



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Einfluss von Lipidoxidationsprodukten auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen“

verfasst von / submitted by

Immanuel Stricker, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien, 2021 / Vienna, 2021

Studienkennzahl It. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 838

Studienrichtung It. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

Ass.-Prof. Mag. Dr. Marc Pignitter

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Masterarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle aus ungedruckten Quellen, gedruckter Literatur oder aus dem Internet im Wortlaut oder im wesentlichen Inhalt übernommenen Formulierungen und Gedanken wurden gemäß den wissenschaftlichen Richtlinien zitiert und durch genaue Quellenangabe kenntlich gemacht.

Immanuel Stricker

DANKSAGUNG

Besonders großer Dank gilt Herrn Ass.-Prof. Mag. Dr. Marc Pignitter für die Planung und Betreuung meiner Masterarbeit am Institut für Physiologische Chemie der Universität Wien. Weiters möchte ich mich vielmals bei Frau Dr.ⁱⁿ Dipl.-Ing. Sarah Franziska Frühwirth, BSc für ihre große Unterstützung und investierte Zeit in mein Projekt bedanken. Beide standen mir stets bei und nahmen sich auch während der Covid-19 Krise Zeit für meine Arbeit. Danke an Frau Verena Preinfalk, MSc und Frau Dr.ⁱⁿ Barbara Lieder für die Einarbeitung und Unterstützung beim Arbeiten in der Zellkultur. Zusätzlich möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima am Institut bedanken, zu dem alle MitarbeiterInnen beigetragen haben.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Freundin Doris und bei meinen Brüdern David und Nathanael bedanken. Meine Familie bedeutet mir alles. Vielen Dank meinen Eltern, die mein Studium erst ermöglicht und mich stets auf meinem Lebensweg unterstützt haben.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
Tabellenverzeichnis	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Hypothesen	2
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Lipidoxidation in Lebensmitteln	3
2.1.1 Lipidautoxidation	4
2.2 Verdauung und Absorption von Lipiden im Menschen.....	7
2.2.1 Verdauung von Lipiden	8
2.2.2 Einfluss der Phospholipide auf die Lipidoxidation in Lebensmitteln und die Aufnahme von Fettsäuren.....	9
2.2.3 Aufnahme von oxidierten Lipiden.....	13
2.2.4 Mögliche Transportmechanismen von Fettsäuren durch die intestinale Membran.....	15
3 Material	18
3.1 Chemikalien, Substanzen, Gegenstände, Geräte und Software	18
3.1.1 Lagerung bei Raumtemperatur	18
3.1.2 Lagerung bei 4 °C.....	19
3.1.3 Lagerung bei -20 °C	20
3.1.4 Verwendete Gase	21
3.1.5 Verwendete Gegenstände	21
3.1.6 Verwendete Geräte.....	22
3.1.7 Verwendete Software	23
4 Studiendesign und Methoden	24
4.1 Aufarbeitung der Sonnenblumenölproben.....	25
4.1.1 Thermische Behandlung	25
4.1.2 Auftrennung der polaren Fraktionen mittels Festphasenextraktion	26
4.2 Charakterisierung der Studienöle	28
4.2.1 Ermittlung der Fettsäurezusammensetzung mittels GC/FID.....	29

4.2.2	Bestimmung der Peroxidzahl der Ölproben mittels Titrimetrie	34
4.2.3	Messung von oxidierten Triglyceriden mittels LC-MS.....	36
4.2.4	Quantifizierung von Hexanal in den Ölproben mittels HS-GC/MS ...	42
4.3 Caco-2 Zellkultur.....		45
4.3.1	Caco-2 Zellen als geeignetes <i>in vitro</i> Modell.....	45
4.3.2	Vorbereitung der Sicherheitswerkbank und Reagenzien	45
4.3.3	Zellen auftauen.....	46
4.3.4	Nährmedium wechseln	46
4.3.5	Passagieren.....	47
4.3.6	Herstellung einer Zellsuspension	48
4.3.7	Bestimmung der Zellzahl.....	49
4.4 Einfluss von Lipidoxidationsprodukten auf die Zusammensetzung von Phospholipiden in Caco-2 Zellen.....		51
4.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration via Bradford Analyse	57
4.5 Einfluss von Lipidoxidationsprodukten auf die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen		59
4.5.1	MTT-Test auf Zellviabilität	62
4.6 Statistische Analyse		63
5 Ergebnisse und Diskussion.....		64
5.1 Charakterisierung der Studienöle.....		64
5.1.1	Ermittlung der Fettsäurezusammensetzung mittels GC/FID	64
5.1.2	Bestimmung der Peroxidzahl der Ölproben mittels Titrimetrie	66
5.1.3	Messung von oxidierten Triglyceriden in der polaren Ölfraktion mittels LC-MS	68
5.1.4	Quantifizierung von Hexanal in den Ölproben mittels HS-GC/MS ...	71
5.2 MTT-Test auf Zellviabilität		73
5.3 Einfluss von Lipidoxidationsprodukten auf die Zusammensetzung von Phospholipiden in Caco-2 Zellen.....		74
5.4 Einfluss von Lipidoxidationsprodukten auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen		79
5.4.1 Einfluss von (erhitztem) Sonnenblumenöl auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen.....		79
5.4.2 Einfluss von Linolsäure auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen		80

5.4.3 Einfluss von Linolsäurehydroperoxid auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen.....	82
5.4.4 Einfluss von Linolsäurehydroxid auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen.....	83
5.4.5 Einfluss von Hexanal auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen ...	85
6 Schlussbetrachtung.....	87
7 Zusammenfassung.....	91
8 Abstract	92
9 Literaturverzeichnis	93
10 Anhang.....	101

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Die drei Hauptreaktionen der Lipidautoxidation (mod. nach Kamal-Eldin und Appelqvist, 1996). ¹⁷	4
Abbildung 2: Bildung und Abnahme von Lipidoxidationsprodukten in Pflanzenölen während der Autoxidation (nach Pignitter und Somoza, 2012). ²⁴	5
Abbildung 3: Fettverdauung und -absorption (nach Armand <i>et al.</i> , 1994). ²⁹	7
Abbildung 4: Strukturformeln von a) Phosphatidylcholin, b) Phosphatidylethanolamin und c) Phosphatidylserin (modifiziert und entnommen aus Cui und Decker, 2016). ⁴⁵ .	10
Abbildung 5: Eine Remodellierung von intestinalen Phospholipiden ist für die Aufnahme von Nahrungslipiden erforderlich (modifiziert nach Wang <i>et al.</i> , 2016). ⁷	12
Abbildung 6: Studiendesign – Charakterisierung der Sonnenblumenölproben sowie Einfluss von Lipidoxidationsprodukten auf die Zusammensetzung der Phospholipide und auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen.	24
Abbildung 7: Externe Kalibrationsgeraden der vier untersuchten Fettsäuremethylester, n = 3.....	32
Abbildung 8: Kalibrationsgerade mit Glyceroltriheptadecanoat, n = 4.	41
Abbildung 9: Isotopen-Verdünnungsreihe für die Hexanalbestimmung, n = 4.....	44
Abbildung 10: Standardgeraden (BSA, c = 0 - 2 mg/mL) der drei biologischen Replikate zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen.	58
Abbildung 11: Prinzip des Assays zur Bestimmung der Fettsäureaufnahme. ⁹³	59
Abbildung 12: Schema der für die Inkubation verwendeten Testsubstanzen.	60
Abbildung 13: Bestimmung der Peroxidzahl der drei Sonnenblumenöle; n = 5, p < 0,009.	66
Abbildung 14: Epoxidierte Triglyceride[O] (n = 3; unterschiedliche Buchstaben weisen auf statistische Signifikanz (p<0,05) hin. Ermittelt durch eine einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von einem Holm-Sidak-Test (Post-Hoc)).....	68
Abbildung 15: Hydroperoxydierte Triglyceride [OOH] (n = 3; p > 0,05. Ermittelt durch eine einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von einem Holm-Sidak-Test (Post-Hoc)). ..	69
Abbildung 16: Bestimmung des Hexanalgehaltes in den (erhitzten) Sonnenblumenölproben; n = 3, p ≤ 0,003.....	71
Abbildung 17: Einfluss der Lipidoxidationsprodukte auf die Zellviabilität. Einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von einem Holm-Sidak-Test (Post-Hoc); n = 3 (3 biologische Replikate, je 2 technische Replikate); p > 0,05; Kontrolle = 99,9 % Puffer + 0,1% DMSO.	73
Abbildung 18: Einfluss von oxidiertem kaltgepresstem Sonnenblumenöl auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen; Verdünnungsfaktor 1:1000; n = 3 (3 biologische Replikate, je 2 technische Replikate); p > 0,05, einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von einem Holm-Sidak-Test (Post-Hoc).	80
Abbildung 19: Einfluss von Linolsäure (LA) auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen; n = 3 (3 biologische Replikate, je 2 technische Replikate); p > 0,05, einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von einem Holm-Sidak-Test (Post-Hoc).	81
Abbildung 20: Einfluss von Linolsäurehydroperoxid (LAOOH) auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen; n = 3 (3 biologische Replikate, je 2 technische Replikate); p < 0,001, einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von einem Holm-Sidak-Test (Post-Hoc).	82
Abbildung 21: Einfluss von Linolsäurehydroxid (LAOH) auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen; n = 3 (3 biologische Replikate, je 2 technische Replikate); p > 0,05, einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von einem Dunn's-Test (Post-Hoc).	84

