurden über ein selektives Ionen-Monitoring detektiert und mit Hilfe der *EnhancedChemStation*-Software (Firma Agilent Technologies Palo Alto, California, USA) analysiert. Die Konzentrationen der U-¹³C-Palmitinsäure und der anderen Fettsäuren wurden in den Proben als µg/Lipidextrakt dargestellt.

Die Anreicherung der ¹³C-Plamitinsäure (µg) wurde auf ein Gramm Gewebefrischmasse bezogen und der natürliche ¹³C-Plamitatgehalt der Gewebe (ermittelt an zwei Tieren pro Gruppe, welche keine ¹³C-Plamitinsäure erhielten) davon subtrahiert. Zur Berechnung der Anreicherung von ¹³C-Plamitat im Fettsäurepool der Gewebe wurde die in den Lipidextrakten ermittelte ¹³C-Plamitatkonzentration auf die Summe der am Gaschromatographen analysierten Fettsäuren in Promille (‰) desselben Lipidextrakts dargestellt. Nach der Subtraktion der natürlichen ¹³C-Plamitanreicherung der Gewebe wurde die so ermittelte ¹³C-Plamitatkonzentration ($\delta^{13}\text{C}$ -Palmitat ‰) in den Geweben der Einzeltiere als Gruppenmittelwert zusammengefasst.

3.4. Orale metabolischer Toleranztest (OMTT)

In Experiment C wurde den Ratten nach der 4-wöchigen Fütterungsperiode ein Katheter in die A. carotis implantiert. Nach einer 48-stündigen Erholungsphase wurde den Tieren am Morgen zu Beginn der Hellphase ein OMTT verabreicht und in den darauffolgenden 6 Stunden der postprandiale Verlauf einzelner Plasmametabolite untersucht. Der OMTT (3 g/Tier) wurde den Ratten über eine Spritze unter ständiger Kontrolle innerhalb von 5 min in den Schlund appliziert. Die Blutentnahme (200 - 400 µl) über den Carotiskatheter erfolgte nüchtern (Zeitpunkt t_0) und postprandial 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Stunden nach der Verabreichung des OMTT. Nach dem Zentrifugieren (10 min, 2000 rpm, 4 °C) der EDTA-Blutproben wurde das Plasma bis zur weiteren Bestimmung von Glucose, Triglyceriden, Cholesterol und Insulin bei -20 °C gelagert.

3.4.1. Operationstechnik

Die Ratten wurden wie bereits beschrieben mit einer Mischung aus Xylazinhydrochlorid (10 mg/kg KG) und Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg KG) narkotisiert. Im ventralen

Halsbereich wurde das Fell der Tiere rasiert und die freigelegte Haut desinfiziert. Mit einem Längsschnitt zwischen Brust- und Schlüsselbein auf einer Seite der Halsregion (siehe Abbildung 10) wurde die A. carotis unter Fett-, Bindegewebe und Halsmuskulatur freipräpariert.

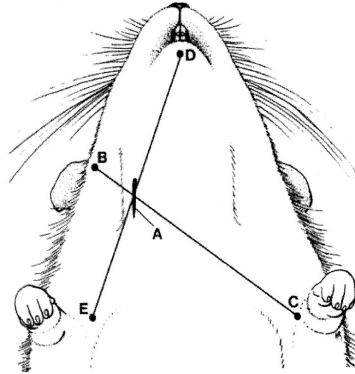


Abbildung 10: Einschnittsstelle in der ventralen Halsregion der Ratte zum Freipräparieren der A. carotis
Quelle [236]

Nach dem Freilegen der A. carotis (siehe Abbildung 11) wurde die Gefäßwand der A. carotis mit einer Flügelschere geöffnet, ein Polyethylenkatheter mit einem Durchmesser von 0,5 mm einige Millimeter in Richtung Herz eingeführt und die Durchlässigkeit des Katheters getestet. Um das Verrutschen des Katheters zu vermeiden, wurde dieser mit Hilfe von Seidenfäden im Gefäß und anschließend an der Halsmuskulatur fixiert. Vom dorsalen Halsbereich der Tiere wurde der Katheter nun seitlich unter der Hautdecke mit einer stumpfen Arterienklemme zur Austrittsstelle im Nacken der Ratte geführt. Bis zur späteren Blutentnahme wurde der Katheter mit NaCl gefüllt, verschlossen und in Form einer Schlinge oberhalb des Schultergürtels der Tiere fixiert.



Abbildung 11: Arterienkatheter mit dorsaler Austrittsstelle im Nacken der Tiere
a/b = fixierend angebrachte Seidenfäden; Quelle [237]

3.4.2. Bestimmung von Glucose, Triglyceriden, Cholesterol und Insulin

Die Plasmakonzentrationen von Glucose, Triglyceriden und Cholesterol wurden mit einem automatischen Laboranalysegerät (Firma Konelab Corporation, Espoo, Finnland) gemessen. Hierfür wurden klinische Testkits der Firma *Thermo Clinical Labsystems* (Vantaa, Finnland) und Randox (Clumlin, England) verwendet. Insulin wurde mittels eines ELISA (*Ultrasensitive Rat Insulin ELISA*, Firma Mercodia, Uppsala, Schweden) analysiert.

Das Testprinzip zur Bestimmung der Plasmaglukosekonzentration beruht auf der ATP-abhängigen Phosphorylierung von Glucose durch eine Hexokinase. Das gebildete Glucose-6-Phosphat wird durch die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase zu 6-Phosphogluconat oxidiert. In der zweiten Reaktion wird eine äquimolare Menge an NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert, so dass durch die daraus resultierende Erhöhung der Extinktion bei 340 nm die Glukosekonzentration der Proben erfasst werden kann.

Bei der Bestimmung der Konzentration von Triglyceriden wurden die Triglyceride mithilfe einer Lipase zu Glycerol und freien Fettsäuren hydrolysiert. Anschließend wird das Glycerol unter Zugabe von ATP zu Glycerol-3-Phosphat phosphoryliert, welches dann zu Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid oxidiert wird. Das Wasserstoffperoxid reagiert mit Aminophenazon und 4-Chlorphenol unter Bildung eines Quinonimin-Farbstoffes, dessen Extinktion bei 510 nm gemessen wird. Die Glycerolbestimmung nach Lipolyse wurde um die Konzentration an freiem Glycerol korrigiert. Das freie Glycerol im Plasma der Tiere wird ebenfalls unter Zugabe von ATP und Glycerokinase in Glycerol-3-Phosphat und ADP überführt. Glycerol-3-Phosphat reagiert mit Sauerstoff über die Glycerol-Phosphatoxidase u.a. zu Wasserstoffperoxid, welches mit einem Sulfphonsäure-Komplex (DCHBS, 3,5-Dichlor-2-Hydroxybenzen-Sulphonsäure) und Aminophenazon zur Bildung eines Quinonimin-Farbstoffes führt, welcher bei 510 nm gemessen wird.

Das Testprinzip zur Untersuchung der Konzentration von Cholesterol im Plasma der Tiere basiert auf der Spaltung von Cholesterinestern mittels einer Esterase in freies Cholesterol und Fettsäuren. Die Oxidation des Cholesterols durch eine Cholesteroloxidase führt u.a. zur Bildung von Wasserstoffperoxid, welches zusammen mit Phenol und Amino-4-Antipyrin durch eine Peroxidase zu Quinonimin reagiert. Dieser rote Farbstoff wird bei 510 nm gemessen.

Im Nüchternzustand wurde weiterhin die Konzentration freier Fettsäuren bestimmt. Das Testprinzip zur Untersuchung der freien Fettsäuren im Plasma der Tiere beginnt mit der

Aktivierung der freien Fettsäuren durch eine Acyl-CoA-Synthetase zu Acyl-CoA. Anschließend wird das Acyl-CoA durch eine Acyl-CoA-Oxidase unter Bildung von Wasserstoffperoxid oxidiert. Das Wasserstoffperoxid reagiert daraufhin mit 4-AAP (4-Aminoantipyrine) und TOOS (N-Ethyl-N-2-[Hydroxy-3-Sulphopropyl]-m-Toluidine) zu einem violetten Farbkomplex, der bei 540 nm gemessen wird.

Für die Insulinbestimmung mittels ELISA (*Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*) wurden 5 µl Plasma benötigt. Der Enzym-Immunoassay basiert auf einer direkten *Sandwich*-Technik mit zwei Antikörpern, welche gegen das Insulinmolekül gerichtet sind. Während der Inkubation reagiert das Insulin mit einem Peroxidase-konjugierten Insulinantikörper und mit einem Insulinantikörper, welcher an der Oberfläche der Microtiterplatte (im 96 *well*-Vormat) gebunden ist. Nach einigen Waschsritten entsteht über eine Reaktion mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenizin ein Farbkomplex, welcher bei 450 nm mit dem ELISA-Reader (Spectra Max 340, Firma Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA) und der entsprechenden Analysesoftware (*Soft Max[®]PRO Version 1.1*, Firma Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA) gemessen und quantifiziert wurde.

3.4.3. Auswertung postprandialer Plasmametabolite

Neben der Darstellung der Plasmakonzentrationsverläufe von Glucose und Triglyceriden wurde die Fläche unterhalb der Glucose- und Triglyceridkonzentrationszeitkurve (AUC, *area under the curve*) bestimmt und der maximale Anstieg der Triglyceride in den drei Diätgruppen ermittelt. Für die Auswertung wurden lediglich die Ratten berücksichtigt, von denen ein kompletter Datensatz über die gesamten 6 Stunden zur Verfügung stand. Der maximale Triglyceridanstieg wurde als Differenz aus der maximalen Triglyceridkonzentration und der Nüchternkonzentration zum Zeitpunkt t_0 berechnet ($\Delta TG_{\max} - TG_{\text{nüchtern}}$). Die Berechnung der Fläche unterhalb der Kurve erfolgte nach folgender Gleichung :

$$AUC (0 - t_n) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n (C_{i-1} + C_i) (t_i - t_{i-1})$$

3.5. Bestimmung der Körperfettmasse

In Experiment D wurde 5 Tieren pro Gruppe am letzten Tag der 4-wöchigen Fütterungsperiode im gefasteten Zustand 0,6 g/kg KG deuteriertes Wasser ($D_2O/H_2O = 67$ Atomprozent, Firma ARMAR Chemicals, Döttingen, Schweiz) intraperitoneal injiziert. Die verwendeten Spritzen wurden vor und nach der Injektion gewogen, um die exakte Dosis des applizierten Deuterium-angereicherten Wassers zu bestimmen. In den anschließenden 4 Stunden hatten die Tiere keinen Zugang zu Futter oder Trinkwasser und der Marker konnte sich gleichmäßig im Körperwasser der Tiere (TBW, *total body water*) verteilen. Nach den 4 Stunden wurden die Tiere narkotisiert und rasch entblutet. Das Blut wurde in EDTA-beschichteten Monovetten aufgefangen und bis zur weiteren Aufbereitung bei -20 °C gelagert. Ziel des Experimentes war es, über die Bestimmung des Gesamtkörperwassers der Tiere eine indirekte Aussage über die Fettmasse der Tiere vorzunehmen.

Die Deuterium-Verdünnungsmethode als nicht-invasive *in vivo*-Methode eignet sich gut zur Berechnung des Gesamtkörperwassers, weil die Kinetik von D_2O nahezu identisch mit der von nichtmarkiertem Wasser ist [238]. Unter der Annahme eines Wassergehalts von 73 % der fettfreien Masse (FFM) kann aus der Verteilung des deuterierten Wassers im Gesamtkörperwasserpool (TBW) die fettfreie Masse und im Anschluss durch Zuhilfenahme des Körpergewichtes (KG) anhand des Zwei-Kompartimentenmodells die Fettmasse (FM) der Tiere errechnet werden:

$$FFM (g) = TBW/0,73$$

$$FM (g) = KG (g) - FFM (g)$$

mit

FFM = fettfreie Masse

TBW = Gesamtkörperwasser (*total body water*)

FM = Fettmasse

KG = Körpergewicht

Da es allerdings bei der Bestimmung des Gesamtkörperwasserpools mit der Deuterium-Verdünnungsmethode zu einer Überschätzung des Gesamtkörperwassers um 4 - 5 % des Körpergewichtes kommt (markierte Wasserstoffatome können mit unmarkierten Wasserstoffatomen im Verteilungsraum z. B. aus Carboxyl-, Hydroxyl- und

Aminogruppen ausgetauscht werden, [239]), wurde bei der Berechnung des Gesamtkörperwassers ein Fehlerfaktor von 0,04 berücksichtigt:

$$TBW = [\text{injizierte D}_2\text{O-Menge (g) / (D}_2\text{O-Gehalt im Blut (g) / 1000000)] - [0,04 \cdot \text{KG (g)}]$$

mit

TBW = Gesamtkörperwasser (*total body water*)

D₂O = deuteriertes Wasser (²H₂O)

KG = Körpergewicht

Zur Gewinnung des deuterierten Wassers aus den Blutproben wurden diese mit Hilfe einer Kühlfalle nach dem Prinzip der Gefriertrocknung sublimiert. Bei dem Prozess wurde das Blut mit dem darin enthaltenen deuterierten Wasser gefroren. Durch ein angelegtes Vakuum wurde das gebildete Eis anschließend bei niedrigem Druck sublimiert, und der gebildete Wasserdampf in einer Vakuumkammer aufgefangen. Durch Verflüssigung des gebildeten Wasserdampfes wurde das Wasser zurückgewonnen.

Die Konzentrationsbestimmung des deuterierten Wassers in den sublimierten Blutproben erfolgte am Institut für Tierernährung der Universität Hohenheim (Arbeitsgruppe Steingäß) an einem Prozess-Photometer (SPECTRAN 677, Firma Bodenseewerk Geosystem GmbH, Überlingen, Deutschland) im infraroten Wellenlängenbereich bei einer Wellenlänge von 340 – 420 nm. Die Messungen erfolgten im Konzentrationsbereich einer linearen Standardkurve als Triplikate gegen Wasser. Die Darstellung der D₂O-Konzentration in den Proben erfolgte in µg/g Gewebe.

3.6. Hyperinsulinämischer-euglycämischer Clamp (EHC) und intraperitonealer Glucosetoleranztest (IPGTT)

In Bratislava wurde am Institut für Experimentelle Endokrinologie der Slowakischen Akademie der Wissenschaften im Rahmen einer bestehenden Kooperation (Arbeitsgruppe Klimes/Sebokova) ein hyperinsulinämischer-euglycämischer Clamp an männlichen Wistar Charles-River-Ratten (Firma AnLab, Prag, Tschechische Republik) mit gleichem Ausgangsgewicht wie in den Kieler Tierexperimenten durchgeführt. Der EHC gilt als Goldstandard zur Messung der Insulinsensitivität von Geweben, mit Quantifizierung der insulinstimulierten Glucoseaufnahme unter standardisierten Bedingungen [54]. Nach der 4-wöchigen Fütterung mit den oben genannten Diäten,

welche in Kiel produziert, vakuumverpackt und bei -20 °C gekühlt nach Bratislava versandt wurden, wurden die Ratten mit einer Mischung aus Xylazinhydrochlorid (10 mg/kg KG) und Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg KG) anästhesiert und Verweilkatheter in die A. carotis und V. jugularis implantiert. Nach einer 72-stündigen Erholungsphase wurden die Tiere 16 Stunden gefastet und der Nüchtern-glucose- und -insulinspiegel bestimmt. Anschließend wurde der EHC durchgeführt, wobei kontinuierlich über 90 min mit einer Rate von 6,4 mU/kg/min den Ratten porcines Insulin (Firma Actrapid, Novo Nordisk, Dänemark) infundiert wurde, um die Plasmainsulinkonzentration an der Obergrenze des physiologischen Bereichs ($1,49 \pm 0,05$ nmol/l) zu halten. Die arterielle Plasmaglukosekonzentration wurde durch variable Glucoseinfusionen (40-prozentige Glucoselösung, Firma Delta Selekt, Dreieich, Deutschland) auf dem basalen Nüchtern-glucosespiegel gehalten. Zur Kontrolle der Glucose- und Insulinkonzentration im Plasma der Ratten wurden während des 90-minütigen Clamps im 15-Minuten Intervall Blutproben entnommen. Da durch die im hyperinsulinämischen Clamp erreichten hohen Insulinspiegel die endogene hepatische Glucoseabgabe annähernd komplett supprimiert wird [240], entspricht die zur Aufrechterhaltung der Euglykämie erforderliche Glucoseinfusionsrate (GIR) im Wesentlichen der vom Gewebe aufgenommenen Glucosemenge und kann als indirektes Maß für die Insulinsensitivität herangezogen werden.

Die Plasmaglukosekonzentration wurde mit einem *Glucose Analyser* (Firma Beckmann, Fullerton, USA) bestimmt. Die Plasmainsulinkonzentration wurde mithilfe eines RIA (*rat insulin RIA*, Firma Linco, St. Charles, USA) analysiert.

Um zu prüfen, ob die in Kiel gehaltenen Ratten nach der 4-wöchigen Fütterungsperiode mit den gleichen Diäten ebenfalls eine gestörte insulinstimulierte Glucoseaufnahme in die Gewebe aufwiesen, wurde in einem zusätzlichen Experiment in Kiel mit 2 Tieren pro Gruppe ein intraperitonealer Glucosetoleranztest (IPGTT) durchgeführt und die Plasmaverläufe von Glucose und Insulin über die drei nachfolgenden Stunden ermittelt. Hierfür bekamen die Tiere am Morgen des letzten Tages der Fütterungsperiode 2 g/kg KG Glucose intraperitoneal injiziert. Zur Injektion wurde 40-prozentige Glucoselösung (Firma Delta Selekt, Dreieich, Deutschland) verwendet. Die Blutabnahmen (200 µl) über die Schwanzvene erfolgten an nüchternen Tieren zum Zeitpunkt t_0 sowie 30 min, 1, 2 und 3 Stunden nach der Injektion der Glucoselösung.

Nach dem Zentrifugieren der EDTA-Blutproben wurde das Plasma der Tiere bis zur weiteren Bestimmung von Glucose und Insulin bei -20 °C gelagert.

Die Plasmakonzentration von Glucose wurde an dem bereits in Kapitel 3.4.2. beschriebenen Laboranalysegerät (Firma Konelab Corporation, Espoo, Finnland) mit Hilfe des klinischen Tests (Firma Thermo Clinical Labsystems, Vantaa, Finnland) gemessen. Insulin wurde mittels eines ELISA (*Ultrasensitive Rat Insulin ELISA*, Firma Mercodia, Uppsala, Schweden) analysiert. Die Testprinzipien sind ebenfalls in Kapitel 3.4.2. detailliert beschrieben.

3.7. Datenauswertung und Statistik

Zur statistischen Datenauswertung wurde das Programm STATGRAPHICS Plus Version 4.1 (Firma Manugistics, Rockville, Maryland, USA) verwendet. Der Einfluss der Versuchsdiäten (LF, MCT, LCT) auf alle untersuchten Parameter wurde für alle beschriebenen Experimente (A, B-a, B-b, C, D, E) mittels einfacher Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem paarweisen Vergleich der Mittelwerte nach *Student-Newman-Keuls* durchgeführt. Sofern in den Experimenten Parameter in einzelnen Organen untersucht wurden, erfolgte die Auswertung organspezifisch. Die Daten sind, wenn nicht anders beschrieben, als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

Um Unterschiede zwischen dem gefasteten und postprandialen Zustand sowie zwischen der chronischen und einmaligen Applikation von U-¹³C-Palmitat untersuchen zu können, wurden die Experimente B-a und B-b miteinander verglichen. In einem ersten Schritt wurde mittels multifaktorieller Varianzanalyse die Signifikanz der Einflussfaktoren „Experiment“, „Versuchsgruppe“ und „Organ“ getestet. Signifikante Einflussfaktoren (hier: „Experiment“ und „Organ“) wurden im Anschluss durch multiple paarweise Vergleiche (95 % LSD) geprüft, um Unterschiede zwischen den Experimenten (B-a vs. B-b) bzw. den Organen in den jeweiligen Versuchsgruppen festzustellen. Ein P-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

Bei der folgenden Darstellung der Ergebnisse wird zur besseren Übersicht auf die Experimente hingewiesen, aus welchen die jeweiligen Resultate stammen.

4.1. Gewichtsentwicklung

Die Gewichtsentwicklung aller Ratten aus den in Kiel durchgeführten Versuchen (Experiment A, B-a, B-b, C, D ohne E) ist in Abbildung 12 dargestellt. Zu Beginn des Experiments (Versuchswoche 0, W0) wogen die Ratten im Mittel 280 g. Nach der 4-wöchigen Fütterungsperiode lag das mittlere Gewicht der Tiere zwischen 370 g in der LF-Gruppe und 350 g in der LCT-Gruppe. Die Gewichtszunahme der Ratten war in der LF- und MCT-Gruppe mit $87,4 \pm 3,7$ g und $80,5 \pm 2,9$ g signifikant höher als in der LCT-Gruppe mit $62,3 \pm 2,6$ g.

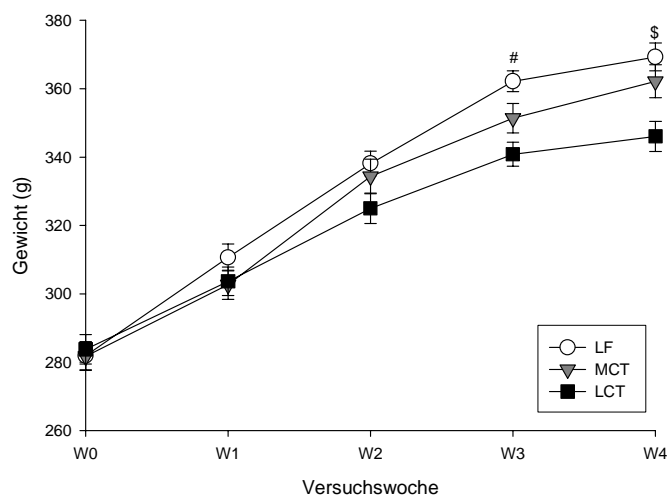


Abbildung 12: Gewichtsentwicklung der Ratten (Experiment A-D)

Mittelwert \pm SEM; n = 49-50; #: signifikanter Unterschied zwischen LF, MCT und LCT ($P < 0,05$, ANOVA); \$: signifikante Unterschiede zwischen LF und MCT gegenüber LCT ($P < 0,05$, ANOVA); W = Versuchswoche

Die in Bratislava im Rahmen des EHC eingesetzten Ratten, welche mit identischen Diäten gefüttert wurden, starteten mit einem Gewicht von 264 g, kamen jedoch nach der 4-wöchigen Fütterungsperiode auf höhere Endgewichte als die in Kiel gehaltenen Ratten. Die Gewichtszunahme der Tiere in Bratislava war zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich ($135,6 \pm 8,1$ g (LF), $135,8 \pm 13,5$ g (MCT), $127,9 \pm 12,3$ g (LCT)).

In Abbildung 13 ist die Gewichtszunahme der Ratten für die jeweiligen Experimente dargestellt. Mit Ausnahme von Experiment D (n = 5 pro Gruppe) und E (Bratislava) waren die Gewichtszunahmen der Ratten der MCT- und LCT-Gruppe aus den Experimenten A, B-a, B-b und C nicht signifikant unterschiedlich voneinander. Für die LF-Tiere ergaben sich hingegen signifikante Unterschiede zwischen den Experimenten A, B-a und B-b verglichen mit Experiment C, D und E.

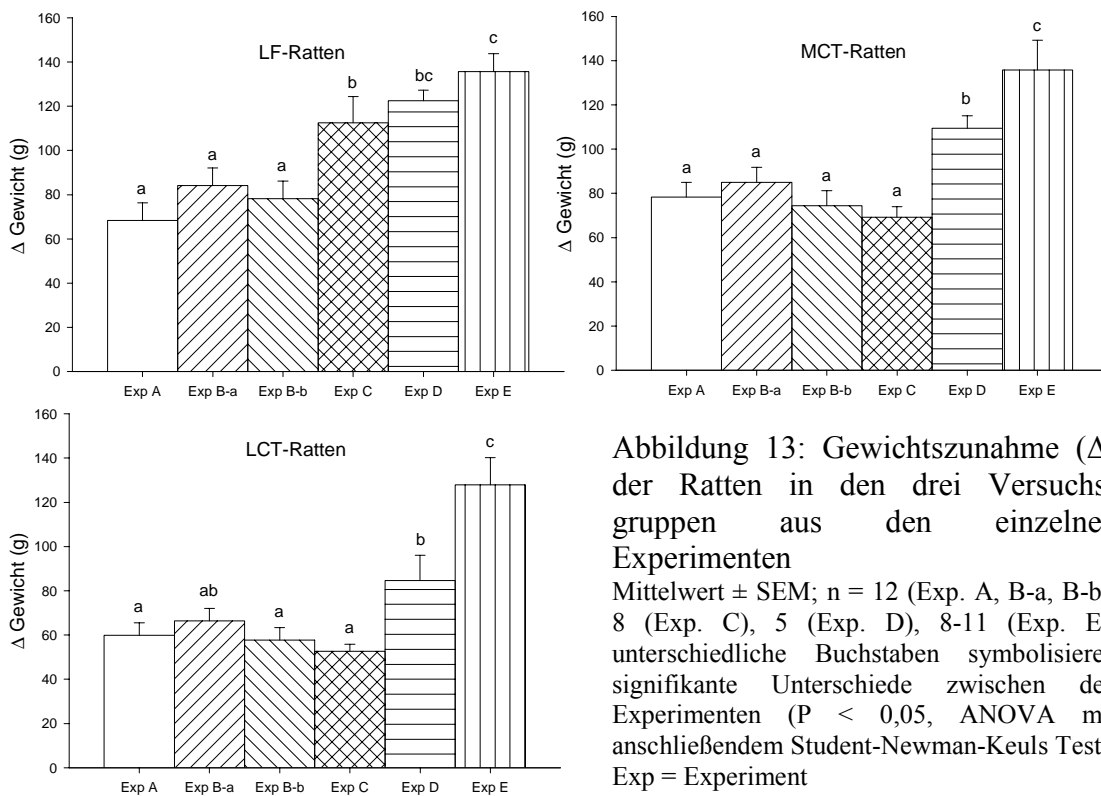


Abbildung 13: Gewichtszunahme (Δ) der Ratten in den drei Versuchsgruppen aus den einzelnen Experimenten
 Mittelwert \pm SEM; n = 12 (Exp. A, B-a, B-b), 8 (Exp. C), 5 (Exp. D), 8-11 (Exp. E); unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Experimenten ($P < 0,05$, ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls Test); Exp = Experiment

Die Ratten der LF-Gruppe wiesen bei den in Kiel durchgeführten Experimente aufgrund der starken Gewichtszunahme der LF-Tiere in Experiment C in der 3. und 4. Versuchswoche signifikant höhere Gewichte auf als die Tiere der MCT- und LCT-Gruppe (siehe Abbildung 12).

Das wöchentlich ermittelte Gewicht der Ratten in den einzelnen Experimenten ist in Tabelle 7 dargestellt. Lediglich in den Experimenten C und D traten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen in der Körpermasse auf. In den übrigen Experimenten aus Kiel (A, B-a und B-b) und dem Experiment aus Bratislava (E) gab es keine signifikanten Unterschiede im wöchentlich ermittelten Gewicht der Ratten zwischen den drei Versuchsgruppen.

Tabelle 7: Gewichtsentwicklung der Ratten in den Kieler Experimenten

Exp. A	LF	MCT	LCT	ANOVA
W0	322,4 ± 6,6	322,3 ± 8,1	325,0 ± 8,3	ns
W1	349,3 ± 5,2	343,9 ± 8,1	345,6 ± 7,1	ns
W2	361,9 ± 5,6	365,5 ± 7,9	355,9 ± 7,2	ns
W3	377,3 ± 5,5	382,8 ± 7,4	367,6 ± 7,9	ns
W4	390,7 ± 6,2	400,5 ± 7,6	384,9 ± 8,7	ns
Δ w4-w0	68,3 ± 5,2	78,3 ± 4,8	59,8 ± 6,7	ns
Exp. B-a	LF	MCT	LCT	ANOVA
W0	265,2 ± 3,4	263,7 ± 3,6	264,3 ± 2,7	ns
W1	294,3 ± 4,1	286,3 ± 4,6	288,5 ± 3,3	ns
W2	329,7 ± 7,5	340,5 ± 13,4	325,8 ± 11,1	ns
W3	356,1 ± 5,9	347,3 ± 6,6	338,2 ± 3,3	ns
W4	349,4 ± 6,0	348,7 ± 7,2	330,7 ± 3,5	<0,05
Δ w4-w0	84,8 ± 3,8 ^a	85,0 ± 4,6 ^a	66,4 ± 2,9 ^b	<0,01
Exp. B-b	LF	MCT	LCT	ANOVA
W0	270,4 ± 3,2	270,4 ± 3,9	269,7 ± 3,6	ns
W1	292,0 ± 4,9	291,7 ± 5,5	285,1 ± 4,0	ns
W2	318,0 ± 5,1	314,9 ± 6,8	303,4 ± 4,5	ns
W3	349,1 ± 5,5	338,9 ± 9,0	329,2 ± 5,7	ns
W4	348,6 ± 6,2	344,9 ± 9,7	327,5 ± 5,8	ns
Δ w4-w0	78,3 ± 3,6 ^a	74,5 ± 6,8 ^a	57,7 ± 3,9 ^b	<0,05
Exp. C	LF	MCT	LCT	ANOVA
W0	275,3 ± 6,6	276,0 ± 4,2	285,4 ± 4,6	ns
W1	312,7 ^a ± 5,1	289,8 ^b ± 5,2	295,1 ^b ± 4,7	<0,05
W2	344,1 ^a ± 6,8	312,8 ^b ± 6,2	312,9 ^b ± 5,2	<0,01
W3	364,9 ^a ± 7,4	329,1 ^b ± 6,1	326,8 ^b ± 5,4	<0,001
W4	387,8 ^a ± 8,8	345,2 ^b ± 6,3	338,4 ^b ± 5,2	<0,001
Δ w4-w0	112,5 ^a ± 11,9	69,2 ^b ± 4,7	53,0 ^b ± 2,8	<0,001

Fortsetzung Tabelle 7: Gewichtsentwicklung der Ratten in den Kieler Experimenten

Exp. D	LF	MCT	LCT	ANOVA
W0	263,3 ± 8,5	265,1 ± 9,0	263,7 ± 8,9	ns
W1	298,6 ± 6,1	292,5 ± 2,7	298,4 ± 3,1	ns
W2	340,1 ± 3,9 ^b	330,2 ± 3,7 ^{ab}	321,4 ± 4,8 ^a	<0,05
W3	367,5 ± 5,0 ^b	355,5 ± 5,7 ^b	334,5 ± 6,8 ^a	<0,01
W4	385,8 ± 4,2 ^b	374,5 ± 6,8 ^b	348,4 ± 9,0 ^a	<0,01
Δ w4-w0	122,5 ± 4,7 ^b	109,5 ± 11,4 ^b	84,7 ± 11,4 ^a	<0,05

Mittelwert ± SEM; n = 12 (Exp. A, B-a, B-b), 8 - 9 (Exp. C), 5 (Exp. D); ns = nicht signifikant; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen (P < 0,05, ANOVA mit anschließendem *Student-Newman-Keuls* Test); W = Versuchswoche

4.2. Futterverzehr

In Experiment B-a wurde die Futteraufnahme (Futterverbrauch abzüglich des verstreuten Futters) täglich registriert. In Abbildung 14 ist der Verzehr während der 4-wöchigen Fütterungsperiode ohne die letzten 5 Tage, an denen die Ratten aufgrund des Versuchsdesigns restriktiv gefüttert wurden (vgl. Kapitel 3.3.), dargestellt.

Im Mittel verzehrten die Ratten der LF- und MCT-Gruppe täglich 30,5 ± 0,3 g und die Tiere der LCT-Gruppe 34,4 ± 0,3 g Futter pro Tag. Die Futteraufnahme in der LCT-Gruppe war damit signifikant höher als die Futteraufnahme in der LF- und MCT-Gruppe (P < 0,001).

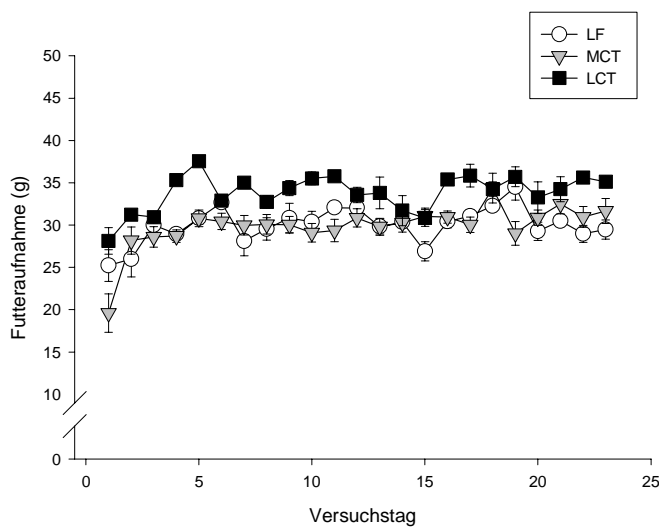


Abbildung 14: Tägliche Futteraufnahme der Ratten (Experiment B-a)

In der 3. Versuchswoche wurde in Experiment B-a anhand der ermittelten Futteraufnahme und einer 5-tägigen Kotsammlung die scheinbare Verdaulichkeit von Fett und Energie der Diäten ermittelt (siehe Tabelle 8). Die Futteraufnahme in dieser 5-tägigen Sammelperiode lag bei $31,0 \pm 0,5$ g/d in der LF-Gruppe, $31,3 \pm 0,9$ g/d in der MCT-Gruppe und $33,7 \pm 0,7$ g/d in der LCT-Gruppe.

4.2.1. Scheinbare Fettabsorption

Die tägliche Fettaufnahme (g/d) betrug $1,8 \pm 0,03$ (LF), $5,8 \pm 0,2$ (MCT) und $6,1 \pm 0,1$ (LCT). Damit war die Fettaufnahme über die beiden Hochfettdiäten signifikant höher als über die LF-Diät. Die Fettausscheidung mit dem Faeces war mit $598 \pm 35,1$ mg/d in der LCT-Gruppe signifikant höher als in der LF- und MCT-Gruppe mit $62,0 \pm 1,7$ bzw. $48,9 \pm 2,8$ mg/d, was sich ebenfalls in einer signifikant größeren Kottrockenmasse in der LCT-Gruppe verglichen mit der LF- und MCT-Gruppe widerspiegelte. Die scheinbare Fettabsorption war in der MCT-Gruppe mit $99,1 \pm 0,04$ % höher als in der LF-Gruppe mit $96,5 \pm 0,1$ % und LCT-Gruppe mit $90,2 \pm 0,5$ % (siehe Tabelle 8).

4.2.2. Scheinbare Energieabsorption

Während der 5-tägigen Sammelperiode war die aufgenommene tägliche Energiemenge in allen drei Gruppen signifikant voneinander verschieden und betrug in der LF-Gruppe $447,3 \pm 7,5$ kJ/d, in der MCT-Gruppe $492,5 \pm 3,2$ kJ/d und in der LCT-Gruppe $528,9 \pm 10$, kJ/d. Die mit den Faeces ausgeschiedene Energiemenge war in der LCT-Gruppe aufgrund des erhöhten Fettgehaltes im Kot mit $91,6 \pm 4,2$ kJ/d signifikant höher als in der LF- und MCT-Gruppe mit $16,7 \pm 0,4$ bzw. $14,2 \pm 0$, kJ/d. Die scheinbare Energieabsorption war in der LF- und LCT-Gruppe mit $430,5 \pm 17,1$ bzw. $437,2 \pm 7,5$ kJ/d nahezu identisch, wohingegen sie in der MCT-Gruppe mit $477,4 \pm 13,0$ kJ/d signifikant höher war (siehe Tabelle 8). Die höhere scheinbare Energieabsorption in der MCT-Gruppe könnte auf eine höhere Oxidation der MCT-Fette hinweisen, da die Tiere verglichen mit den Ratten der LF- und LCT-Gruppe, trotz der höheren scheinbaren Energieabsorption, während der 4-wöchigen Fütterungsperiode kein höheres Gewicht entwickelten.

Tabelle 8: Fett- und Energiebilanz¹⁾ der Ratten (Experiment B-a)

Parameter	LF	MCT	LCT	ANOVA
Futtermittelaufnahme (g/d)	31,0 ± 0,5 ^a	31,3 ± 0,9 ^a	33,7 ± 0,7 ^b	<0,05
Fettaufnahme (g/d)	1,8 ± 0,03 ^a	5,8 ± 0,2 ^b	6,1 ± 0,1 ^b	<0,001
Energieaufnahme (kJ/d)	447,3 ± 7,5 ^a	492,5 ± 13,4 ^b	528,9 ± 10,9 ^b	<0,001
Kottrockenmasse (g/d)	1,1 ± 0,02 ^a	1,1 ± 0,03 ^a	2,9 ± 0,1 ^b	<0,001
Fäkale Fettexkretion (mg/d)	62,0 ± 1,7 ^a	48,9 ± 2,8 ^a	598,6 ± 35,1 ^b	<0,001
Fäkale Energieexkretion (kJ/d)	16,7 ± 0,4 ^a	14,2 ± 0,4 ^a	91,6 ± 4,2 ^b	<0,001
Scheinbare Fettabsorption (%)	96,5 ± 0,1 ^b	99,1 ± 0,04 ^c	90,2 ± 0,5 ^a	<0,001
Energieabsorption (kJ/d)	430,5 ± 17,1 ^a	477,4 ± 13,0 ^b	437,2 ± 7,5 ^a	<0,01

¹⁾ Bilanzen wurden über 5 Tage in der 3. Versuchswoche ermittelt; Mittelwert ± SEM; n = 12; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen (P < 0,05, ANOVA mit anschließendem *Student-Newman-Keuls* Test); d = Tag (*day*)

4.3. Körperfettmasse der Ratten

In Experiment D wurde bei 5 Tieren pro Gruppe der Gesamtfettgehalt der Tierkörper mittels der Deuterium-Verdünnungsmethode bestimmt (siehe Kapitel 3.5.). In diesem Experiment waren die Ratten der LF- und MCT-Gruppe am Ende der 4-wöchigen Fütterungsperiode signifikant schwerer als die Ratten der LCT-Gruppe (siehe Tabelle 7).

Der ermittelte Körperwassergehalt und die daraus abgeleitete Fettmasse der Tiere ist in Tabelle 9 dargestellt. Die injizierte Menge an deuteriertem Wasser betrug im Mittel in allen drei Versuchsgruppen 1,14 ± 0,01 g pro Tier. Die prozentuale Fettmasse der Ratten aus der LF-Gruppe (12,7 ± 2,0 %) unterschied sich nicht signifikant von der Fettmasse der Ratten aus der MCT- bzw. LCT-Gruppe (7,7 ± 1,7 bzw. 8,8 ± 1,6 %). Allerdings war auffällig, dass die Tiere der MCT-Gruppe trotz des relativ höheren Körpergewichts in der 4. Versuchswoche eine ähnliche Fettmasse wie die im Mittel leichteren Tiere der LCT-Gruppe aufwiesen, welches ebenfalls für eine umfangreichere Oxidation der MCT-Fette sprechen könnte (siehe vorheriges Kapitel).

Tabelle 9: Gesamtkörperwasser, fettfreie Masse und Fettmasse der Ratten (Experiment D)

	LF	MCT	LCT	ANOVA
KG (g)	389,4 ± 4,9 ^b	376,8 ± 7,2 ^b	348,2 ± 8,8 ^a	<0,01
D ₂ O _{Blut} (ppm)	2917,0 ± 80,6	2877,2 ± 76,5	3133,4 ± 81,9	ns
TBW (%)	63,7 ± 1,5	67,4 ± 1,2	66,6 ± 1,1	ns
FFM (%)	87,3 ± 2,0	92,3 ± 1,7	91,2 ± 1,6	ns
FM (%)	12,7 ± 2,0	7,7 ± 1,7	8,8 ± 1,6	ns

n = 5; ns = nicht signifikant; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen (P < 0,05, ANOVA mit anschließendem *Student-Newman-Keuls* Test); KG = Körpergewicht; D₂O_{Blut} = D₂O-Gehalt im Blut; ppm = *parts per million*; TBW = Gesamtkörperwasser (*total body water*); FFM = fettfreie Masse; FM = Fettmasse

Der mittels der Deuterium-Verdünnungsmethode ermittelte prozentuale Anteil des Fettgewebes am Gesamtkörpergewicht der Ratten scheint, verglichen zum Menschen, gering, deckt sich allerdings mit Daten aus der Literatur, in denen bei Ratten das Gesamtkörperwasser (TBW) bestimmt wurde und die daraus berechnete prozentuale Fettmasse der Tiere im Durchschnitt ebenfalls unter 13 % lag [241;242].

4.4. Organgewicht und Fettgehalt der Gewebe

In Experiment B-a wurde überprüft, ob die Fütterung der Hochfettdiäten eventuell zu einer Lebervergrößerung (Leberverfettung) geführt haben könnte. Das relative Lebergewicht (% der Körpermasse) war mit 2,6 ± 0,1 (LF), 2,7 ± 0,1 (MCT) und 2,5 ± 0,1 (LCT) nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Versuchsgruppen.

Bei den Ratten aus Experiment D (n = 5 pro Gruppe, signifikant leichtere LCT-verglichen mit LF- und MCT-Tieren) wurden am Tag der Tötung die retroperitonealen und epididymalen Fettdepots entnommen und gewogen. Weder das relative Gewicht des retroperitonealen Fettdepots (2,7 ± 0,5 % (LF), 2,5 ± 0,3 % (MCT), 1,9 ± 0,3 % (LCT)) noch das relative Gewicht des epididymalen Fettdepots (2,9 ± 0,2 % (LF), 2,8 ± 0,3 % (MCT), 2,4 ± 0,1 % (LCT)) war signifikant unterschiedlich zwischen den Versuchsgruppen.

4.4.1. Lipidgehalt in ausgewählten Organen

In Experiment B-a wurde die Gesamtlipidfraktion einzelner Organe gravimetrisch bestimmt. Der Lipidgehalt der Gewebe ist in Tabelle 10 dargestellt. In der Leber der Ratten der beiden Hochfettgruppen war der Lipidgehalt signifikant höher als bei den Tieren der LF-Gruppe, wohingegen der Lipidgehalt im Herzmuskel der LCT-Tiere signifikant niedriger als bei den LF-Tieren war.

Tabelle 10: Lipidgehalt der Organe (mg/g Gewebe, Experiment B-a)

	LF	MCT	LCT	ANOVA
Leber	46,07 ± 1,75 ^a	55,62 ± 2,67 ^b	53,59 ± 1,76 ^b	<0,01
Herz	28,24 ± 0,73 ^b	26,13 ± 0,91 ^{ab}	25,23 ± 0,75 ^a	<0,05
MS	11,40 ± 0,97	9,74 ± 1,74	12,90 ± 1,34	ns
MG	10,27 ± 1,25	9,81 ± 1,43	7,82 ± 1,7	ns
Fa	770,35 ± 71,72	797,46 ± 12,84	725,06 ± 40,45	ns
Fr	771,07 ± 35,68	856,12 ± 24,73	826,67 ± 27,72	ns

Mittelwert ± SEM; n = 10-12; ns = nicht signifikant; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen (P < 0,05, ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls Test); MS = Musculus soleus; MG = Musculus gastrocnemius; Fa = abdominales Fettgewebe; Fr = retroperitoneales Fettgewebe;

Obwohl der Lipidgehalt in den untersuchten Skelettmuskeln jeweils keine Unterschiede zwischen den Gruppen aufwies, wird aus Abbildung 15 ersichtlich, dass die LCT-Tiere einen signifikant höheren Lipidgehalt im M. soleus, verglichen mit dem M. gastrocnemius, aufwiesen (P < 0,01).

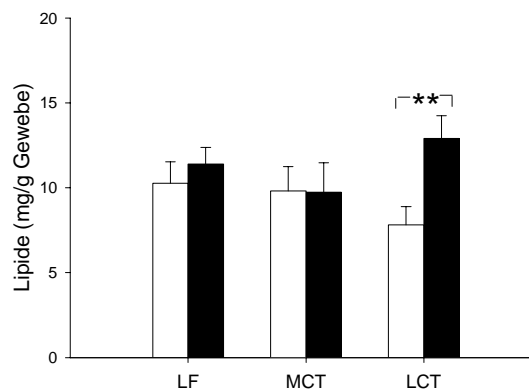


Abbildung 15: Lipidgehalt (mg/g Gewebe) im M. gastrocnemius □ und M. soleus ■ (Experiment B-a)

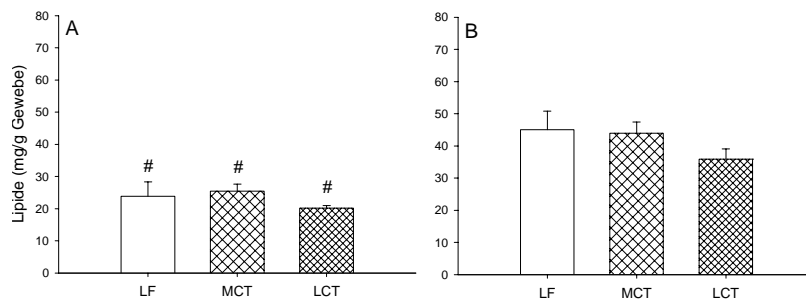
Mittelwert ± SEM; n = 10-12; **: signifikanter Unterschied (P < 0,01, gepaarter t-Test)

Weiterhin wurde der Lipidgehalt der Mucosa des Duodenums, des proximalen und distalen Jejunums und des Ileums bestimmt (siehe Abbildung 16). Dies geschah nach der 4-wöchigen Fütterungsperiode und anschließendem 12-stündigen Futterentzug (Experiment B-a), sowie nach der 4-wöchigen Fütterungsperiode und der anschließenden einmaligen Gabe einer fettreichen Testmahlzeit (OMTT, 5 h postprandial, Experiment B-b).

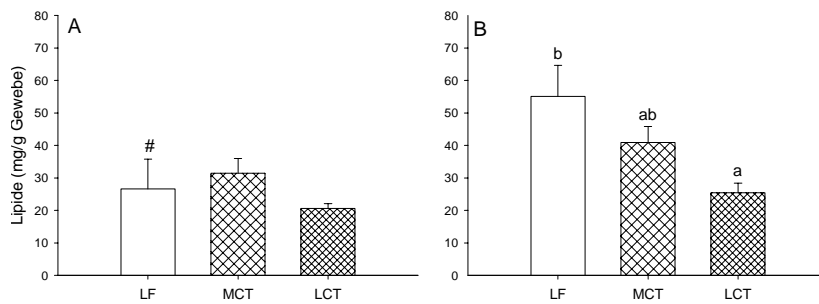
Nach der 4-wöchigen Fütterungsperiode und anschließendem 12-stündigen Futterentzug (siehe Abbildung 16 I-IV A) war der Lipidgehalt der Mucosa in allen Dünndarmabschnitten nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Versuchsgruppen. Allerdings bestand in den distalen Abschnitten des Dünndarms (distales Jejunum und Ileum) eine Tendenz zur Reihenfolge LF > MCT > LCT.

Fünf Stunden nach der Gabe des OMTT im Anschluss an die 4-wöchige Fütterungsperiode (siehe Abbildung 16 I-IV B) waren Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen im Lipidgehalt der Dünndarmmucosa - mit Ausnahme des Duodenums - festzustellen. Im proximalen Jejunum war der Lipidgehalt in der LF-Gruppe mit $55,12 \pm 9,49$ mg/g Gewebe nicht signifikant höher als in der MCT-Gruppe mit $40,94 \pm 4,39$ mg/g Gewebe und signifikant höher als in der LCT-Gruppe mit $25,42 \pm 3,03$ mg/g Gewebe ($P < 0,01$). Im distalen Jejunum hingegen war der Lipidgehalt in der MCT-Gruppe mit $65,52 \pm 12,05$ mg/g Gewebe tendenziell höher als in der LCT-Gruppe mit $47,93 \pm 5,73$ mg/g Gewebe und signifikant höher als in der LF-Gruppe mit $31,88 \pm 2,88$ mg/g Gewebe ($P < 0,05$). Auch im Ileum war 5 Stunden nach der Gabe des OMTT der Lipidgehalt in der MCT-Gruppe mit $23,75 \pm 6,17$ mg/g Gewebe signifikant höher als in der LF- und LCT-Gruppe mit $10,57 \pm 3,88$ bzw. $7,73 \pm 1,36$ mg/g Gewebe ($P < 0,05$). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die diätetische Vorkonditionierung über einen Zeitraum von 4 Wochen zu Unterschieden in der Fettabsorption führt. Während die mucosalen Lipidgehalte in der LF-Gruppe für eine Fettabsorption im Duodenum/proximalen Jejunum sprechen, weisen die Werte der LCT-Gruppe auf eine Verlagerung der Fettabsorption vom Duodenum/proximalen Jejunum zum distalen Jejunum hin, welches durch die relativ schlechtere Verdaulichkeit des LCT-Fettes bedingt sein könnte (vgl. Kapitel 4.2.1.). Die für die MCT-Gruppe ermittelten Werte sprechen ebenfalls für eine umfangreichere Fettabsorption im distalen Jejunum.

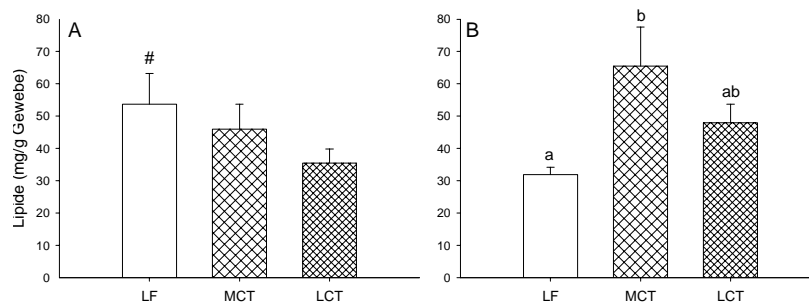
I



II



III



IV

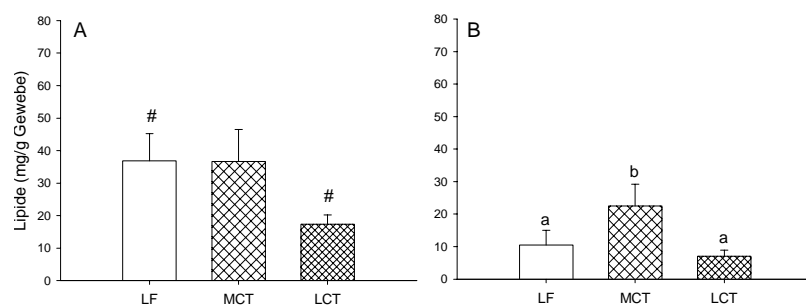


Abbildung 16: Lipidgehalt (mg/g Gewebe) in der Mucosa des Duodenums (I), proximalen Jejunums (II), distalens Jejunum (III) und Ileums (IV) nach 4-wöchiger Fütterungsperiode und 12-stündigem Futterentzug (A, Experiment B-a) bzw. nach 4-wöchiger Fütterungsperiode und einmaliger Gabe des OMTT (B, Experiment B-b) Mittelwert ± SEM; n = 8-12; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen innerhalb eines Experiments (P < 0,05, ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls Test); #: signifikante Unterschiede zwischen Experiment B-a und B-b (P < 0,05, ANOVA mit anschließendem paarweisen Vergleich (95 % LSD))

Da die beiden Experimente B-a und B-b ein identisches Versuchsdesign aufwiesen und sich die Gewichte der Ratten in diesen beiden Experimenten nicht unterschieden, wurde neben dem Einfluss der Versuchsdiäten in den jeweiligen Experimenten auch der Unterschied im mucosalen Lipidgehalt der einzelnen Dünndarmabschnitte zwischen dem gefasteten und dem postprandialen Zustand innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppen verglichen (siehe Kapitel 3.7.).

In der Mucosa des Duodenums war der Lipidgehalt in allen drei Versuchsgruppen im postprandialen Zustand signifikant höher als im gefasteten Zustand (siehe Abbildung 16 I B und A). Auch im proximalen Jejunum war der mucosale Lipidgehalt im postprandialen Zustand höher als im gefasteten Zustand, allerdings ergab sich lediglich in der LF-Gruppe ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Experimenten (siehe Abbildung 16 II B und A). In der Mucosa des distalen Jejunums war der Lipidgehalt in der LF-Gruppe im postprandialen Zustand signifikant niedriger als im gefasteten Zustand (siehe Abbildung 16 III B und A). Der höhere mucosale Lipidgehalt des distalen Jejunums in der MCT- und LCT-Gruppe im postprandialen Zustand war hingegen nicht signifikant unterschiedlich zum gefasteten Zustand. Der mucosale Lipidgehalt im Ileum war in allen drei Versuchsgruppen im postprandialen Zustand niedriger als im gefasteten Zustand, wobei der Unterschied in der MCT-Gruppe nicht signifikant war (siehe Abbildung 16 IV B und A).

4.4.2. Triglyceridgehalt in ausgewählten Organen

Zusätzlich zur Bestimmung des Gesamtlipidgehalts der Gewebe wurde in der Leber, dem Herzmuskel, dem oxidativen M. soleus, dem glykolytischen M. gastrocnemius sowie dem abdominalen Fettgewebe der Triglyceridgehalt bestimmt (siehe Tabelle 11). In keinem der untersuchten Gewebe konnten signifikante Unterschiede in der Triglyceridkonzentration zwischen den drei Versuchsgruppen nachgewiesen werden.

Tabelle 11: Triglyceridkonzentration der Gewebe (mg/g Gewebe, Experiment B-a)

Gewebe	LF	MCT	LCT	ANOVA
Leber	16,51 ± 1,09	17,01 ± 1,04	19,11 ± 1,78	ns
MS	3,62 ± 0,48	5,86 ± 1,65	2,94 ± 0,78	ns
MG	1,24 ± 0,35	2,28 ± 0,66	1,09 ± 0,20	ns
Herz	1,71 ± 0,42	1,18 ± 0,18	2,15 ± 0,31	ns
Fa	370,63 ± 43,71	428,17 ± 69,72	502,69 ± 23,51	ns

Mittelwert ± SEM; n = 9-12; ns = nicht signifikant; MS = Musculus soleus; MG = Musculus gastrocnemius; Fa = abdominales Fettgewebe

4.5. Fettsäuremuster der Gesamtlipid-, Triglycerid- und Phospholipidfraktion

In Experiment B-a und B-b wurde das Fettsäuremuster der Gesamtlipidfraktion und in Experiment B-a zusätzlich das Fettsäuremuster der Triglycerid- und Phospholipidfraktion der Gewebe ermittelt.

4.5.1. Gesamtlipidfraktion

Bereits in der Gesamtlipidfraktion, welche neben den Triglyceriden und Phospholipiden noch Diglyceride, Monoglyceride und freien Fettsäuren beinhaltet, wurde deutlich, dass es aufgrund der Hochfettdiäten insbesondere im abdominalen und retroperitonealen Fettgewebe sowie in der Leber der Ratten im nüchternen und postprandialen Status zu Veränderungen im Fettsäuremuster kam. In der MCT-Gruppe wurde in den o.g. Geweben eine signifikante Anreicherung der mittelkettigen gesättigten Fettsäuren (C10:0 + C12:0) und in der LCT-Gruppe eine signifikante Anreicherung der langkettigen gesättigten Fettsäuren (C16:0 + C18:0) im Vergleich zu den anderen Fütterungsgruppen nachgewiesen (siehe Tabelle 12 und 13). Caprylsäure (C8:0) konnte in der Gesamtlipidfraktion der Gewebe nicht nachgewiesen werden. Der Myristinsäuregehalt (C14:0) war mit maximal 1,5 % im abdominalen Fettgewebe bzw. minimal 0,1 % im M. soleus niedrig (Ausnahme: Duodenum 5 Stunden postprandial mit 8,4 - 9,2 %, kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen) und wurde daher bei der Ermittlung der Summe der LCFA vernachlässigt. Bei den einfach ungesättigten Fettsäuren (MCFA) traten hauptsächlich Ölsäure (C18:1) und Palmitoleinsäure (C16:1)

auf. Ölsäure machte den wesentlichen Anteil der MCFA-Fraktion aus, welcher bezogen auf das Gesamtfettsäuremuster zwischen 3,5 % im M. soleus und 22,9 % im retroperitonealen Fettgewebe lag. Palmitoleinsäure kam hingegen mit 0,1 - 4,7 %, bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt anteilmäßig in geringerem Umfang vor, war jedoch in allen Geweben in der LF-Gruppe am häufigsten und in der LCT-Gruppe am wenigsten nachzuweisen. Bei den mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA), insbesondere im Fettgewebe, dominierte die Linolsäure (C18:2), jedoch lag Arachidonsäure (C20:4) im Muskelgewebe, in der Leber und in der Mucosa des Duodenums in ähnlicher Konzentration vor. Die Menge an Linolensäure (C18:3 α und γ) lag dagegen nur im Bereich von 0,1 - 1,3 %, mit Ausnahme des Fettgewebes, indem postprandial bis zu 6,8 % Linolensäure nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 12: Fettsäuremuster der Gesamtlipidfraktion der Mucosa des Duodenums, der Leber, des M. soleus, des M. gastrocnemius, des abdominalen Fettgewebes und des retroperitonealen Fettgewebes der Ratten (%) nach 12-stündigem Futterentzug (Experiment B-a)

Duodenum	LF	MCT	LCT	ANOVA
Σ ges. MCFA	0,00 \pm 0,00 ^a	0,22 \pm 0,11 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	<0,05
Σ ges. LCFA	33,46 \pm 0,80	34,38 \pm 1,30	34,26 \pm 1,43	ns
Σ MUFA	15,39 \pm 1,40 ^b	8,31 \pm 0,96 ^a	6,04 \pm 0,69 ^a	<0,001
Σ PUFA	49,76 \pm 1,54 ^a	55,49 \pm 2,04 ^b	58,40 \pm 1,49 ^b	<0,01
Leber	LF	MCT	LCT	ANOVA
Σ ges. MCFA	0,01 \pm 0,01 ^a	0,12 \pm 0,03 ^b	0,00 \pm 0,00 ^a	<0,001
Σ ges. LCFA	33,79 \pm 0,35 ^a	34,20 \pm 0,22 ^a	38,26 \pm 0,36 ^b	<0,001
Σ MUFA	9,18 \pm 0,63 ^b	7,74 \pm 0,43 ^{ab}	6,66 \pm 0,41 ^a	<0,01
Σ PUFA	55,37 \pm 0,71 ^{ab}	56,07 \pm 0,55 ^b	53,79 \pm 0,53 ^a	<0,05
MS	LF	MCT	LCT	ANOVA
Σ ges. MCFA	0,00 \pm 0,00	0,02 \pm 0,02	0,00 \pm 0,00	ns
Σ ges. LCFA	43,61 \pm 4,41 ^a	34,07 \pm 0,59 ^a	44,14 \pm 2,54 ^a	<0,05
Σ MUFA	9,36 \pm 2,02	8,61 \pm 1,43	4,42 \pm 1,09	ns
Σ PUFA	43,54 \pm 4,55	54,01 \pm 1,29	48,42 \pm 2,71	ns

Fortsetzung Tabelle 12: Fettsäuremuster der Gesamtlipidfraktion der Mucosa des Duodenums, der Leber, des M. soleus, des M. gastrocnemius, des abdominalen Fettgewebes und des retroperitonealen Fettgewebes der Ratten (%) nach 12-stündigem Futterentzug (Experiment B-a)

MG	LF	MCT	LCT	ANOVA
Σ ges. MCFA	0,03 ± 0,03 ^a	0,44 ± 0,18 ^b	0,00 ± 0,00 ^a	<0,01
Σ ges. LCFA	41,98 ± 4,38	46,25 ± 4,67	42,91 ± 2,27	ns
Σ MUFA	7,23 ± 0,73 ^c	5,30 ± 0,59 ^b	2,62 ± 0,22 ^a	<0,001
Σ PUFA	46,41 ± 4,70	44,64 ± 5,03	48,68 ± 2,85	ns

Fa	LF	MCT	LCT	ANOVA
Σ ges. MCFA	0,13 ± 0,04 ^a	5,72 ± 0,39 ^b	0,23 ± 0,02 ^a	<0,001
Σ ges. LCFA	25,04 ± 0,63 ^a	26,12 ± 0,65 ^a	41,22 ± 0,67 ^b	<0,001
Σ MUFA	25,62 ± 0,73 ^b	20,91 ± 0,47 ^a	20,30 ± 0,75 ^a	<0,001
Σ PUFA	44,37 ± 1,26 ^b	45,27 ± 0,87 ^b	37,15 ± 0,53 ^a	<0,001

Fr	LF	MCT	LCT	ANOVA
Σ ges. MCFA	0,06 ± 0,03 ^a	4,84 ± 0,30 ^b	0,20 ± 0,01 ^a	<0,001
Σ ges. LCFA	26,63 ± 0,65 ^a	28,99 ± 0,45 ^b	36,80 ± 0,66 ^c	<0,001
Σ MUFA	25,89 ± 0,51 ^b	20,99 ± 0,80 ^a	24,97 ± 1,02 ^b	<0,001
Σ PUFA	45,72 ± 1,10 ^b	43,43 ± 0,93 ^b	36,79 ± 0,96 ^a	<0,001

Mittelwert ± SEM; n = 11-12; ns = nicht signifikant; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen innerhalb eines Experiments (P < 0,05, ANOVA mit anschließendem *Student-Newman-Keuls* Test); Σ = Summe; ges. = gesättigt; MCFA = mittelkettige Fettsäuren (C10:0 + C12:0); LCFA = langkettige Fettsäuren (C16:0 + C18:0); MUFA = einfach-ungesättigte Fettsäuren (C16:1 + C18:1); PUFA = mehrfach ungesättigte Fettsäuren (C18:2 + C18:3 + C20:4 + C22:6); MS = M. soleus; MG = M. gastrocnemius; Fa = abdominales Fettgewebe; Fr = retroperitoneales Fettgewebe

Beim Vergleich des Fettsäuremusters der Gewebe zwischen dem nüchternen und dem postprandialen Zustand in den jeweiligen Versuchsgruppen (Experiment B-a vs. B-b, vgl. Kapitel 3.7.) wurde deutlich, dass in der Mucosa des Duodenums insbesondere mittel- und langkettige gesättigte Fettsäuren bzw. MUFA verstärkt im postprandialen Zustand nachzuweisen waren (P < 0,05). Der Vergleich des Fettsäuremusters der Gesamtlipidfraktionen der übrigen Gewebe zwischen dem nüchternen und dem postprandialen Zustand in den jeweiligen Versuchsgruppen war weniger eindeutig. Lediglich im abdominalen Fettgewebe traten bezüglich der Summe an MCFA, LCFA,

MUFA und PUFA in allen drei Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen dem nüchternen und dem postprandialen Zustand auf. Der niedrigere Gehalt an LCFA und MUFA im M. soleus in allen Versuchsgruppen im postprandialen Zustand, verglichen mit dem nüchternen Zustand (siehe Tabelle 13), könnte durch einen geringeren Triglyceridgehalt in der Lipidfraktion des M. soleus in Experiment B-b (postprandial) im Vergleich zu Experiment B-a (nüchtern) erklärt werden. Der Triglyceridgehalt (mg/g Gewebe) der Versuchsgruppen aus Experiment B-b betrug $1,69 \pm 0,52$ (LF), $1,42 \pm 0,34$ (MCT) und $1,70 \pm 0,44$ (LCT), wohingegen der Triglyceridgehalt (mg/g Gewebe) der Versuchsgruppen aus Experiment B-a $3,62 \pm 0,48$ (LF), $5,86 \pm 1,65$ (MCT) und $2,94 \pm 0,78$ (LCT) betrug (vgl. Tabelle 11). Alle Ergebnisse der paarweisen Vergleiche (95 % LSD) zwischen dem nüchternen und postprandialen Zustand in den jeweiligen Versuchsgruppen sind in Tabelle 13 enthalten.

Tabelle 13: Fettsäuremuster der Gesamtlipidfraktion der Mucosa des Duodenums, der Leber, des M. soleus und des M. gastrocnemius der Ratten (%) fünf Stunden nach Gabe des OMTT (Experiment B-b)

Doudenum	LF	MCT	LCT	ANOVA
Σ ges. MCFA	$2,57 \pm 0,28$	$2,26 \pm 0,30^{\#}$	$2,50 \pm 0,26$	ns
Σ ges. LCFA	$42,68 \pm 1,26^{\#}$	$43,69 \pm 0,82^{\#}$	$45,32 \pm 0,50^{\#}$	ns
Σ MUFA	$18,93 \pm 0,83^{\#}$	$17,54 \pm 0,71^{\#}$	$17,05 \pm 0,54^{\#}$	ns
Σ PUFA	$25,27 \pm 1,59^{\#}$	$26,17 \pm 2,10^{\#}$	$23,97 \pm 1,42^{\#}$	ns
Leber	LF	MCT	LCT	ANOVA
Σ ges. MCFA	$0,00 \pm 0,00^a$	$0,03 \pm 0,01^{b\#}$	$0,01 \pm 0,01^a$	<0,05
Σ ges. LCFA	$29,98 \pm 0,41^{a\#}$	$34,28 \pm 0,92^b$	$39,84 \pm 0,70^{c\#}$	<0,001
Σ MUFA	$8,15 \pm 0,25^b$	$6,55 \pm 0,26^{a\#}$	$8,48 \pm 0,24^{b\#}$	<0,001
Σ PUFA	$60,12 \pm 0,38^{c\#}$	$56,96 \pm 1,07^b$	$49,63 \pm 0,72^{a\#}$	<0,001
MS	LF	MCT	LCT	ANOVA
Σ ges. MCFA	$0,00 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,03$	$0,00 \pm 0,00$	ns
Σ ges. LCFA	$30,67 \pm 0,70^{a\#}$	$32,51 \pm 0,69^{a\#}$	$36,77 \pm 0,81^{b\#}$	<0,001
Σ MUFA	$4,97 \pm 1,58^{\#}$	$4,22 \pm 0,86^{\#}$	$3,21 \pm 0,99^{\#}$	ns
Σ PUFA	$60,12 \pm 1,17^{b\#}$	$58,53 \pm 0,73^{ab\#}$	$55,83 \pm 1,43^{a\#}$	<0,05

Fortsetzung Tabelle 13: Fettsäuremuster der Gesamtlipidfraktion der Mucosa des Duodenums, der Leber, des M. soleus und des M. gastrocnemius der Ratten (%) fünf Stunden nach Gabe des OMTT (Experiment B-b)

MG	LF	MCT	LCT	ANOVA
Σ ges. MCFA	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,14 [#]	0,00 ± 0,00	ns
Σ ges. LCFA	34,03 ± 0,76 ^{a#}	37,39 ± 0,91 ^{b#}	40,49 ± 1,17 ^c	<0,001
Σ MUFA	8,59 ± 1,86	6,41 ± 1,69	5,61 ± 1,06	ns
Σ PUFA	51,80 ± 1,74	50,89 ± 1,83	48,10 ± 1,99	ns

Fa	LF	MCT	LCT	ANOVA
Σ ges. MCFA	0,12 ± 0,02 ^a	6,10 ± 0,03 ^b	0,23 ± 0,02 ^a	<0,001
Σ ges. LCFA	23,64 ± 0,69 ^a	25,92 ± 0,91 ^a	39,48 ± 1,07 ^b	<0,001
Σ MUFA	24,97 ± 0,65 ^b	20,09 ± 0,34 ^a	20,84 ± 0,59 ^a	<0,001
Σ PUFA	49,96 ± 1,34 ^c	46,11 ± 1,15 ^b	38,27 ± 0,61 ^a	<0,001

Fr	LF	MCT	LCT	ANOVA
Σ ges. MCFA	0,10 ± 0,03 ^a	4,26 ± 0,32 ^b	0,24 ± 0,01 ^{a#}	<0,001
Σ ges. LCFA	24,16 ± 0,69 ^{a#}	26,24 ± 0,88 ^{b#}	36,71 ± 0,51 ^c	<0,001
Σ MUFA	25,57 ± 0,78	24,14 ± 0,66 [#]	25,85 ± 0,30 [#]	ns
Σ PUFA	47,99 ± 1,26 ^c	42,94 ± 1,24 ^b	34,88 ± 0,50 ^{a#}	<0,001

Mittelwert ± SEM; n = 11-12; ns = nicht signifikant; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen innerhalb eines Experiments (P < 0,05, ANOVA mit anschließendem *Student-Newman-Keuls* Test); #: signifikante Unterschiede zwischen Experiment B-a und B-b (P < 0,05, ANOVA mit anschließendem paarweisen Vergleich (95 % LSD)); Σ = Summe; ges. = gesättigt; MCFA = mittelkettige Fettsäuren (C10:0 + C12:0); LCFA = langkettige Fettsäuren (C16:0 + C18:0), MUFA = einfach-ungesättigte Fettsäuren (C16:1 + C18:1); PUFA = mehrfach ungesättigte Fettsäuren (C18:2 + C18:3 + C20:4 + C22:6); MS = M. soleus; MG = M. gastrocnemius; Fa = abdominales Fettgewebe; Fr = retroperitoneales Fettgewebe

Bezüglich des Anteils der MCFA und LCFA in der Duodenalmucosa ergab sich im postprandialen Zustand (Experiment B-b) kein signifikanter Unterschied zwischen den Fütterungsgruppen, jedoch waren die entsprechenden Werte signifikant höher im Vergleich zum nüchternen Zustand (Experiment B-a). In den übrigen untersuchten Geweben (Leber, Skelettmuskulatur und Fettgewebe) konnte 5 Stunden nach Gabe des OMTT ein signifikant höherer Gehalt an langkettigen gesättigten Fettsäuren (C16:0 + C18:0) bei den Ratten der LCT-Gruppe im Vergleich zur LF- und MCT-Gruppe nachzuweisen werden, wohingegen im nüchternen Zustand der Gehalt der langkettigen

gesättigten Fettsäuren (C16:0 + C18:0) in der LCT-Gruppe lediglich in der Leber und dem Fettgewebe signifikant höher war als in der LF- und MCT-Gruppe. Dies könnte auf ein schnelleres postprandiales Anfluten der langkettigen gesättigten Fettsäuren insbesondere in die Skelettmuskulatur durch die 4-wöchige diätetische Vorkonditionierung in der LCT-Gruppe hindeuten.

4.5.2. Triglyceridfraktion

In diesem und dem folgenden Kapitel wird das Fettsäuremuster der Triglycerid (TG)- und Phospholipid (PL)-Fraktionen der Rattengewebe detaillierter beschrieben. Das Fettsäuremuster der beiden Fraktionen wurde in Experiment B-a nach 4-wöchiger Fütterungsperiode und anschließendem 12-stündigem Futterentzug analysiert. Die Triglyceridfraktion stellt v.a. das gespeicherte Fett in den Geweben dar. Da keine aussagekräftige Quantifizierung der TG- und PL-Fraktionen möglich war, wurde im Folgenden lediglich das Fettsäuremuster dieser beiden Fraktionen betrachtet.

Insgesamt zeigte die TG-Fraktion der Gewebe nach der 4-wöchigen Fütterung der Versuchsdiäten in den untersuchten Geweben ein vergleichbares Fettsäuremuster. Aus diesem Grund wird im folgenden das Fettsäuremuster der Triglyceride der Leber, des M. soleus und des abdominalen Fettgewebe exemplarisch dargestellt (siehe Abbildung 17). Die Ergebnisse der übrigen Gewebe (Jejunum, M. gastrocnemius, Herzmuskel, retroperitoneales Fettgewebe) sind im Anhang zu finden (siehe Abbildungen A2 und A3).

In den untersuchten Geweben der Hochfettdiät-gefütterten Ratten (MCT und LCT) wies die TG-Fraktion einen signifikant höheren Gehalt an gesättigten Fettsäuren (Summe ges. FS: C8:0 + C10:0 + C12:0 + C14:0 + C16:0 + C18:0) und dementsprechend einen signifikant niedrigeren Gehalt an ungesättigten Fettsäuren (Summe unges. FS: C16:1 + C18:1 + C18:2 + C18:3 + C20:4) auf als die Ratten der LF-Gruppe (siehe Abbildung 17 A, C und E). Darüber hinaus konnte interessanterweise in der TG-Fraktion aller untersuchten Gewebe der MCT-Gruppe, im Gegensatz zur LF- und LCT-Gruppe, ein signifikant höherer Gehalt an Capryl- und Caprinsäure nachgewiesen werden, welcher zwischen $1,0 \pm 0,3$ % in der Leber und $11,3 \pm 1,1$ % im M. soleus lag. In der Leber war der Gehalt an LCFA (C16:0 + C18:0) zwischen allen drei Versuchsgruppen signifikant unterschiedlich, wobei der Gehalt in der LF-Gruppe mit $34,1 \pm 0,7$ % am niedrigsten und in der LCT-Gruppe mit $50,0 \pm 1,0$ % am höchsten war (siehe Abbildung 17 B).