Abbildung 22: Einfluss von Hexanal auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen; n = 3 (3 biologische Replikate, je 2 technische Replikate); p = 0,005, einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von einem Holm-Sidak-Test (Post-Hoc).....	85
Abbildung 23: Schematische Darstellung der Charakterisierung der verwendeten Sonnenblumenöle.	87
Abbildung 24: Eine 30-minütige Inkubation mit Lipidoxidationsprodukten wirkte sich unterschiedlich auf die Gehalte an Phosphatidylcholinen (PC) in Caco-2 Zellen aus...88	
Abbildung 25: Eine 30-minütige Inkubation mit Lipidoxidationsprodukten wirkte sich unterschiedlich auf die FS-Aufnahme von Caco-2 Zellen aus.....90	

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Phospholipide in Caco-2 Zellen (modifiziert nach Dias et al., 1992). ⁵⁰	10
Tabelle 2: Fettsäurezusammensetzung typischer Caco-2 Zellen (modifiziert nach Dias et. al., 1992). ⁵⁰	11
Tabelle 3: Quantifizierung von LAOH und Hexanal in verschiedenen Kompartimenten (apikal, im Lysat, basolateral) von HGT-1-Magenzellen nach Inkubation (6 h) mit LA [100 µM], mit LAOOH [100 µM] oder Inkubation (30 min) mit Hexanal [100 µM] (modifiziert nach Zaunschirm et al. (2019)). ³	14
Tabelle 4: CD36-mRNA-Spiegel entlang der Darmlängsachse in Enterozyten von Ratten. Angabe als Mittelwerte ± Standardfehler relativ zur Kontrolle mit 18S-mRNA (modifiziert nach Chen et al., 2001). ⁶⁷	16
Tabelle 5: Analysebedingungen der FAME-Bestimmung.....	29
Tabelle 6: Verlauf des Temperaturgradienten bei der FAME-Bestimmung.....	30
Tabelle 7: Spezifische Retentionszeiten der Fettsäuremethylester.	30
Tabelle 8: Ermittelte Konzentrationsbereiche der Kalibriergeraden.....	31
Tabelle 9: Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD, LOQ)	33
Tabelle 10: Einstellungen der LC-MS zur Bestimmung der oxidierten Triglyceride (oxTG).....	36
Tabelle 11: Komponenten der mobilen Phase.	37
Tabelle 12: Gradient-Elution der HPLC.....	37
Tabelle 13: MRM-Übergänge: „qualifier- und quantifier-Ionen“ der oxTG. ⁸⁵	38
Tabelle 14: Analyse von freier Linolsäure (LA), Linolsäurehydroxid (LAOH) und Linolsäurehydroperoxid (LAOOH) mittels LC-MS (nach Frühwirth et al., 2020). ⁸	39
Tabelle 15: Analyse von Phytosterolen als auch ihren Estern mit LA mittels LC-MS (nach Frühwirth et al., 2020). ⁸	40
Tabelle 16: Parameter der GC/MS-Anlage während der Hexanal-Bestimmung.	42
Tabelle 17: Verlauf des Temperaturgradienten.....	43
Tabelle 18: Analysierte Phosphatidylcholine (PC) und ihre berechneten spezifischen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z)	52
Tabelle 19: Analysierte Phosphatidylethanolamine (PE) und ihre berechneten spezifischen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z).....	53
Tabelle 20: Analysierte Phosphatidylserine (PS) und ihre berechneten spezifischen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z)	54
Tabelle 21: Fettsäurezusammensetzung des für die Studie verwendeten kaltgepressten Sonnenblumenöls. Die Referenzwerte für Sonnenblumenöle variieren, je nach Pflanzenzüchtung, besonders im Gehalt an Ölsäure (C18:1) und Linolsäure (C18:2). ⁹	65
Tabelle 22: Phosphatidylcholine (PC) in Caco-2 Zellen nach 30 min Inkubation mit oxidierten Lipiden.	75
Tabelle 23: Phosphatidylethanolamine (PE) in Caco-2 Zellen nach 30 min Inkubation mit oxidierten Lipiden.	76
Tabelle 24: Phosphatidylserine (PS) in Caco-2 Zellen nach 30 min Inkubation mit oxidierten Lipiden.	77

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AUC	= Fläche unter der Kurve (engl.: „area <u>under the curve</u> “)
Caco-2	= Humane kolorektale Adenokarzinomzellen (engl.: „human <u>colorectal adenocarcinoma</u> cells“)
DG	= <u>D</u> iglycerid
DHA	= Docosahexaensäure (engl.: „ <u>D</u> oco <u>hexaenoic</u> <u>a</u> cid“)
DMSO	= <u>D</u> imethyl <u>sulfoxid</u>
EPA	= Eicosapentaensäure (engl.: „ <u>E</u> icosapentaenoic <u>a</u> cid“)
FAME	= Fettsäure-Methylester (engl.: „ <u>f</u> atty <u>a</u> cid <u>m</u> ethyl <u>e</u> ster“)
FBS	= Fetales Kälberserum (engl.: „ <u>f</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum“)
FS/FA	= <u>F</u> ettsäure (engl.: „ <u>f</u> atty <u>a</u> cid“)
FSBP/FABP	= <u>F</u> ettsäure <u>bindungs</u> proteine (engl.: „ <u>f</u> atty <u>a</u> cid <u>b</u> inding <u>p</u> rotein“)
HEXA	= Hexanal
HGT-1	= Menschliche Magenkrebszelllinie (engl.: „ <u>h</u> uman <u>gt</u> umour <u>c</u> ell <u>l</u> ine“)
HIGH	= Hocherhitztes kaltgepresstes Sonnenblumenöl (engl.: „severely heated cold-pressed sunflower oil“)
LA	= Linolsäure (engl.: „ <u>l</u> inoleic <u>a</u> cid“)
LAOH	= Linolsäurehydroxid (LAOOH) (engl.: „ <u>l</u> inoleic <u>a</u> cid hydroxide“)
LAOOH	= Linolsäurehydroperoxid (engl.: „ <u>l</u> inoleic <u>a</u> cid hydroperoxide“)
LOD	= Nachweisgrenze (engl.: „ <u>l</u> imit <u>o</u> f <u>d</u> etection“)
LOQ	= Quantifizierungsgrenze (engl.: „ <u>l</u> imit <u>o</u> f <u>q</u> uantification“)
m/z	= Masse-zu-Ladung-Verhältnis
µM	= Mikromolar
MED	= Mäßig erhitzt kaltgepresstes Sonnenblumenöl (engl.: „moderately heated cold-pressed sunflower oil“)
meq O ₂ /kg	= Milliäquivalent Sauerstoff pro Kilogramm