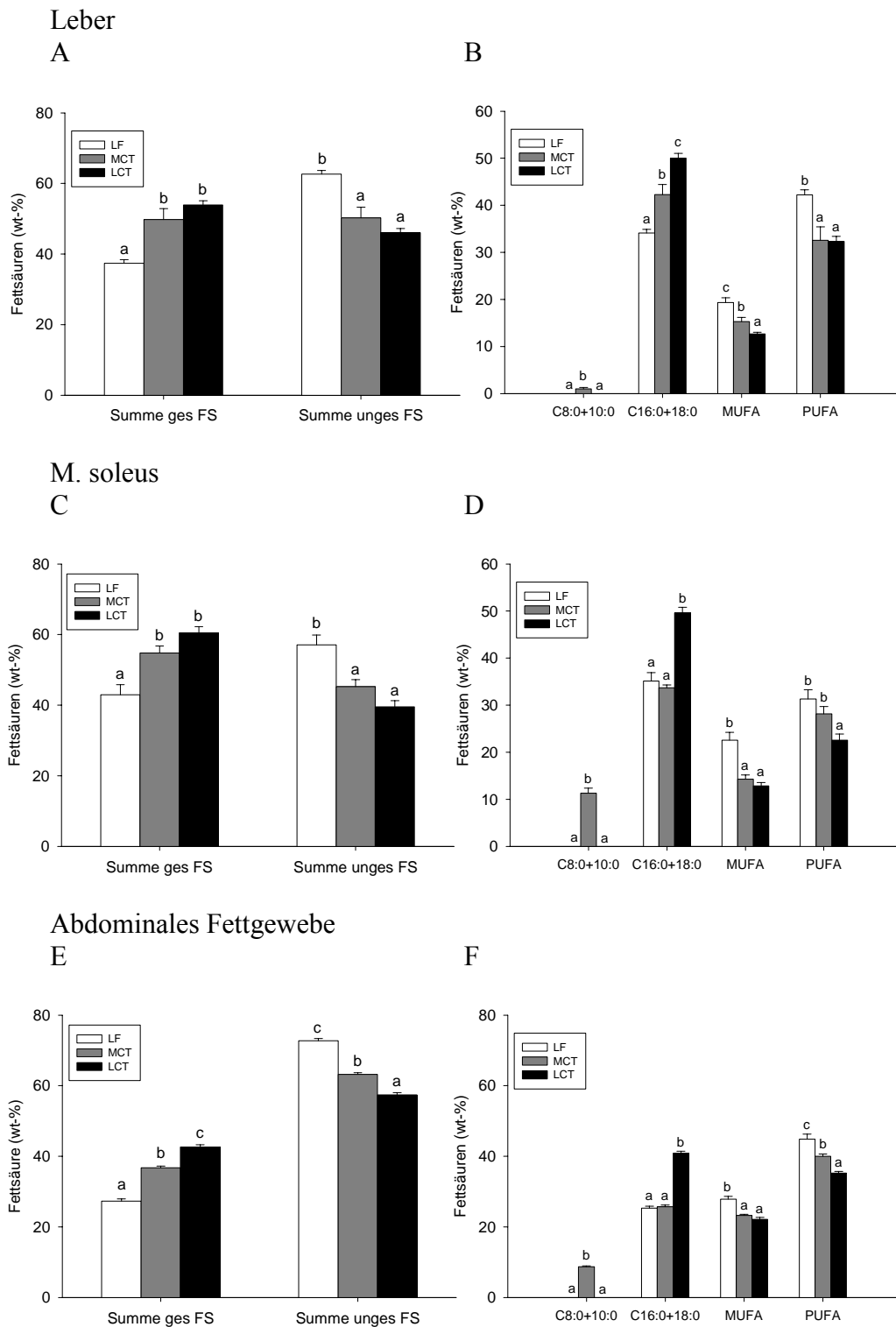


Abbildung 17: Fettsäuremuster in der Triglyceridfraktion von Leber, M. soleus und abdominalem Fettgewebe der Ratten (Gewichts-%) nach 4-wöchiger Fütterung der Versuchsdiäten (Experiment B-a)

Mittelwert ± SEM; n = 7-12; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen ($P < 0,05$, ANOVA mit anschließendem *Student-Newman-Keuls* Test); C 8:0+10:0 = Capryl- und Caprinsäure; C 16:0+18:0 = Palmitin- und Stearinsäure, MUFA = einfach-ungesättigte Fettsäuren (C16:1 + C18:1); PUFA = mehrfach ungesättigte Fettsäuren (C18:2 + C18:3 + C20:4 + C22:6)

Im M. soleus und abdominalen Fettgewebe wiesen lediglich die Ratten der LCT-Gruppe einen signifikant höheren Gehalt an LCFA im Vergleich zu den Ratten der LF- und MCT-Gruppe auf. Der Gehalt der MUFA war in der TG-Fraktion der Leber, des M. soleus und des abdominalen Fettgewebes jeweils in der LF-Gruppe signifikant höher als in den beiden Hochfettdiät-gefütterten Gruppen (MCT und LCT). Darüber hinaus war der Gehalt der PUFA in den Triglyceriden der untersuchten Gewebe in der LF-Gruppe signifikant höher als in der LCT-Gruppe, die MCT-Gruppe nahm diesbezüglich eine Mittelstellung ein (siehe Abbildung 17 B, D und F).

4.5.3. Phospholipidfraktion

In der PL-Fraktion der untersuchten Gewebe war das Fettsäuremuster weniger komplex im Vergleich zur TG-Fraktion aufgebaut. Mit Ausnahme der Mucosa des Jejunums, wo der Anteil der Capryl-, Caprin-, Laurin- und Myristinsäure maximal 5,3 % in der MCT-Gruppe betrug und damit signifikant höher als in der LF- und LCT-Gruppe war und des abdominalen Fettgewebes, wo der Anteil der Capryl-, Caprin-, Laurin- und Myristinsäure maximal 5,6 % in der MCT-Gruppe, ohne signifikante Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen, betrug, konnte in den Phospholipiden der übrigen Gewebe der Gehalt an Capryl-, Caprin-, Laurin- und Myristinsäure aufgrund des geringen Vorkommens (Summe < 2 %) vernachlässigt werden. Der Gehalt an MUFA (C16:1 + C18:1) lag in der PL-Fraktion der untersuchten Geweben unter 10 %. Bis auf die Mucosa des Jejunums wiesen allerdings alle Gewebe in der LF-Gruppe einen signifikant höheren Gehalt an MUFA auf als in der MCT-Gruppe und diese wiederum einen signifikant höheren Gehalt an MUFA auf als in der LCT-Gruppe.

Die deutlichsten Unterschiede ergaben sich in der PL-Fraktion des M. soleus und des Herzmuskels, die exemplarisch in Abbildung 18 dargestellt sind. In der PL-Fraktion des M. soleus der LCT-Gruppe war ein signifikant höherer Gehalt an LCFA (C16:0 + C18:0) und ein signifikant niedriger Gehalt an MUFA und PUFA, verglichen mit der LF- und MCT-Gruppe, nachzuweisen (siehe Abbildung 18 B). In der PL-Fraktion des Herzmuskels unterschieden sich alle drei Versuchsgruppen signifikant voneinander. Die LF-Gruppe wies den höchsten Gehalt an MUFA und PUFA und den niedrigsten Gehalt an LCFA auf. In der LCT-Gruppe ergab sich der höchste Gehalt an LCFA und der niedrigste Gehalt an MUFA und PUFA (siehe Abbildung 18 D).

Die Fettsäuremuster der PL-Fraktion aus jejunaler Mucosa, Leber und M. gastrocnemius sind im Anhang zu finden (siehe Abbildungen A4 und A5). Da im Fettgewebe der Phospholipidanteil im Gegensatz zum Triglyceridanteil sehr gering und keine saubere Isolierung der Phospholipide möglich war, ist das Fettsäuremuster der PL-Fraktion im abdominalen und retroperitonealen Fettgewebe nicht dargestellt.

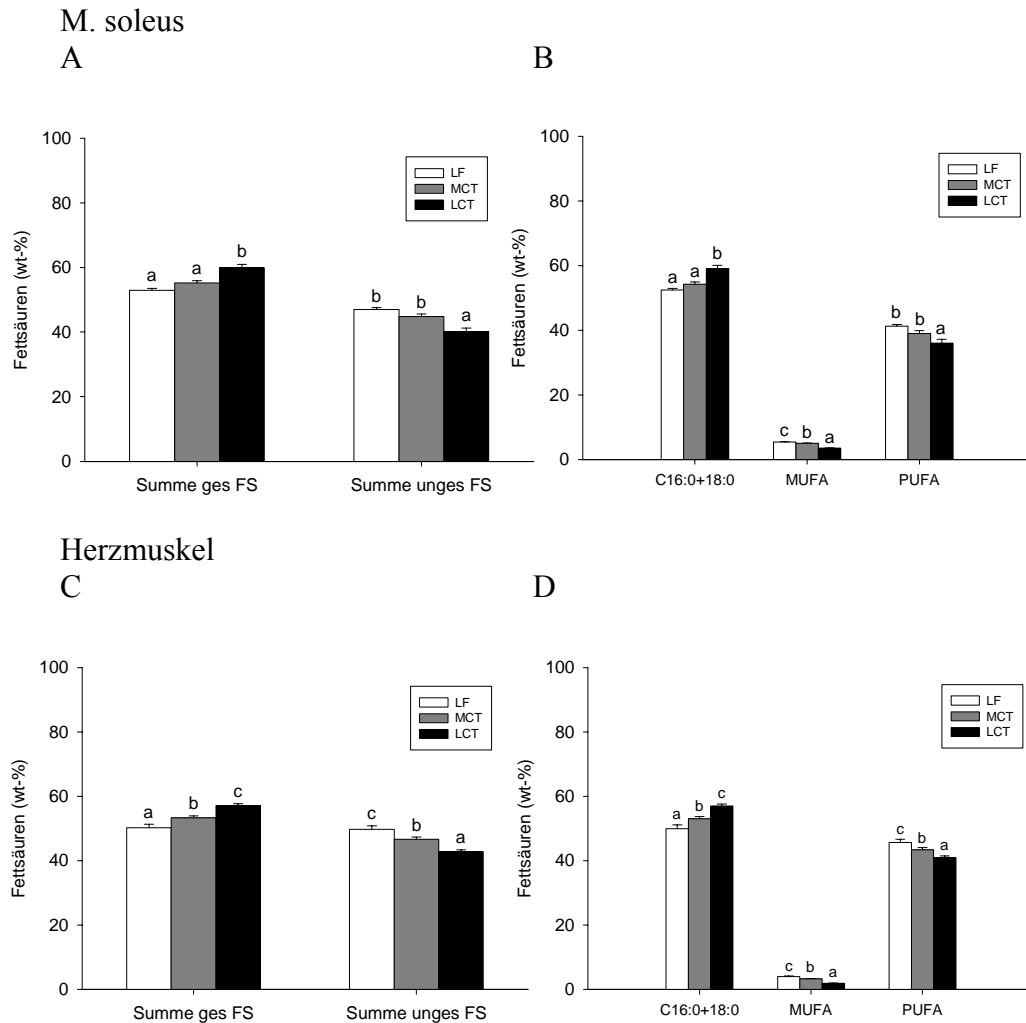


Abbildung 18: Fettsäuremuster in der Phospholipidfraktion von M. soleus und Herzmuskel der Ratten (Gewichts-%) nach 4-wöchiger Fütterung der Versuchsdiäten (Experiment B-a)

Mittelwert ± SEM; n = 7-12; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen (P < 0,05, ANOVA mit anschließendem *Student-Newman-Keuls* Test); C 8:0+10:0 = Capryl- und Caprinsäure; C 16:0+18:0 = Palmitin- und Stearinsäure, MUFA = einfach-ungesättigte Fettsäuren (C16:1 + C18:1); PUFA = mehrfach ungesättigte Fettsäuren (C18:2 + C18:3 + C20:4 + C22:6)

4.6. U-¹³C-Palmitatkonzentration der Gewebe

Die Anreicherung der U-¹³C-Palmitinsäure in den Geweben wurde nach der 5-tägigen chronischen Verabreichung mit dem Futter (Experiment B-a) bzw. nach der einmaligen Gabe im OMTT (Experiment B-b) im Anschluss an die 4-wöchige Fütterungsperiode untersucht. In den folgenden Kapiteln wird die Gewebeanreicherung des U-¹³C-Palmitats, welches den Ratten als Marker für langkettige gesättigte Fettsäure verabreicht wurde, dargestellt. Neben dem jeweiligen Vergleich der drei Fütterungsgruppen in den beiden Experimenten wurde auch die Markeranreicherung in den Geweben der jeweiligen Fütterungsgruppen zwischen beiden Experimenten und die Markeranreicherung zwischen den Geweben innerhalb eines Experiments verglichen (siehe Kapitel 3.7.).

4.6.1. Duodenum

In der Mucosa des Duodenums war die Anreicherung von U-¹³C-Palmitat ($\mu\text{g/g}$ Gewebe) 5 Stunden nach der einmaligen Gabe des Markers mit der fettreichen Testmahlzeit (OMTT) mit $1096,1 \pm 91,5$ in der LF-Gruppe, $1380,7 \pm 178,7$ in der MCT-Gruppe und $1103,6 \pm 113,7$ in der LCT-Gruppe wesentlich höher als in den anderen untersuchten Geweben ($P < 0,001$) und wesentlich höher als nach der 5-tägigen Applikation der U-¹³C-Palmitinsäure mit den Versuchsdiäten ($P < 0,001$), jedoch nicht signifikant unterschiedlich zwischen den drei Versuchsgruppen (siehe Abbildung 19 B, Seite 83). Nach der 5-tägigen Applikation der U-¹³C-Palmitinsäure mit den Versuchsdiäten war diese jedoch in der Mucosa des Duodenums in der LCT-Gruppe mit $8,4 \pm 0,8 \mu\text{g/g}$ Gewebe signifikant niedriger als in der LF- und MCT-Gruppe mit $13,5 \pm 1,6$ bzw. $12,7 \pm 1,3 \mu\text{g/g}$ Gewebe ($P < 0,05$, siehe Abbildung 19 A).

4.6.2. Leber

Die Anreicherung von U-¹³C-Palmitat in der Leber der MCT- und LCT-Tiere war 5 Stunden nach der einmaligen Gabe des Markers signifikant höher als nach der chronischen Applikation des Markers mit den Versuchsdiäten ($P < 0,05$). Darüber hinaus war die U-¹³C-Palmitat-Anreicherung in der Leber der LCT-Gruppe 5 Stunden nach der einmaligen Gabe des Markers mit dem OMTT mit $95,0 \pm 8,0 \mu\text{g/g}$ Gewebe signifikant höher als in der LF- und MCT-Gruppe mit $51,6 \pm 2,6$ bzw. $65,7 \pm 4,5 \mu\text{g/g}$

Gewebe ($P < 0,001$, siehe Abbildung 20 B). Nach der chronischen Applikation des Markers mit den Versuchdiäten war die Anreicherung von $U\text{-}^{13}\text{C}$ -Palmitat in der Leber der LCT-Tiere dagegen signifikant niedriger als in der Leber der LF- und MCT-Tiere ($P < 0,001$, siehe Abbildung 25 A).

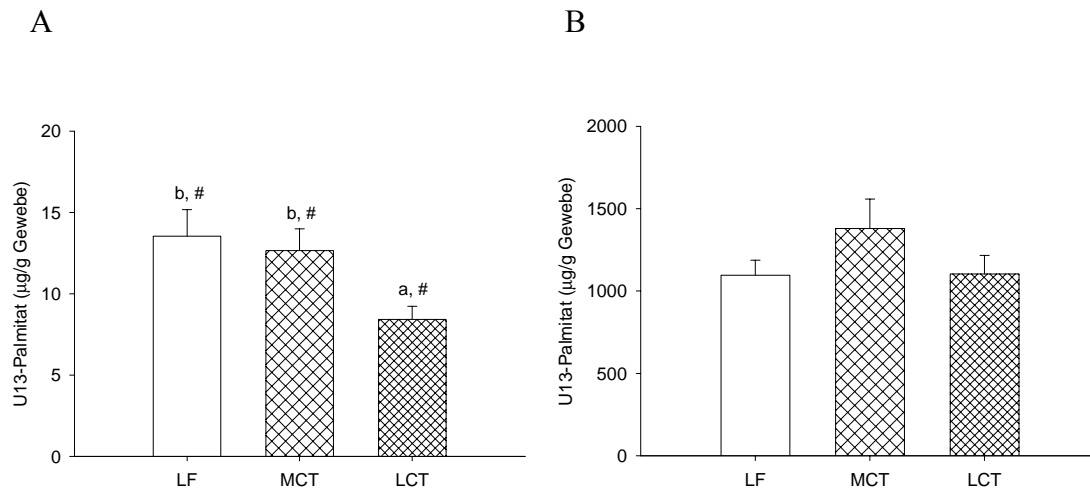


Abbildung 19: Anreicherung der $U\text{-}^{13}\text{C}$ -Palmitinsäure in der Mucosa des Duodenums nach chronischer (A, Experiment B-a) und einmaliger Applikation des Markers (B, Experiment B-b)

Mittelwert \pm SEM; $n = 10$; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen innerhalb eines Experiments ($P < 0,05$, ANOVA mit anschließendem *Student-Newman-Keuls* Test); #: signifikante Unterschiede zwischen Experiment B-a und B-b ($P < 0,05$, ANOVA mit anschließendem paarweisen Vergleich (95 % LSD))

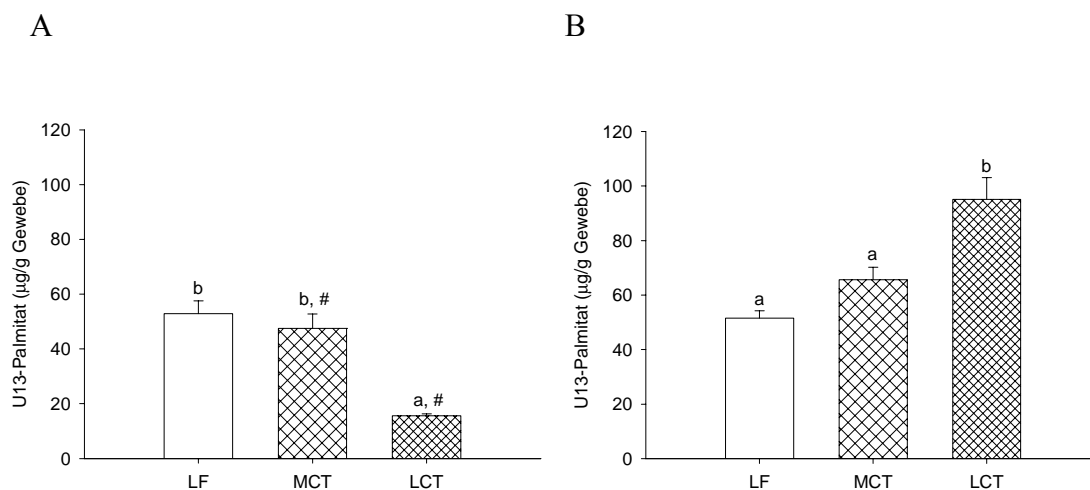


Abbildung 20: Anreicherung der $U\text{-}^{13}\text{C}$ -Palmitinsäure in der Leber nach chronischer (A, Experiment B-a) und einmaliger Applikation des Markers (B, Experiment B-b)

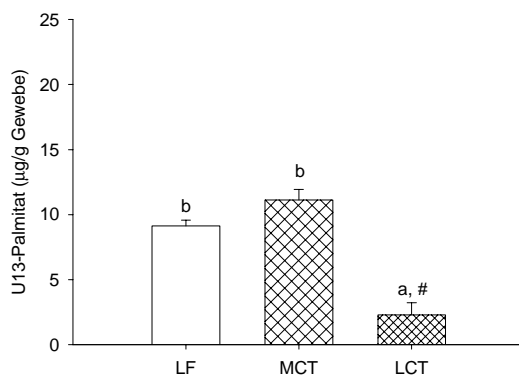
Mittelwert \pm SEM; $n = 10$; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen innerhalb eines Experiments ($P < 0,05$, ANOVA mit anschließendem *Student-Newman-Keuls* Test); #: signifikante Unterschiede zwischen Experiment B-a und B-b ($P < 0,05$, ANOVA mit anschließendem paarweisen Vergleich (95 % LSD))

4.6.3. Muskelgewebe

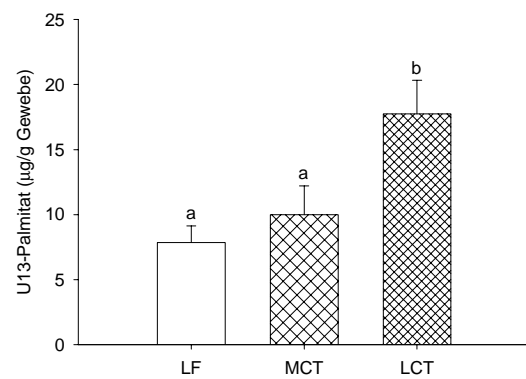
Im M. soleus ergab sich bezüglich der Anreicherung der U-¹³C-Palmitinsäure nach der akuten (Experiment B-b) und der chronischen (Experiment B-a) Applikation ein ähnliches Bild wie in der Leber. Im M. soleus der LCT-Gruppe lag die U-¹³C-Palmitinsäure nach der chronischen Applikation in wesentlich geringerer Konzentration vor als 5 Stunden nach der einmaligen Applikation mit dem OMTT (P < 0,001). Darüber hinaus war die Anreicherung der U-¹³C-Palmitinsäure 5 Stunden nach der einmaligen Applikation des Markers in der LCT-Gruppe signifikant höher als in der LF- und MCT-Gruppe (P < 0,01, siehe Abbildung 21 B).

M. soleus

A

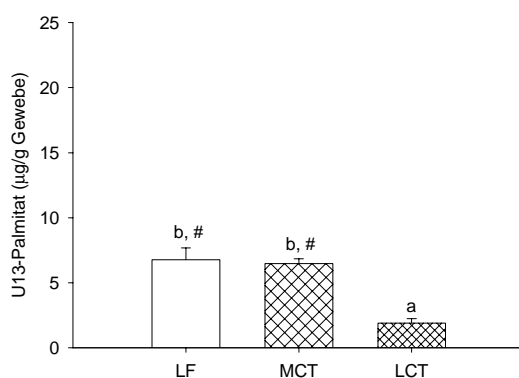


B



M. gastrocnemius

C



D

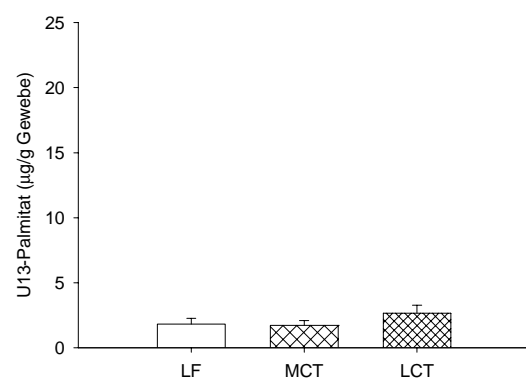


Abbildung 21: Anreicherung der U-¹³C-Palmitinsäure im M. soleus und M. gastrocnemius nach chronischer (A/C, Experiment B-a) und einmaliger Applikation des Markers (B/D, Experiment B-b)

Mittelwert ± SEM; n = 10; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen innerhalb eines Experiments (P < 0,05, ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls Test); #: signifikante Unterschiede zwischen Experiment B-a und B-b (P < 0,05, ANOVA mit anschließendem paarweisen Vergleich (95 % LSD))

Dagegen war nach der chronischen Applikation des Markers mit den Versuchdiäten die Anreicherung der U-¹³C-Palmitinsäure im M. soleus der LCT-Gruppe signifikant niedriger als in der LF- und MCT-Gruppe ($P < 0,001$, siehe Abbildung 21 A).

Im M. gastrocnemius der LF- und MCT-Gruppe lag die U-¹³C-Palmitinsäure nach der chronischen Applikation in wesentlich geringerer Konzentration vor als 5 Stunden nach der einmaligen Applikation mit dem OMTT ($P < 0,001$), wohingegen der Gehalt der U-¹³C-Palmitinsäure in der LCT-Gruppe nach der chronischen Applikation vergleichbar zur einmaligen Applikation des Markers blieb (vgl. Abbildung 21 C und D). Fünf Stunden nach der einmaligen Applikation des Markers mit dem OMTT war die nachweisbare U-¹³C-Palmitat-Anreicherung im M. gastrocnemius darüber hinaus geringer als im M. soleus ($P < 0,001$) und nicht signifikant unterschiedlich zwischen den drei Versuchsgruppen (siehe Abbildung 21 D). Nach der chronischen Applikation des Markers mit den Versuchdiäten war die Anreicherung der U-¹³C-Palmitinsäure im M. gastrocnemius der LCT-Gruppe ebenfalls signifikant niedriger als in der LF- und MCT-Gruppe ($P < 0,001$, siehe Abbildung 21 C).

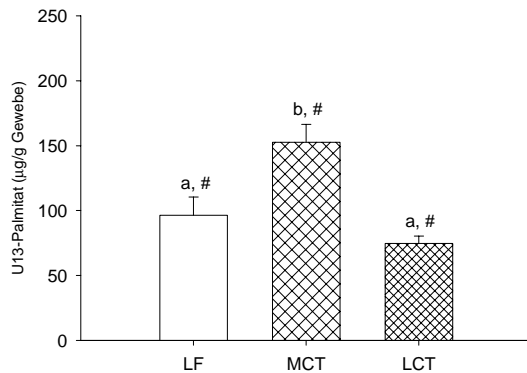
4.6.4. Fettgewebe

Die Anreicherung der U-¹³C-Palmitinsäure in den beiden untersuchten Fettgeweben war in allen drei Versuchsgruppen nach der chronischen Applikation des Markers signifikant höher als nach der einmaligen Applikation des Markers ($P < 0,001$, siehe Abbildung 22). Darüber hinaus kam es im Fettgewebe durch die chronische Applikation des Markers mit den Versuchsdiäten zu einer relativ stärkeren Anreicherung des Markers verglichen mit den anderen Geweben ($P < 0,001$).

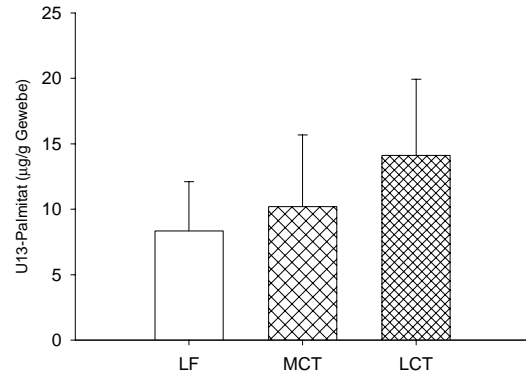
Wie in den anderen untersuchten Geweben kam es nach der chronischen Applikation des U-¹³C-Palmitats mit den Versuchdiäten sowohl im abdominalen als auch im retroperitonealen Fettgewebe zu einer signifikant höheren Anreicherung des Markers in der MCT-Gruppe verglichen mit der LCT-Gruppe ($P < 0,001$, siehe Abbildung 22 A und C). Im Unterschied zu den anderen Geweben war allerdings die Anreicherung des Markers in der LF-Gruppe signifikant geringer als in der MCT-Gruppe und unterschied sich nicht von der LCT-Gruppe.

Abdominales Fettgewebe

A

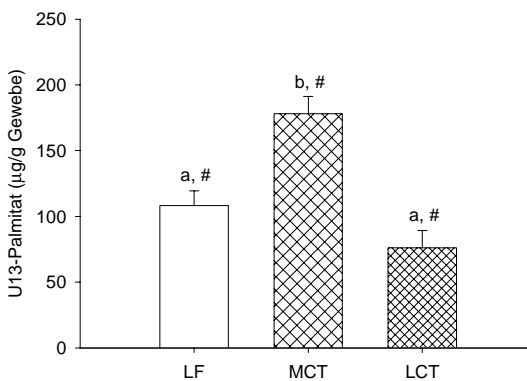


B



Retroperitoneales Fettgewebe

C



D

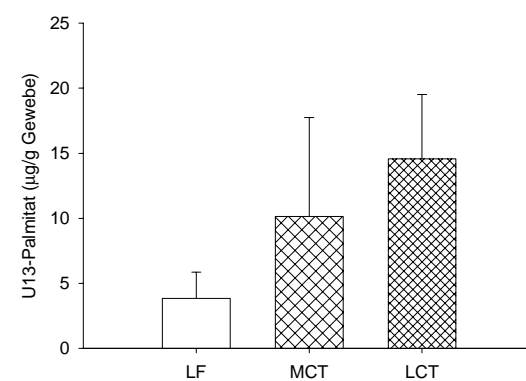


Abbildung 22: Anreicherung der U-¹³C-Palmitinsäure im abdominalen und retroperitonealen Fettgewebe nach chronischer (A/C, Experiment B-a) und einmaliger Applikation des Markers (B/D, Experiment B-b)

Mittelwert ± SEM; n = 10; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen innerhalb eines Experiments (P < 0,05, ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls Test); #: signifikante Unterschiede zwischen Experiment B-a und B-b (P < 0,05, ANOVA mit anschließendem paarweisen Vergleich (95 % LSD))

Fünf Stunden nach der einmaligen Gabe des Markers mit dem OMTT war die Anreicherung der U-¹³C-Palmitinsäure in beiden untersuchten Fettgeweben nicht signifikant unterschiedlich zwischen den drei Versuchsgruppen (siehe Abbildung 22 B und D). Die große Streuung innerhalb der Gruppen resultierte aus einer Markerkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze von 1,5 µg/Probe bei einigen Ratten, welche bei der Kalkulation der Markeranreicherung mit einem theoretischen Wert von 0,0 µg/Probe definiert wurde. Die geringe Markerkonzentration im Fettgewebe der Ratten deckt sich mit Ergebnissen von Bessesen et al. [243], in denen in den ersten 8 Stunden nach der gastrischen Applikation von ¹⁴C-Palmitinsäure ebenfalls

lediglich sehr geringe Mengen des Markers im Fettgewebe der Ratten, verglichen mit anderen Geweben, nachgewiesen werden konnten.

Kritisch anzumerken ist an dieser Stelle, dass es zu einer Unterschätzung der U-¹³C-Palmitatkonzentration, insbesondere in der LCT-Gruppe gekommen sein könnte. Aus der Literatur ist bekannt, dass Ratten nach der chronischen Fütterung von Hochfettdiäten mit langkettigen Fettsäuren – im Gegensatz zu kohlenhydratreichen Diäten – nicht mehr in der Lage sind, die *de novo* Fettsäuresynthese sowie die Fettsäureelongation (von C16:0 zu C18:0) und die Desaturierung (von C18:0 zu C18:1) zu reduzieren [244;245]. Aus diesem Grund wäre es möglich, dass die U-¹³C-Palmitinsäure während der 5-tägigen Fütterung mit den Versuchsdiäten, insbesondere in der LCT-Gruppe, zu Stearinsäure elongiert bzw. über Stearinsäure zu Ölsäure desaturiert worden ist. Mit dem verwendeten GS-MS (Massenspektrometer gekoppelt an einen Gaschromatographen) wurde lediglich die U-¹³C-Palmitatkonzentration in dem Gesamtpalmitatpool der Lipidfraktionen analysiert. Die Anreicherung von ¹³C im Stearinsäure- bzw. Ölsäurepool der Lipidfraktionen wurde hingegen nicht erfasst. Mit einem Isotopenverhältnis-Massenspektrometer, welches die Anreicherung von ¹³C zu ¹²C in den Lipidfraktionen analysieren könnte, wäre gegebenenfalls eine höhere ¹³C-Anreicherung in den Geweben der Ratten, insbesondere nach der chronischen Applikation des Markers mit der LCT-Diät, detektiert worden.

4.6.5. Anteil von U-¹³C-Palmitat an den Gesamtfettsäuren der Gewebe

Neben der im vorherigen Kapitel dargestellten Anreicherung der U-¹³C-Palmitinsäure in den Geweben, welche nach der chronischen Applikation des Markers (Experiment B-a) das Fettgewebe als wichtigstes Zielorgan für die Speicherung langkettig gesättigter Fettsäuren bestätigt, ist in Tabelle 14 die Konzentration der U-¹³C-Palmitinsäure bezogen auf die Menge der Gesamtfettsäuren nach chronischer Applikation des Markers mit den Versuchsdiäten in Gewichtsprozent dargestellt. Hierbei wurden lediglich die Daten der Ratten berücksichtigt, bei denen U-¹³C-Palmitat in den Gewebeproben nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 14: Anteil der U-¹³C-Palmitinsäure an der Gesamtfettsäurekonzentration der Gewebe (U-¹³C-Palmitat/gesFS, %) nach chronischer Applikation des Markers mit den Versuchsdiäten (Experiment B-a)

	LF	MCT	LCT	ANOVA
D	1,63 ± 0,12 ^{c, §}	1,31 ± 0,10 ^{b, §}	0,74 ± 0,05 ^{a, §}	<0,001
L	1,70 ± 0,09 ^{b, §}	1,68 ± 0,09 ^{b, #}	0,67 ± 0,03 ^{a, §}	<0,001
MS	1,97 ± 0,25 ^{b, §}	2,14 ± 0,19 ^{b, §}	0,74 ± 0,01 ^a	<0,01
MG	1,59 ± 0,27 ^{b, §}	1,29 ± 0,10 ^{b, §}	0,60 ± 0,06 ^a	<0,01
Fa	0,76 ± 0,06 ^c	0,57 ± 0,04 ^b	0,29 ± 0,03 ^a	<0,001
Fr	0,64 ± 0,05 ^b	0,65 ± 0,04 ^b	0,29 ± 0,04 ^a	<0,001

Mittelwert ± SEM; n = 8-10 (MS der LCT-Gruppe: n = 4); unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen (P < 0,05, ANOVA mit anschließendem *Student-Newman-Keuls* Test); §: signifikanter Unterschied im Vergleich zum Fettgewebe innerhalb einer Versuchsgruppe (P < 0,05, ANOVA mit anschließenden multiplen Vergleichen (95 % LSD)); #: signifikanter Unterschied im Vergleich zu Fettgewebe, Mucosa des Duodenums und M. gastrocnemius innerhalb einer Versuchsgruppe (P < 0,05, ANOVA mit anschließenden multiplen Vergleichen (95 % LSD)); §: signifikanter Unterschied im Vergleich zu Fettgewebe, Mucosa des Duodenums, M. gastrocnemius und Leber innerhalb einer Versuchsgruppe (P < 0,05, ANOVA mit anschließenden multiplen Vergleichen (95 % LSD)); D = Duodenum; L = Leber; MS = M. soleus, MG = M. gastrocnemius; Fa = abdominales Fettgewebe; Fr = retroperitoneales Fettgewebe;

Grundsätzlich zeigte sich bei dieser Auswertung die gleiche Tendenz wie bei der Darstellung der U-¹³C-Palmitiatkonzentration pro Gramm Gewebe (siehe oben), d.h. nach chronischer Applikation des U-¹³C-Palmitiats lag ein signifikant niedrigerer Gehalt des Markers in der LCT-Gruppe verglichen zur LF- und MCT-Gruppe in allen Geweben vor. Aus Tabelle 14 wird darüber hinaus deutlich, dass der Gehalt des Markers bezogen auf die Gesamtfettsäuren im Fettgewebe aufgrund des hohen Lipidgehalts wesentlich stärker verdünnt wurde und deswegen niedriger war als in den übrigen Geweben (P < 0,001). Weiterhin kam es in der MCT-Gruppe bezogen auf die Gesamtfettsäuremenge zur stärksten Anreicherung des Markers im M. soleus verglichen zu den übrigen Geweben (P < 0,001).

In Tabelle 15 ist die Konzentration der U-¹³C-Palmitinsäure bezogen auf die Menge der Gesamtfettsäuren nach der einmaligen Applikation des Markers mit dem OMTT in Gewichtsprozent dargestellt. Fünf Stunden nach der einmaligen Applikation des Markers war in allen drei Versuchsgruppen die stärkste relative U-¹³C-Palmitatanreicherung im Duodenum nachzuweisen (P < 0,001). Lediglich in der Leber konnte zwischen den drei Versuchsgruppen ein Unterschied mit einer stärkeren

relativen U-¹³C-Palmitatanreicherung in beiden Hochfettgruppen (MCT- und LCT) verglichen mit der LF-Gruppe detektiert werden.