MG	= <u>Monoglycerid</u>
MRM	= <u>Multiple Reaction Mode</u>
MTT	= 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (ein Farbstoff)
MUFA	= Einfach ungesättigte Fettsäure (engl.: „ <u>monounsaturated fatty acid</u> “)
PC	= <u>Phosphatidylcholin</u>
PE	= <u>Phosphatidylethanolamin</u>
PI	= <u>Phosphatidylinositol</u>
PL	= <u>Phospholipid</u> (engl.: „ <u>phospholipid</u> “)
PS	= <u>Phosphatidylserin</u>
PUFA	= Mehrfach ungesättigte Fettsäure (engl.: „ <u>polyunsaturated fatty acid</u> “)
PVDF	= <u>Polyvinyldenfluorid</u>
SFA	= Gesättigte Fettsäure (engl.: „ <u>saturated fatty acid</u> “)
SFM	= <u>Serumfreies Medium</u>
SM	= <u>Sphingomyelin</u>
SÖ	= kaltgepresstes, unbehandeltes <u>Sonnenblumenöl</u> (engl.: „ <u>cold-pressed, untreated sunflower oil</u> “)
TG	= <u>Triglycerid</u>
VF	= <u>Verdünnungsfaktor</u>
vgl.	= <u>Vergleich/vergleiche</u>

1 Einleitung

Erwärmung und eine lange, oftmals ungünstige Lagerung von pflanzlichen Ölen kann zu einem Anstieg von Lipidoxidationsprodukten und somit zur Beeinträchtigung der Produktqualität von Lebensmitteln führen. So sind beispielsweise die Änderung von strukturellen Eigenschaften, die Änderung der Farbe des Lebensmittels sowie das Entstehen von unangenehmen Nebenaromen („ranzig werden“) direkt oder indirekt auf eine vermehrte Lipidoxidation zurückzuführen. Eine Verkürzung der Haltbarkeit und somit das Verderben von Lebensmitteln ist die Folge.¹ Hauptursachen für die Entstehung von Lipidoxidationsprodukten sind die erhöhte Exposition der Produkte an Sauerstoff, Temperatur und Licht.² Generell kann zwischen primären und sekundären Lipidoxidationsprodukten unterschieden werden. Ergebnisse von Zaunschirm *et al.* (2019)³ zeigten, dass die Lipidoxidationsprodukte der Linolsäure (LA), eine in pflanzlichen Ölen häufig vorkommende mehrfach ungesättigte Fettsäure (FS), von Magenzellen (HGT-1 Zellen) aufgenommen werden können. Dabei wird LA und ihr primäres Oxidationsprodukt, Linolsäurehydroperoxid (LAOOH), zu Linolsäurehydroxid (LAOH) abgebaut, welches sehr wahrscheinlich auch von Magenzellen absorbiert werden kann. Die Ergebnisse weisen ebenfalls darauf hin, dass sekundäre Oxidationsprodukte, wie Hexanal, ebenfalls von HGT-1 Zellen absorbiert werden können.³

Allgemein werden Lipide, vor allem in Form von Triglyceriden (TG), aus der Nahrung vom Menschen aufgenommen. Im Zuge der Verdauung werden TG durch Lipasen in Diglyceride (DG), Monoglyceride (MG) und freien FS enzymatisch gespalten und zuletzt durch den Magen bzw. hauptsächlich durch den Dünndarm aufgenommen.^{4,5} Arnis Kuksis (1986)⁶ untersuchte die Auswirkungen einer fettreichen Nahrung auf die Zusammensetzung der Phospholipide (PL) der Darmzottenmembranen von Ratten. Futter, welches mit Maiskeimöl angereichert wurde, führte verglichen zur fastenden bzw. standardmäßig gefütterten Gruppe zu einem deutlichen Anstieg der Phospholipidklassen in den Membranen. Dieser Anstieg wurde unter anderem bei den Phospholipidklassen Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamin (PE) festgestellt. Eine fettreiche Ernährung kann somit einen Einfluss auf die Zusammensetzung der PL in Membranen haben.⁶

Intestinale Membranen mit eingelagerten PL, welche reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) sind, können FS verbessert aufnehmen als Membranen, die zum großen Teil PL mit gesättigten FS enthalten.⁷ Frühwirth *et al.* (2020)⁸ zeigten, dass eine thermische Behandlung von Traubenkernölen zu einem Anstieg von oxidierten Triglyceriden (oxTG) führte. Die sechsständige Inkubation von HGT-1 Zellen mit oxidierten Lipiden aus nicht verdauten Ölen induzierte die Bildung von zellulären PL, die aus ungesättigten FS bestanden, um etwa 40 bis 60 Prozent. Die Phospholipidklassen, die diesen Anstieg in Magenzellen zeigten, waren die Phosphocholine PC(18:1/22:6) und PC(18:2/0:0), das Phosphoserin PS(42:8) sowie das Phosphoinositol PI(20:4/0:0).⁸ Über den Einfluss von Lipidoxidationsprodukten auf die Remodellierung von PL und somit mögliche Effekte auf die Fettsäureabsorption von Darmzellen ist noch nichts bekannt.

In dieser Arbeit wurde ein handelsübliches, kaltgepresstes Sonnenblumenöl erhitzt und anschließend charakterisiert (vgl. Kapitel 4.1 und 4.2). Teil der Charakterisierung des Sonnenblumenöls war die Ermittlung der Fettsäurezusammensetzung als auch die Bestimmung von primären und sekundären Lipidoxidationsprodukten. Die Peroxidzahl (POZ) und damit der Gehalt an Hydroperoxiden in den Ölproben wurden ermittelt, epoxidierte und hydroperoxydierte Triglyceride analysiert als auch der Gehalt an Hexanal bestimmt. Sonnenblumenöl wurde gewählt, da es reich an LA ist und in vielen westlichen Haushalten regelmäßig konsumiert wird.⁹

Nach der Charakterisierung der Öle wurde der Einfluss von Lipidoxidationsprodukten auf die Zusammensetzung von PL und auf die FS-Aufnahme von Caco-2 Zellen untersucht.

1.1 Hypothesen

„Lipidoxidationsprodukte aus der Nahrung beeinflussen die Zusammensetzung der Phospholipide in Caco-2 Zellen.“

„Lipidoxidationsprodukte aus der Nahrung beeinflussen die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen.“

2 Literaturübersicht

2.1 Lipidoxidation in Lebensmitteln

Die Lipidoxidation in Lebensmitteln stellt sowohl die Lebensmittelindustrie als auch Konsument*innen vor verschiedene Probleme.¹⁰ Durch die Lipidoxidation können unterschiedliche für den Menschen potenziell toxische Verbindungen entstehen, welche die Produktqualität negativ beeinflussen können.¹¹ Insbesondere von Lipiden abgeleitete Elektrophile (typischerweise Aldehyde) können Reaktionen mit der Desoxyribonukleinsäure, mit Proteinen und anderen nukleophilen Biomolekülen induzieren. oxidative Prozesse im Menschen werden mit dem Altern als auch der Entstehung einer Reihe von degenerativen Erkrankungsbildern wie Krebs, Atherosklerose, Makuladegeneration, Alzheimer sowie Parkinson in Verbindung gebracht und schon seit vielen Jahren wissenschaftlich diskutiert.¹²⁻¹⁴

In Lebensmitteln zersetzen sich ungesättigte FS, welche einst zum Glyceringerüst eines TG oder PL verestert waren, in flüchtige Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht. Solche „ranzigen“ Nebenaromen werden von Konsument*innen unangenehm und schlecht riechend bzw. schmeckend wahrgenommen und sind ein deutliches Indiz für eine vorangeschrittene Lipidoxidation.¹⁰ Dabei sind ein Mix aus Zersetzungprodukte von Hydroperoxiden wie zum Beispiel aliphatische Carbonylverbindungen für den Geschmacksverlust und das „oxidative Aroma“ im oxidierten Speiseöl hauptverantwortlich.¹⁵ Allgemein ist der Einsatz von Ölen, die reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) sind, in funktionellen Lebensmitteln als ernährungsphysiologisch vorteilhafte Zutat aufgrund der oxidativen Instabilität eingeschränkt.¹⁶ Der Grund für die erhöhte Anfälligkeit für die Lipidoxidation von PUFA, verglichen mit gesättigten FS und einfach ungesättigten FS (MUFA) liegt in der höheren Anzahl an Doppelbindungen.^{15,17}

Eine erhöhte Oxidationsstabilität kann durch eine Verringerung der Konzentrationen an PUFA erreicht werden. Dies kann entweder durch die Fetthärtung oder durch das Ersetzen von PUFA-reichen Ölen durch tropische Lipide mit erhöhtem Gehalt an gesättigten FS, wie Palm-, Shea-, Kokos- oder Kakaofett, erreicht werden. Durch die Fetthärtung können Transfettsäuren

entstehen, welche bei einem erhöhten Konsum mit einer erhöhten Inzidenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, diversen Krebserkrankungen und somit mit einer erhöhten Gesamtmortalität in Verbindung gebracht werden kann.^{18,19} Die gängige industrielle Praxis, PUFA-reiche Öle mit tropischen Lipiden zu ersetzen, steht außerdem im Widerspruch zu weit verbreiteten Ernährungsempfehlungen, die einen erhöhten Konsum von MUFA und PUFA anraten.^{16,20} Zudem wird die hohe Produktion von tropischen Alternativen, insbesondere des Fettes der Ölpalme, häufig wegen der Entstehung von ökologischen und menschenrechtlichen Problemen nicht nur von Umweltschutzorganisationen in den Massenmedien kritisiert. Letztendlich verkürzt eine fortschreitende Lipidoxidation immer die Haltbarkeit und beschleunigt somit das Verderben von Lebensmitteln.¹⁰

2.1.1 Lipidautoxidation

Die Autoxidation von Lipiden kann im Wesentlichen in drei Hauptreaktionen unterteilt werden: Initiation, Propagation und Termination (vgl. Abbildung 1).²¹

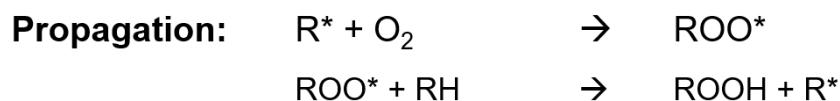


Abbildung 1: Die drei Hauptreaktionen der Lipidautoxidation (mod. nach Kamal-Eldin und Appelqvist, 1996).¹⁷

Die Initiationsreaktion ist der geschwindigkeitslimitierende Faktor der Lipidautoxidation, läuft thermodynamisch nicht spontan ab und benötigt einen Initiator, um die Kettenreaktion zu starten. Die Initiation läuft normalerweise eher langsam ab und hängt vom verwendeten Initiator ab.²² Solche Initiatoren sind zum Beispiel Wärme, Licht, Metalle oder/und Enzyme.¹⁷ Bei der Initiationsreaktion werden Alkylradiikale (R*) einer ungesättigten FS durch die

Abspaltung eines Wasserstoffatoms (RH) erzeugt. Die zur Entfernung von Wasserstoff aus FS oder Acylglycerinen erforderliche Energie hängt von der Position des Wasserstoffatoms in den Molekülen ab. Wasserstoffatome, welche sehr nahe an die Doppelbindungen angrenzen, lassen sich leichter entfernen. Bei PUFA lässt sich zum Beispiel der Wasserstoff, welcher zwischen den beiden Doppelbindungen an Kohlenstoff gebunden vorliegt, besonders leicht entfernen.¹⁵ Bei der Propagation induzieren die durch die Initiation gebildeten Radikale weitere Reaktionen. So kommt es beispielsweise durch Peroxylradikale zu einer Abstraktion von Wasserstoffatomen anderer Lipidmoleküle (RH), wodurch wieder neue Radikale gebildet werden.¹⁷ Die Rate für die Bildung von Lipidperoxylradikalen und Hydroperoxiden hängt von der Sauerstoffverfügbarkeit sowie der Temperatur ab.²³ Die primären Oxidationsprodukte, wie Lipidhydroperoxide, sind bei Raumtemperatur und in Abwesenheit von Metallen relativ stabil.¹⁵ Hydroperoxide entstehen in den frühen Phasen der Lipidoxidation, der Initiation und Propagation.^{21,24,25} Abbildung 2 zeigt die Autoxidation im zeitlichen Verlauf.

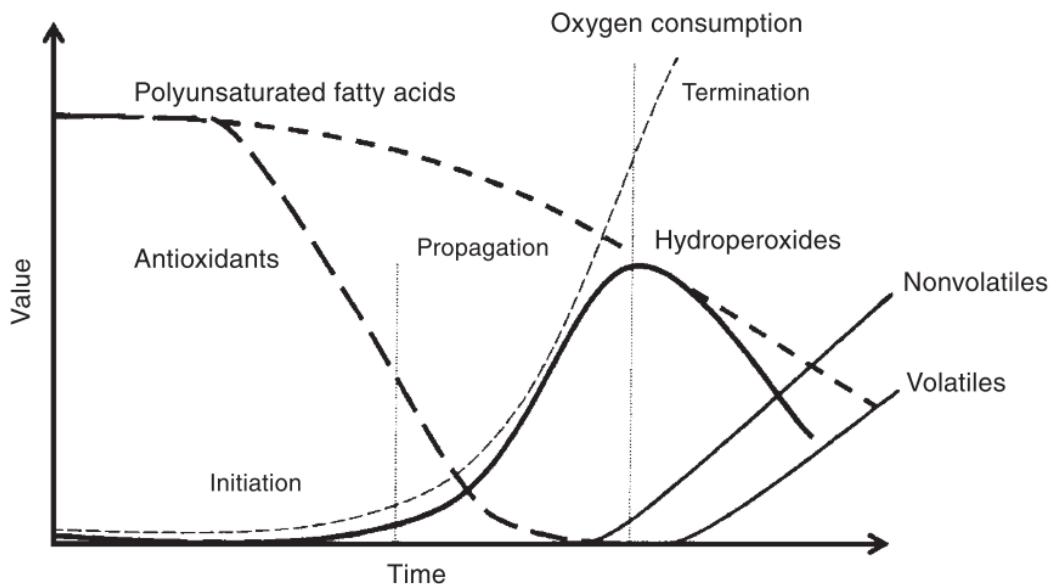


Abbildung 2: Bildung und Abnahme von Lipidoxidationsprodukten in Pflanzenölen während der Autoxidation (nach Pignitter und Somoza, 2012).²⁴

Nach der Elektronenumlagerung, der Zugabe von Hydroxylradikalen oder dem Wasserstofftransfer sind die endgültigen sekundären Lipidoxidationsprodukte meist niedermolekulare Aldehyde, Ketone, Alkohole und kurzkettige Kohlenwasserstoffe, Ester, Furane und Lactone. Die Zeit für die Sekundärproduktbildung aus dem primären Oxidationsprodukt Hydroperoxid

variiert je nach Ölart. In Oliven- und Rapsölen entstehen sekundäre Oxidationsprodukte beispielsweise schon unmittelbar nach der Hydroperoxidbildung.²⁶ Lipidhydroperoxide können jedoch auch zu Epoxyhydroperoxiden, Oxohydroperoxiden, Bihydroperoxiden, cyclischen Peroxiden und bicyclischen Endoperoxiden oxidiert werden.^{15,21} Wenn alle vorhandenen Lipide oxidiert sind und Radikale miteinander reagieren (Termination), entstehen nichtradikale Spezies und die Reaktion stoppt. Die Kettenreaktion läuft somit so lange bis keine Wasserstoffatome mehr zur Verfügung stehen oder die Kette unterbrochen wird.^{15,17,27} Lipidhydroperoxide können jedoch auch Kondensationsreaktionen eingehen, die den Autoxidationsprozess unter Bildung von flüchtigen sekundären Oxidationsprodukten, wie zum Beispiel von Dimeren und Polymeren, beenden können.^{21,22}

Im nächsten Kapitel 2.2 wird näher darauf eingegangen, ob und wie oxidierte Lipide vom menschlichen Körper aufgenommen werden können.