Tabelle 15: Anteil der U-¹³C-Palmitinsäure an der Gesamtfettsäurekonzentration der Gewebe (U-¹³C-Palmitat/gesFS, %) nach einmaliger Applikation des Markers mit dem OMTT (Experiment B-b)

	LF	MCT	LCT	ANOVA
D	67,17 ± 6,51 [§]	70,70 ± 6,56 [§]	66,62 ± 3,18 [#]	ns
L	2,12 ± 0,09 ^a	2,85 ± 0,19 ^b	3,76 ± 0,43 ^{b, §}	<0,001
MS	1,18 ± 0,12	1,31 ± 0,27	1,63 ± 0,27	ns
MG	0,49 ± 0,02	0,50 ± 0,05	0,71 ± 0,11	ns
Fa	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,07 ± 0,02	ns
Fr	0,04 ± 0,001	0,08 ± 0,03	0,06 ± 0,01	ns

Mittelwert ± SEM; n = 6-10; ns = nicht signifikant; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen (P < 0,05, ANOVA mit anschließendem *Student-Newman-Keuls* Test); D = Duodenum; L = Leber; MS = M. soleus, MG = M. gastrocnemius; Fa = abdominales Fettgewebe; Fr = retroperitoneales Fettgewebe; §: signifikanter Unterschied im Vergleich zum Fettgewebe innerhalb einer Versuchsgruppe (P < 0,05, ANOVA mit anschließenden multiplen Vergleichen (95 % LSD)); #: signifikanter Unterschied im Vergleich zu Fettgewebe und Leber innerhalb einer Versuchsgruppe (P < 0,05, ANOVA mit anschließenden multiplen Vergleichen (95 % LSD))

4.7. Muskuläre Expression von putativen Fettsäuretransportern

In Experiment A wurde nach 4-wöchiger Fütterungsperiode die mRNA-Konzentration des membranständigen FATP (*fatty acid transport protein*) und FAT/CD36 (*fatty acid translocase*) bzw. des cytosolischen H-FABP (*cytosolic fatty acid binding protein*) im roten M. soleus und weißen M. gastrocnemius gemessen. Die Gewichtsentwicklung und die Gewichtszunahme der Ratten in Experiment A, indem die LF-Diät eine andere Zusammensetzung als in den restlichen Experimenten aufwies (siehe Seite 40), war während der 4-wöchigen Fütterungsperiode zwischen den Gruppen nicht signifikant verschieden (siehe Tabelle 7).

Generell war die mRNA-Konzentration der putativen Fettsäuretransporter, bezogen auf die Konzentration der 18 S-rRNA, im roten, oxidativen M. soleus wesentlich höher als im weißen, ausschließlich glykolytischen Teil des M. gastrocnemius. Weiterhin scheint auf transkriptioneller Ebene FAT weniger stark als FATP und H-FABP im M. soleus exprimiert zu werden, wohingegen sich im M. gastrocnemius diesbezüglich kein

eindeutiges Bild abzeichnete. Im Folgenden werden die entsprechenden Daten detaillierter vorgestellt.

4.7.1. H-FABP_c-Expression im *M. soleus* und *M. gastrocnemius*

Die Expression des cytosolischen H-FABP ist in Abbildung 23 dargestellt. Verglichen mit der LF-Gruppe war die relative Konzentration der H-FABP_c-mRNA im *M. soleus* in der MCT-Gruppe nahezu gleich und in der LCT-Gruppe wenn auch nicht signifikant ($P < 0,1$) um das 2,1-fache erhöht. Im *M. gastrocnemius* war die relative Konzentration der H-FABP_c-mRNA in der MCT-Gruppe um das 1,5-fache und in der LCT-Gruppe um das 1,6-fache erhöht, jedoch nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Versuchsgruppen.

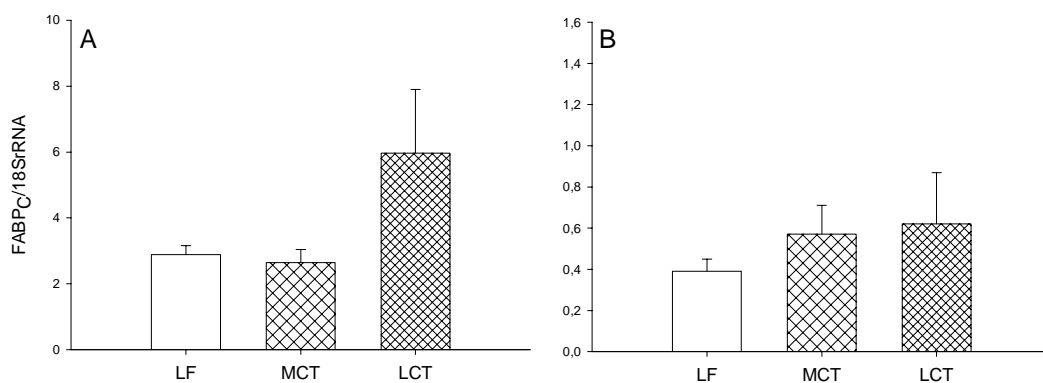


Abbildung 23: Expression von H-FABP_c im *M. soleus* (A) und *M. gastrocnemius* (B) Mittelwert \pm SEM; n = 11-12

4.7.2. FAT/CD36-Expression im *M. soleus* und *M. gastrocnemius*

Die relative FAT-mRNA-Konzentration war im *M. soleus* in der MCT-Gruppe leicht (1,2-fach) und in der LCT-Gruppe deutlicher (1,9-fach), verglichen mit der LF-Gruppe, erhöht ($P = 0,11$). Im *M. gastrocnemius* war die relative FAT-mRNA-Konzentration in der MCT-Gruppe ebenfalls leicht (1,2-fach) und in der LCT-Gruppe deutlich, wenn auch nicht signifikant (2,5-fach) erhöht (siehe Abbildung 24).

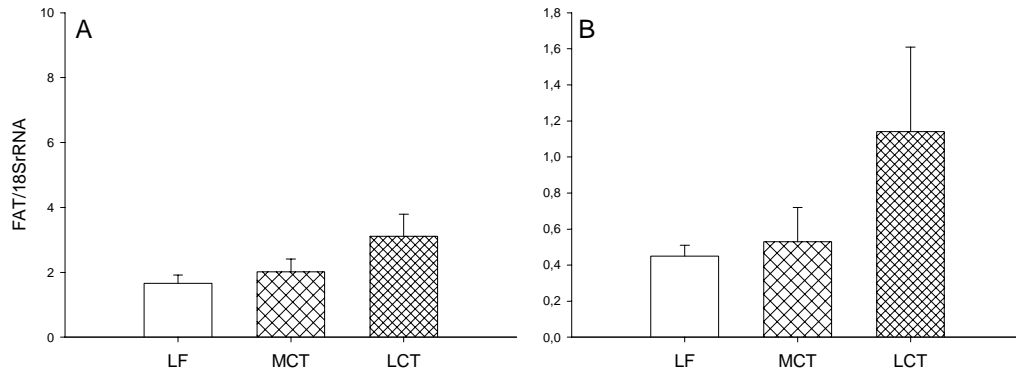


Abbildung 24: Expression von FAT/CD36 im M. soleus (A) und M. gastrocnemius (B) Mittelwert ± SEM; n = 8-12

4.7.3. FATP-Expression im M. soleus und M. gastrocnemius

Verglichen mit der LF-Gruppe war die FATP-mRNA-Konzentration im M. soleus in der MCT-Gruppe nicht verschieden, wohingegen die FATP-mRNA-Konzentration in der LCT-Gruppe signifikant um das 2,1-fache erhöht war ($P < 0,01$, siehe Abbildung 25). Im M. gastrocnemius war die relative mRNA-Konzentration von FATP in der MCT-Gruppe, verglichen mit der LF-Gruppe, nicht verschieden und in der LCT-Gruppe leicht, um das 1,3-fache, ohne signifikante Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen, erhöht.

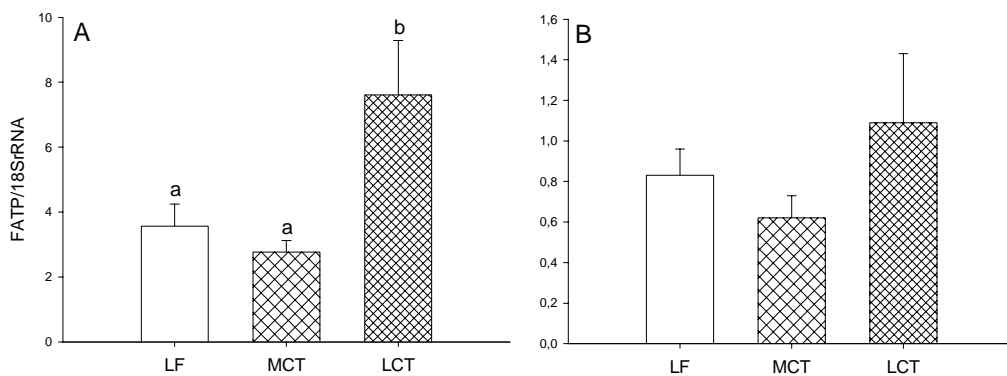


Abbildung 25: Expression von FATP im M. soleus (A) und M. gastrocnemius (B) Mittelwert ± SEM; n = 11-12; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen ($P < 0,05$, ANOVA mit anschließendem *Student-Newman-Keuls* Test)

4.8. Expression von FAT/CD36 in der Dünndarmmucosa

Im Intestinum der Ratten konnte FATP mit dem verwendeten Assay für FATP1 (NM_053580) nicht nachgewiesen werden. Weil das FATP1 der Ratte eine höhere Homologie zum humanen FATP1 (89,5 %) als zum humanen FATP4 (58,3 %) aufweist, und lediglich FATP4 gewebespezifisch im Intestinum nachgewiesen werden kann [246], wurde dieser Befund erwartet. Da auch H-FABP_c aufgrund des gewebespezifischen Expressionsmusters nicht im Intestinum der Ratten nachgewiesen wurde [247], wurde in der Mucosa des Duodenums und Ileums der Ratten lediglich die relative mRNA-Konzentration von FAT/CD36 quantifiziert. Grundsätzlich war die FAT-mRNA-Konzentration im Duodenum, dem Hauptort der Fettabsorption, wesentlich stärker ausgeprägt als im Ileum der Tiere.

In der Mucosa des Duodenums war die relative mRNA-Konzentration von FAT nach der 4-wöchigen Fütterungsperiode und dem anschließenden nächtlichen Futterentzug nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Versuchsgruppen (siehe Abbildung 26).

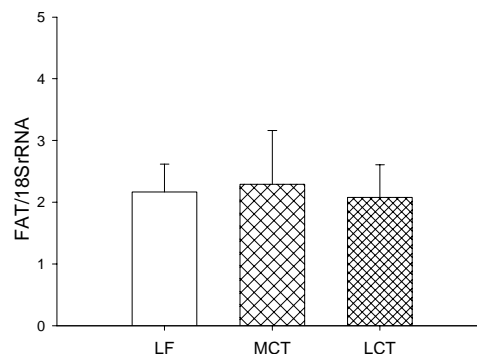


Abbildung 26: Expression von FAT/CD36 im Duodenum

Mittelwert ± SEM; n = 3-4

Im Unterschied zum Duodenum wurde die FAT-mRNA-Konzentration in der Mucosa des Ileums nach der 4-wöchigen Fütterungsperiode und dem anschließenden nächtlichen Futterentzug durch beide Hochfettdiäten, unabhängig vom Versuchsfett, um das 2,6-fache im Vergleich zur LF-Gruppe erhöht. Aufgrund der geringen Tierzahlen pro Gruppe war dieser Anstieg jedoch knapp nicht signifikant ($P = 0,052$).

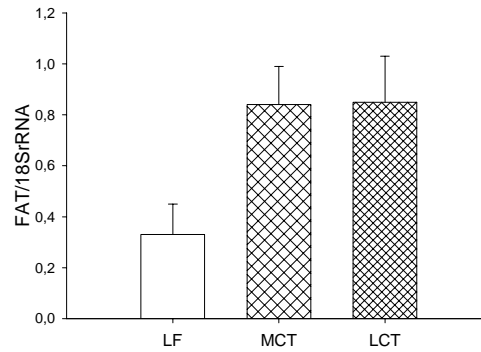


Abbildung 27: Expression von FAT/CD36 im Ileum
Mittelwert \pm SEM; n = 3-4

4.9. Plasmametabolite

4.9.1. Nüchternphase

Nach der 4-wöchigen Fütterungsperiode wurden in Experiment C die Konzentrationen von Glucose, TG, FFA, Cholesterol und Insulin im Nüchternzustand bestimmt. Nach der 4-wöchigen Fütterung der Versuchsdiäten wurde den Ratten ein arterieller Katheter implantiert und nach der 2-tägigen Erholungsphase das Futter über Nacht entzogen. Anschließend erfolgte die Entnahme von Blutproben (t_0). Im Anschluss daran erhielten die Ratten den OMTT und die Konzentrationen von Glucose, TG und Insulin wurden postprandial über 6 Stunden bestimmt. Das Endgewicht der Tiere in Experiment C unterschied sich insofern von dem der anderen Experimente, als dass die Ratten der LF-Gruppe signifikant schwerer waren als die Ratten der MCT- und LCT-Gruppe (siehe Tabelle 7). Die Gewichtsentwicklung der Tiere der beiden Hochfettgruppen (MCT und LCT) hingegen unterschied sich nicht signifikant voneinander und auch nicht signifikant von der Gewichtszunahme der MCT- und LCT-Ratten in den vorangegangenen Experimenten (siehe Abbildung 13).

In Tabelle 16 sind die Nüchternkonzentrationen (t_0) der untersuchten Plasmametabolite, welche sich nicht zwischen den Gruppen unterschieden, dargestellt.

Tabelle 16: Nüchternkonzentrationen der Plasmametabolite (Experiment C)

	LF	MCT	LCT	P-Wert
Glucose (mmol/l)	5,14 ± 0,26	4,77 ± 0,13	4,73 ± 0,19	ns
Insulin (pmol/l)	101,86 ± 14,90	109,70 ± 27,66	78,46 ± 9,25	ns
Cholesterol (mmol/l)	1,93 ± 0,17	1,64 ± 0,12	2,18 ± 0,17	ns
FFS (mmol/l)	0,90 ± 0,09	1,06 ± 0,10	1,08 ± 0,10	ns
Triglyceride (µmol/l)	282,28 ± 36,05	243,16 ± 45,04	285,76 ± 33,44	ns

Mittelwert ± SEM; n = 8-9 (Ausnahme: Insulin mit n = 2-3 (LF, MCT) bzw. 8 (LCT)); ns = nicht signifikant; FFS = freie Fettsäuren

4.9.2. Postprandiale Phase

In Abbildung 28 ist der postprandiale Glucoseverlauf im Plasma der Tiere und die Fläche unterhalb der Glucosekurve (AUC_{Glc}) nach der Verabreichung des OMTT im Anschluss an die 4-wöchige Fütterungsperiode dargestellt.

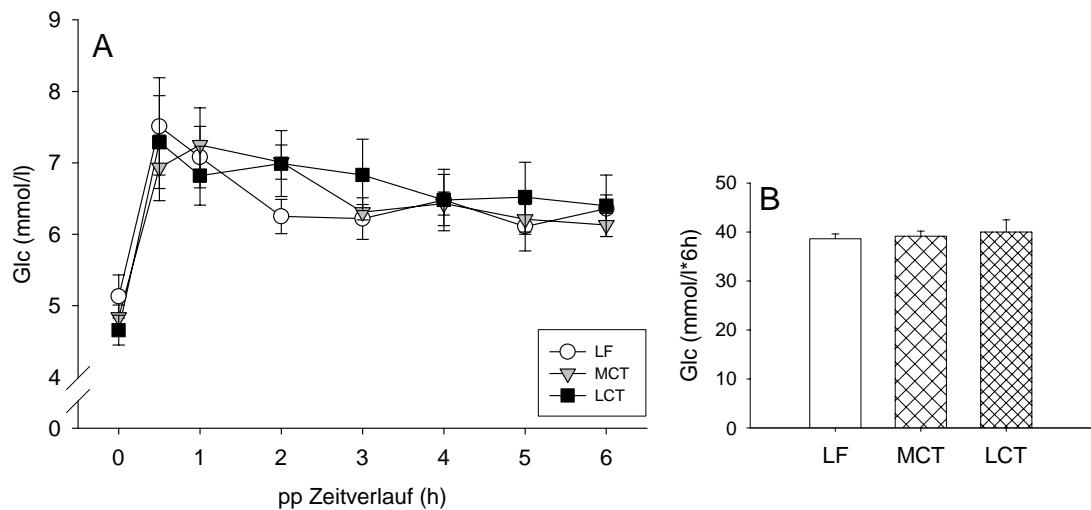


Abbildung 28: Postprandiale Verläufe (mmol/l) der Plasmaglukosekonzentration (A) und AUC (B) nach Gabe des OMTT

Mittelwert ± SEM; n = 6-7; AUC = Fläche unter der Kurve (*area under the curve*); t₀ = Nüchternkonzentration

Dreißig Minuten nach Verabreichung des OMTT wurde die höchste Glukosekonzentration gemessen. Weder das gemessene Glukosemaximum, noch der anschließende Abfall der Plasmaglukosekonzentration oder die Fläche unterhalb der

Konzentrationszeitkurve (AUC) waren signifikant verschieden zwischen den Versuchsgruppen. Auch die Berechnung der Fläche unterhalb der Konzentrationszeitkurve mit der t_0 -Konzentration als *baseline* führte zu keinem Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ($125,8 \pm 37,4$ mmol/l·6h (LF), $167,1 \pm 21,2$ mmol/l·6h (MCT), $187,8 \pm 53,5$ mmol/l·6h (LCT)).

Aus versuchstechnischen Gründen wurde lediglich bei einer geringen Anzahl von Tieren, insbesondere in der MCT- und LCT-Gruppe, die Insulinkonzentration im Plasma der Ratten zum Zeitpunkt t_0 , 30 min und eine Stunde nach der Gabe des OMTT analysiert. Zu keinem dieser Zeitpunkte traten signifikante Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen auf (siehe Abbildung 29).

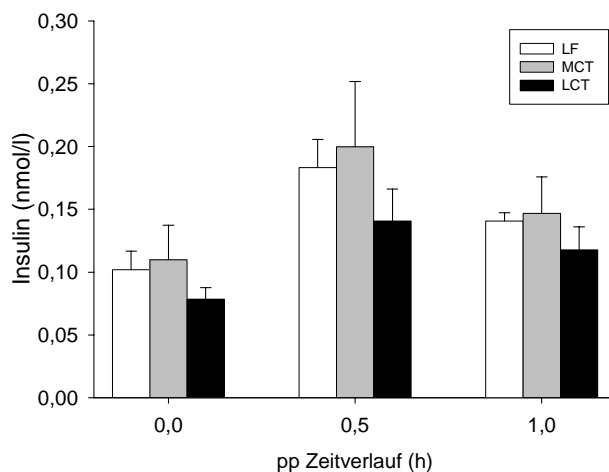


Abbildung 29: Postprandiale Plasmainsulinkonzentration (nmol/l) nach Gabe des OMTT

Mittelwert \pm SEM; n = 2-8; t_0 = Nüchternkonzentration

In Abbildung 30 ist der postprandiale Triglyceridverlauf, die Fläche unterhalb der TG-Konzentrationszeitkurve (AUC_{TG}) und der maximale TG-Anstieg ($\Delta TG_{max} - TG_0$) nach der Verabreichung des OMTT dargestellt. Dreißig Minuten nach Verabreichung des OMTT kam es in allen drei Versuchsgruppen zu einem leichten Abfall der Triglyceridkonzentration im Plasma der Tiere. Das anschließende Anfluten der Triglyceride im Plasma erreichte in der LF- und MCT-Gruppe im Mittel nach zwei Stunden sein Maximum mit $455,19 \pm 96,61$ μ mol/l in der LF-Gruppe bzw. $355,25 \pm 66,20$ μ mol/l in der MCT-Gruppe. In der LCT-Gruppe hingegen kam es im Mittel erst 5 Stunden nach der Gabe des OMTT zum Triglyceridmaximum im Plasma der Tiere, welches bei $576,99 \pm 75,34$ μ mol/l lag. Aufgrund der Streuungen innerhalb

der Versuchsgruppen waren zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in der Plasmatriglyceridkonzentration zwischen den Gruppen festzustellen.

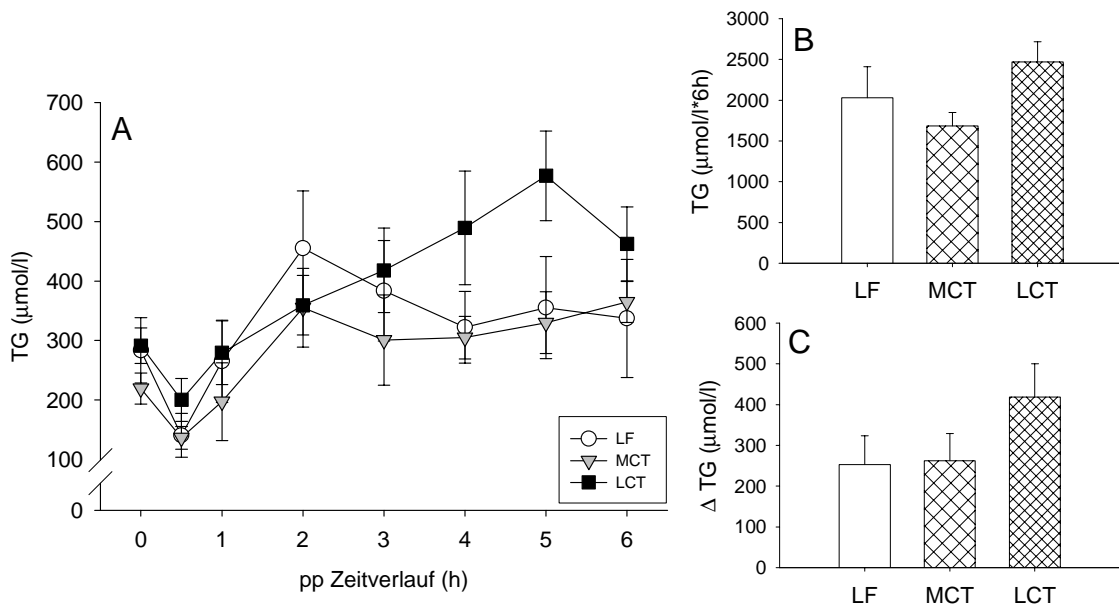


Abbildung 30: Postprandiale Verläufe (µmol/l) der Plasma-TG-Konzentration (A), AUC (B) und maximaler Triglyceridanstieg (C) nach Gabe des OMTT
 Mittelwert ± SEM; n = 7-9; AUC = Fläche unter der Kurve (area under the curve);
 t₀ = Nüchternkonzentration

Auch die Fläche unterhalb der Kurve (AUC_{TG}), welche in der LCT-Gruppe mit 2470,52 ± 274,66 µmol/l·6h größer war als in der LF- und MCT-Gruppe mit 2030,65 ± 380,15 bzw. 1683,06 ± 164,77 µmol/l·6h, war nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Versuchsgruppen (siehe Abbildung 30 B). Die Berechnung der Fläche unterhalb der Konzentrationszeitkurve mit der t₀-Konzentration als *baseline* führte zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den Versuchsgruppen (330,3 ± 373,1 mmol/l·6h (LF), 366,7 ± 199,7 mmol/l·6h (MCT), 721,7 ± 306,8 mmol/l·6h (LCT)). Der maximale TG-Anstieg war in der LCT-Gruppe mit 418,46 ± 81,38 µmol/l, wenn auch nicht signifikant, höher als in der LF- und MCT-Gruppe mit 252,93 ± 70,76 bzw. 262,59 ± 66,30 µmol/l (siehe Abbildung 30 C).

4.10. Glucoseinfusionsrate während des EHC und Glucose-/Insulin-Antwort nach dem IPGTT

Das Experiment des hyperinsulinämischen-euglykämischen Clamps wurde in Bratislava durchgeführt. Die während des 90-minütigen Clamps eingestellten supraphysiologischen Insulinkonzentrationen waren nicht signifikant verschieden zwischen den Gruppen und lagen im *steady state* bei $1,50 \pm 0,11$ nmol/l in der LF-Gruppe, $1,42 \pm 0,04$ nmol/l in der MCT-Gruppe und $1,54 \pm 0,08$ nmol/l in der LCT-Gruppe. Auch die Nüchterninsulinkonzentrationen vor Beginn des Clamps waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen ($249,1 \pm 48,8$ pmol/l (LF), $160,0 \pm 15,1$ pmol/l (MCT), $180,9 \pm 35,1$ pmol/l (LCT)). Die Glucosenüchternkonzentrationen wurde während des Clamps durch Infusionen von Glucose konstant gehalten.

In Abbildung 31 ist die Glucoseinfusionsrate während des 90-minütigen Clamps dargestellt, welche in der LCT-Gruppe mit $97,17 \pm 3,39$ mmol/kg/min signifikant niedriger war als in der MCT-Gruppe mit $121,00 \pm 5,00$ mmol/kg/min und diese war wiederum signifikant niedriger als in der LF-Gruppe mit $135,67 \pm 5,39$ mmol/kg/min ($P < 0,001$). Die niedrigste bzw. höchste insulinabhängige Glucoseaufnahme in die Gewebe wiesen somit die Ratten der LCT-Gruppe bzw. der LF-Gruppe auf.

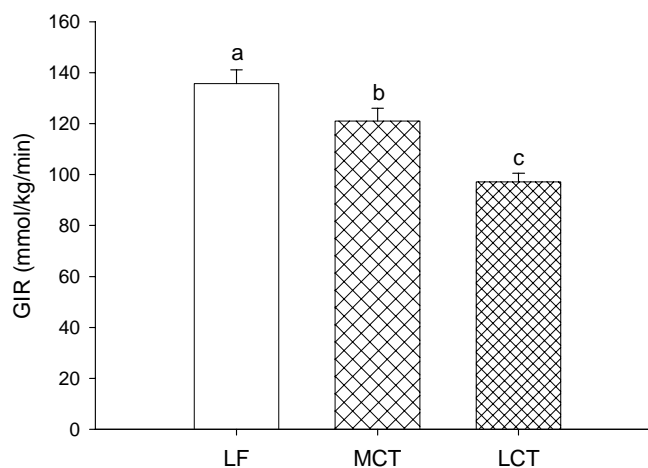


Abbildung 31: Glucoseinfusionsrate (mmol/kg/min) während des hyperinsulinämischen-euglykämischen Clamps nach 4-wöchiger Fütterung der Versuchsdiäten

Mittelwert \pm SEM; n = 8-11; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen ($P < 0,05$, ANOVA mit anschließendem *Student-Newman-Keuls* Test)

Um zu überprüfen, ob die in Kiel gehaltenen Ratten nach der 4-wöchigen Fütterungsperiode ebenfalls eine veränderte Glucose- und Insulinantwort aufwiesen, wurde mit zwei Tieren pro Gruppe ein intraperitonealer Glucosetoleranztest (IPGTT)

durchgeführt (Experiment E). In Abbildung 32 ist der Plasmaglukosekonzentrationszeitverlauf der Tiere im Anschluss an den IPGTT dargestellt. Dabei ergab sich für die LCT-Ratten der stärkste Anstieg, der mit einer signifikant größeren AUC, verglichen mit den LF- und MCT-Tieren, einherging ($P < 0,01$). Die signifikant größere Fläche unterhalb der Glukosekonzentrationszeitkurve der LCT-Tiere verglichen mit den LF- und MCT-Tieren wurde noch deutlicher, wenn die t_0 -Konzentration als *baseline* zur Berechnung der AUC verwendet wurde ($8,4 \pm 0,8$ mmol/l·3h (LF), $9,4 \pm 0,1$ mmol/l·3h (MCT), $18,6 \pm 1,5$ mmol/l·3h (LCT)).

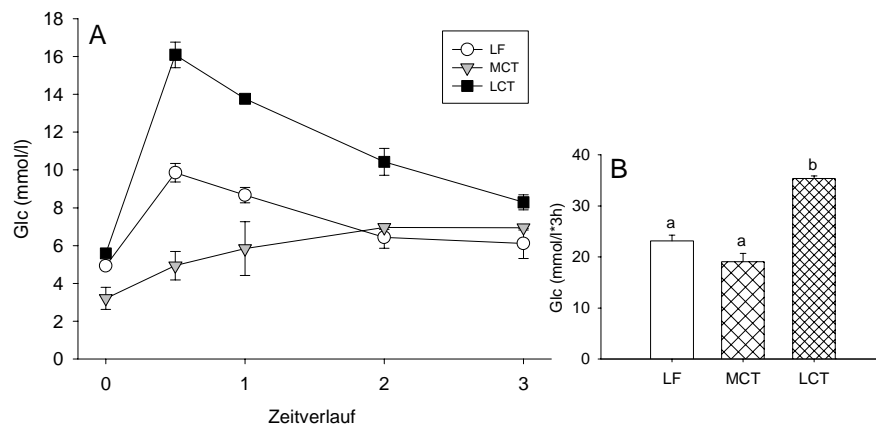


Abbildung 32: Verläufe (mmol/l) der Plasmaglukosekonzentration (A) und AUC (B) nach intraperitonealem Glucosetoleranztest (IPGTT)

Mittelwert \pm SEM; $n = 2$; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen ($P < 0,05$, ANOVA mit anschließendem *Student-Newman-Keuls* Test); AUC = Fläche unter der Kurve (*area under the curve*)

Der Befund, dass es bei den beiden MCT-Tieren 30 min nach der intraperitonealen Injektion der Glucoselösung zu keinem Plasmaglukosepeak kam, kann nicht erklärt werden, zumal bei allen Tieren eine leichte Insulinantwort auf den IPGTT nachzuweisen war (siehe Abbildung 33).

In Abbildung 33 ist zu erkennen, dass 30 min nach dem IPGTT die Insulinantwort in den zwei Tieren der LCT-Gruppe stärker ausgeprägt war als in den Tieren der LF- und MCT-Gruppe ($P < 0,05$). Da in der 2. und 3. Stunde nach dem IPGTT keine wesentlichen Veränderungen in der Plasmainsulinkonzentration zu erwarten waren, wurde auf die Messung der Insulinkonzentration im Plasma der Tiere zu diesen Zeitpunkten verzichtet.

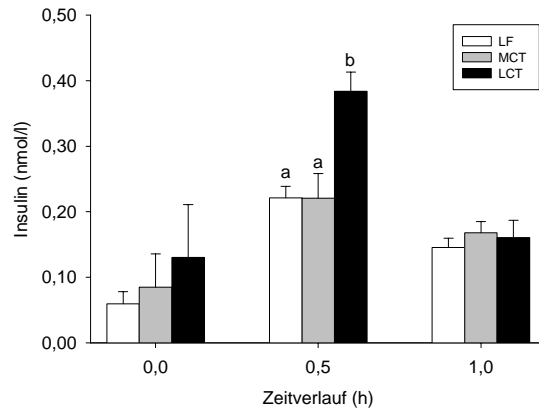


Abbildung 33: Plasmainsulinkonzentration (nmol/l) nach intraperitonealem Glucosetoleranztest (IPGTT)

Mittelwert \pm SEM; n = 2; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen ($P < 0,05$, ANOVA mit anschließendem *Student-Newman-Keuls* Test)

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde bei Ratten untersucht, welche Auswirkungen die 4-wöchige Fütterung von Hochfettdiäten mit ausschließlich mittelkettigen gesättigten Fettsäuren im Vergleich zu ausschließlich langkettigen gesättigten Fettsäuren auf die Insulinsensitivität bei Ratten hat und inwieweit sich durch Unterschiede in der Fettassimilation der verwendeten Versuchsfette (MCT vs. LCT) pathophysiologische Veränderungen im Rahmen der Insulinresistenz erklären lassen. Die untersuchte Thematik wird im Folgenden weiterführend diskutiert.

5.1. Einfluss von Hochfettdiäten auf die Insulinsensitivität und das Körpergewicht

Die 4-wöchige Fütterung der Hochfettdiät mit überwiegend langkettigen gesättigten Fettsäuren (LCT-Diät) führte im hyperinsulinämischen-euglycämischen Clamp (EHC) im Gegensatz zur LF- und MCT-Diät zu einer verminderten Gesamtkörperglucoseaufnahme (vgl. Abbildung 31), was durch eine verminderte Insulinsensitivität der Gewebe erklärt werden kann. Darüber hinaus konnte auch beim IPGTT eine beginnende gestörte Glucose- und Insulinantwort in der LCT-Gruppe, verglichen mit der LF- und MCT-Gruppe, nachgewiesen werden (vgl. Abbildungen 32 und 33). Dass die chronische Fütterung von Hochfettdiäten mit langkettigen Fettsäuren bei Ratten zur Ausbildung einer Insulinresistenz führt, scheint in der Literatur hinreichend belegt. So konnte in vielen Experimenten nach der Fütterung von Hochfettdiäten mit langkettigen Fettsäuren in einem anschließenden EHC eine verminderte Glucoseinfusionsrate und somit eine verminderte Insulinsensitivität der Gewebe nachgewiesen werden [2;7;33;70;248]. Allerdings ist dabei kritisch anzumerken, dass es sich bei diesen Hochfettdiäten mit langkettigen Fettsäuren überwiegend um langkettige ungesättigte Fettsäuren handelte, und betitelte „Hochfettdiäten mit langkettigen gesättigten Fettsäuren“ noch überwiegend langkettige ungesättigte Fettsäuren enthielten [2] (vgl. Kapitel 1). Unseres Erachtens ist bislang noch keine Hochfettdiät mit tatsächlich überwiegend langkettigen gesättigten Fettsäuren eingesetzt worden, um die Insulinsensitivität bei Ratten zu untersuchen. Aus Zellkulturstudien ist hingegen bekannt, dass langkettige gesättigte Fettsäuren die Insulinsensitivität herabsetzen. So führte eine 4-stündige Inkubation von Myozyten und Adipozyten mit Palmitat zu einer

verminderten Glucoseaufnahme und zu einer verschlechterten Insulinsignaltransduktion in den Zellen [5;153;249]. Darüber hinaus kam es in Myozyten neben einer reduzierten Aufnahme von Desoxyglucose zu einer erhöhten Akkumulation von Triglyceriden, DAG und Ceramiden, nicht jedoch von langkettigen Acyl-CoA [250].

Die Verwendung von Palmitin- und Stearinsäure als dominierende Fettsäuren in der LCT-Diät war durch die Fragestellung begründet, den Einfluss der Fettsäurekettenlänge auf die Fettassimilation und die Insulinsensitivität der Ratten zu untersuchen, ohne Unterschiede im Grad der Fettsäuresättigung vorzunehmen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete LCT-Diät kann allerdings insofern problematisch betrachtet werden, als dass eine schlechte Absorption von Stearinsäure, insbesondere in der sn-1,3 Position der Triglyceride, bekannt ist [251;252] und in den letzten zwei bis drei Jahrzehnten der Einsatz strukturierter Triglyceride mit Stearinsäure in der sn-1,3 Position als mögliche Präventionsmaßnahme bei Adipositas, zur Verbesserung des Plasmalipidprofils und zur Senkung des Plasmacholesterols eingehend diskutiert wurde [253;254]. Die Fettabsorption bei der LCT-Diät war auch in der vorliegenden Arbeit zunächst erwartungsgemäß schlecht, konnte jedoch durch die Emulgierung des Versuchsfetts auf 90 % gesteigert werden (vgl. Tabelle 8). Darüber hinaus kompensierten die Ratten der LCT-Gruppe die schlechtere Fettabsorption mit einem höheren Futterverzehr. Vergleichbare Beobachtungen wurden bereits beschrieben [255]. Letztendlich entsprach die in Experiment B-a ermittelte scheinbare Energieabsorption der LCT-Tiere der der LF-Tiere. Auch die Endgewichte der Ratten unterschieden sich (in den meisten Experimenten der vorliegenden Arbeit) nach der 4-wöchigen Fütterungsperiode nicht zwischen den drei Versuchsgruppen.

Ebenso wie die LCT-Diät führte die Hochfettdiät mit überwiegend mittelkettigen gesättigten Fettsäuren (MCT-Diät) im Vergleich zur Niedrigfettdiät (LF-Diät) zu einer verminderten Gesamtkörperglucoseaufnahme unter hyperinsulinämischen-euglycämischen Bedingungen und damit zu einer geringeren Insulinsensitivität der Tiere. Verglichen mit der LCT-Diät war die Gesamtkörperglucoseaufnahme der MCT-Tiere im EHC jedoch signifikant höher, was wiederum auf eine höhere Insulinsensitivität der MCT-gefütterten Ratten im Vergleich zu den LCT-gefütterten Ratten hindeutet. Die Befunde deuten darauf hin, dass nicht die absolute Energieaufnahme, sondern die Art der zugeführten Energie, insbesondere die Art der zugeführten Fettquelle von großer Bedeutung bei der Entstehung einer Insulinresistenz

ist. Die Studie von Storlien et al. [2] unterstützt diese Folgerung, zumindest für Hochfettdiäten mit unterschiedlichen Quellen langkettiger Fettsäuren (ohne den Einsatz überwiegend langkettiger gesättigter Fettsäuren), bei Ratten nach restriktiver Fütterung (310 kJ/Tag), weil für die verwendeten isokalorischen Diätformen mit differenziellem Fettsäuremuster unterschiedliche Glucoseinfusionsraten im EHC bei den Ratten ermittelt wurden. Darüber hinaus wurde bislang in zwei Humanstudien der Einfluss von MCT-angereicherten Diäten auf den Glucosstoffwechsel und die Insulinsensitivität verglichen mit isokalorischen LCT-Diäten untersucht [198;229]. In der ersten Studie führte die 5-tägige Gabe einer Diät mit einem Fettgehalt von 40 %, wobei 77,5 % der Fettenergie aus MCT-Fetten stammte, verglichen mit einer isokalorischen LCT-Diät bei Gesunden, Probanden mit erhöhten TG-Spiegeln und Typ 2-Diabetikern, zu einer erhöhten, insulinbedingten Gesamtkörperglucoseaufnahme während eines hyperinsulinämischen-euglycämischen Clamps [229]. In der zweiten Studie mit Typ 2-Diabetikern führte die 30-tägige Gabe einer MCT-reichen Diät lediglich zu erniedrigten postprandialen Glucoseanstiegen im Plasma der Probanden, nicht jedoch zu veränderten Nüchternspiegeln von Glucose und Insulin, und ebenfalls zu keiner stimulierten insulinvermittelten Gesamtkörperglucoseaufnahme verglichen mit der isokalorischen LCT-Diät [198].