2.2 Verdauung und Absorption von Lipiden im Menschen

Lipide und lipidähnliche Substanzen werden überwiegend über die Nahrung aufgenommen und dienen dem menschlichen Körper mit etwa 9 Kilokalorien pro Gramm als bedeutende Energiequelle und wichtigste Energiereserve. Darüber hinaus besitzen Lipide viele wichtige physiologische Funktionen, wie der Aufbau von Zellmembranen, die Verbesserung der Absorption fettlöslicher Vitamine als auch die Synthese von biologisch wirksamen Substanzen. Nahrungslipide sind größtenteils in Form von TG strukturiert, welche vor ihrer Absorption in freie FS und MG gespalten werden müssen.²⁸ Die wichtigsten Schritte der Fettverdauung sind die Hydrolyse, Mizellisierung und Absorption durch Enterozyten.⁵

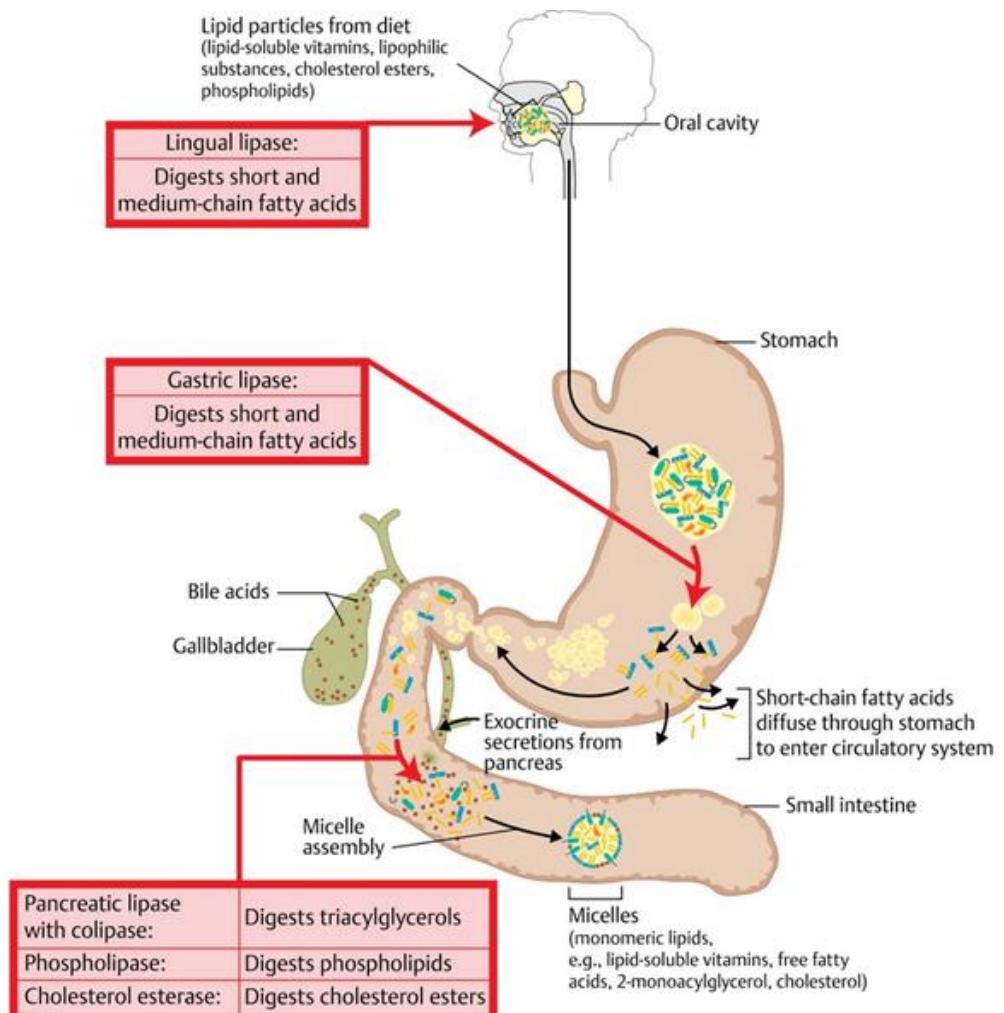


Abbildung 3: Fettverdauung und -absorption (nach Armand *et al.*, 1994).²⁹

2.2.1 Verdauung von Lipiden

Auch wenn Lipasen an verschiedenen anatomischen Regionen des oberen Verdauungstrakts synthetisiert werden, beginnt die partielle Hydrolyse von Fetten beim erwachsenen Menschen erst im Magen. Es wurde gezeigt, dass eine Lipase-Aktivität größtenteils nur in der Magenschleimhaut stattfindet.³⁰ Der optimale pH-Bereich der preduodenalen Lipasen liegt zwischen 4,5 und 5,5.³¹ Im lingualen Bereich, Pharynx und Antrum konnte keine signifikante Aktivität der Lipasen festgestellt werden. Die Aktivität der Lipase im Magen entspricht in etwa 20 Prozent jener des Pankreas-Gegenstückes.^{31,32} Andere Autoren beschreiben eine Hydrolyse der TG-Ketten durch die gastrische Lipase zu knapp zwölf Prozent innerhalb der ersten Stunde bzw. zu 17,5 Prozent im Gesamtverlauf der Verdauung.^{29,33} Die Aktivität der gastrischen Lipase nimmt im Duodenum deutlich ab.³⁴ Im Duodenum wird die Hydrolyse durch Pankreaslipasen fortgesetzt, welche bis zu 70 Prozent der Nahrungsfettsäuren freisetzen.⁵ TG werden durch Pankreaslipasen zu DG und anschließend zu MG und freie FS hydrolysiert (vgl. Abbildung 3).³⁵ Gallensäuren, auch Gallensalze genannt, leisten einen wesentlichen Beitrag an der Verdauung von Lipiden. Ihre Hauptaufgabe liegt darin, große Fettropfen in winzige Assoziationskolloide (Mizellen) zu emulgieren und somit Nahrungslipide für Lipasen besser zugänglich zu machen.³⁶ Gallensalze werden aus Hepatozyten in der Leber synthetisiert, über den Hauptgallengang ans Duodenum abgegeben und im gesamten Darm effizient rückresorbiert. Anschließend werden Gallensäuren über die *vena portae hepatis* der Leber zurückgeführt, woraufhin der enterohepatische Kreislauf von Neuem beginnt. Lediglich fünf Prozent der Gallensäuren gehen im Kot verloren.³⁷ Gallensalze können in niedrigen Konzentrationen die Pankreaslipasen-Aktivität verbessern, in höheren Konzentrationen kann ein gegenteiliger Effekt auftreten. Diese Art von Homöostase, FS aus Nahrungs-TG vermehrt oder verringert zu hydrolisieren, wird durch die Colipase reguliert. Ist die Colipase nicht vorhanden, so kann dies zu gravierenden gesundheitlichen Folgen wie einer deutlich verringerte Bioverfügbarkeit von Nahrungslipiden und demzufolge zu Hypovitaminosen (Vitamin A, D, E, und K) führen. Darüber hinaus ist das Pankreasenzym Carboxylesterlipase an der Lipidverdauung beteiligt. Die Carboxylesterlipase wird durch Gallensalze stimuliert und weist breite Substrat-

Reaktivitäten auf. Durch die Wechselwirkungen zwischen den Produkten der Lipolyse und den Gallensalzen kommt es zur weiteren Bildung von Mizellen.⁵

Bereits seit den 1940er Jahren wird ein Mangel an essenziellen FS in Darmmembranen mit Malabsorptionen in Verbindung gebracht.^{38–40} Über die Mechanismen dieser Theorie ist noch wenig bekannt. Verschiedene Publikationen zeigten, dass Defekte bei diversen intrazellulären Ereignissen zu einer verringerten Fettabsorption bei Mangel an essenziellen FS beitragen können. Diese intrazellulären Prozesse sind zum Beispiel die FS-Aufnahme, die Umesterung von TG, Lipolyse, Solubilisierung durch Galle oder/und die Sekretion von Chylomikronen in die Lymphe.^{38,39,41} Die Lipid-Malabsorption ist nicht nur eine der Hauptursachen für einen Mangel an essenziellen FS, sondern sie tritt auch sekundär zur Defizienz an essenziellen FS auf.⁴² Wie sich der Verlust von essenziellen FS auf diese Prozesse auswirken kann, ist noch ungeklärt.⁷

2.2.2 Einfluss der Phospholipide auf die Lipidoxidation in Lebensmitteln und die Aufnahme von Fettsäuren

PL sind amphiphile Moleküle, die beim Aufbau biologischer Membranen eine wichtige Rolle spielen. Sie bilden in Membranen eine kontinuierliche Doppelschicht aus Lipidmolekülen und erleichtern biologische Funktionen wie Transport und Signalübertragung.⁴³ Phosphoglyceride sind wichtige Vertreter der PL. Sie tragen Glycerin als Grundgerüst, welches typischerweise an der sn-3 Gruppe mit einer Phosphatgruppe verbunden ist. Zudem befinden sich an den Positionen sn-1 und s-2 je eine veresterte FS. Gesättigte FS (SFA) befinden sich häufiger an Position sn-1, ungesättigte FS neigen dazu, an Position sn-2 verestert zu werden. Wenn die an die Phosphatgruppe gebundene Gruppe Cholin ist, wird dieses PL Phosphatidylcholin (→ PC) genannt. Weitere Substitutionsgruppen an der Phosphatgruppe sind zum Beispiel Ethanolamin oder Serin (vgl. Abbildung 4). Darüber hinaus gibt es eine andere Art von Lipiden, Sphingolipide, die manchmal als PL angesehen werden, da sie eine PC- oder PE-Gruppe in den Molekülen enthalten können.⁴⁴ Ein geeignetes Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten FS in PL ist für lebende Zellen wichtig, da der Sättigungsgrad den physikalischen Zustand, wie die Fließfähigkeit der Zellmembran, bestimmt.⁴⁵

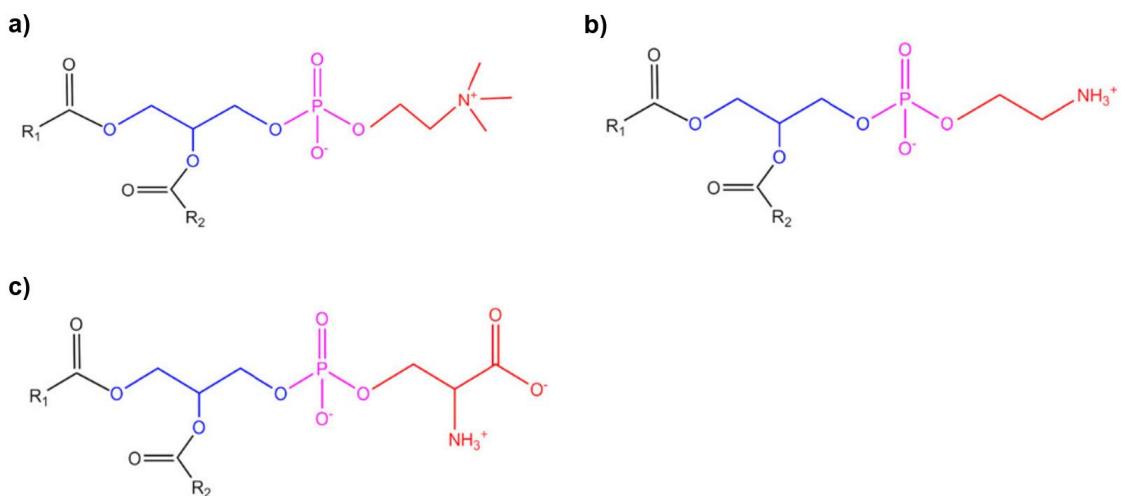


Abbildung 4: Strukturformeln von a) Phosphatidylcholin, b) Phosphatidylethanolamin und c) Phosphatidylserin (modifiziert und entnommen aus Cui und Decker, 2016).⁴⁵

Die Konzentration und Zusammensetzung der für Lebensmittel endogenen PL hängt generell von der Herkunft eines Lebensmittels (pflanzlich/tierisch), seiner Spezies sowie von der Verarbeitung ab.⁴⁵ PL aus Kaltwasser-Meerestieren sind so im Vergleich zu warmen Süßwasserspezies stark ungesättigt und reich an Omega-3-FS.⁴⁶ Die FS-Zusammensetzung von PL variiert ebenfalls je nach Herkunft. Darüber hinaus gibt es viele Hinweise, dass Nahrungslipide die Zusammensetzung der PL-FS beeinflussen können.^{47–49}

Tabelle 1: Zusammensetzung der Phospholipide in Caco-2 Zellen (modifiziert nach Dias et al., 1992).⁵⁰

PL-Subklasse	Anteil in Caco-2 Zellen [%]
Phosphatidylcholin (PC)	52,6
Phosphatidylethanolamin (PE)	19,3
Phosphatidylserin (PS)	16,6
andere PL*	11,5

*Phosphatidylinositol (PI) und Sphingomyelin (SM)

Die wichtigsten, in Darmzellen (Caco-2 Zellen) vorkommenden PL sind PC, PE, PS, Phosphatidylinositol (PI) und Sphingomyelin (SM) (vgl. Tabelle 1).

In Tabelle 2 sind die nach Dias *et al.* (1992)⁵⁰ in Caco-2 Zellen typischerweise vorkommenden FS gelistet. Weitere Autoren bestätigen das Vorliegen dieser FS in Caco-2 Zellen.^{51,52}

Tabelle 2: Fettsäurezusammensetzung typischer Caco-2 Zellen (modifiziert nach Dias *et. al.*, 1992).⁵⁰

Fettsäure	Anteil in Caco-2 Zellen [%]
C16:0 Palmitinsäure	24,7
C18:0 Stearinsäure	24,5
C18:1 n-9 Ölsäure	16,6
C18:2 n-6 Linolsäure	5,6
C20:4 n-6 Arachidonsäure	7,2
Summe andere FS (Anteil <2,5 %)	21,4

In der Lebensmittelindustrie werden PL häufig wegen ihren vielseitigen technologischen Eigenschaften eingesetzt. Die häufigsten Anwendungen von PL, wie Lecithin (= Phosphatidylcholin), in Lebensmitteln sind wohl jene als Emulgatoren. PL können jedoch auch aufgrund ihrer antioxidativen Wirkungen eingesetzt werden.^{45,53} Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert, wie PL die Lipidoxidation beeinflussen können.⁴⁵ PL können beispielsweise pro-oxidative Metalle binden oder während der Lipidoxidation durch die Maillard-Reaktion antioxidative Verbindungen produzieren.⁵⁴ Weitere antioxidative Mechanismen sind die Veränderung der Lokalisation von Antioxidantien wie Tocopherole sowie deren Regeneration.^{55,56} Die Wirkung als eigenständiges Oxidationssubstrat wird ebenfalls diskutiert. Mögliche antioxidative Eigenschaften in biologischen Membranen, wie Fleisch, sind ein hoher Anteil an ungesättigte FS, die negative Ladung (welche pro-oxidierende Metalle anzieht) oder die große Oberfläche von PL (wenn sie als Dispersionen vorliegen).⁵⁷ Andere Autoren konnten keine antioxidativen Wirkungen, sondern sogar pro-oxidative Wirkungen durch PL feststellen.^{58,59} Ein diskutierter pro-oxidativer Mechanismus von PL ist die Bildung von Assoziationskolloiden, welche die

Metall-Lipid-Wechselwirkungen erhöhen können. Bei der Beurteilung der PL ist es folglich wichtig, alle Möglichkeiten des Verhaltens von PL in der Matrix zu berücksichtigen, um ihre antioxidative beziehungsweise pro-oxidative Rolle zu verstehen, bevor sie zur Hemmung von Lipidoxidationsreaktionen eingesetzt werden können.⁴⁵ Die pro- beziehungsweise antioxidativen Effekte von PL könnten sich auch auf die Aufnahme von FS auswirken.

Nach Wang *et al.* (2016)⁷ ist eine Remodellierung von intestinalen PL notwendig, um die Diffusion von Lipiden durch die Zellmembran zu ermöglichen. Denn ein hoher Anteil an MG und PL im Lumen kann die Mizellisierung verbessern, wodurch die Absorption der Lipidmetabolite durch die Darmschleimhaut nochmals erleichtert wird.⁵ (vgl. Abbildung 5)