Die für MCT-Fette beschriebene gewichtsreduzierende Wirkung [202;256;257] konnte in unseren Experimenten bei Ratten nach *ad libitum*-Fütterung einer MCT-reichen Hochfettdiät nicht nachgewiesen werden. Allerdings war in der vorliegenden Studie die scheinbare Energieabsorption der MCT-Tiere höher als die der LF- und LCT-Tiere. Auch die Fettmasse der MCT-Tiere war mit 7,7 % etwas, wenn auch nicht signifikant, niedriger als die Fettmasse der gleichschweren LF-Tiere (12,7 %) bzw. die Fettmasse der in diesem Experiment (Experiment D) signifikant leichteren LCT-Tiere (8,8 %). Die Ergebnisse könnten auf eine, in der Literatur beschriebene, erhöhte Oxidation von mittelkettigen Fettsäuren und eine dadurch bedingte erhöhte postprandiale Thermogenese bei den MCT-gefütterten Tiere hindeuten [173;174;193]. Eine indirekte Kalorimetrie zur Bestimmung des Energieumsatzes der Tiere wurde allerdings nicht durchgeführt. In einer Studie, die den Einfluß von isokalorischen MCT- und LCT-Diäten (ohne den Einsatz überwiegend langkettiger gesättigter Fettsäuren) bei Ratten untersuchte, wurde ein geringerer Körperfettgehalt, kleinere Fettgewebepolster (*fat pads*) und eine geringere Adipozytengröße nach der Fütterung der MCT-Diät verglichen

mit der LCT-Diät beschrieben [258]. Allerdings war bei dieser und vergleichbaren Studien das Körpergewicht der MCT-gefütterten Ratten an Ende der Fütterungsperiode geringer als das der LCT-Tiere [256;257].

5.2. Aspekte der zellulären Aufnahme und Metabolisierung von Fettsäuren

Es wird angenommen, dass eine höhere Verfügbarkeit von Lipiden bzw. eine erhöhte Plasmakonzentration von freien Fettsäuren zur Triglyceridakkumulation in nicht-adipösem Gewebe führt und dort zur zellulären Lipotoxizität beiträgt [259;260]. Die für die hochfettgefütterte insulinresistente Ratte häufig beschriebene Triglyceridakkumulation im Skelettmuskel der Tiere [7;33;34;70] konnte in unserer Studie für die verwendete LCT- bzw. MCT-Diät nicht nachgewiesen werden. Dies könnte u.a. durch das Versuchsdesign begründet sein, da die Ratten in den letzten 5 Tagen der 4-wöchigen Fütterungsperiode in Experiment B-a und B-b restriktiv gefüttert wurden, was zu einer reduzierten Futter- und Energieaufnahme am Ende beider Experimente führte (vgl. Kapitel 3.3.). Hieraus resultierende Veränderungen des Stoffwechsels (gesteigerte Nutzung von TG) während dieser Zeit könnte den Nachweis einer Triglyceridakkumulation in den Geweben der Tiere verhindert haben. Darüber hinaus konnte in unserem Experiment nicht zwischen intra- und extrazellulären Triglyceriden differenziert werden, obwohl bekannt ist, dass insbesondere intrazelluläre Triglyceride im Skelettmuskel stark mit einer Insulinresistenz assoziiert sind [260;261].

Im Zusammenhang mit der bereits oben angesprochenen Lipotoxizität kann neben einer erhöhten zellulären Aufnahme von langkettigen Fettsäuren auch eine verminderte Fettsäureoxidation für die Triglyceridakkumulation im Skelettmuskel verantwortlich sein [260;262]. Darüber hinaus scheint auch die eingeschränkte Flexibilität des intrazellulären Lipidstoffwechsels, insbesondere des intrazellulären Pools an langkettigen Acyl-CoA als regulatorischen Mediatoren (*second messengers*), von Bedeutung [33;34;263]. Der Gehalt an Acyl-CoA in den Organen/Geweben der Ratten in unserem Experiment wurde nicht bestimmt.

5.2.1. Einfluss von Hochfettdiäten auf die zelluläre Fettsäureaufnahme

Die Ergebnisse der einmaligen U-¹³C-Palmitatgabe mit einer fettreichen Testmahlzeit (OMTT) und die Expressionsdaten der putativen Fettsäuretransportierenden/-bindenden Proteine (FATP, FAT/CD36, H-FABP_c) scheinen allerdings die Hypothese einer erhöhten zellulären Aufnahme von langkettigen Fettsäuren in den oxidativen Skelettmuskel der LCT-gefütterten (insulinresistenten) Ratten zu bestätigen. Die erhöhte Expression des Fettsäuretransporters FATP im oxidativen Skelettmuskel der LCT-Tiere (vgl. Abbildung 25) könnte eine verstärkte aktive Aufnahme mit gleichzeitiger Aktivierung langkettiger gesättigter Fettsäuren vermuten lassen [110] und, bedingt durch die stärkere transkriptionelle Expression von FATP verglichen mit dem cytosolischen H-FABP und FAT/CD36, auf eine besondere Stellung von FATP bei zellulären Aufnahme- und Assimilationsprozessen langkettiger Fettsäuren hindeuten. Auch die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene schnellere Anflutung der markierten U-¹³C-Palmitinsäure in den oxidativen M. soleus der LCT-gefütterten Ratten nach einmaliger Gabe mit einer fettreichen Mahlzeit (vgl. Abbildung 21) bestätigt die Annahme einer erhöhten zellulären Aufnahme von langkettigen Fettsäuren in die oxidative Skelettmuskulatur der LCT-hochfettgefütterten, insulinresistenten Ratte. Hegarty et al. [264] konnten zudem nach der chronischen Fütterung einer Hochfettdiät bei Ratten eine, verglichen mit einer Standarddiät, erhöhte zelluläre Aufnahme von Brompalmitat, einem nicht-metabolisierbarem Fettsäurederivat, nachweisen. Parallel dazu war die mRNA-Konzentration von FAT/CD36 und die ACS-Aktivität im oxidativen Skelettmuskel der Tiere erhöht. Nach Aussage der Autoren deutet dies auf Adaptationsmechanismen des Skelettmuskels im Sinne einer effizienteren Fettsäureaufnahme in die oxidative Skelettmuskulatur bei hochfettgefütterten Ratten hin [264]. Van Nieuwenhoven et al. [265] konnten darüber hinaus bei männlichen Wistar-Ratten nach der Ausbildung eines Streptozotocin-induzierten Diabetes im Herzmuskel der Tiere einen leichten, wenn auch nicht signifikanten, Anstieg der mRNA-Expression von FAT/CD36, FATP, FABP_{pm} und H-FABP_c nachweisen.

Im Vergleich zum Transport von langkettigen Fettsäuren [111;206] scheinen an der zellulären Aufnahme von kurz- und mittelkettigen Fettsäuren keine fettsäuretransportierenden bzw. bindenden Proteine beteiligt zu sein [266;267]. Dies könnte erklären, warum in der Skelettmuskulatur der MCT-gefütterten Ratten in der

vorliegenden Arbeit keine erhöhte mRNA-Konzentration von H-FABP_c, FAT/CD36 und FATP, verglichen mit der LF-Gruppe, nachzuweisen war.

Bedeutung fettsäuretransportierender/-bindender Proteine

Die Bedeutung der fettsäurebindenden/-transportierenden Proteine für die zelluläre Aufnahme von langkettigen Fettsäuren wird ferner durch die Tatsache untermauert, dass im M. gastrocnemius mit überwiegend glycolytischen Fasern die Expression der untersuchten fettsäurebindenden/-transportierenden Proteine geringer war, als im M. soleus mit überwiegend oxidativen Fasern. Eine im M. gastrocnemius, verglichen zum M. soleus, geringere Expression von FAT/CD36, FATP, FABP_{pm} und H-FABP_c konnte auch von van Nieuwenhoven et al. [265] bei Ratten nachgewiesen werden.

Die grundsätzliche Bedeutung der fettsäuretransportierenden/-bindenden Proteine wird schließlich aus Befunden, die von transgenen Tieren (Überexpression oder Gen-*knockout*) stammen, deutlich. So weisen Mäuse mit einer Überexpression von FAT/CD36 neben einer erhöhten Fettsäureaufnahme und -oxidation im Herz- und Skelettmuskel erniedrigte Nüchternspiegel von Triglyceriden, freien Fettsäuren und Cholesterin auf [268]. Dagegen zeichnen sich FAT/CD36-defiziente Mäuse durch das entgegengesetzte Bild aus und kompensieren eine erniedrigte Fettsäureutilisation im Herzmuskel mit einer erhöhten Glucoseutilisation [269]. Auch SHR-Ratten (*spontaneously hypertensive rats*), welche neben Bluthochdruck Störungen des Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels aufweisen [270-274], sind ein gutes Beispiel für eine FAT/CD36-Defizienzmutation. Bei der Suche nach Genloci, welche für eine verringerte Insulinantwort bei diesen Tieren verantwortlich sein könnten, wurde ein Locus auf Chromosom 4 ausfindig gemacht, auf welchem FAT/CD36 beim anschließenden Kartieren die stärkste diesbezügliche Assoziation aufwies [275]. SHR-Ratten mit einer FAT/CD36-Defizienz zeigen eine deutlich erhöhte Glucoseaufnahme in den Herz- und Zwerchfellmuskel. Darüber hinaus führte bei diesen Tieren die Fütterung von kurz- und mittelkettigen Fettsäuren, welche unabhängig von FAT/CD36 in die Zelle aufgenommen werden [267;276], zu einer weitgehenden Normalisierung der Glucoseaufnahme in den Herzmuskel [267]. Interessanterweise bewirkte auch die Re-Expression von FAT/CD36 bei den SHR-Ratten eine Senkung der Triglycerid- und FFA-Plasmaspiegel [267]. Bei H-FABP_c-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese eine, im Vergleich zum Wildtyp, reduzierte Fettsäureaufnahme in den Herzmuskel mit einer erhöhten Glucoseaufnahme kompensieren [277]. Ein

Schwimmtraining bei 3 Monate alten H-FABP_c-defizienten Mäusen führte darüber hinaus zu wesentlich stärkeren Erschöpfungserscheinungen und bei 25 % der Mäuse zum Tod, wohingegen lediglich ein Tier (< 5%) des Wildtyps beim Schwimmtraining zu Tode kam [277].

Fettsäuretransportierende/-bindende Proteine in der Mucosa des Dünndarms

Die stärkere Expression von FAT/CD36 im proximalen Duodenum der Ratten, verglichen mit den distalen Dünndarmabschnitten, konnte auch von anderen Arbeitsgruppen für FAT/CD36 und L-FABP bei Ratten bzw. für L-FABP bei Mäusen nachgewiesen werden [278;279]. Darüber hinaus scheinen in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zur LF-Diät beide Hochfettdiäten (MCT und LCT), unabhängig von ihrer Fettsäurezusammensetzung, eine stärkere transkriptionelle FAT/CD36-Expression im Ileum der Tiere zu induzieren. Veränderte Genexpressionsmuster von am Fettstoffwechsel beteiligten Proteinen in intestinalen Mucosazellen von Ratten konnten auch andere Autoren nach der Fütterung von Fettmahlzeiten beobachten. So berichteten beispielsweise Mahan et al. [280] von der Expression einer Triglyceridlipase in intestinalen Mucosazellen, welche stärker im proximalen Viertel des Dünndarm als in distalen Dünndarmabschnitten exprimiert wurde, und deren Expression sich nach der oralen Gabe von Maisöl lediglich in den distalen Dünndarmabschnitten, nicht jedoch im proximalen Viertel des Dünndarms, erhöhen ließ [280]. Auch Poirier et al. [279] fanden eine erhöhte Expression von FAT/CD36 in der Mucosa des Dünndarms (Duodenum, proximales Jejunum, Ileum) von männlichen Wistar-Ratten nach der 3-tägigen Fütterung einer Sonnenblumenöl-angereicherten Diät. Die 3-tägige Fütterung einer MCT-angereicherten Diät führte hingegen nach Befunden dieser Arbeitsgruppe zu keiner (Duodenum) bzw. lediglich einer geringen (proximales Jejunum, Ileum) Erhöhung der FAT/CD36-mRNA-Konzentration in der Dünndarmmucosa [279]. Die Unterschiede in der transkriptionellen FAT/CD36-Expression, verglichen mit unserem Experiment (eine tendenziell gleichstark erhöhte mRNA-Konzentration von FAT/CD36 in der Mucosa des Ileums nach der Fütterung der MCT- und LCT-Diät), könnten zum einen mit der differierenden Fettsäurezusammensetzung und Menge der verabreichten diätetischen Fette, zum anderen mit der Fütterungsdauer (3 Tage vs. 4 Wochen) erklärbar sein. Das von Poirier et al. [279] verwendete Futter bestand zu 28 % der Energie aus Fett, welches sich zu 80 % aus ungesättigten Fettsäuren zusammensetzte, wohingegen die Hochfettdiäten aus unserem Experiment zu 53 % der Energie aus Fett

bestanden und dieses in der LCT-Diät zu 75 % aus langkettigen gesättigten Fettsäuren bestand. Darüber hinaus enthielt das Kontrollfutter von Poirier et al. [279] lediglich 3 % der Energie in Form von Fett, wohingegen unser Kontrollfutter, aufgrund der identischen absoluten Menge an Sojaöl und Sojalecithin in den Versuchsdiäten, 21 % der Energie in Form von Fett enthielt und somit einen weit über dem natürlichen Fettbedarf der Ratten liegenden Lipidgehalt aufwies. Die Frage, inwieweit die Gabe einer „Niedrigfett-diät“ mit 21 % der Energie in Form von Fett die Expression von FAT/CD36 *per se* stimuliert haben könnte, und somit die Relation zu den Hochfett-diäten mit 53 % der Energie in Form von Fett vermindert haben könnte, bleibt unbeantwortet. Darüber hinaus konnte leider nur an 3 - 4 Tieren pro Gruppe die Expression von FAT/CD36 untersucht werden. Auch die Betrachtung weiterer interessanter Kandidatengene des Fettstoffwechsels, wie beispielsweise des intestinalen und hepatischen FABP oder des microsomalen Transferproteins (MTP), welches eine wichtige Rolle bei der Lipoproteinsynthese im glatten endoplasmatischen Retikulum des Enterozyten zu spielen scheint [281], konnte nicht vorgenommen werden. Durch die Verwendung von Microarrays, mit welchen die Expression von bis zu 10.000 Genen gleichzeitig analysiert werden kann, hätte ein breiteres Spektrum von möglicherweise - durch die Versuchsdiäten - in der Expression veränderten Gene nachgewiesen werden können. Weiterhin hätte der limitierenden Aussagekraft von quantitativen Expressionsergebnissen auf transkriptioneller Ebene begegnet werden können, indem auf proteomischer Ebene die Konzentration der untersuchten fettsäuretransportierenden Proteine für funktionelle Aussagen bestimmt worden wäre, zumal bekannt ist, dass zahlreiche regulatorische post-transkriptionelle und post-translationelle Prozesse die Funktion von Proteinen beeinflussen. So wurde beispielsweise für FAT/CD36 gezeigt, dass Glucose deren Translation in Makrophagen hochreguliert [282], dass elektrische *in vitro* Muskelkontraktionen und Insulin die FAT/CD36-Translokation aus dem intrazellulären Pool an die Zellmembran stimulieren [283;284] und dass auch die Glykosylierung und Phosphorylierung von FAT/CD36 dessen Funktion beeinflusst [285;286].

Postprandiale Anflutung stabil markierter Palmitinsäure in die Gewebe

Neben der bereits oben erwähnten stärkeren Anflutung von markierter U-¹³C-Palmitinsäure in den oxidativen M. soleus der LCT-Tiere (Seite 104), verglichen mit den LF- und MCT-Tieren, 5 Stunden nach der Gabe der fettreichen Testmahlzeit

(OMTT), konnte auch in der Leber der LCT-Tiere eine höhere postprandiale Markerkonzentration, verglichen mit den LF- und MCT-Tieren nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 20). Die Unterschiede bei der Anflutung langkettiger gesättigter Fettsäuren in die Gewebe nach diätetischer Vorkonditionierung mit den Versuchsdiäten könnten zum einen auf eine umfangreichere intestinale Absorption der freien Palmitinsäure aus der Testmahlzeit durch die vorherige 4-wöchige Fütterung mit der LCT-Diät hindeuten, zum anderen könnte die Aufnahmekapazität für Palmitinsäure in der Leber und dem oxidativen M. soleus durch die vorherige 4-wöchige Fütterung mit einer LCT-Diät im Vergleich zur isokalorischen LF- oder MCT-Diät erhöht sein. Geht man von der Annahme aus, dass die Ratten der LCT-Gruppe eine geringere Insulinsensitivität aufwiesen als die Ratten der MCT- und LF-Gruppe, könnte spekuliert werden, dass der oxidative Skelettmuskel der insulinresistenten LCT-Tiere wegen der verminderten Fähigkeit Glucose aufzunehmen, den Energiebedarf vermehrt über Fettsäuren deckt und dementsprechend eine höhere Aufnahmekapazität für diese vorhanden ist. Diese Hypothese ist konform mit der erhöhten Expression des fettsäuretransportierenden Protein FATP bei den LCT-gefütterten Ratten (vgl. Abbildung 25). Sie ist ebenfalls konform mit Ergebnissen anderer Studien, die zeigten, dass bei Ratten nach verstärkter Aufnahme von langkettigen Fettsäuren erhöhte Triglyceridablagerungen und erhöhte Acyl-CoA-Konzentrationen im Skelettmuskel der Tiere auftraten [7;34;66;262]. Auch in einer *ex vivo*-Studie mit isolierten Adipozyten von adipösen Zucker- (fa/fa) und diabetischen Zucker-Ratten (ZDF) konnte eine erhöhte zelluläre Aufnahme von Ölsäure im Vergleich zu Adipozyten von Wistar- (+/) und schlanken Zucker-Ratten (fa/+) nachgewiesen werden [269]. Ferner konnte gezeigt werden, dass isolierte Rattenmuskeln von adipösen Ratten (fa/fa) eine höhere Aufnahme von ¹⁴C-Palmitat im Vergleich zu schlanken Ratten (fa/+) aufwiesen und parallel dazu eine erhöhte Konzentration von Plasmamembran-gebundenem FABP auftrat [287]. Obwohl in der vorliegenden Arbeit für die Bestimmung der U-¹³C-Palmitatanreicherung keine Differenzierung zwischen der Triglycerid- und Phospholipidfraktion der Gewebe vorgenommen und die Markerkonzentration lediglich in der Gesamtlipidfraktion der Gewebe bestimmt wurde, kann angenommen werden, dass ein Großteil des stabilen Markers in den Triglyceriden und nicht in den Phospholipiden der Gewebe gespeichert wurde. Vergleichbar wurde beispielsweise in 3T3-L1-Adipozyten, welche für 24 Stunden mit radioaktiv markiertem Octanoat bzw. Oleat inkubiert wurden, nach der Differenzierung der zellulären Lipidfraktion in Triglyceride und Phospholipide gezeigt,

dass die radioaktiv markierten Fettsäuren ausschließlich in der Triglyceridfraktion und nicht in der Phospholipidfraktion der Adipozyten nachzuweisen waren [288].

Die Tatsache, dass 5 Stunden nach der fettreichen Testmahlzeit, unabhängig von den Versuchsgruppen, die relative Anreicherung des Markers ($\mu\text{g/g}$ Gewebe) in der Dünndarmmucosa am höchsten, in der Leber und der roten Skelettmuskulatur geringer und im Fettgewebe der Tiere am geringsten war (vgl. Abbildungen 19 - 22), deckt sich mit Befunden einer Rattenstudie, in der eine mit einem Lipidtrunk verabreichte markierte Stearinsäure nach der Absorption bis zu 24 Stunden in hoher Konzentration in der Darmmucosa verblieb, in geringerer Konzentration in der Leber und dem Skelettmuskel und lediglich in sehr geringer Konzentration im abdominalen Fettgewebe der Ratten nachweisbar war [243]. Weitere Studien, welche die Metabolisierung von markierten langkettigen Fettsäuren nach einer Mahlzeit in den Geweben bei chronisch hochfettgefütterten Ratten untersuchten und dabei insbesondere die Unterschiede einer MCT- und LCT-Fütterung betrachteten, liegen in der Literatur unseres Wissens nicht vor. Der Aussagewert der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Palmitatanreicherung wird allerdings dadurch eingeschränkt, dass die verwendete markierte Palmitinsäure, im Gegensatz zu nicht-metabolisierbarem Brompalmitat, in den 5 Stunden nach Applikation des Markers verstoffwechselt worden sein könnte. Dennoch ist aus dem durchgeführten Experiment deutlich ersichtlich, dass das postprandiale Schicksal der markierten Palmitinsäure, als Marker für langkettige gesättigte Fettsäuren, durch die vorangegangene 4-wöchige diätetische Konditionierung in der LCT-Gruppe anders als in der MCT- und LF-Gruppe war. Als Zeitpunkt der Gewebeentnahme wurde die 5. Stunde nach Gabe des OMTT gewählt, weil aus Humanstudien bekannt war, dass die maximale Konzentration von markierter Palmitinsäure in der Chylomikronenfraktion 3 - 4 Stunden nach der Gabe eines flüssigen Fetttrunks (Fischöl) oder einer gemischten Mahlzeit mit dem Marker nachzuweisen war [289;290].

5.2.2. Einfluss von Hochfettdiäten auf die zelluläre Fettsäuremetabolisierung

Die Gewebeanreicherung der markierten Palmitinsäure im Gleichgewichtszustand des Markers, von dem nach der 5-tägigen Applikation des Markers mit dem Futter ausgegangen werden kann, war überraschend. Die geringere Markerkonzentration in den Geweben der LCT-gefütterten Ratten, verglichen mit den MCT- und LF-gefütterten Ratten (im Fettgewebe lediglich im Vergleich zu den MCT-gefütterten Ratten), deutet

auf Unterschiede in der zellulären Metabolisierung von langkettigen gesättigten Fettsäuren in den Versuchsgruppen hin. So könnte bei den LCT-gefütterten Ratten eine höhere Fettsäureoxidation angenommen werden, welche zunächst im Widerspruch zur Literatur zu stehen scheint. In der Literatur wird angenommen, dass die Fütterung von Hochfettdiäten mit langkettigen Fettsäuren bei Ratten zu einer vermehrten Lipidakkumulation in den Geweben, insbesondere in der Leber und dem Skelettmuskel, führt und dass dieser Befund womöglich durch eine verminderte Fettsäureoxidation verursacht sein könnte [2;33;94]. Nach dieser Annahme hätte in unserem Experiment in der LCT-Gruppe eine vermehrte Veresterung der markierten Palmitinsäure in den Triglyceriden erfolgen und eine höhere Markerkonzentration in den Geweben der LCT-Tiere nachweisbar sein müssen. Dies war jedoch nicht der Fall, denn die geringe Markerkonzentration in den Geweben der LCT-Tiere spricht eher für eine gesteigerte als für eine reduzierte Oxidation der markierten Palmitinsäure. Bereits Randle et al. [80] nahm, zumindest eine anfänglich verstärkte Fettsäureoxidation, insbesondere im Muskel von Ratten, als mögliche Ursache einer reduzierten Glucoseaufnahme, an [82]. Weiterhin konnten in isolierten Rattenmuskeln von adipösen (fa/fa) und schlanken (fa/+) Ratten keine Unterschiede in der prozentualen Palmitatoxidation, aber - bedingt durch eine höhere muskuläre Palmitataufnahme - eine signifikant höhere Gesamtoxidation der Palmitinsäure in den adipösen (fa/fa) Ratten verglichen mit den schlanken (fa/+) Ratten nachgewiesen werden [287]. Zudem war die Glucoseaufnahme in den isolierten Skelettmuskel der adipösen (fa/fa) Ratten um 42 % geringer als bei den schlanken (fa/+) Ratten [287]. Hegarty et al. [264] fanden ebenfalls keine Anzeichen einer verminderten Fettsäureoxidation, sondern wiesen eine Erhöhung der Triglyceridsynthese, einhergehend mit einer erhöhten Fettsäureoxidation, im oxidativen Muskel von hochfettgefütterten insulinresistenten Ratten nach. Für eine höhere Oxidation von neu-anflutenden langkettigen gesättigten Fettsäuren könnten auch die Befunde von Untersuchungen an Myozyten sprechen, in denen die Überexpression der Carnitinpalmityltransferase 1 (CPT1), dem Schüsselenzym des Fettsäuretransports in die Mitochondrien [106], zwar zu einer erhöhten Palmitatoxidation und einer höheren Desoxyglucoseaufnahme führte, jedoch keine Erniedrigung der intrazellulären Triacylglycerid-, Diacylglycerid-, Ceramid- und Acyl-CoA-Konzentrationen nach 4-stündiger Inkubation mit Palmitat nachgewiesen werden konnte [250]. Die Autoren kamen daher zu dem Schluss, dass der positive Effekt einer gesteigerten β -Oxidation auf die Glucoseaufnahme (Insulinsensitivität) unabhängig von der muskulären

Lipidakkumulation ist [250]. Neben einer möglicherweise erhöhten Fettsäureoxidation könnte in der vorliegenden Arbeit auch eine verstärkte Fettsäureelongation und anschließende Desaturierung der markierten Palmitinsäure eine Ursache für die geringe Markerkonzentration in den Geweben der LCT-gefütterten Ratten sein. Die These einer verstärkten Metabolisierung anflutender, langkettiger gesättigter Fettsäuren wird durch Befunde gestützt, die belegen, dass Ratten nach chronischer Fütterung von Hochfettdiäten mit langkettigen Fettsäuren nicht mehr in der Länge sind, die *de novo* Fettsäuresynthese sowie die Fettsäureelongation und Desaturierung zu reduzieren [244;245] (vgl. Kapitel 4.6.4.). Alle diese Befunde stützten die Vermutung einer verstärkten Oxidation und/oder Metabolisierung anflutender langkettiger gesättigter Fettsäuren bei (insulinresistenten) LCT-gefütterten Ratten und deuten auf keine verminderte Fettsäureoxidation im Skelettmuskel dieser Tiere hin. Inwieweit in unseren Experiment eine erhöhte Fettsäureoxidation und/oder verstärkte Elongation der markierten Palmitinsäure und möglicherweise anschließende Desaturierung in den Geweben der LCT-gefütterten Ratten stattgefunden hat, kann allerdings nicht geklärt werden.

Die im Vergleich zur LF- und LCT-Gruppe erhöhte Anreicherung der markierten Palmitinsäure im abdominalen und retroperitonealen Fettgewebe der MCT-Tiere nach der 5-tägigen Applikation mit den Versuchsdiäten deutet auf einen verstärkten Einbau des langkettigen gesättigten Palmitats in die Triglyceride dieser Tiere hin. In einer Zellkulturstudie mit 3T3-L1-Adipozyten wurde gezeigt, dass nach der 24-stündigen Inkubation mit Octanoat dieses in den Triglyceriden gespeichert wurde und vornehmlich in der sn-1,3 Position der Triglyceride wiederzufinden war [288]. Der höhere *Turnover* von Fettsäuren an der sn-1,3 im Vergleich zur sn-2 Position der Triglyceride [288;291], die raschere Oxidation von mittelkettigen Fettsäuren [292] und die Tatsache, dass die MCT-Tiere nachweislich mittelkettige Fettsäure (MCFA) in der Triglyceridfraktion der Fettgewebe gespeichert hatten (vgl. Abbildungen 17 und A3), erlauben die folgende Hypothese: In den Triglyceriden des Fettgewebes der MCT-Ratten finden sich in der sn-1,3 Position der Triglyceride leichter substituier- und oxidierbare MCFA. Da die MCT-Diät kaum langkettige gesättigte Fettsäuren enthielt, könnte die in den letzten 5 Tagen des Experiments mit der Diät verabreichte U-¹³C-Palmitinsäure nach zellulärer Aufnahme in die Adipozyten vermehrt durch einen Teil der in sn-1,3 Position der Triglyceride gespeicherten MCFA ersetzt worden sein, was zu einer höheren Konzentration der markierten Palmitinsäure bei den MCT-Tieren

geführt haben könnte. Im Fettgewebe der LF- und LCT-gefütterten Ratten waren hingegen die sn-1,3 Positionen der Triglyceride durch schwerer substituierbare langkettige Fettsäuren besetzt, so dass der Marker hier nicht so stark in der Triglyceridfraktion substituiert wurde.

Um die Gewebekonzentration des Markers zwischen den drei Gruppen vergleichen zu können, wurde in allen drei Versuchsdiäten die gleiche (absolute) Menge an markierter Palmitinsäure gefüttert. Somit war jedoch der prozentuale Anteil der markierten Palmitinsäure am Gesamtpalmitatpool der Diät in der LCT-Gruppe geringer als in der LF- und MCT-Gruppe. Geht man in der LCT-Gruppe von einer schlechteren Absorption der Nahrungsfette aus, könnte gegebenenfalls ein geringerer Anteil der markierten Palmitinsäure resorbiert worden sein. Gegen eine schlechtere Resorption der U-¹³C-Palmitinsäure in der LCT-Gruppe spricht allerdings die postprandiale Anflutung des Markers, welches in der Leber und dem oxidativen M. soleus der LCTgefütterten Ratten in einer erhöhten postprandialen U-¹³C-Palmitatkonzentration resultierte (vgl. Abbildungen 20 und 21). Des weiteren ist zu berücksichtigen, dass der Marker als freie Fettsäure dem Futter zugesetzt wurde und somit, im Gegensatz zu den verfütterten Triglyceriden, direkt im Duodenum der Ratten in die Enterozyten gelangen konnte. So zeigten beispielsweise Mansbach & Nevin [293], zumindest für Ölsäure und Triolein, eine nahezu vollständige und sehr schnelle Absorption der freien Fettsäure, welche in Kombination mit der Triglyceridinfusion intraduodenal bei Ratten injiziert wurde. Darüber hinaus wird Palmitat beispielsweise besser als Stearat absorbiert und zu über 90 % in Chylomikronen wiedergefunden, wohingegen gesättigte Fettsäuren mit mehr als 18 Kohlenstoffatomen zu weniger als 20 % in Chylomikronen nachweisbar waren [294]. Auch Bessesen et al. [243] konnten bei der Gabe von markierter Ölsäure, Linolensäure oder Stearinsäure mit einer gemischten Mahlzeit keinen Unterschied in der Konzentration der drei markierten Fettsäuren im Gastrointestinaltrakt von Ratten nachweisen. Durch diese Studien kann auch in unserem Experiment eine gute und in allen drei Gruppen gleichwertige intestinale Absorption der markierten Palmitinsäure angenommen werden. Zudem ist die Calciumkonzentration des Futters, welche aufgrund der Bildung von Calciumseifen insbesondere mit langkettigen gesättigten Fettsäuren einen Einfluss auf die Fettabsorption ausüben könnte [251], als mögliche Ursache einer verminderten Absorption des Markers in der LCT-Gruppe auszuschließen, da die Calciumkonzentration und die parallel verabreichte

Markerkonzentration in allen drei Versuchsdiäten identisch war. Kotanalysen zur Präzision der Annahmen wurden allerdings nicht durchgeführt.

5.3. Einfluss von Hochfettdiäten auf das Fettsäuremuster der Gewebe

Nach der 4-wöchigen Fütterung der Hochfettdiät mit überwiegend mittelkettigen Fettsäuren wurde ein Teil der MCFA in den Triglyceriden der Rattengewebe gespeichert, im oxidativen M. soleus waren beispielsweise 11,3 % der nachgewiesenen Fettsäuren MCFA (vgl. Abbildung 17). Obwohl MCFA nach der intestinalen Absorption v.a. über die Portalvene zur Leber gelangen und dort vornehmlich oxidiert werden [181], konnte auch in anderen Studien ein Teil enteral verabreichter MCFA in Chylomikronen und Nüchternplasmatriglyceriden gefunden werden [182;220]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass MCFA nicht vollständig in der Leber oxidiert werden [201], sondern zu geringen Anteilen in Triglyceriden extrahepatischer Gewebe gespeichert werden [258;295]. Auch in 3T3-L1-Adipozyten wurden MCFA (Octanoat) nach 24-stündiger Inkubation in den Triglyceriden der Adipozyten nachgewiesen und machten dort 10 % der Fettsäurefraktion aus [288]. Die physiologische Bedeutung der peripher gespeicherten MCFA ist nicht bekannt. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Gabe einer MCT-reichen Diät im Fettgewebe von Ratten neben der Speicherung der MCFA in der Triglyceridfraktion zu einer reduzierten Expression von PPAR γ , einem regulatorischen Transkriptionsfaktor für adipogene Gene, führte [258].

In vielen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass sich das Fettsäuremuster der Diät relativ rasch im Fettsäuremuster der gespeicherten Triglyceride und auch der Membranphospholipide widerspiegelt [2;258;296]. Auch in der vorliegenden Arbeit waren die Unterschiede im Fettsäuremuster der Triglyceridfraktion der drei Versuchsgruppen durch die 4-wöchige Vorkonditionierung mit den Versuchsdiäten bedingt, welche beispielsweise nach der Fütterung der beiden Hochfettdiäten zu einer erhöhten Gewebespeicherung gesättigter Fettsäuren führte. Die LF-Ratten wiesen demgegenüber einen höheren prozentualen Anteil der mit dem Futter verabreichten ungesättigten Fettsäuren auf. Allerdings führte die Fütterung der MCT-Diät verglichen mit der LCT-Diät, insbesondere im oxidativen M. soleus und Herzmuskel sowie im abdominalen und retroperitonealen Fettgewebe der Tiere, zu einer geringeren Abnahme

an einfach ungesättigten Fettsäuren und zu einer geringeren Akkumulation von Palmitin- und Stearinsäure (vgl. Abbildung 17).

Die Fettsäurezusammensetzung der Membranphospholipide kann die Insulinsensitivität beeinflussen. So wurde in Tier- und Humanstudien eine Assoziation zwischen der Fettsäurezusammensetzung der Muskelmembranphospholipide und der Insulinwirkung nachgewiesen [297;298]. Die Mechanismen, durch welche die Phospholipidzusammensetzung die Insulinwirkung beeinflussen kann, sind dabei nicht eindeutig geklärt. Eine Rolle könnten Änderungen der Membranfluidität oder eine durch Phospholipasen bedingte Freisetzung von Diacylglyceriden (DAG) spielen, wobei DAG wiederum zelluläre Prozesse z.B. über die Proteinkinase C beeinflussen könnten [1;299-301]. Ein erhöhter Anteil langkettiger gesättigter Fettsäuren im Fettsäureprofil der Phospholipide reduziert im Allgemeinen die Membranfluidität, wobei der erhöhte Anteil langkettiger gesättigter Fettsäuren durch die externe Zufuhr, Stoffwechselmodifikationen oder erhöhte Desaturaseaktivitäten bedingt sein könnte [75;260]. Da der Insulinrezeptor in die Lipidmembran der Zelle eingebettet ist, könnten Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung der Membranen die Zugänglichkeit zum Rezeptor, die Insulinbindung oder aber dessen Aktivität beeinflussen [302]. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) mit einer stärkeren Insulinwirkung korrelieren, wohingegen eine Erniedrigung des PUFA-Gehalts in den Phospholipiden die entgegengesetzte Wirkung zeigte [2;297;299;303-305]. In unserer Studie konnten Unterschiede zwischen den drei Diätgruppen in der Summe der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren in den Phospholipiden, insbesondere des oxidativen M. soleus und Herzmuskels, nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 18), wobei der Skelettmuskel als Hauptort der insulinstimulierten Glucoseaufnahme eine wichtige Einflussgröße bei Störungen der Insulinsensitivität einnimmt [32] und der Herzmuskel bis zu 70 % seiner Energie aus der Fettsäureoxidation gewinnen kann [306]. In der Phospholipidfraktion der LCT-Tiere konnte darüber hinaus ein geringerer Gehalt an einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA) und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) verglichen mit den MCT- und LF-Tieren nachgewiesen werden. Möglicherweise nehmen nicht nur PUFA sondern auch MUFA, trotz ihres geringen Vorkommens in der Phospholipidfraktion der Gewebe, eine sensible Stellung bei der fettinduzierten Insulinresistenz ein. Denn auch in der Leber und dem M. gastrocnemius wurde nach der 4-wöchigen Fütterung der LCT-Diät, im Gegensatz zur MCT- und LF-Diät, ein geringerer MUFA-Anteil in den

Phospholipiden gefunden, wohingegen der PUFA-Gehalt der Phospholipidfraktion der Leber und des *M. gastrocnemius* keine Unterschiede zwischen den Gruppen aufwies (vgl. Abbildungen 18, A4 und A5). Die Konzentration der MUFA in den Phospholipiden der o.g. insulin sensitiven Gewebe wies dabei eine ähnliche Abstufung auf (LF > MCT > LCT), wie die Glucoseinfusionsrate während des EHC, als Maß für die Insulinsensitivität eines Organismus [54] (vgl. Abbildung 31).