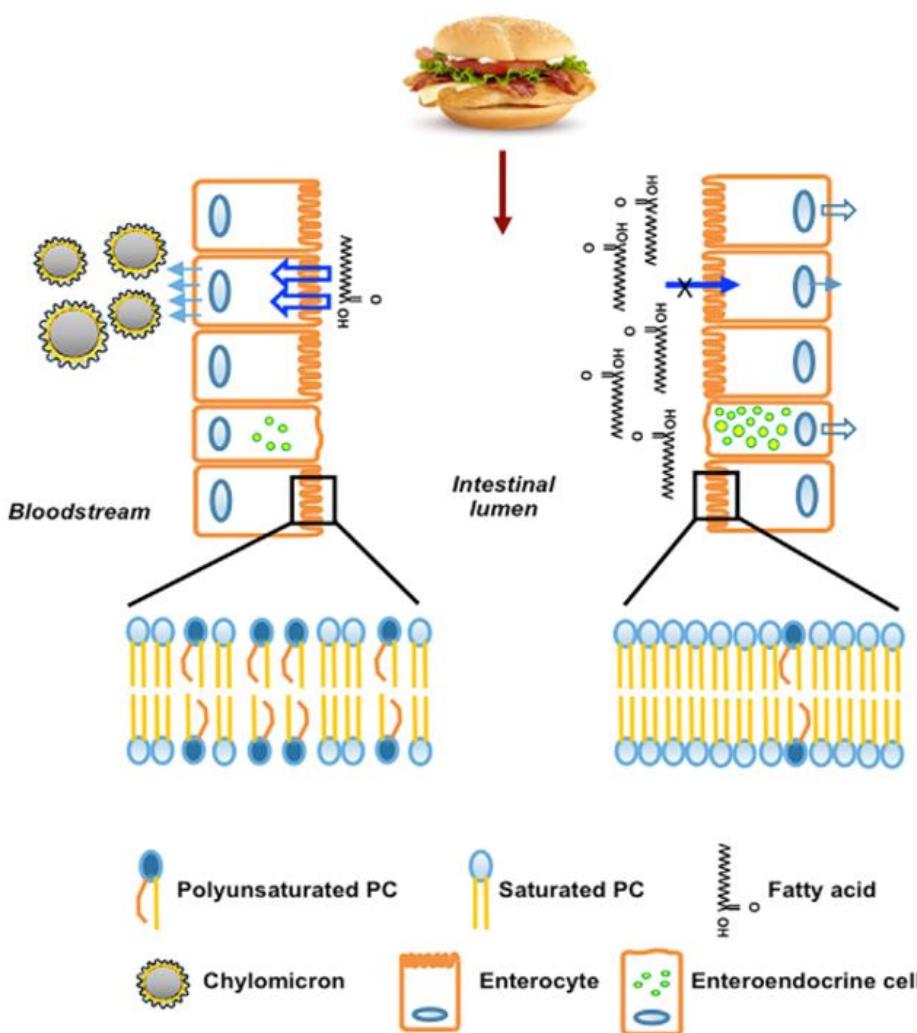


Abbildung 5: Eine Remodellierung von intestinalen Phospholipiden ist für die Aufnahme von Nahrungslipiden erforderlich (modifiziert nach Wang *et al.*, 2016).⁷

PL haben außerdem großen Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften von Membranen. Lpcat3 (Lysophosphatidylcholinacyltransferase 3) und andere Enzyme der Gruppe der Lysophospholipidacyltransferasen spielen bei der Regulation der Fettsäurezusammensetzung von PL und Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle.⁶⁰ Es ist anzunehmen, dass Änderungen beim Einbau von PUFA in PL den Lipidtransport durch die Zellmembran beeinflussen können. Eine Änderung der PL-Zusammensetzung durch das Enzym Lpcat3 hemmte jedenfalls die Absorption von FS und Cholesterin in Mäusen, welche für das Überleben bei einer fettreichen Ernährung erforderlich sind. Die Autoren Wang *et al.* (2016)⁷ kommen zum Schluss, dass die PL-Zusammensetzung in Membranen ein entscheidender Faktor für die passive Lipidabsorption ist, die unter anderem die Absorption mit der Nahrungsaufnahme koppelt.⁷

Über den Einfluss von Lipidoxidationsprodukten auf die Remodellierung von intestinalen PL und somit mögliche Effekte auf die FS-Aufnahme von Darmzellen ist derzeit noch wenig bekannt.

2.2.3 Aufnahme von oxidierten Lipiden

Die westliche Ernährung zeichnet sich durch einen hohen Konsum von wärmebehandelten Lipiden aus. Oftmals werden Öle durch Konsument*innen lange gelagert beziehungsweise hohen Temperaturen ausgesetzt, was zur vermehrten Bildung von Lipidperoxidationsprodukten führen kann (vgl. Kapitel 2.1). Die Nahrungsaufnahme von oxidierten Pflanzenölen wurde mit verschiedenen biologischen Wirkungen in Verbindung gebracht, wohingegen das Wissen über Wirkungen strukturell charakterisierter Lipidperoxidationsprodukte und ihre mögliche Absorption in den Körper knapp ist.³

Stapràns *et al.* (1994)⁶¹ untersuchten, ob oxidierte Öle in der Nahrung den Gehalt an oxidierten Lipiden in humanen postprandialen Serumchylomikronen beeinflussen können. Bei den Probanden, die hochoxidiertes Öl konsumierten, wurden durchschnittlich um 4,7-fach höhere Spiegel an konjugierte Diene in den Serumchylomikronen gemessen als in der Kontrollgruppe, welche niedrig oxidiertes Maiskeimöl erhielt. Diese Daten zeigen, dass oxidierte Lipide aus der Nahrung vom menschlichen Dünndarm absorbiert werden können, sich in Chylomikronen einlagern und im Blutkreislauf auftreten können.⁶¹

Ergebnisse einer *in vitro* Studie von Zaunschirm *et al.* (2019)³ zeigten, dass die Lipidoxidationsprodukte der LA, eine in pflanzlichen Ölen häufig vorkommende mehrfach ungesättigte FS, von Magenzellen (HGT-1 Zellen) aufgenommen werden können. Dabei wurde LA und ihr primäres Oxidationsprodukt LAOOH zu LAOH abgebaut, die sehr wahrscheinlich auch von Magenzellen absorbiert werden kann. Die Autoren weisen jedoch explizit darauf hin, dass die Abbauwege von LAOOH, die zur Bildung von LAOH führten, derzeit noch nicht vollständig erforscht sind. Die Ergebnisse weisen ebenfalls darauf hin, dass sekundäre Oxidationsprodukte, wie Hexanal, ebenfalls von Magenzellen absorbiert werden können (vgl. Tabelle 3).³

Tabelle 3: Quantifizierung von LAOH und Hexanal in verschiedenen Kompartimenten (apikal, im Lysat, basolateral) von HGT-1-Magenzellen nach Inkubation (6 h) mit LA [100 µM], mit LAOOH [100 µM] oder Inkubation (30 min) mit Hexanal [100 µM] (modifiziert nach Zaunschirm *et al.* (2019)).³

Inkubation mit	LA	LAOOH	Hexanal
Quantifizierung von	LAOH [µM]	LAOH [µM]	Hexanal [µM]
apikal	1,11 ± 0,05 ^a	1,22 ± 0,05 ^a	3,15 ± 0,62 ^b
im Lysat	n.d.	n.d.	n.d.
basolateral	1,12 ± 0,05 ^a	2,09 ± 0,53 ^{b,*}	1,11 ± 0,05 ^{a,*}

Die Daten werden als MW ± SA angezeigt (n = 3 - 4, technische Replikate = 1 - 2). Statistisch signifikante Unterschiede wurden unter Verwendung einer zweifachen Varianzanalyse ($p \leq 0,01$), gefolgt vom Holm-Sidak-Post-Hoc-Test ($p \leq 0,05$) analysiert. ^{a, b, c} Unterschiedliche Buchstaben in einer Reihe zeigen signifikante Unterschiede zwischen den drei Behandlungen an ($p \leq 0,05$). Sternchen (*) zeigen signifikante Unterschiede innerhalb einer Behandlung zwischen apikalen und basolateralen Kompartimenten an ($p \leq 0,05$).

Dasilva *et al.* (2018)⁶² untersuchten Caco-2-Zellen, die mit unterschiedlichen Anteilen an Docosahexaensäure (DHA) und Eicosapentaensäure (EPA) als auch mit oxidierten beziehungsweise nicht oxidierten PUFA inkubiert wurden. Die Ergebnisse zeigen eine inverse Korrelation zwischen Lipidoxidationsprodukten im Magen und dem Gehalt an bioverfügbarren PUFA. Außerdem weisen die

Autoren darauf hin, dass die Stabilität von PUFA während der Magen-Darm-Verdauung die anschließende Absorption stark beeinflussen kann.⁶²

Die Auswirkungen (einzelner) primärer und sekundärer Peroxidationsprodukte der LA auf den Fettsäurestoffwechsel sind noch nicht hinreichend geklärt.