5.4. Einfluss von Hochfettdiäten auf postprandiale

Plasmametabolite nach einer fettreichen Testmahlzeit

Neben einer erhöhten Nüchterntriglyceridkonzentration sind insbesondere erhöhte postprandiale Triglyceridspiegel mit einer Insulinresistenz assoziiert [307;308]. Als Ursachen hierfür werden eine geringere LPL-Aktivität und die dadurch verminderte Aufnahme von freien Fettsäuren in das Fettgewebe, sowie eine fehlende Suppression der Freisetzung von freien Fettsäuren aus dem Fettgewebe im postprandialen Zustand diskutiert [309]. In unserer Studie führte die 4-wöchige Fütterung der LCT-Diät verglichen mit der LF- und MCT-Diät zu Veränderungen im postprandialen Triglyceridprofil. Dazu zählten ein später erreichtes Triglyceridmaximum, ein stärkerer Triglyceridanstieg und eine größere Fläche unterhalb der Triglyceridkonzentrationszeitkurve. Auch wenn die Unterschiede nicht signifikant waren, deuten sie auf beginnende Störungen des Lipidstoffwechsels bei den LCT-Tieren hin. Die postprandialen Glucose- und Insulinkonzentrationen unterschieden sich hingegen nicht zwischen den Gruppen. Die Kohlenhydratquelle der fettreichen Mahlzeit (OMTT) war hauptsächlich Saccharose und wenig Laktose, welche zusammen 29,6 % der Energie ausmachten. Bezüglich der Kohlenhydratquelle der fettreichen Mahlzeit (OMTT) soll kurz erwähnt werden, dass neben der bislang diskutierten Hypothese zur Entstehung einer fettinduzierten Insulinresistenz auch die Fütterung von Diäten mit einem hohen Anteil an Saccharose oder Fruktose zu einer verminderten Insulinsensitivität z.B. bei Ratten führt [75;310-312]. Auf dieses Thema wird jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht näher eingegangen. Einundfünfzig Prozent der Energie der Testmahlzeit (OMTT) stammte aus Fett. Grundsätzlich ist die Frage zu stellen, inwieweit der verwendete OMTT, der aus dem Humanbereich stammt [230-232] (vgl. Kapitel 3.1.2.) bei Ratten geeignet war, um die durch diätetische Vorkonditionierung verursachten Veränderungen hinsichtlich der postprandialen Konzentrationen von Plasmametaboliten zu untersuchen.

Wird das metabolische Körpergewicht der Ratten und die im Humanbereich üblicherweise verabreichten 500 ml (1017 kcal) Testtrunk berücksichtigt, hätte den Ratten bei einer vergleichbaren Energieaufnahme 21 kcal appliziert werden müssen. Tatsächlich konnte den Tiere bei einmaliger Mahlzeitengabe jedoch nur 3 g des Trunks (12,2 kcal) verabreicht werden. Nur durch die ausschließliche Gabe eines Fettbolus hätte bei den Ratten eine dem Menschen vergleichbare Energieaufnahme im Bezug auf das metabolische Körpergewicht erreicht werden können, welche möglicherweise zu deutlicheren Unterschieden im postprandialen Triglyceridprofil der Ratten geführt hätte. Auch die Katheterimplantierung (postoperativer Stress der Tiere) könnte, trotz der 48-stündigen Erholungsphase, die Ergebnisse beeinflusst haben. Dennoch konnte zumindest in Humanstudien eine durch MCT-Fette, verglichen mit LCT-Fetten, bedingte Reduktion der postprandialen Triglyceridkonzentration nach einer fettreichen Mahlzeit nachgewiesen werden [214;313].

5.5. Weiterführende Aspekte zur Insulinresistenz

Die vorliegende Arbeit konnte nur einen geringen Teilaspekt der Insulinresistenz, der möglichen Mechanismen ihrer Entstehung und ihrer eventuellen Prävention durch die Substitution langkettiger gegen mittelkettige gesättigte Fettsäuren in der Diät berücksichtigen. Neben der Leber und dem Skelettmuskel als wichtigen insulinsensitiven (*insulin responsive*) Organen, wurde auch das Fettgewebe als wichtiges sekretorisches Organ von Hormonen und Zytokinen untersucht und diskutiert. Darüber hinaus sind jedoch noch weitere Organe bei der Beeinflussung des Fett- und Glucosestoffwechsels von Bedeutung. Neben dem Pankreas mit den insulinsezernierenden β -Zellen wird dem Gehirn in jüngster Zeit zunehmend eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Glucose- und Fettstoffwechsels zugesprochen [314]. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die intracerebroventrikuläre Infusion von Insulin die hepatische Insulinsensitivität verbessert [315] und die 7-tägige Hemmung der Insulinsignalkaskade im Hypothalamus zur hepatischen Insulinresistenz mit einhergehender erhöhter hepatischer Glucoseproduktion bei Ratten führt [315;316]. Auch eine Hemmung der Carnitinpalmitoyltransferase 1 (CPT1) und die dadurch bewirkte akute Erhöhung der AcylCo-A-Konzentration im Hypothalamus scheint neben der Regulation der Nahrungsaufnahme die hepatische Insulinsensitivität zu verbessern [317]. Diese Regulation des hepatischen Glucosestoffwechsels durch den lipidsensitiven

(*lipid sensing*) Hypothalamus kann durch eine Vagotomie blockiert werden [318]. Darüber hinaus wurden in der vorliegenden Arbeit keine Medikamente diskutiert, welche beispielsweise die Insulinsensitivität verbessern. So ist bekannt, dass z.B. PPAR γ -Agonisten wie Gliazone zu einer erhöhten Insulinsensitivität bei hochfettgefütterten insulinresistenten Ratten mit einhergehenden verminderten Acyl-CoA- und Triglyceridkonzentrationen im Skelettmuskel der Tiere führen [96;319].

5.6. Übertragbarkeit der Studienergebnisse auf den Menschen

Bei der Interpretation der an Ratten erhobenen Studienergebnisse für die Situation beim Menschen muss bedacht werden, dass die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen kritisch zu betrachten ist. So kann die hochfettgefütterte, insulinresistente Ratte, obwohl sie als Modell für das Metabolische Syndrom anerkannt ist [1], nicht als komplettes Modell für den humanen Diabetes Mellitus Typ 2 gelten, da die Tiere z.B. keine erhöhten basalen Glucose- und Insulinspiegel, wie sie für Typ 2-Diabetes charakteristisch sind, aufweisen [7]. Darüber hinaus existieren Unterschiede im Metabolismus von Ratten und Menschen. Zum Beispiel führt die PPAR α -Aktivierung in der Leber von Ratten zu einer starken Stimulation der peroxisomalen Proliferation, wohingegen beim Menschen nur marginale Effekte sichtbar werden, die erklären, warum Clofibrate als potente PPAR α -Liganden keinen proliferativen Effekt beim Menschen ausüben [75]. Die Komplexität der pathophysiologischen Veränderungen bei der fettinduzierten Insulinresistenz wird zudem noch vergrößert, indem Hinweise auf geschlechtsspezifische Unterschiede bei der fettinduzierten Insulinresistenz bei Ratten hindeuten [320] und ein Grossteil der durchgeführten Rattenstudien zur Ermittlung der Insulinsensitivität lediglich an männlichen Tieren durchgeführt wurde. Auch die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Expression putativer fettsäurebindender Proteine [321;322] und der Fruktose-induzierten Insulinresistenz [323] sprechen für eine eingeschränkte Übertragbarkeit der Studienergebnisse auf den Menschen. In der vorliegenden Arbeit wurde zudem lediglich der Einfluss einer 4-wöchigen Fütterungsperiode auf die Entstehung einer fettinduzierten Insulinresistenz bei den Ratten untersucht. Da eine längerfristige Fütterung der Hochfettdiäten die Insulinsensitivität und Fettassimilation der Ratten abweichend modifizieren könnte, ist auch diesbezüglich keine direkte Übertragbarkeit auf den Menschen zu empfehlen.

Tatsache ist allerdings, dass in den letzten Dekaden die Energiedichte der Mahlzeiten in den hochindustrialisierten Nationen kontinuierlich zugenommen hat und Fette in der westlichen Diät inzwischen ca. 40 % der täglichen Energieaufnahme ausmachen. Die diätetischen Fette enthalten dabei hauptsächlich langkettige Fettsäuren mit 16 oder mehr C-Atomen [259;324]. Ein Überangebot an diesen Fetten, den daraus freigesetzten Fettsäuren und ihren Derivaten trägt zur Entstehung einer Insulinresistenz bei [76;259], die ein Indikator für einen möglicherweise später auftretenden Diabetes Mellitus Typ 2 ist [325-327]. Aufgrund der kontinuierlich zunehmenden Prävalenz von Typ 2-Diabetes und dem dadurch bedingten Anstieg der Krankheits- und Folgekosten werden u.a. Präventionsmaßnahmen im Bereich der Ernährung diskutiert. Einen Beitrag dazu könnte auch die Substitution langkettiger Fettsäuren durch mittelkettige Fettsäuren liefern. Die von uns durchgeführten Rattenstudien haben gezeigt, dass eine isokalorische Hochfettdiät mit mittelkettigen Fettsäuren, verglichen mit einer Hochfettdiät mit langkettigen gesättigten Fettsäuren, zu einer weniger stark ausgeprägten Insulinresistenz (höhere Glucoseinfusionsrate während des EHC) führt und die damit einhergehenden untersuchten pathophysiologischen Veränderungen in der Fettassimilation weniger stark ausgeprägt waren (z.B. ein nachweislich geringerer Gehalt an PUFA und MUFA in den Phospholipiden des M. Soleus und Herzmuskels, was mit einer höheren Membranfluidität verbunden sein kann). Diese Ergebnisse sprechen grundsätzlich für den Einsatz von MCT-Fetten in der Humanernährung als präventionsunterstützende Maßnahme im Kontext des Metabolischen Syndroms. Allerdings muss beachtet werden, dass die Menge der im Rattenexperiment eingesetzten MCT-Fette im Humanbereich nicht realisierbar ist. So ist beispielsweise der Anteil der möglichen substituierbaren diätetischen Fette in der menschlichen Ernährung beschränkt, da wahrscheinlich lediglich flüssige Speiseöle mit einem günstigen Fettsäureprofil und einem Großteil einfach- und mehrfach ungesättigter Fettsäuren, z.B. im Salatdressing, durch flüssige MCT-Öle substituiert werden können, wohingegen gesättigte Fettsäuren größtenteils versteckt in komplexen Lebensmitteln und Produkten vorkommen, und sich nicht so einfach substituieren lassen. Letztendlich sollte zudem bedacht werden, dass diätetische Maßnahmen nicht die einzige Möglichkeit darstellen, um der steigenden Prävalenz der Adipositas und dem Typ 2-Diabetes entgegenzuwirken. Insbesondere vermehrte körperliche Aktivität trägt dazu bei, die Entstehung einer Insulinresistenz zu verhindern bzw. die Insulinsensitivität bei Risikopersonen zu verbessern [34;328].

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese geprüft, ob eine Substitution von langkettigen gesättigten Fettsäuren durch mittelkettige gesättigte Fettsäuren in Hochfettdiäten bei *ad libitum*-Fütterung zu einer verminderten Insulinresistenz bei Ratten führt und in wieweit sich dieses durch eine veränderte Fettassimilation der Versuchsfette (MCT vs. LCT) begründen lässt. Als Kontrolle diente eine isokalorische Niedrigfettdiät (LF). Zur Aufklärung der pathophysiologischen Veränderungen bei der Entstehung einer Insulinresistenz wurde nach 4-wöchiger Fütterungsperiode (1) die Insulinsensitivität der Tiere durch einen hyperinsulinämischen-euglycämischen Clamp ermittelt, (2) die Expression von putativen Fettsäuretransportern im Skelettmuskel und der Dünndarmmucosa auf transkriptioneller Ebene quantifiziert, (3) das Fettsäuremuster der Triglycerid- und Phospholipidfraktion der Gewebe analysiert, (4) die Anreicherung einer stabil markierten langkettigen gesättigten Fettsäure in den Geweben nach der chronischen Applikation mit dem Futter bzw. nach der einmaligen Gabe mit einer fettreichen Testmahlzeit untersucht und (5) die postprandialen Verläufe von Plasmametaboliten der Ratten analysiert.

Nach 4-wöchiger Fütterung der MCT-Diät konnte eine im Vergleich zur LCT-Diät höhere Insulinsensitivität der Tiere nachgewiesen werden. In der Phospholipidfraktion der oxidativen Skelettmuskulatur und des Herzmuskels wurde bei den MCT-gefütterten Ratten im Vergleich zu den LCT-gefütterten Ratten ein höherer Gehalt an einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren gefunden. Auch die postprandialen Triglyceridspiegel der MCT-gefütterten Ratten waren nach der Gabe einer standardisierten fetthaltigen Testmahlzeit tendenziell niedriger als die der LCT-gefütterten Ratten.

Nach 4-wöchiger Fütterung der LCT-Diät konnte in der Leber und dem oxidativen Skelettmuskel der Ratten, im Vergleich zur MCT-Diät, 5 Stunden nach der Gabe einer standardisierten fetthaltigen Testmahlzeit eine schnellere Anflutung von U-¹³C-markierter Palmitinsäure nachgewiesen werden. Auch die Expression (m-RNA-Konzentration) des putativen fettsäuretransportierenden Proteins FATP war im oxidativen Muskel der LCT-gefütterten Ratten höher als bei den MCT-gefütterten Ratten. Die vermehrte Aufnahme langkettiger gesättigter Fettsäuren in den Skelettmuskel, der erniedrigte PUFA-Gehalt der Phospholipide in der Muskulatur und

die tendenziell erhöhten postprandialen Triglyceridspiegel bei den LCT-gefütterten Ratten stimmen mit Befunden anderer Studien zum Einfluss von Hochfettdiäten mit langkettigen Fettsäuren bei der Entstehung einer Insulinresistenz überein. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit keine Triglyceridakkumulation und, nach 5-tägiger Gabe der U-¹³C-Palmitinsäure mit den Versuchsdiäten, keine erhöhte Akkumulation des markierten Palmitats in den Geweben der LCT-gefütterten Ratten nachgewiesen werden, obwohl der Gehalt an unmarkierter Palmitin- und Stearinsäure in der Triglyceridfraktion der Gewebe dieser Tiere höher war als bei den MCT- und LF-gefütterten Tieren.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die 4-wöchige Fütterung einer Hochfettdiät mit mittelkettigen gesättigten Fettsäuren bei Ratten zu geringeren pathophysiologischen Veränderungen und zu einer schwächer ausgeprägten Insulinresistenz führt als die 4-wöchige Fütterung einer isokalorischen Hochfettdiät mit langkettigen gesättigten Fettsäuren, d.h. die MCT-Versuchsfette scheinen im Vergleich zu den eingesetzten LCT-Fetten die Entstehung einer Insulinresistenz zumindest zu verzögern. Im Gegensatz zu bisherigen publizierten Studien, unterschieden sich die experimentellen Fette lediglich in der Fettsäurekettenlänge und nicht zusätzlich in dem Grad der Sättigung der verwendeten Fettsäuren. Ob eine Hochfettdiät mit überwiegend mittelkettigen Fettsäuren die Entstehung einer Insulinresistenz allerdings verhindern kann, bleibt fraglich. Zum einen führte die 4-wöchige Fütterung der MCT-Hochfettdiät im Vergleich zur Niedrigfett (LF)-Diät zu einer verminderten Insulinsensitivität der Ratten, auch wenn diese noch deutlicher ausgeprägt war als nach Verfütterung der LCT-Hochfettdiät. Zum anderen wurde in der vorliegenden Arbeit lediglich der Einfluss einer 4-wöchigen Fütterungsperiode auf die Insulinsensitivität der Tiere untersucht. Wie sich eine längerfristige Fütterung von Hochfettdiäten auf die Insulinsensitivität und die Fettassimilation bei Ratten auswirkt, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beantwortet werden.

7. Summary

The present study was aimed to investigate the effect of high fat diets with either medium or long chain saturated triglycerides (MCT vs. LCT) on insulin resistance and fat assimilation in rats. Therefore, the subsequent parameters were examined in rats after a 4-week *ad libitum* feeding period on high fat diets, compared to an isocaloric low fat (LF) diet: (1) total body insulin sensitivity by means of the glucose infusion rate during hyperinsulinemic euglycemic clamping, (2) the expression of putative fatty acid transport and/or binding proteins in skeletal muscle, (3) the fatty acid pattern of tissue triglycerides and phospholipids, (4) the accumulation of ^{13}C -labelled palmitic acid in various tissues after a single and chronic (5-day period) application, and (5) the postprandial profile of plasma metabolites.

Feeding of the MCT diet over a period of 4 weeks resulted in a higher insulin sensitivity compared with the LCT diet. Furthermore, phospholipids isolated from oxidative skeletal as well as heart muscle of the MCT animals contained a higher portion of mono- and polyunsaturated fatty acids (MUFA and PUFA) compared with the LCT diet. In addition, postprandial plasma triglycerides tended to be lower in MCT-fed rats as compared to LCT-fed rats.

In contrast to the MCT-fed rats, a higher accumulation of ^{13}C -palmitic acid as a marker for long chain saturated fatty acids occurred in liver and oxidative skeletal muscle in LCT-fed rats, 5 hours after feeding a high fat mixed meal. Furthermore, expression of fatty acid transport protein (FATP) was higher in oxidative muscle of LCT-fed rats in comparison to MCT-fed rats. The observation of increased fatty acid uptake and decreased PUFA content in phospholipids of oxidative muscle as well as the trend towards increased postprandial TG levels in LCT-fed rats are consistent with data from published studies dealing with the influence of high fat diets on insulin resistance. In contrast to the current hypothesis of induction of insulin resistance by long chain fatty acids, however, we did not find a higher accumulation of ^{13}C -labelled palmitic acid in LCT-fed rats after 5-day chronic tracer administration with the experimental diet. Furthermore, triglycerides did not accumulate in insulin sensitive tissues after feeding the LCT diet, compared with the MCT and LF diet.

In summary the results indicate that feeding a high fat MCT diet for 4 weeks results in less pathophysiologic changes and a weaker insulin resistance than feeding the high fat LCT diet. Furthermore, in the present study, the differences found in the assimilation of dietary fat can be solely attributed to differences in chain length of dietary saturated fatty acids and are not hampered by possible influences of various amounts of MUFA and PUFA, which can be often found in the literature.

It remains, however, questionable whether a high fat MCT diet really could prevent insulin resistance, because a 4-week feeding period resulted in a somewhat impaired insulin sensitivity as compared to the LF diet, although the alterations were less pronounced than after feeding the LCT diet. It appears, however, that MCT vs. LCT fat may at least delay the development of insulin resistance caused by a high fat intake. Because only the effect of a 4 week feeding period was investigated in the present study, the effects of such diets after a more prolonged feeding can not be judged.

Literaturverzeichnis

- (1) Kraegen EW, Cooney GJ, Ye J, Thompson AL. Triglycerides, fatty acids and insulin resistance - hyperinsulinemia. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 2001; 109(4):S516-S526
- (2) Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, Pascoe WS, Khouri S, Kraegen EW. Influence of dietary-fat composition on development of insulin resistance in rats - Relationship to muscle triglyceride and omega-3-fatty-acids in muscle phospholipid. *Diabetes* 1991; 40(2):280-289
- (3) Manco M, Bertuzzi A, Salinari S, Scarfone A, Calvani M, Greco AV, Mingrone G. The ingestion of saturated fatty acid triacylglycerols acutely affects insulin secretion and insulin sensitivity in human subjects. *British Journal of Nutrition* 2004; 92(6):895-903
- (4) Folsom AR, Ma J, McGovern PG, Eckfeldt JH. Relation between plasma phospholipid saturated fatty acids and hyperinsulinemia. *Metabolism* 1996; 45(2):223-228
- (5) Hunnicutt JW, Hardy RW, Williford J, McDonald JM. Saturated fatty-acid induced insulin-resistance in rat adipocytes. *Diabetes* 1994; 43(4):540-545
- (6) Manco M, Mingrone G, Greco AV, Capristo E, Gniuli D, De Gaetano A, Gasbarrini G. Insulin resistance directly correlates with increased saturated fatty acids in skeletal muscle triglycerides. *Metabolism-Clinical and Experimental* 2000; 49(2):220-224
- (7) Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ, Storlien LH. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat fed rats. *Diabetes* 1991; 40(11):1397-1403
- (8) Schrezenmeir J. Hyperinsulinemia, hyperproinsulinemia and insulin resistance in the metabolic syndrome. *Experientia* 1996; 52(5):426-432
- (9) Reaven GM. Role of insulin resistance in human-disease. *Diabetes* 1988; 37(12):1595-1607
- (10) DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance - A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular-disease. *Diabetes Care* 1991; 14(3):173-194
- (11) Reaven GM. Insulin resistance/compensatory hyperinsulinemia, essential hypertension, and cardiovascular disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88(6):2399-2403
- (12) Obesity and Overweight. WHO fact sheet 2003
- (13) MONICA Project Region Augsburg. Dietary surveys 1984/85 and 1994/95 in middle-aged men from the city of Augsburg (in German). GSF-Bericht 1998
- (14) Schneider R. Relevance and Costs of obesity in Germany (in German). *Ernährungsumschau* 1996;43:369-374
- (15) King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025 - Prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998; 21(9):1414-1431
- (16) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs236/en/>, 21 12 2004
- (17) Statistisches Bundesamt. Gesundheitsbericht für Deutschland: Gesundheitsberichterstattung des Bundes Metzler-Poeschel, Stuttgart 1998
- (18) Liebl A, Neiss A, Spannheimer A, Reitberger U, Wagner T, Gortz A. Costs of type 2 diabetes in Germany - Results of the CODE-2 (R) Study. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 2001; 126(20):585-589

- (19) Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H. Mortality and causes of death in the WHO multinational study of vascular disease in diabetes. *Diabetologia* 2001; 44:S14-S21
- (20) Statistisches Bundesamt. Fortschreibung des Bevölkerungsstandes und Todesursachenstatistik 2003
- (21) <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/diabetes/en/>, 21.12.2004
- (22) Frayn KN. Adipose tissue and the insulin resistance syndrome. *Proceedings of the Nutrition Society* 2001; 60(3):375-380
- (23) Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA, Stern MP. Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (Syndrome-X). *Diabetes* 1992; 41(6):715-722
- (24) Kaplan NM. The deadly quartet - Upper-body obesity, glucose-intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Archives of Internal Medicine* 1989; 149(7):1514-1520
- (25) Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus - Provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine* 1998; 15(7):539-553
- (26) Jager A, Kostense PJ, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CDA. Microalbuminuria is strongly associated with NIDDM and hypertension, but not with the insulin resistance syndrome: the Hoorn study. *Diabetologia* 1998; 41(6):694-700
- (27) Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) *Jama-Journal of the American Medical Association* 2001; 285:2486-2497
- (28) McGarry JD. What if Minkowski had been ageusic - An alternative angle on diabetes. *Science* 1992; 258(5083):766-770
- (29) Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365(9468):1415-1428
- (30) Jeppesen J, Hollenbeck CB, Zhou MY, Coulston AM, Jones C, Chen YDI, Reaven GM. Relation between insulin-resistance, hyperinsulinemia, postheparin plasma-lipoprotein lipase activity, and postprandial lipemia. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1995; 15(3):320-324
- (31) Robinson DS, Cryer A, Davies P. Role of clearing-factor lipase (lipoprotein-lipase) in transport of plasma triglycerides. *Proceedings of the Nutrition Society* 1975; 34(3):211-215
- (32) DeFronzo RA. The triumvirate - Beta-cell, muscle, liver - A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 1988; 37(6):667-687
- (33) Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, Kraegen EW. Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes* 1997; 46(11):1768-1774
- (34) Oakes ND, Bell KS, Furler SM, Camilleri S, Saha AK, Ruderman NB, Chisholm DJ, Kraegen EW. Diet-induced muscle insulin resistance in rats is ameliorated by acute dietary lipid withdrawal or a single bout of exercise - Parallel relationship between insulin stimulation of glucose uptake and suppression of long-chain fatty acyl-CoA. *Diabetes* 1997; 46(12):2022-2028
- (35) Storlien LH, Oakes ND, Pan DA, Kusunoki M, Jenkins AB. Syndromes of insulin resistance in the rat - Inducement by diet and amelioration with benfluorex. *Diabetes* 1993; 42(3):457-462
- (36) Furler SM, Poynten AM, Kriketos AD, Lowy AJ, Ellis BA, MacLean EL, Courtenay BG, Kraegen EW, Campbell LV, Chisholm DJ. Independent influences of central fat and skeletal muscle lipids on insulin sensitivity. *Obesity Research* 2001; 9(9):535-543

- (37) Boden G, Lebed B, Schatz M, Homko C, Lemieux S. Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects. *Diabetes* 2001; 50(7):1612-1617
- (38) Krssak M, Petersen KF, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, Shulman GI, Roden M. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a H-1 NMR spectroscopy study (Rapid communication) (vol 42, pg 113, 1999). *Diabetologia* 1999; 42(10):1269
- (39) Abate N, Garg A. Heterogeneity in adipose-tissue metabolism - Causes, implications and management of regional adiposity. *Progress in Lipid Research* 1995; 34(1):53-70
- (40) Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: Their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews* 2000; 21(6):697-738
- (41) Richelsen B, Pedersen SB, Mollerpedersen T, Bak JF. Regional differences in triglyceride breakdown in human adipose-tissue - Effects of catecholamines, insulin, and prostaglandin-E2. *Metabolism* 1991; 40(9):990-996
- (42) Vague J. The degree of masculine differentiation of obesities - A factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 1956; 4(1):20-34
- (43) Vague J. La differenciation sexuelle facteur determinant des formes de lobesite. *Presse Medicale* 1947; 55(30):339-340
- (44) Kalmijn S, Curb JD, Rodriguez BL, Yano K, Abbott RD. The association of body weight and anthropometry with mortality in elderly men: The Honolulu heart program. *International Journal of Obesity* 1999; 23(4):395-402
- (45) Folsom AR, Kaye SA, Sellers TA, Hong CP, Cerhan JR, Potter JD, Prineas RJ. Body-fat distribution and 5-year risk of death in older women (VOL 269, PG 483, 1993). *Jama-Journal of the American Medical Association* 1993; 269(10):1254
- (46) Fontbonne A, Thibault N, Eschwege E, Ducimetiere P. Body-fat distribution and coronary heart-disease mortality in subjects with impaired glucose-tolerance or diabetes-mellitus - The Paris prospective-study, 15-year follow-up. *Diabetologia* 1992; 35(5):464-468
- (47) Frayn KN. Visceral fat and insulin resistance - Causative or correlative? *British Journal of Nutrition* 2000; 83:S71-S77
- (48) Thomas EL, Saeed N, Hajnal JV, Brynes A, Goldstone AP, Frost G, Bell JD. Magnetic resonance imaging of total body fat. *Journal of Applied Physiology* 1998; 85(5):1778-1785
- (49) Arner P. Regional adiposity in man. *Journal of Endocrinology* 1997; 155(2):191-192
- (50) Engfeldt P, Arner P. Lipolysis in human adipocytes, effects of cell size, age and of regional differences. *Horm Metab Res Suppl* 1988; 19:26-29
- (51) Tavernier G, Galitzky J, Valet P, Remaury A, Bouloumie A, Lafontan M, Langin D. Molecular mechanisms underlying regional variations of catecholamine-induced lipolysis in rat adipocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 1995; 31(6):E1135-E1142
- (52) Lefebvre AM, Laville M, Vega N, Riou JP, van Gaal L, Auwerx J, Vidal H. Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes* 1998; 47(1): 98-103
- (53) Ferrannini E, Haffner SM, Mitchell BD, Stern MP. Hyperinsulinemia - The key feature of a cardiovascular and metabolic syndrome. *Diabetologia* 1991; 34(6):416-422

- (54) DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique - Method for quantifying insulin-secretion and resistance. *American Journal of Physiology* 1979; 237(3):E214-E223
- (55) Garg A, Misra A. Lipodystrophies: Rare disorders causing metabolic syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2004; 33(2):305-331
- (56) Campbell PJ, Carlson MG, Nurjhan N. Fat-Metabolism in human obesity. *American Journal of Physiology* 1994; 266(4):E600-E605
- (57) Coppack SW, Evans RD, Fisher RM, Frayn KN, Gibbons GF, Humphreys SM, Kirk ML, Potts JL, Hockaday TDR. Adipose-tissue metabolism in obesity - Lipase action in vivo before and after a mixed meal. *Metabolism-Clinical and Experimental* 1992; 41(3):264-272
- (58) Lewis GF, Omeara NM, Soltys PA, Blackman JD, Iverius PH, Druetzler AF, Getz GS, Polonsky KS. Postprandial lipoprotein metabolism in normal and obese subjects - Comparison after the vitamin-A fat-loading test. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1990; 71(4):1041-1050
- (59) Foufelle F, Ferre P. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochemical Journal* 2002; 366:377-391
- (60) Brunzell JD, Hokanson JE. Dyslipidemia of central obesity and insulin resistance. *Diabetes Care* 1999; 22:C10-C13
- (61) Taghibiglou C, Rashid-Kolvear F, Van Iderstine SC, Le Tien H, Fantus IG, Lewis GF, Adeli K. Hepatic very low density lipoprotein-ApoB overproduction is associated with attenuated hepatic insulin signaling and overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in a fructose-fed hamster model of insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(1):793-803
- (62) Frayn KN. Regulation of fatty acid delivery in vivo. *Skeletal Muscle Metabolism in Exercise and Diabetes* 1998; 441:171-179
- (63) Boden G, Chen XH, Rosner J, Barton M. Effects of a 48-h fat infusion on insulin-secretion and glucose-utilization. *Diabetes* 1995; 44(10):1239-1242
- (64) Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 97(12):2859-2865
- (65) Boden G, Chen XH. Effects of fat on glucose-uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes. *Journal of Clinical Investigation* 1995; 96(3):1261-1268
- (66) Cooney GJ, Thompson AL, Furler SM, Ye J, Kraegen EW. Muscle long-chain acyl CoA esters and insulin resistance. *Lipids and Insulin Resistance: the Role of Fatty Acid Metabolism and Fuel Partitioning* 2002; 967:196-207
- (67) Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 1999; 48(6):1270-1274
- (68) Kim JK, Youn JH. Prolonged suppression of glucose metabolism causes insulin resistance in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 1997; 35(2):E288-E296
- (69) Chalkley SM, Hettiarachchi M, Chisholm DJ, Kraegen EW. Five-hour fatty acid elevation increases muscle lipids and impairs glycogen synthesis in the rat. *Metabolism-Clinical and Experimental* 1998; 47(9):1121-1126

- (70) Ellis BA, Poynten A, Lowy AJ, Furler SM, Chisholm DJ, Kraegen EW, Cooney GJ. Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2000; 279(3):E554-E560
- (71) Chalkley SM, Hettiarachchi M, Chisholm DJ, Kraegen EW. Long-term high-fat feeding leads to severe insulin resistance but not diabetes in Wistar rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2002; 282(6):E1231-E1238
- (72) Storlien LH, Kraegen EW, Chisholm DJ, Ford GL, Bruce DG, Pascoe WS. Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. *Science* 1987; 237(4817):885-888
- (73) Luo J, Rizkalla SW, Vidal H, Oppert JM, Colas C, Boussairi A, Guerre-Millo M, Chapuis AS, Chevalier A, Durand G, Slama G. Moderate intake of n-3 fatty acids for 2 months has no detrimental effect on glucose metabolism and could ameliorate the lipid profile in type 2 diabetic men - Results of a controlled study. *Diabetes Care* 1998; 21(5):717-724
- (74) Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell LC, Nalsen C, Berglund L, Louheranta A, Rasmussen BM, Calvert GD, Maffetone A, Pedersen E, Gustafsson IB, STORLIEN LH. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU study. *Diabetologia* 2001; 44(3):312-319
- (75) Delarue J, LeFoll C, Corporeau C, Lucas D. n-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity? *Reproduction Nutrition Development* 2004; 44(3):289-299
- (76) Boden G. Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: Significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 2003; 111(3):121-124
- (77) Boden G, Jadali F, White J, Liang Y, Mozzoli M, Chen X, Coleman E, Smith C. Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate-metabolism in normal men. *Journal of Clinical Investigation* 1991; 88(3):960-966
- (78) Santomauro ATMG, Boden G, Silva MER, Rocha DM, Santos RF, Ursich MJM, Strassmann PG, Wajchenberg BL. Overnight lowering of free fatty acids with acipimox improves insulin resistance and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes* 1999; 48(9):1836-1841
- (79) Boden G. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2002; 5(5):545-549
- (80) Randle PJ, Garland PB, Newsholme EA, Hales CN. Glucose fatty-acid cycle - Its role in insulin sensitivity and metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963; 1(728):785-789
- (81) Randle PJ. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: The glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes-Metabolism Reviews* 1998; 14(4):263-283
- (82) Randle PJ, GARLAND PB, Newsholme EA. Regulation of glucose uptake by muscle. 8. Effects of fatty acids ketone bodies + pyruvate + of alloxandibetes + starvation on uptake + metabolic fate of glucose in rat heart + diaphragm muscles. *Biochemical Journal* 1964; 93(3):652-665
- (83) Hirabara SM, Carvalho CRD, Mendonca JR, Haber EP, Fernandes LC, Curi R. Palmitate acutely raises glycogen synthesis in rat soleus muscle by a mechanism that requires its metabolization (Randle cycle). *Febs Letters* 2003; 541(1-3):109-114
- (84) Kim JK, Wi JK, Youn JH. Metabolic impairment precedes insulin resistance in skeletal muscle during high-fat feeding in rats. *Diabetes* 1996; 45(5):651-658
- (85) Boden G, Chen XH, Ruiz J, White JV, Rossetti L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose-uptake. *Journal of Clinical Investigation* 1994; 93(6):2438-2446

- (86) Tutwiler GF, Ryzlak MT. Inhibition of mitochondrial carnitine palmitoyl transferase by 2-tetradecylglycidic acid (MCN-3802). *Life Sciences* 1980; 26(5):393-397
- (87) Roden M, Krssak M, Stingl H, Gruber S, Hofer A, Fornsinn C, Moser E, Waldhausl W. Rapid impairment of skeletal muscle glucose transport/phosphorylation by free fatty acids in humans. *Diabetes* 1999; 48(2):358-364
- (88) Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Journal of Clinical Investigation* 1999; 103(2):253-259
- (89) Wolfe RR. Metabolic interactions between glucose and fatty acids in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 1998; 67(3):519S-526S
- (90) Sidossis LS, Stuart CA, Shulman GI, Lopaschuk GD, Wolfe RR. Glucose plus insulin regulate fat oxidation by controlling the rate of fatty acid entry into the mitochondria. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 98(10):2244-2250
- (91) Laybutt DR, Chisholm DJ, Kraegen EW. Specific adaptations in muscle and adipose tissue in response to chronic systemic glucose oversupply in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 1997; 36(1):E1-E9
- (92) Laybutt DR, SchmitzPeiffer C, Saha A, Ruderman N, Chisholm D, Biden T, Kraegen E. Activation of protein kinase C epsilon may contribute to muscle insulin resistance induced by lipid accumulation during chronic glucose infusion in rats. *Diabetes* 1997; 46:923
- (93) Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Chisholm DJ, Kraegen EW. Fat feeding causes widespread *in vivo* insulin resistance, decreased energy-expenditure, and obesity in rats. *American Journal of Physiology* 1986; 251(5):E576-E583
- (94) Chen MT, Kaufman LN, Spennetta T, Shrago E. Effects of high fat-feeding to rats on the interrelationship of body-weight, plasma-insulin, and fatty acyl-coenzyme-A esters in liver and skeletal-muscle. *Metabolism-Clinical and Experimental* 1992; 41(5):564-569
- (95) Saha AK, Vavvas D, Kurowski TG, Apazidis A, Witters LA, Shafrir E, Ruderman NB. Malonyl-CoA regulation in skeletal muscle: Its link to cell citrate and the glucose-fatty acid cycle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 1997; 35(4):E641-E648
- (96) Oakes ND, Kennedy CJ, Jenkins AB, Laybutt DR, Chisholm DJ, Kraegen EW. A new antidiabetic agent, BRL-49653, reduces lipid availability and improves insulin action and glucoregulation in the rat. *Diabetes* 1994; 43(10):1203-1210
- (97) Svedberg J, Bjorntorp P, Smith U, Lonnroth P. Free fatty-acid inhibition of insulin binding, degradation, and action in isolated rat hepatocytes. *Diabetes* 1990; 39(5):570-574
- (98) Gonzalezmanchon C, Ayuso MS, Parrilla R. Control of hepatic gluconeogenesis - Role of fatty-acid oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1989; 271(1):1-9
- (99) Williamson JR, Kreisber RA, Felts PW. Mechanism for stimulation of gluconeogenesis by fatty acids in perfused rat liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1966; 56(1):247-254
- (100) Ross BD, Hems R, Krebs HA. Rate of gluconeogenesis from various precursors in perfused rat liver. *Biochemical Journal* 1967; 102(3):942-951
- (101) Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM (vol 46, pg 3, 1997). *Diabetes* 1997; 46(3):536

- (102) Puhakainen I, Koivisto VA, Ykijarvinen H. No reduction in total hepatic glucose output by inhibition of gluconeogenesis with ethanol in NIDDM patients. *Diabetes* 1991; 40(10):1319-1327
- (103) Boden G, Cheung P, Mozzoli M. FFA cause hepatic insulin resistance by inhibiting insulin suppression of glycogenolysis. *Diabetes* 2002; 51:A24
- (104) Faergeman NJ, Knudsen J. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochemical Journal* 1997; 323:1-12
- (105) Chien D, Dean D, Saha AK, Flatt JP, Ruderman NB. Malonyl-CoA content and fatty acid oxidation in rat muscle and liver in vivo. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2000; 279(2):E259-E265
- (106) McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system - From concept to molecular analysis. *European Journal of Biochemistry* 1997; 244(1):1-14
- (107) Reddy JK, Mannaerts GP. Peroxisomal lipid-metabolism. *Annual Review of Nutrition* 1994; 14:343-370
- (108) Hamilton JA. Fatty acid transport: difficult or easy? *Journal of Lipid Research* 1998; 39(3): 467-481
- (109) Hamilton JA, Kamp F. How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes* 1999; 48(12):2255-2269
- (110) Stremmel W, Pohl J, Ring A, Herrmann T. A new concept of cellular uptake and intracellular trafficking of long-chain fatty acids. *Lipids* 2001; 36(9):981-989
- (111) Storch J, Thumser AEA. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 2000; 1486(1):28-44
- (112) McArthur MJ, Atshaves BP, Frolov A, Foxworth WD, Kier AB, Schroeder F. Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. *Journal of Lipid Research* 1999; 40(8): 1371-1383
- (113) Elsing C, Gorski J, Boeker C, Stremmel W. Long-chain fatty acid uptake by skeletal myocytes: A confocal laser scanning microscopy study. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1998; 54(7): 744-750
- (114) Stremmel W. Uptake of fatty-acids by jejunal mucosal cells is mediated by a fatty-acid binding membrane-protein. *Journal of Clinical Investigation* 1988; 82(6):2001-2010
- (115) Stremmel W. Fatty-acid uptake by isolated rat-heart myocytes represents a carrier-mediated transport process. *Journal of Clinical Investigation* 1988; 81(3):844-852
- (116) Schwieterman W, Sorrentino D, Potter BJ, Rand J, Kiang CL, Stump D, Berk PD. Uptake of oleate by isolated rat adipocytes is mediated by a 40-kDa plasma-membrane fatty-acid binding-protein closely related to that in liver and gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988; 85(2):359-363
- (117) Stremmel W, Theilmann L. Selective-inhibition of long-chain fatty-acid uptake in short-term cultured rat hepatocytes by an antibody to the rat-liver plasma-membrane fatty acid-binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1986; 877(1):191-197
- (118) Abumrad N, Harmon C, Ibrahim A. Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. *Journal of Lipid Research* 1998; 39(12):2309-2318

- (119) Sorrentino D, Stump DD, VanNess K, Simard A, Schwab AJ, Zhou SL, Goresky CA, Berk PD. Oleate uptake by isolated hepatocytes and the perfused rat liver is competitively inhibited by palmitate. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 1996; 33(2):G385-G392
- (120) Stremmel W, Strohmeyer G, Berk PD. Hepatocellular uptake of oleate is energy-dependent, sodium linked, and inhibited by an antibody to a hepatocyte plasma-membrane fatty-acid binding-protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986; 83(11):3584-3588
- (121) Luiken JJFP, vanNieuwenhoven FA, America G, vanderVusse GJ, Glatz JFC. Uptake and metabolism of palmitate by isolated cardiac myocytes from adult rats: Involvement of sarcolemmal proteins. *Journal of Lipid Research* 1997; 38(4):745-758
- (122) Berk PD, Wada H, Horio Y, Potter BJ, Sorrentino D, Zhou SL, Isola LM, Stump D, Kiang CL, Thung S. Plasma-membrane fatty acid-binding protein and mitochondrial glutamic-oxaloacetic transaminase of rat-liver are related. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990; 87(9):3484-3488
- (123) Febbraio M, Guy E, Coburn C, Knapp FF, Beets AL, Abumrad NA, Silverstein RL. The impact of overexpression and deficiency of fatty acid translocase (FAT)/CD36. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2002; 239(1-2):193-197
- (124) Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, Sharma K, Cheng WL, Pearce SFA, Silverstein RL. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(27):19055-19062
- (125) Gertow K, Skoglund-Andersson C, Eriksson P, Boquist S, Orth-Gomer K, Schenck-Gustafsson K, Hamsten A, Fisher RM. A common polymorphism in the fatty acid transport protein-1 gene associated with elevated post-prandial lipaemia and alterations in LDL particle size distribution. *Atherosclerosis* 2003; 167(2):265-273
- (126) Abumrad N, Coburn C, Ibrahim A. Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1999; 1441(1):4-13
- (127) Abumrad NA, Elmaghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA. Cloning of a rat adipocyte membrane-protein implicated in binding or transport of long-chain fatty-acids that is induced during preadipocyte differentiation - Homology with human CD36. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268(24):17665-17668
- (128) Babbitt J, Trigatti B, Rigotti A, Smart EJ, Anderson RGW, Xu SZ, Krieger M. Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272(20):13242-13249
- (129) Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low-density-lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268(16):11811-11816
- (130) Bonen A, Luiken JJFP, Liu S, Dyck DJ, Kiens B, Kristiansen S, Turcotte LP, van der Vusse GJ, Glatz JFC. Palmitate transport and fatty acid transporters in red and white muscles. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 1998; 38(3):E471-E478
- (131) Glatz JFC, Storch J. Unravelling the significance of cellular fatty acid-binding proteins. *Current Opinion in Lipidology* 2001; 12(3):267-274
- (132) Stremmel W, Strohmeyer G, Borchard F, Kochwa S, Berk PD. Isolation and partial characterization of a fatty-acid binding-protein in rat-liver plasma-membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985; 82(1):4-8

- (133) Schaffer JE, Lodish HF. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long-chain fatty-acid transport protein. *Cell* 1994; 79(3):427-436
- (134) Lewis SE, Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE. Membrane topology of the murine fatty acid transport protein 1. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(40):37042-37050
- (135) Watkins PA, Lu JF, Steinberg SJ, Gould SJ, Smith KD, Braiterman LT. Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* FAT1 gene decreases very long-chain fatty acyl-CoA synthetase activity and elevates intracellular very long-chain fatty acid concentrations. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(29):18210-18219
- (136) Uchiyama A, Aoyama T, Kamijo K, Uchida Y, Kondo N, Orii T, Hashimoto T. Molecular cloning of cDNA encoding rat very long-chain acyl-CoA synthetase. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271(48):30360-30365
- (137) Hirsch D, Stahl A, Lodish HF. A family of fatty acid transporters conserved from *Mycobacterium* to man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95(15):8625-8629
- (138) Kalant D, Cianflone K. Regulation of fatty acid transport. *Current Opinion in Lipidology* 2004; 15(3):309-314
- (139) Brinkmann JFF, Abumrad NA, Ibrahimi A, van der Vusse GJ, Glatz JFC. New insights into long-chain fatty acid uptake by heart muscle: a crucial role for fatty acid translocase/CD36. *Biochemical Journal* 2002; 367:561-570
- (140) Schmitz-Peiffer C. Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply. *Cellular Signalling* 2000; 12(9-10):583-594
- (141) Schmitz-Peiffer C, Browne CL, Oakes ND, Watkinson A, Chisholm DJ, Kraegen EW, Biden TJ. Alterations in the expression and cellular localization of protein kinase C isozymes epsilon and theta are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat-fed rat. *Diabetes* 1997; 46(2):169-178
- (142) Schmitz-Peiffer C. Protein kinase C and lipid-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002;967:146-157
- (143) Kasahara K, Kikkawa U. Distinct effects of saturated fatty-acids on protein-kinase-C subspecies. *Journal of Biochemistry* 1995; 117(3):648-653
- (144) Neshler M, Boneh A. Effect of fatty-acids and their acyl-coa esters on protein-kinase-C activity in fibroblasts - Possible implications in fatty-acid oxidation defects. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1994; 1221(1):66-72
- (145) Orellana A, Hidalgo PC, Morales MN, Mezzano D, Bronfman M. Palmitoyl-CoA and the acyl-CoA thioester of the carcinogenic peroxisome-proliferator ciprofibrate potentiate diacylglycerol-activated protein kinase-C by decreasing the phosphatidylserine requirement of the enzyme. *European Journal of Biochemistry* 1990; 190(1):57-61
- (146) Mocchiutti NO, Bernal CA, Lombardo YB. [Chronic consumption of brominated vegetable oils: their effect on liver secretion and catabolism of plasma lipoproteins]. *Arch Latinoam Nutr* 1992; 42(4):403-408
- (147) Merrill AH, Jones DD. An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1990; 1044(1):1-12
- (148) Turinsky J, Osullivan DM, Bayly BP. 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry* 1990; 265(28):16880-16885

- (149) Summers SA, Garza LA, Zhou HL, Birnbaum MJ. Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Molecular and Cellular Biology* 1998; 18(9):5457-5464
- (150) Schmitz-Peiffer C, Craig DL, Biden TJ. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(34):24202-24210
- (151) Summers SA, Garza LA, Zhou HL, Birnbaum MJ. Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Molecular and Cellular Biology* 1998; 18(9):5457-5464
- (152) Zhou HL, Summers SK, Birnbaum MJ, Pittman RN. Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(26):16568-16575
- (153) Montell E, Turini M, Marotta M, Roberts M, Noe V, Ciudad CJ, Mace K, Gomez-Foix AM. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2001; 280(2):E229-E237
- (154) Duplus E, Glorian M, Forest C. Fatty acid regulation of gene transcription. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(40):30749-30752
- (155) Pegorier JP, Le May C, Girard J. Control of gene expression by fatty acids. *Journal of Nutrition* 2004; 134(9):2444S-2449S
- (156) Clarke SD, Gasperikova D, Nelson C, Lapillonne A, Heird WC. Fatty acid regulation of gene expression - A genomic explanation for the benefits of the Mediterranean diet. *Lipids and Insulin Resistance: the Role of Fatty Acid Metabolism and Fuel Partitioning* 2002; 967:283-298
- (157) Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid-hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990; 347(6294):645-650
- (158) Lu TT, Repa JJ, Mangelsdorf DJ. Orphan nuclear receptors as eLiXiRs and FiXeRs of sterol metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(41):37735-37738
- (159) Olefsky JM. Nuclear receptor minireview series. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(40):36863-36864
- (160) Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 1998; 395(6698):137-143
- (161) Feng WJ, Ribeiro RCJ, Wagner RL, Nguyen H, Apriletti JW, Fletterick RJ, Baxter JD, Kushner PJ, West BL. Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* 1998; 280(5370):1747-1749
- (162) Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism. *Endocrine Reviews* 1999; 20(5):649-688
- (163) Pan DA, Mater MK, Thelen AP, Peters JM, Gonzalez FJ, Jump DB. Evidence against the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) as the mediator for polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic L-pyruvate kinase gene transcription. *Journal of Lipid Research* 2000; 41(5):742-751
- (164) Ren B, Thelen AP, Peters JM, Gonzalez FJ, Jump DB. Polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic fatty acid synthase and S14 gene expression does not require peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272(43):26827-26832

- (165) Ou JF, Tu H, Shan B, Luk A, DeBose-Boyd RA, Bashmakov Y, Goldstein JL, Brown MS. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98(11):6027-6032
- (166) Hertz R, Magenheim J, Berman I, Bar-Tana J. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4 alpha. *Nature* 1998; 392(6675):512-516
- (167) Jump DB. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Current Opinion in Lipidology* 2002; 13(2):155-164
- (168) Marrapodi M, Chiang JYL. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) and agonist inhibit cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. *Journal of Lipid Research* 2000; 41(4):514-520
- (169) Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *Journal of Clinical Investigation* 2002; 109(9):1125-1131
- (170) Osborne TF. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): Key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(42):32379-32382
- (171) Kawaguchi T, Osatomi K, Yamashita H, Kabashima T, Uyeda K. Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription - Regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(6):3829-3835
- (172) Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, Arnot D, Uyeda K. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98(16):9116-9121
- (173) Bach AC, Ingenbleek Y, Frey A. Usefulness of dietary medium-chain triglycerides in body weight control: Fact or fancy? *Journal of Lipid Research* 1996; 37(4):708-726
- (174) Bach AC, Babayan VK. Medium-chain triglycerides - An update. *American Journal of Clinical Nutrition* 1982; 36(5):950-962
- (175) Livesey G, Elia M. Estimation of energy-expenditure, net carbohydrate utilization, and net fat oxidation and synthesis by indirect calorimetry - Evaluation of errors with special reference to the detailed composition of fuels. *American Journal of Clinical Nutrition* 1988; 47(4):608-628
- (176) Greenberger NJ, Rodgers JB, Isselbac KJ. Absorption of medium and long chain triglycerides - Factors influencing their hydrolysis and transport. *Journal of Clinical Investigation* 1966; 45(2):217-227
- (177) Greenberger NJ, Skillman TG. Medium-chain triglycerides - Physiologic considerations and clinical implications. *New England Journal of Medicine* 1969; 280(19):1045-1058
- (178) Harkins RW, Sarett HP. Nutritional evaluation of medium-chain triglycerides in rat. *Journal of the American Oil Chemists Society* 1968; 45(1):26-30
- (179) Babayan VK. Medium chain triglycerides and structured lipids. *Lipids* 1987; 22(6):417-420
- (180) Valdivieso V. Absorption of medium-chain triglycerides in animals with pancreatic atrophy. *American Journal of Digestive Diseases* 1972; 17(2):129-137
- (181) McGarry JD, Foster DW. Regulation of hepatic fatty-acid oxidation and ketone-body production. *Annual Review of Biochemistry* 1980; 49:395-420

- (182) Swift LL, Hill JO, Peters JC, Greene HL. Medium-chain fatty-acids - Evidence for incorporation into chylomicron triglycerides in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 1990; 52(5):834-836
- (183) Lee DS, Hashim SA, Vanitall TB. Effect of long chain triglyceride on chylous transport of medium chain fatty acids. *American Journal of Physiology* 1968; 214(2):294-299
- (184) Guillot E, Vaugelade P, Lemarchal P, Rerat A. Intestinal-absorption and liver uptake of medium-chain fatty-acids in non-anesthetized pigs. *British Journal of Nutrition* 1993; 69(2):431-442
- (185) Scheig R, Klatskin G. Hepatic metabolism of 1-14C octanoic and 1-14C palmitic acids. *Journal of the American Oil Chemists Society* 1968; 45(1):31-33
- (186) Souza PF, Williamson DH. Effects of feeding medium-chain triacylglycerols on maternal lipid metabolism and pup growth in lactating rats. *Br J Nutr* 1993; 69(3):779-787
- (187) Fritz IB. Action of carnitine on long chain fatty acid oxidation by liver. *American Journal of Physiology* 1959; 197(2):297-304
- (188) Otto DA. Relationship of the ATP/ADP ratio to the site of octanoate activation. *Journal of Biological Chemistry* 1984; 259(9):5490-5494
- (189) Zammit VA. Mechanisms of regulation of the partition of fatty-acids between oxidation and esterification in the liver. *Progress in Lipid Research* 1984; 23(1):39-67
- (190) Groot PHE, Hulsmann WC. Activation and oxidation of octanoate and palmitate by rat skeletal-muscle mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1973; 316(2):124-135
- (191) Mannaerts GP, VanVeldhoven PP. Metabolic pathways in mammalian peroxisomes. *Biochimie* 1993; 75(3-4):147-158
- (192) Guy DG, Tuley RJ. Effect of diets high in carbohydrate, soy oil, medium-chain triglycerides or tripelargonin on blood and liver lipid and glucose intermediates in meal-eating rats. *Journal of Nutrition* 1981; 111(8):1437-1445
- (193) Crozier GL. Medium-chain triglyceride feeding over the long-term - The metabolic-fate of [C-14] octanoate and [C-14] oleate in isolated rat hepatocytes. *Journal of Nutrition* 1988; 118(3):297-304
- (194) Yeh YY, Zee P. Relation of ketosis to metabolic changes induced by acute medium-chain triglyceride feeding in rats. *Journal of Nutrition* 1976; 106(1):58-67
- (195) McGarry JD, Foster DW. Regulation of ketogenesis from octanoic acid - role of tricarboxylic acid cycle and fatty acid synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 1971; 246(4):1149-1159
- (196) Nakamura T, Yoshihara D, Ohmori T, Yanai M, Takeshita Y. Effects of diet high in medium-chain triglyceride on plasma ketone, glucose, and insulin concentrations in enterectomized and normal rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 1994; 40(2):147-159
- (197) Crozier G, Boisjoyeux B, Chanez M, Girard J, Peret J. Metabolic effects induced by long-term feeding of medium-chain triglycerides in the rat. *Metabolism-Clinical and Experimental* 1987; 36(8):807-814
- (198) Yost TJ, Erskine JM, Gregg TS, Podlecki DL, Brass EP, Eckel RH. Dietary substitution of medium-chain triglycerides in subjects with non-insulin-dependent diabetes-mellitus in an ambulatory setting - Impact on glycemic control and insulin-mediated glucose-metabolism. *Journal of the American College of Nutrition* 1994; 13(6):615-622
- (199) Christensen E, Hagve TA, Gronn M, Christophersen BO. Beta-oxidation of medium chain (C8-C14) fatty-acids studied in isolated liver-cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1989; 1004(2):187-195

- (200) Leveille GA, Pardini RS, Tillotso JA. Influence of medium-chain triglycerides on lipid metabolism in rat. *Lipids* 1967; 2(4):287-294
- (201) Carnielli VP, Sulkers EJ, Moretti C, Wattimena JLD, Vangoudoever JB, Degenhart HJ, Zacchello F, Sauer PJJ. Conversion of octanoic-acid into long-chain saturated fatty-acids in premature-infants fed a formula containing medium-chain triglycerides. *Metabolism-Clinical and Experimental* 1994; 43(10):1287-1292
- (202) Hwang SG, Yano H, Kawashima R. Influence of dietary medium-chain and long-chain triglycerides on fat deposition and lipogenic enzyme-activities in rats. *Journal of the American College of Nutrition* 1993; 12(6):643-650
- (203) Hwang SG, Yano H, Kawashima R. The influence of dietary medium and long-chain triglycerides on growth performances and fat deposition in growing rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 1992; 38(2):127-139
- (204) Hill JO, Peters JC, Lin D, Yakubu F, Greene H, Swift L. Lipid-accumulation and body-fat distribution is influenced by type of dietary-fat fed to rats. *International Journal of Obesity* 1993; 17(4):223-236
- (205) Zurier RB, Campbell RG, Hashim SA, Vanitall TB. Enrichment of depot fat with odd and even numbered medium chain fatty acids. *American Journal of Physiology* 1967; 212(2):291-294
- (206) Ockner RK, Ho WKL, Poppenha RB, Manning JA. Binding protein for fatty-acids in cytosol of intestinal-mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science* 1972; 177(4043):56-58
- (207) Bass NM. Function and regulation of hepatic and intestinal fatty-acid binding-proteins. *Chemistry and Physics of Lipids* 1985; 38(1-2):95-114
- (208) Aas M. Organ and subcellular distribution of fatty acid activating enzymes in rat. *Biochimica et Biophysica Acta* 1971; 231(1):32-47
- (209) Bortz WM, Lynen F. Inhibition of acetyl CoA carboxylase by long chain acyl CoA derivatives. *Biochemische Zeitschrift* 1963; 337(6):505-509
- (210) Pegorier JP, Duee PH, Herbin C, Laulan PY, Blade C, Peret J, Girard J. Fatty-acid metabolism in hepatocytes isolated from rats adapted to high-fat diets containing long-chain or medium-chain triacylglycerols. *Biochemical Journal* 1988; 249(3):801-806
- (211) Chanez M, Boisjoyeux B, Arnaud MJ, Peret J. Metabolic effects in rats of a diet with a moderate level of medium-chain triglycerides. *Journal of Nutrition* 1991; 121(5):585-594
- (212) Takase S, Hosoya N. Possible role of insulin status in the increased lipogenic enzyme-activity by dietary medium-chain triglyceride in rat-liver. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 1987; 33(3):177-184
- (213) Carvajal O, Nakayama M, Kishi T, Sato M, Ikeda I, Sugano M, Imaizumi K. Effect of medium-chain fatty acid positional distribution in dietary triacylglycerol on lymphatic lipid transport and chylomicron composition in rats. *Lipids* 2000; 35(12):1345-1351
- (214) Asakura L, Lottenberg AMP, Neves MQTS, Nunes VS, Rocha JC, Passarelli M, Nakandakare ER, Quintao ECR. Dietary medium-chain triacylglycerol prevents the postprandial rise of plasma triacylglycerols but induces hypercholesterolemia in primary hypertriglyceridemic subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 2000; 71(3):701-705
- (215) Borel P, Tyssandier V, Mekki N, Grolier P, Rochette Y, Alexandre-Gouabau MC, Lairon D, Azais-Braesco V. Chylomicron beta-carotene and retinyl palmitate responses are dramatically diminished when men ingest beta-carotene with medium-chain rather than long-chain triglycerides. *Journal of Nutrition* 1998; 128(8):1361-1367

- (216) Turkenkopf IJ, Maggio CA, Greenwood MRC. Effect of high-fat weanling diets containing either medium-chain triglycerides or long-chain triglycerides on the development of obesity in the Zucker rat. *Journal of Nutrition* 1982; 112(7):1254-1263
- (217) Roth B, Ekelund M, Fan BG, Hagerstrand I, Salehi A, Lundquist I, Nilsson-Ehle P. Biochemical and ultra-structural reactions to parenteral nutrition with two different fat emulsions in rats. *Intensive Care Medicine* 1998; 24(7):716-724
- (218) Ecelbarger GL, Lasekan JB, Ney DM. In vivo triglyceride secretion and hepatic and plasma-lipids in rats fed medium-chain triglycerides, tripelargonin, or corn-oil. *Journal of Nutritional Biochemistry* 1991; 2(5):260-266
- (219) Bray GA, Lee M, Bray TL. Weight-gain of rats fed medium-chain triglycerides is less than rats fed long-chain triglycerides. *International Journal of Obesity* 1980; 4(1):27-32
- (220) Hill JO, Peters JC, Swift LL, Yang D, Sharp T, Abumrad N, Greene HL. Changes in blood-lipids during 6 days of overfeeding with medium or long-chain triglycerides. *Journal of Lipid Research* 1990; 31(3):407-416
- (221) Tholstrup T, Ehnholm C, Jauhiainen M, Petersen M, Hoy CE, Lund P, Sandstrom B. Effects of medium-chain fatty acids and oleic acid on blood lipids, lipoproteins, glucose, insulin, and lipid transfer protein activities. *American Journal of Clinical Nutrition* 2004; 79(4):564-569
- (222) Uzawa H, Kinsell LW, Schlierf G, Chirman S, Michaels G, Wood P. Hyperglyceridemia resulting from intake of medium chain triglycerides. *American Journal of Clinical Nutrition* 1964; 15(6):365-369
- (223) Temme EHM, Mensink RP, Hornstra G. Effects of medium chain fatty acids (MCFA), myristic acid, and oleic acid on serum lipoproteins in healthy subjects. *Journal of Lipid Research* 1997; 38(9):1746-1754
- (224) Cater NB, Heller HJ, Denke MA. Comparison of the effects of medium-chain triacylglycerols, palm oil, and high oleic acid sunflower oil on plasma triacylglycerol fatty acids and lipid and lipoprotein concentrations in humans. *Am J Clin Nutr* 1997; 65(1):41-45
- (225) Opara EC, Garfinkel M, Hubbard VS, Burch WM, Akwari OE. Effect of fatty-acids on insulin release - Role of chain-length and degree of unsaturation. *American Journal of Physiology* 1994; 266(4):E635-E639
- (226) Madison LL, Unger RH, Mebane D, Lochner A. Hypoglycemic action of ketones .2. Evidence for stimulatory feedback of ketones on pancreatic beta cells. *Journal of Clinical Investigation* 1964; 43(3):408-415
- (227) Rath R, Skala I, Rathova E. Metabolic aspects of use of medium chain triglycerides in treatment of obesity. *Zeitschrift fur Ernährungswissenschaft* 1972;13:116-124
- (228) Tantibhedhyangkul P, Hashim SA, Vanitall TB. Effects of ingestion of long-chain and medium-chain triglycerides on glucose tolerance in man. *Diabetes* 1967; 16(11):796-799
- (229) Eckel RH, Hanson AS, Chen AY, Berman JN, Yost TJ, Brass EP. Dietary substitution of medium-chain triglycerides improves insulin-mediated glucose-metabolism in NIDDM subjects. *Diabetes* 1992; 41(5):641-647
- (230) Schrezenmeir J, Weber P, Probst R, Biesalski HK, Luley C, Prellwitz W, Krause U, Beyer J. Postprandial pattern of triglyceride-rich lipoprotein in normal-weight humans after an oral lipid load - exaggerated triglycerides and altered insulin-response in some subjects. *Annals of Nutrition and Metabolism* 1992; 36(4):186-196

- (231) Schrezenmeir J, Keppler I, Fenselau S, Weber P, Biesalski HK, Probst R, Laue C, Zuchhold HD, Prellwitz W, Beyer J. The phenomenon of a high triglyceride response to an oral lipid load in healthy-subjects and its link to the metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1993; 683:302-314
- (232) Schrezenmeir J, Sturmer W. High triglyceride response after an oral metabolic: Tolerance test in sons with parental history of the metabolic syndrome. *Diabetologia* 1996; 39:1023
- (233) Naumann K, Bassler R, Seibold R, Barth K. *Handbuch der langwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik: Methodenbuch III*. Neumann-Neudamm, Melsungen 1976
- (234) Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 1957; 226(1):497-509
- (235) Kaluzny MA, Duncan LA, Merritt MV, Epps DE. Rapid separation of lipid classes in high-yield and purity using bonded phase columns. *Journal of Lipid Research* 1985; 26(1):135-140
- (236) van Dongen JJ, Remie R, Rensena JW, van Wunik GHJ. *Manual of microsurgery on the laboratory rat*. Elsevier, Amsterdam 1999
- (237) Waynforth HB. *Experimental and Surgical Technique in the Rat*. Academic Press, London 1980
- (238) Pinson EA. Water exchanges and barriers as studied by the use of hydrogen isotopes. *Physiological Reviews* 1952; 32(2):123-134
- (239) Wang ZM, Deurenberg P, Pietrobelli A, Baumgartner RN, Heymsfield SB. Hydration of fat-free body mass: review and critique of a classic body-composition constant. *American Journal of Clinical Nutrition* 1999; 69(5):833-841
- (240) Lam TKT, Carpentier A, Lewis GF, van de Werve G, Fantus IG, Giacca A. Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2003; 284(5):E863-E873
- (241) Culebras JM, Fitzpatrick GF, Brennan MF, Boyden CM, Moore FD. Total-body water and exchangeable hydrogen .2. Review of comparative data from animals based on isotope dilution and desiccation, with a report of new data from rat. *American Journal of Physiology* 1977; 232(1):R60-R65
- (242) Tisavipa A, Vibulsre S, Sheng HP, Huggins RA. Total-body water measured by desiccation and by tritiated-water in adult rats. *Journal of Applied Physiology* 1974; 37(5):699-701
- (243) Bessesen DH, Vensor SH, Jackman MR. Trafficking of dietary oleic, linolenic, and stearic acids in fasted or fed lean rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2000; 278(6):E1124-E1132
- (244) Bassilian S, Ahmed S, Lim SK, Boros LG, Mao CS, Lee WNP. Loss of regulation of lipogenesis in the Zucker diabetic rat. II. Changes in stearate and oleate synthesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2002; 282(3):E507-E513
- (245) Lee WNP, Bassilian S, Lim S, Boros LG. Loss of regulation of lipogenesis in the Zucker diabetic (ZDF) rat. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2000; 279(2):E425-E432
- (246) Stahl A. A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 2004; 447(5):722-727
- (247) Bass NM. The cellular fatty-acid binding-proteins - Aspects of structure, regulation, and function. *International Review of Cytology-A Survey of Cell Biology* 1988; 111:143-184

- (248) Stein DT, Esser V, Stevenson BE, Lane KE, Whiteside JH, Daniels MB, Chen SY, McGarry JD. Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 97(12):2728-2735
- (249) Storz P, Doppler H, Wernig A, Pfizenmaier K, Muller G. Cross-talk mechanisms in the development of insulin resistance of skeletal muscle cells - Palmitate rather than tumour necrosis factor inhibits insulin-dependent protein kinase B (PKB)/Akt stimulation and glucose uptake. *European Journal of Biochemistry* 1999; 266(1):17-25
- (250) Perdomo G, Commerford SR, Richard AMT, Adams SH, Corkey BE, O'Doherty RM, Brown NF. Increased beta-oxidation in muscle cells enhances insulin-stimulated glucose metabolism and protects against fatty acid-induced insulin resistance despite intramyocellular lipid accumulation. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(26):27177-27186
- (251) Brink EJ, Haddeman E, Defouw NJ, Weststrate JA. Positional Distribution of stearic-acid and oleic-acid in a triacylglycerol and dietary calcium-concentration determines the apparent absorption of these fatty-acids in rats. *Journal of Nutrition* 1995; 125(9):2379-2387
- (252) Ranhotra GS, Gelroth JA, Leinen SD. Energy value of a fat high in stearic acid. *Journal of Food Science* 1998; 63(2):363-365
- (253) Schneider CL, Cowles RL, Stuefer-Powell CL, Carr TP. Dietary stearic acid reduces cholesterol absorption and increases endogenous cholesterol excretion in hamsters fed cereal-based diets. *Journal of Nutrition* 2000; 130(5):1232-1238
- (254) Dougherty RM, Allman MA, Iacono JM. Effects of diets containing high or low amounts of stearic-acid on plasma-lipoprotein fractions and fecal fatty-acid excretion of men. *American Journal of Clinical Nutrition* 1995; 61(5):1120-1128
- (255) Kaplan RJ, Greenwood CE. Poor digestibility of fully hydrogenated soybean oil in rats: A potential benefit of hydrogenated fats and oils. *Journal of Nutrition* 1998; 128(5):875-880
- (256) Geliebter A, Torbay N, Bracco EF, Hashim SA, Vanitallie TB. Overfeeding with medium-chain triglyceride diet results in diminished deposition of fat. *American Journal of Clinical Nutrition* 1983; 37(1):1-4
- (257) Baba N, Bracco EF, Hashim SA. Enhanced thermogenesis and diminished deposition of fat in response to overfeeding with diet containing medium chain triglyceride. *American Journal of Clinical Nutrition* 1982; 35(4):678-682
- (258) Han JR, Hamilton JA, Kirkland JL, Corkey BE, Guo W. Medium-chain oil reduces fat mass and down-regulates expression of adipogenic genes in rats. *Obesity Research* 2003; 11(6):734-744
- (259) Manco M, Calvani M, Mingrone G. Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. *Diabetes Obesity & Metabolism* 2004; 6(6):402-413
- (260) Kelley DE, Goodpaster BH, Storlien L. Muscle triglyceride and insulin resistance. *Annual Review of Nutrition* 2002; 22:325-346
- (261) Stein DT, Szczepanik L, Dobbins R, McGarry JD. Increasing intramyocellular triglyceride stores are associated with impaired glucose tolerance and NIDDM. *Diabetes* 1999; 48:A287
- (262) Hegarty BD, Furler SM, Ye J, Cooney GJ, Kraegen EW. The role of intramuscular lipid in insulin resistance. *Acta Physiol Scand* 2003; 178(4):373-383
- (263) Jump DB, Clarke SD, Thelen A, Liimatta M, Ren B, Badin MV. Dietary fat, genes, and human health. *Adv Exp Med Biol* 1997;(422):167-176

- (264) Hegarty BD, Cooney GJ, Kraegen EW, Furler SM. Increased efficiency of fatty acid uptake contributes to lipid accumulation in skeletal muscle of high fat-fed insulin-resistant rats. *Diabetes* 2002; 51(5):1477-1484
- (265) van Nieuwenhoven FA, Willemsen PHM, van der Vusse GJ, Glatz JFC. Co-expression in rat heart and skeletal muscle of four genes coding for proteins implicated in long-chain fatty acid uptake. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1999; 31(3-4):489-498
- (266) Veerkamp JH. Fatty-acid transport and fatty-acid-binding proteins. *Proceedings of the Nutrition Society* 1995; 54(1):23-37
- (267) Hajri T, Ibrahim A, Coburn CT, Knapp FF, Kurtz T, Pravenec M, Abumrad NA. Defective fatty acid uptake in the spontaneously hypertensive rat is a primary determinant of altered glucose metabolism, hyperinsulinemia, and myocardial hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(26):23661-23666
- (268) Ibrahim A, Bonen A, Blinn WD, Hajri T, Li X, Zhong K, Cameron R, Abumrad NA. Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(38):26761-26766
- (269) Berk PD, Zhou SL, Kiang CL, Stump D, Bradbury M, Isola LM. Uptake of long chain free fatty acids is selectively up-regulated in adipocytes of Zucker rats with genetic obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272(13):8830-8835
- (270) Rao RH. Insulin-resistance in spontaneously hypertensive rats - Difference in interpretation based on insulin infusion rate or on plasma-insulin in glucose clamp studies. *Diabetes* 1993; 42(9):1364-1371
- (271) Reaven GM. Insulin resistance, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, and hypertension - Parallels between human-disease and rodent models. *Diabetes Care* 1991; 14(3):195-202
- (272) Reaven GM, Chang H. Relationship between blood-pressure, plasma-insulin and triglyceride concentration, and insulin action in spontaneous hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *American Journal of Hypertension* 1991; 4(1):34-38
- (273) Reaven GM, Chang H, Hoffman BB, Azhar S. Resistance to insulin-stimulated glucose-uptake in adipocytes isolated from spontaneously hypertensive rats. *Diabetes* 1989; 38(9):1155-1160
- (274) Mondon CE, Reaven GM. Evidence of abnormalities of insulin metabolism in rats with spontaneous hypertension. *Metabolism-Clinical and Experimental* 1988; 37(4):303-305
- (275) Aitman TJ, Gotoda T, Evans AL, Imrie H, Heath KE, Trembling PM, Truman H, Wallace CA, Rahman A, Dore C, Flint J, Kren V, Zidek V, Kurtz TW, Pravenec M, Scott J. Quantitative trait loci for cellular defects in glucose and fatty acid metabolism in hypertensive rats. *Nature Genetics* 1997; 16(2):197-201
- (276) Abumrad NA, Park JH, Park CR. Permeation of long-chain fatty-acid into adipocytes - Kinetics, specificity, and evidence for involvement of a membrane-protein. *Journal of Biological Chemistry* 1984; 259(14):8945-8953
- (277) Binas B, Danneberg H, McWhir J, Mullins L, Clark AJ. Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization. *Faseb Journal* 1999; 13(8):805-812
- (278) Poirier H, Niot I, Degrace P, Monnot MC, Bernard A, Besnard P. Fatty acid regulation of fatty acid-binding protein expression in the small intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 1997; 36(2):G289-G295

- (279) Poirier H, Degrace P, Niot I, Bernard A, Besnard P. Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (FAT) in the small intestine - Comparison with fatty acid-binding proteins (FABP). *European Journal of Biochemistry* 1996; 238(2):368-373
- (280) Mahan JT, Mansbach CM. Expression of pancreatic triglyceride lipase mRNA transcripts in the mucosa of rat small intestine and its regulation by fat loading: Analysis by semiquantitative RT-PCR. *Molecular Biology of the Cell* 1999; 10:175A
- (281) Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, Schmitz J, Gay G, Rader DJ, Gregg RE. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* 1992; 258(5084):999-1001
- (282) Griffin E, Re A, Hamel N, Fu CZ, Bush H, McCaffrey T, Asch AS. A link between diabetes and atherosclerosis: Glucose regulates expression of CD36 at the level of translation. *Nature Medicine* 2001; 7(7):840-846
- (283) Luiken JJFP, Dyck DJ, Han XX, Tandon NN, Arumugam Y, Glatz JFC, Bonen A. Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2002; 282(2):E491-E495
- (284) Bonen A, Luiken JJFP, Arumugam Y, Glatz JFC, Tandon NN. Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(19):14501-14508
- (285) Asch AS, Liu I, Briccetti FM, Barnwell JW, Kwakyeberko F, Dokun A, Goldberger J, Pernambuco M. Analysis of cd36 binding domains - Ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain. *Science* 1993; 262(5138):1436-1440
- (286) Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA. Membrane glycoprotein-CD36 - A review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 1992; 80(5):1105-1115
- (287) Turcotte LP, Swenberger JR, Tucker MZ, Yee AJ. Increased fatty acid uptake and altered fatty acid metabolism in insulin-resistant muscle of obese Zucker rats. *Diabetes* 2001; 50(6):1389-1396
- (288) Guo W, Choi JK, Kirkland JL, Corkey BE, Hamilton JA. Esterification of free fatty acids in adipocytes: a comparison between octanoate and oleate. *Biochemical Journal* 2000; 349:463-471
- (289) Heath RB, Karpe F, Milne RW, Burdge GC, Wootton SA, Frayn KN. Selective partitioning of dietary fatty acids into the VLDL TG pool in the early postprandial period. *Journal of Lipid Research* 2003; 44(11):2065-2072
- (290) Evans K, Burdge GC, Wootton SA, Clark ML, Frayn KN. Regulation of dietary fatty acid entrapment in subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle. *Diabetes* 2002; 51(9):2684-2690
- (291) Soma MR, Mims MP, Chari MV, Rees D, Morrisett JD. Triglyceride-metabolism in 3T3-L1 cells - An in vivo C-13 NMR-study. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267(16):11168-11175
- (292) DeLany JP, Windhauser MM, Champagne CM, Bray GA. Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 2000; 72(4):905-911
- (293) Mansbach CM, Nevin P. Intracellular movement of triacylglycerols in the intestine. *Journal of Lipid Research* 1998; 39(5):963-968
- (294) Bracco U. Effect of triglyceride structure on fat-absorption. *American Journal of Clinical Nutrition* 1994; 60(6):S1002-S1009
- (295) Sarda P, Lepage G, Roy CC, Chessex P. Storage of medium-chain triglycerides in adipose-tissue of orally fed infants. *American Journal of Clinical Nutrition* 1987; 45(2):399-405

- (296) Ayre KJ, Hulbert AJ. Dietary fatty acid profile influences the composition of skeletal muscle phospholipids in rats. *Journal of Nutrition* 1996; 126(3):653-662
- (297) Borkman M, Storlien LH, Pan DA, Jenkins AB, Chisholm DJ, Campbell LV. The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids. *New England Journal of Medicine* 1993; 328(4):238-244
- (298) Pan DA, Hulbert AJ, Storlien LH. Dietary fats, membrane phospholipids and obesity. *Journal of Nutrition* 1994; 124(9):1555-1565
- (299) Spector AA, Yorek MA. Membrane lipid-composition and cellular function. *Journal of Lipid Research* 1985; 26(9):1015-1035
- (300) Storlien LH, Kriketos AD, Calvert GD, Baur LA, Jenkins AB. Fatty acids, triglycerides and syndromes of insulin resistance. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1997; 57(4-5):379-385
- (301) Storlien LH, Baur LA, Kriketos AD, Pan DA, Cooney GJ, Jenkins AB, Calvert GD, Campbell LV. Dietary fats and insulin action. *Diabetologia* 1996; 39(6):621-631
- (302) Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997; 46(1):3-10
- (303) Farias RN. Insulin membrane interactions and membrane fluidity changes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1987; 906(3):459-468
- (304) Grunfeld C, Baird KL, Kahn CR. Maintenance of 3T3-L1 cells in culture media containing saturated fatty-acids decreases insulin binding and insulin action. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1981; 103(1):219-226
- (305) Ginsberg BH, Brown TJ, Simon I, Spector AA. Effect of the membrane lipid environment on the properties of insulin-receptors. *Diabetes* 1981; 30(9):773-780
- (306) Bing RJ, Siegel A, Ungar I, Gilbert M. Metabolism of the human heart .2. Studies on fat, ketone and amino acid metabolism. *American Journal of Medicine* 1954; 16(4):504-515
- (307) Frayn KN. Insulin resistance, impaired postprandial lipid metabolism and abdominal obesity - A deadly triad. *Medical Principles and Practice* 2002; 11:31-40
- (308) Summers LKM, Samra JS, Frayn KN. Impaired postprandial tissue regulation of blood flow in insulin resistance: a determinant of cardiovascular risk? *Atherosclerosis* 1999; 147(1):11-15
- (309) Frayn KN. Non-esterified fatty acid metabolism and postprandial lipaemia. *Atherosclerosis* 1998; 141:S41-S46
- (310) Daly M. Sugars, insulin sensitivity, and the postprandial state. *American Journal of Clinical Nutrition* 2003; 78(4):865S-872S
- (311) Thorburn AW, Storlien LH, Jenkins AB, Khouri S, Kraegen EW. Fructose-induced invivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *American Journal of Clinical Nutrition* 1989; 49(6):1155-1163
- (312) Storlien LH, Kraegen EW, Jenkins AB, Chisholm DJ. Effects of sucrose vs starch diets on invivo insulin action, thermogenesis, and obesity in rats. *American Journal of Clinical Nutrition* 1988; 47(3):420-427
- (313) Swift LL, Hill JO, Peters JC, Greene HL. Plasma-lipids and lipoproteins during 6 d of maintenance feeding with long-chain, medium-chain, and mixed-chain triglycerides. *American Journal of Clinical Nutrition* 1992; 56(5):881-886

- (314) Schwartz MW, Porte D. Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 2005; 307(5708):375-379
- (315) Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nature Medicine* 2002; 8(12):1376-1382
- (316) Obici S, Feng ZH, Karkanias G, Baskin DG, Rossetti L. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nature Neuroscience* 2002; 5(6): 566-572
- (317) Obici S, Feng ZH, Arduini A, Conti R, Rossetti L. Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nature Medicine* 2003; 9(6):756-761
- (318) Pocai A, Obici S, Schwartz G, Rossetti L. A brain-liver circuit regulates glucose homeostasis. *Cell Metabolism* 2005;1(1):53-61
- (319) Ye JM, Doyle PJ, Iglesias MA, Watson DG, Cooney GJ, Kraegen EW. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha activation lowers muscle lipids and improves insulin sensitivity in high fat-fed rats - Comparison with PPAR-gamma activation. *Diabetes* 2001; 50(2):411-417
- (320) Frias JP, Macaraeg GB, Ofrecio J, Yu JG, Olefsky JM, Kruszynska YT. Decreased susceptibility to fatty acid-induced peripheral tissue insulin resistance in women. *Diabetes* 2001; 50(6): 1344-1350
- (321) Ockner RK, Burnett DA, Lysenko N, Manning JA. Sex-differences in long-chain fatty-acid utilization and fatty-acid binding-protein concentration in rat-liver. *Journal of Clinical Investigation* 1979; 64(1):172-181
- (322) Bass NM, Manning JA, Ockner RK, Gordon JI, Seetharam S, Alpers DH. Regulation of the biosynthesis of 2 distinct fatty acid-binding proteins in rat-liver and intestine - influences of sex difference and of clofibrate. *Journal of Biological Chemistry* 1985; 260(3):1432-1436
- (323) Galipeau D, Verma S, McNeill JH. Female rats are protected against fructose-induced changes in metabolism and blood pressure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2002; 283(6):H2478-H2484
- (324) Besnard P, Niot I, Bernard A, Carlier H. Cellular and molecular aspects of fat metabolism in the small intestine. *Proceedings of the Nutrition Society* 1996; 55(1B):19-37
- (325) Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C. Insulin-resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes-mellitus - Prospective studies of Pima-indians. *New England Journal of Medicine* 1993; 329(27):1988-1992
- (326) DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM - A balanced overview. *Diabetes Care* 1992; 15(3):318-368
- (327) Lillioja S, Mott DM, Howard BV, Bennett PH, Ykijarvinen H, Freymond D, Nyomba BL, Zurlo F, Swinburn B, Bogardus C. Impaired glucose-tolerance as a disorder of insulin action - Longitudinal and cross-sectional studies in Pima-indians. *New England Journal of Medicine* 1988; 318(19):1217-1225
- (328) Laaksonen DE, Lindstrom J, Lakka TA, Eriksson JG, Niskanen L, Wikstrom K, Aunola S, Keinanen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Valle TT, Ilanne-Parikka P, Louheranta A, Hamalainen H, Hastas M, Salminen V, Cepaitis Z, Hakumaki M, Kaikkonen H, Harkonen P, Sundvall J, Tuomilehto J, Uusitupa M. Physical activity in the prevention of type 2 diabetes - The Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetes* 2005; 54(1):158-165

Anhang

Tabelle A1: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Kits

Chemikalien/Reagenzien/Kits	Firma
TaqMan [®] Reverse Transcription Reagents-Kit TaqMan [®] Universal PCR Master Mix mit <i>AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase</i> , dNTP mit UTP, passivem Referenzfarbstoff (ROX), Uracil-N-Glycosylase (<i>AmpErase[®] UNG</i>) TaqMan [®] -Sonden für 18 S-rRNA, FATP, H-FABP _c , FAT/CD36 (20x Assay Mix)	ABI, Foster City, USA
porcines Insulin	Actrapid, Novo Nordisk, Dänemark
D ₂ O (67 Atomprozent)	Armar Chemicals, Döttingen, Schweiz
Natriumchlorid	Braun, Melsung, Deutschland
U- ¹³ C ₁₆ -Palmitat	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, Massachusetts, USA
Taq-Polymerase	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Agarose	Life Technologies, Paisley, Schottland
Rat insulin RIA	Linco, St. Charles, USA
Lambda DNA/Eco1301 (Styl) Marker dNTP-Set	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Ultrasensitive Rat Insulin ELISA	Mercodia, Uppsala, Schweden

Fortsetzung Tabelle A1: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Kits

Chemikalien/Reagenzien/Kits	Firma
Benzoessäure Chloroform Ethanol Formaldehyd Isopropanol Methanol β-Mercaptoethanol Salzsäure	Merk, Darmstadt, Deutschland
PCR-Primer β-Aktin	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
Kit zur Bestimmung freier Fettsäuren	Randox, Clumlin, England
Bariumhydroxid Glycerin Natriumacetat Natriumcarbonat Tris·Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau Diethylpyrocarbonat (DEPC) Dinatriumdihydrogenethyendiamin-tetraacetat (EDTA) Fettsäuremethylesterstandard für C20:4, cis-13,16-C22:2, cis-4,7,10,13,16,19-C22:6 Fettsäurestandard für C17:0 Triton X-100 Xylenzylanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
3-Morpholino-1-Propansulfonsäure (MOPS) Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg, Deutschland
Fettsäuremethylesterstandard „F.A.M.E. Mix C8-C24“ FAME Standard RM-6	Supelco, Bellefonte, USA
Triglycerid-, Glucose-, Glycerol-Kit	Thermo Clinical LabSystems, Vantaa, Finnland
RNeasy Mini Kit RNase free DNase Set (Desoxyribo-nuclease: 1500Units) RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle A2: Geräte

Geräte	Firma
ABI Prism [®] 7000 Sequence Detection System mit SDS-Analysesoftware	ABI, Foster City, USA
Gaschromatograph Agilent Technologies 6890 N Massenspektrometer Agilent Technologies 5973N	Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA
Speed Vac Concentrator & Refrigerated Condensation Trap	Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, Deutschland
Glucose Analyser	Beckmann, Fullerton, USA
Prozess-Photometer SPECTRAN 677	Bodenseewerk Geosystem GmbH, Überlingen, Deutschland
BioPhotometer Kühlzentrifuge 5810R mit Ausschwing-rotor	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kalorimeters IKA [®] C 4000	IKA [®] Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Polytron Typ PT 10/35	Kinematica GmbH, Luzern, Schweiz
automatisches Laboranalysegerät (Konelab)	Konelab Corporation, Espoo, Finnland
Mikrowaage Mettler AE 163	Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
ELISA-Reader Spectra Max 340 mit Analysesoftware <i>Soft Max[®]PRO Version 1.1</i>	Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA
Spektralphotometer Perkin Elmer 550 A	Perkin Elmer, Wellesley, Massachusetts, USA
Thermocycler	Whatman Biometra, Göttingen, Deutschland

Tabelle A3: Puffer und Lösungen

Puffer	Inhaltsstoff
Blaumarker (6x <i>loading dye</i>)	0,09 % Bromphenolblau 0,09 % Xylenzyanol 60 % Glycerin 60 mmol/l EDTA
DEPC-Wasser (0,1 %)	1 ml DEPC 1 l Reinstwasser autoklavieren
10x MOPS-Puffer	200 mmol/l MOPS 50 mmol/l Natriumacetat 10 mmol/l EDTA pH 7 autoklavieren
TE-Puffer	10 mmol/l Tris (pH 7,6) 1 mmol/l EDTA (pH 8)
50x TAE	40 mmol/l Tris·Essigsäure 1 mmol/l EDTA, pH 8,5

Tabelle A4: Zusammensetzung der Basisdiät (mit Vitamin- und Mineralstoffgehalt)

Inhaltsstoff¹⁾	Einheit	Gehalt
Rohprotein	mg/kg	377294,125
Rohfett	mg/kg	3508,350
Rohfaser	mg/kg	9837,390
Rohasche	mg/kg	88131,968
Feuchtigkeit	mg/kg	93593,528
Disaccharide	mg/kg	23856,362
Polysaccharide	mg/kg	354456,200
Lysin	mg/kg	34859,203
Methionin	mg/kg	23909,980
Cystin	mg/kg	6312,810
Threonin	mg/kg	14498,331
Tryptophan	mg/kg	3959,140
Arginin	mg/kg	21492,080
Histidin	mg/kg	10487,840
Isoleucin	mg/kg	14485,210
Leucin	mg/kg	29393,210
Phenylalanin	mg/kg	14610,970
Valin	mg/kg	7403,785

Fortsetzung Tabelle A4: Zusammensetzung der Basisdiät

Inhaltsstoff¹⁾	Einheit	Gehalt
Alanin	mg/kg	7300,654
Asparaginsäure	mg/kg	9038,256
Glutaminsäure	mg/kg	49697,808
Glycin	mg/kg	11215,825
Prolin	mg/kg	27832,214
Serin	mg/kg	11351,225
Tyrosin	mg/kg	18096,505
Vitamin A	I.E./kg	22875,000
Vitamin D3	I.E./kg	762,500
Vitamin E	mg/kg	229,519
Vitamin K3	mg/kg	15,250
Vitamin B1	mg/kg	30,577
Vitamin B2	mg/kg	31,119
Vitamin B6	mg/kg	22,940
Vitamin B12	mg/kg	0,067
Nikotinsäure	mg/kg	76,577
Pantothensäure	mg/kg	76,454
Folsäure	mg/kg	15,389
Biotin	mg/kg	0,385
Cholinchlorid	mg/kg	1632,017
P-Aminobenzoesäure	mg/kg	152,500
Inosit	mg/kg	173,636
Vitamin C	mg/kg	30,500
Calcium	mg/kg	14205,790
Phosphor	mg/kg	12570,647
Magnesium	mg/kg	1441,090
Natrium	mg/kg	3778,584
Kalium	mg/kg	11705,117
Schwefel	mg/kg	5780,795
Chlor	mg/kg	5583,330
Eisen	mg/kg	281,018
Mangan	mg/kg	162,234
Zink	mg/kg	52,158
Kupfer	mg/kg	9,569
Jod	mg/kg	0,703
Molybdän	mg/kg	0,372
Fluor	mg/kg	6,676
Selen	mg/kg	0,542
Kobalt	mg/kg	0,214
Aluminium	mg/kg	3,427

¹⁾ Angaben des Herstellers (Firma Altromin, Lage, Deutschland); die o.g. Diät wurde als Basisdiät für die drei Versuchsdiäten mit entsprechenden Zusätzen (experimentelles Fett, Sojaöl, Lecithin und Wasser, vgl. Tabelle 2) eingesetzt; I.E. = internationale Einheiten

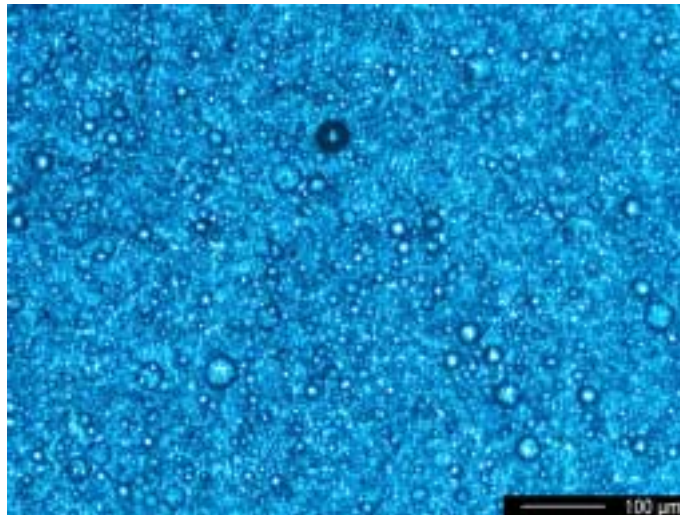


Abbildung A1: Wässrige LCT-Fettemulsion

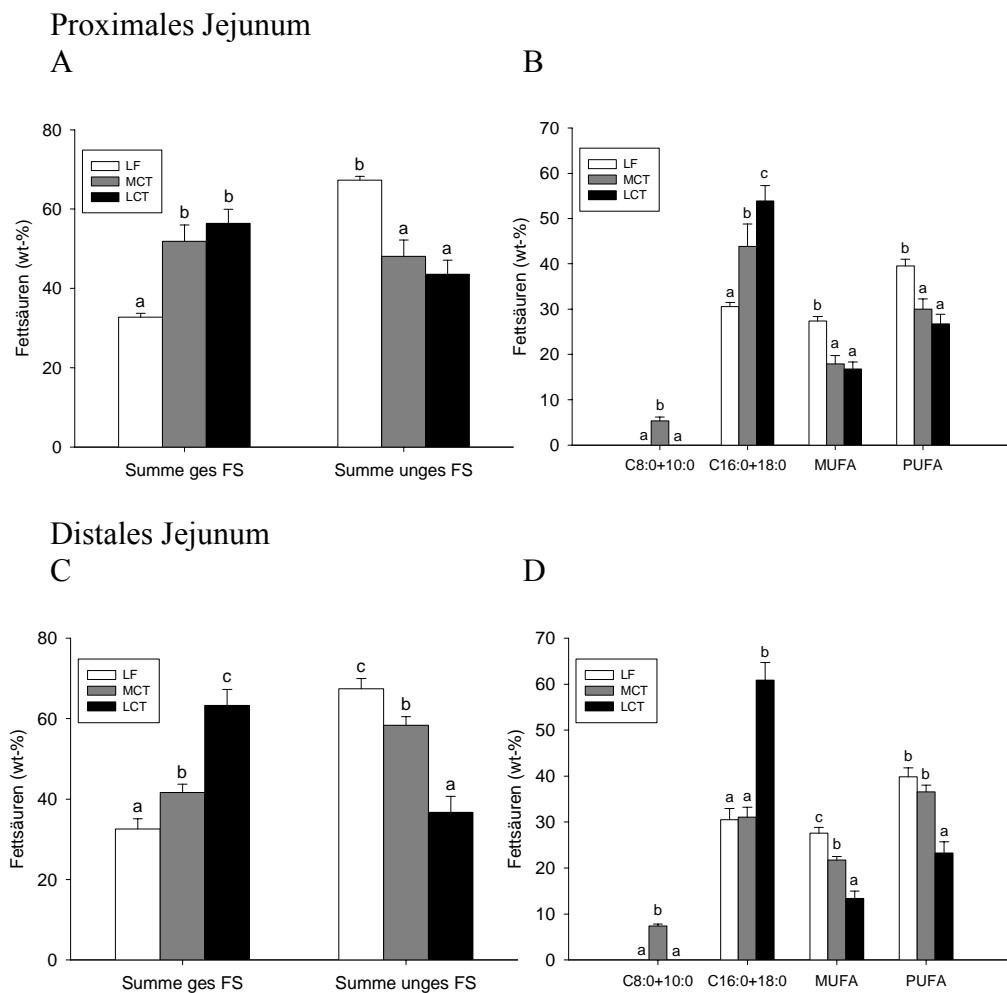
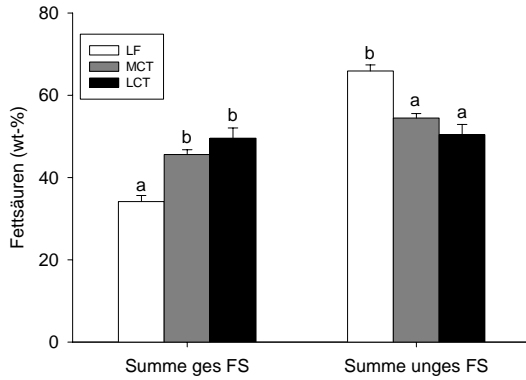


Abbildung A2: Fettsäuremuster in der Triglyceridfraktion des proximalen und distalen Jejunums der Ratten (%) nach der Fütterungsperiode und dem nächtlichen Fasten (Experiment B-a)

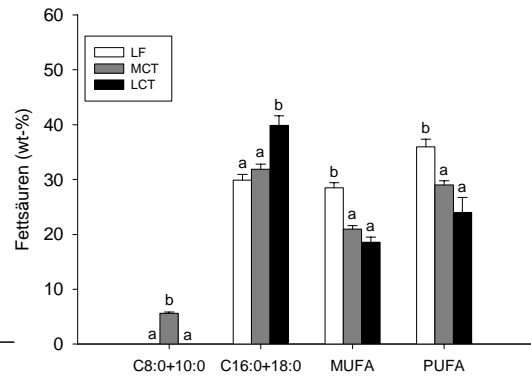
Mittelwert ± SEM; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede ($P < 0,05$ ANOVA mit anschließendem *Student-Newman-Keuls* Test); $n = 11-12$; C 8:0+10:0 = Capryl- und Caprinsäure; C 16:0+18:0 = Palmitin- und Stearinsäure, MUFA = einfach-ungesättigte Fettsäuren (C16:1 + C18:1); PUFA = mehrfach ungesättigte Fettsäuren (C18:2 + C18:3 + C20:4 + C22:6)

M. gastrocnemius

A

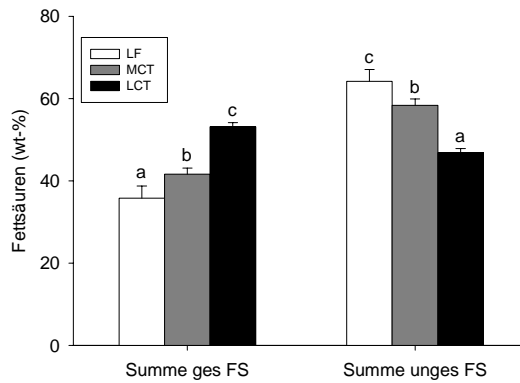


B

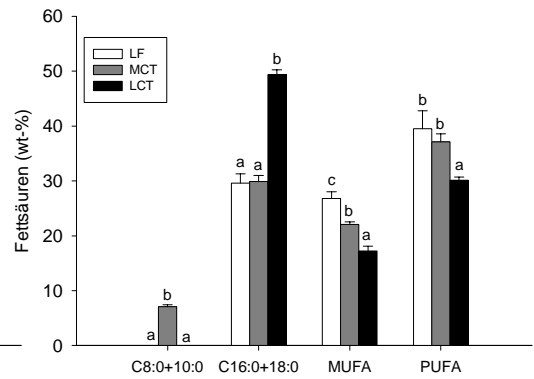


Herzmuskel

C

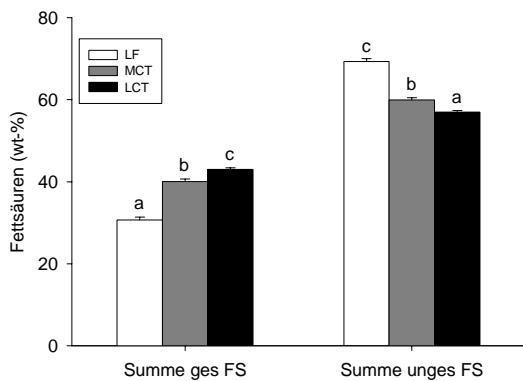


D



Retroperitoneales Fettgewebe

E



F

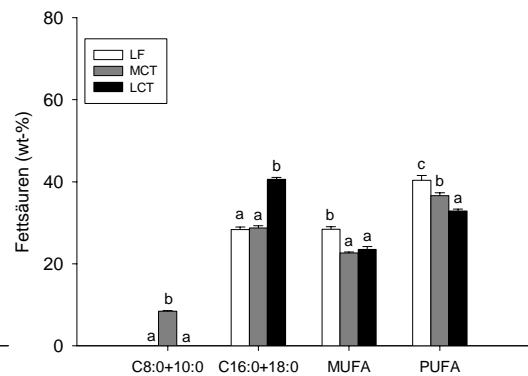


Abbildung A3: Fettsäuremuster in der Triglyceridfraktion des M. gastrocnemius, des Herzmuskels und des retroperitonealen Fettgewebes der Ratten (%) nach der Fütterungsperiode und dem nächtlichen Fasten (Experiment B-a)

Mittelwert ± SEM; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede ($P < 0,05$ ANOVA mit anschließendem *Student-Newman-Keuls* Test); $n = 7-12$; C 8:0+10:0 = Capryl- und Caprinsäure; C 16:0+18:0 = Palmitin- und Stearinsäure, MUFA = einfach-ungesättigte Fettsäuren (C16:1 + C18:1); PUFA = mehrfach ungesättigte Fettsäuren (C18:2 + C18:3 + C20:4 + C22:6)

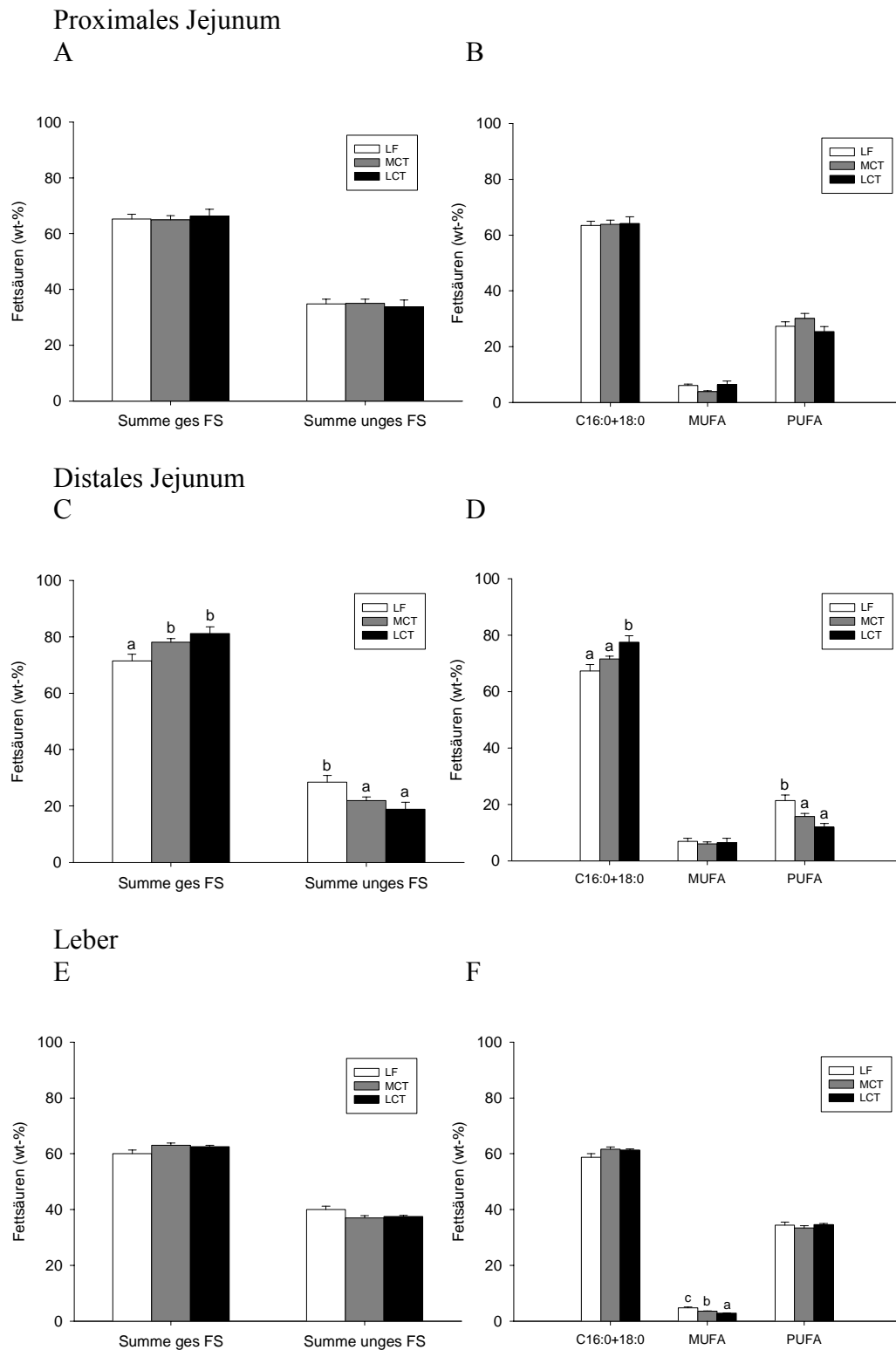


Abbildung A4: Fettsäuremuster in der Phospholipidfraktion des proximalen und distalen Jejunums sowie der Leber der Ratten (%) nach der Fütterungsperiode und dem nächtlichen Fasten (Experiment B-a)

Mittelwert ± SEM; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede ($P < 0,05$ ANOVA mit anschließendem *Student-Newman-Keuls* Test); $n = 11-12$; C 8:0+10:0 = Capryl- und Caprinsäure; C 16:0+18:0 = Palmitin- und Stearinsäure, MUFA = einfach-ungesättigte Fettsäuren (C16:1 + C18:1); PUFA = mehrfach ungesättigte Fettsäuren (C18:2 + C18:3 + C20:4 + C22:6)

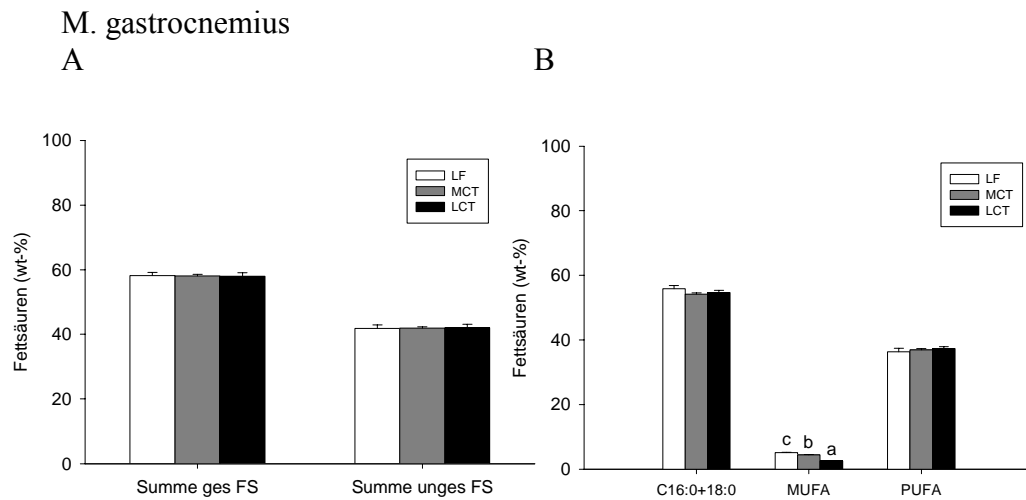


Abbildung A5: Fettsäuremuster in der Phospholipidfraktion des *M. gastrocnemius* der Ratten (%) nach der Fütterungsperiode und dem nächtlichen Fasten (Experiment B-a) Mittelwert \pm SEM; unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede ($P < 0,05$ ANOVA mit anschließendem *Student-Newman-Keuls* Test); $n = 7-12$; C 8:0+10:0 = Capryl- und Caprinsäure; C 16:0+18:0 = Palmitin- und Stearinsäure, MUFA = einfach-ungesättigte Fettsäuren (C16:1 + C18:1); PUFA = mehrfach ungesättigte Fettsäuren (C18:2 + C18:3 + C20:4 + C22:6)

Danksagung

An dieser möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danken. Auch wenn ich nicht alle Personen, die mich bei der Fertigstellung der Arbeit fachlich und moralisch unterstützt haben, mit Namen erwähnen kann, so möchte ich doch einige Personen besonders hervorheben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. S. Wolfram sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die Übernahme des Referats, sowie für seine freundliche Unterstützung und engagierte Durchsicht des Manuskripts. Genauso herzlich möchte ich Herrn Prof. Dr. J. Schrezenmeir dafür danken, dass ich an seinem Institut die Arbeit durchführen konnte, dass er mir die Möglichkeit gab, andere Themen nicht aus den Augen zu verlieren und für sein stetes Interesse und die Übernahme des Koreferats.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologie und Biochemie der Ernährung, der Forschergruppe und des Instituts für Tierernährung und Stoffwechselfysiologie danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft und den freundlichen Umgang miteinander. Insbesondere Frau Dr. M. Pfeuffer, Herrn Dr. M. deVrese und Herrn Dr. N. Roos danke ich für die anregenden Diskussionen und ihre Debattierfreudigkeit. Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. S. Wein, die sich mit mir das eine oder andere Wochenende in Schädtkbek um die Ohren geschlagen hat. Den Mitarbeitern der Versuchsstation Schädtkbek, Frau K. Gonda, Herrn J. Kunze und Herrn H. Fischer, danke ich für ihre Unterstützung bei der Durchführung der zahlreichen Tierexperimente.

Des weitern danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die finanzielle Förderung. Den im Rahmen des Kieler Netzwerks „Nahrungsfette und Stoffwechsel – Genvariabilität, -regulation, -funktion und funktionelle Lebensmittelinhaltsstoffe“ beteiligten Kooperationspartnern aus Bratislava (Prof. Dr. I. Klimes, Prof. Dr. E. Sebkova, Dr. S. Wein), Kuopio (Prof. Dr. KH. Herzig, M. Lehtonen, A. Huotari) und Hamburg (Prof. Dr. H. Steinhart, A. Fliegel, I. Oppermann) möchte ich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit danken.

Schließlich danke ich ganz besonders meiner Familie und meinem Freund für ihre Unterstützung und dafür, dass sie mir immer zur Seite standen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Berit Marten
Geburtsdatum: 18 Juni 1975
Geburtsort: Wolfenbüttel
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

1981 – 1985 Grundschule am Geitelplatz Wolfenbüttel
1985 – 1987 Orientierungsstufe Wallstraße Wolfenbüttel
1987 – 1994 Theodor-Heuss-Gymnasium Wolfenbüttel
06/1994 Allgemeine Hochschulreife

1994 – 2001 Oecotrophologiestudium an der Christian-Albrechts-Universität
Kiel, Fachrichtung: Ernährungswissenschaft
10/1997 – 06/1998 Auslandsstudium am University College Cork (Irland),
Fachrichtung: Food Science & Nutrition
04/2000 – 07/2001 Diplomarbeit am Institut für Physiologie und Biochemie der
Ernährung, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und
Lebensmittel Kiel
07/2001 Diplom

Wissenschaftliche Mitarbeit

09/2001 – 12/2001 Klinik für Allgemeine Innere Medizin, Universitätsklinikum Kiel
01/2002 – 01/2003 Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung,
Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel Kiel
02/2003 – 03/2005 Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie,
Christian-Albrechts-Universität Kiel
04/2005 – 10/2005 Klinik für Allgemeine Innere Medizin, Universitätsklinikum Kiel
09/2005 – 12/2005 Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, Abteilung
Molekulare Ernährung, Christian-Albrechts-Universität Kiel

Kiel, den 17.11.2005