2.2.4 Mögliche Transportmechanismen von Fettsäuren durch die intestinale Membran

Die intestinale Absorption von Lipiden ist hocheffizient, da mehr als 95% der Nahrungslipide aufgenommen werden können.⁶³ Es ist jedoch immer noch umstritten, ob FS durch passive Diffusion oder durchträgervermittelte Prozesse durch das apikale Plasmalemma der Enterozyten transportiert werden.^{64,65} Wichtige Fettsäuretransportproteine sind zum Beispiel FATP4 und CD36.⁶⁵⁻⁶⁷

Fettsäuretransportproteine

Die Fettsäuretransportproteine, häufiger Fettsäurebindungsproteine (FSBP, engl: „FABP“) genannt, bestehen aus intrazellulären Proteinen mit einer Größe von 14 bis 15 Kilodalton und wurden in den 1970er Jahren erstmals entdeckt.^{68,69}

Dasträgervermittelte Modell der FSBP basiert auf Beobachtungen, dass die FS-Aufnahme in Caco-2 Enterozyten mit FS sättigbar und wettbewerbsfähig ist.^{70,71}

Die ersten FSBP wurden in der Leber entdeckt (LFABP, FABP1), später konnten FSBP im Darm und in geringerem Maße auch in der Niere identifiziert werden.⁷² Intestinale FSBP, wie zum Beispiel IFABP oder FABP2, sind auch in intestinalen Enterozyten vorhanden und werden nach Storch und Corsico (2008) auch ausschließlich in diesem Gewebe exprimiert.⁷² In intestinalen Enterozyten werden nach einer Publikation von Storch und Gajda (2015) sowohl Leber-(LFABP, FABP1) als auch Darmfettsäurebindungsproteine (IFABP, FABP2) exprimiert, die höchstwahrscheinlich unterschiedliche Funktionen in den Enterozyten haben könnten. Diese Proteine weisen eine hohe Affinitätsbindung für langketige FS und andere hydrophobe Liganden auf, weshalb angenommen wird, dass sie an der Aufnahme und dem Transport von Lipiden im Darm beteiligt sind.⁷³ Das Vorhandensein von Lipidbindungsproteinen (\uparrow FSBP-Spiegel im Cytosol der Enterozyten) ist somit für die hohe Kapazität der Lipidaufnahme im Dünndarm sehr wahrscheinlich mitverantwortlich.⁷² Guilmeau *et al.* (2007)⁷⁴

fanden heraus, dass in den Zottenzellen von intestinalen Enterozyten zwei Typen von FSBP exprimiert werden, die in Kryptazellen nicht vorhanden waren.⁷⁴ Eine Überexpression von FATP4 hatte nach Stahl *et al.* (1999)⁶⁶ eine höhere FS-Aufnahme und die Verringerung der FATP4-Expression eine Hemmung der FS-Aufnahme um etwa 50 Prozent zur Folge. Die Autoren kamen zum Schluss, dass FATP4 der Haupttransporter für FS in Enterozyten ist und dies ein wichtiges Ziel für die Therapie gegen Fettleibigkeit darstellen könnte.⁶⁶

Die Fettsäure-Translokase, auch CD36 genannt, ist eines von mehreren diskutierten intestinalen Transportproteinen für langkettige FS. Chen *et al.* (2001)⁶⁷ fanden heraus, dass die CD36-mRNA-Spiegel der Darmschleimhaut je nach anatomischer Lage entlang der Darmlängsachse, stark variieren (vgl. Tabelle 4). Die CD36-Proteinspiegel im proximalen Bereich des Darms waren im Vergleich zur distalen Darmschleimhaut deutlich höher.⁶⁷

Tabelle 4: CD36-mRNA-Spiegel entlang der Darmlängsachse in Enterozyten von Ratten. Angabe als Mittelwerte \pm Standardfehler relativ zur Kontrolle mit 18S-mRNA (modifiziert nach Chen *et al.*, 2001).⁶⁷

Enterozyten im	CD36-mRNA-Spiegel [% 18S rRNA]
Magen	45 \pm 7
Duodenum	173 \pm 29
Jejunum	238 \pm 17
Ileum	117 \pm 14
Colon	9 \pm 1

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CD36 ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von langkettigen FS durch Dünndarm-Enterozyten haben könnte. Dies könnte auch wichtige Auswirkungen auf das Verständnis der FS-Aufnahme vom menschlichen Organismus haben.⁶⁷

Obwohl FSBP seit über 40 Jahren untersucht werden, bleibt ungewiss, warum sie so stark exprimiert werden und warum es so viele verschiedene FSBP gibt. Ihre spezifischen Funktionen müssen noch geklärt werden.⁷²

Passive Diffusion

Mehrere Autoren beschreiben die FS-Aufnahme in Enterozyten als einen passiven Prozess, welcher linear, protease-resistant und temperaturunabhängig ist.⁷⁵⁻⁷⁷ Während sich Daten aus *in vitro*-Studien vermehrt für die Diffusion aussprechen, stellt sich das Testen der passiven Diffusion *in vivo* aufgrund des Fehlens eines geeigneten Modellsystems als besonders schwierig dar. Es wurde bisher von keiner genetische Mutation berichtet, die die passive FS-Aufnahme bei Tieren direkt beeinflussen könnte.⁷

3 Material

3.1 Chemikalien, Substanzen, Gegenstände, Geräte und Software

3.1.1 Lagerung bei Raumtemperatur

- Aceton, ROTIPURAN® ≥99,8%, p.a., ACS, ISO | C₃H₆O | Carl Roth
- Acetonitril, ROTISOLV® HPLC/LC-MS grade | C₂H₃N | Roth
- Ammoniumformiat | HCOONH₄ | Sigma-Aldrich
- Chloroform/Trichlormethan (≥ 99 %, wasserfrei, enthält Amylene zur Stabilisierung) | CHCl₃ | Sigma-Aldrich
- Diethylether | (C₂H₅)₂O | Sigma-Aldrich
- Dimethylsulfoxid (DMSO) | C₂H₆OS | Sigma-Aldrich
- Eisessig (konzentrierte, wasserfreie Essigsäure), ROTIPURAN® (100 %, p.a.) | CH₃COOH | Carl Roth
- Erythrosin B | C₂₀H₆I₄Na₂O₅ | Sigma-Aldrich
- Ethanol (EtOH), vergällt | C₂H₅OH | Carl Roth
- Ethanol-Lösung (70%) | Ethanol (vergällt) mit zweifach destilliertem Wasser auf 70 % verdünnt | Carl Roth
- F.A.M.E Mix RM-1 | Supelco
- Hexaquart® pure, Aldehyd- und aminfreies Konzentrat zur Desinfektion und Reinigung | B. Braun
- Isopropanol / Propan-2-ol ROTISOLV®, (≥ 99,95 % HPLC/LC-MS grade) | C₃H₈O | Carl Roth
- Kaliumiodid (≥ 99,5 %) | KI | Carl Roth
- Methanol, ROTISOLV®, HPLC | CH₃OH | Carl Roth
- Natriumhydroxid, fest, >85 %, Plätzchen | NAOH | Carl Roth
- Natriummethoxidlösung (0,5 N in Methanol) | CH₃NaO | Sigma-Aldrich
- Natriumsulfat ≥ 99%, p.a., gepulvert | Na₂SO₄ | Carl Roth

- Natriumthiosulfat (0,1 N) | Na₂S₂O₄ | Carl Roth
- n-Hexan, wasserfrei, 95 % | C₆H₁₄ | Sigma-Aldrich
- Petroleumether 40-60°C, ROTIPURAN®, p.a., ACS, ISO | C₆H₁₄ | Carl Roth
- Phosphorsäure, 85 % | Sigma-Aldrich
- Pyrogallol puriss., ACS, ≥99% | C₆H₃(OH)₃ | Sigma-Aldrich
- Salzsäure (1N) | HCl | Sigma-Aldrich
- Stärke puriss., p.a. | Sigma-Aldrich
- Stickstoff (flüssig) | N | Linde Gas GmbH
- Toluol ROTIDRY® Sept ≥99,5 % (≥30 ppm H₂O) | C₆H₅CH₃ | Carl Roth
- Wasser (HPLC/LC--MS grade) | VWR International
- zweifach destilliertes Wasser; Leitfähigkeit: 18,2 M Ω*cm | H₂O | aus Satorius
arium 611 UF

3.1.2 Lagerung bei 4 °C

- BSA-Standard [2 mg/mL] | Sigma-Aldrich
- Coomassie Brilliant Blue G-250 | Sigma-Aldrich
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit stabilem Glutamin + 10% fetales Kälberserum (FBS) | Gibco, Thermo Fisher Scientific
- Hank's Balanced salt solution (HBSS) | Sigma-Aldrich
- Kaltgepresstes Sonnenblumenöl | gekauft am 01.10.2019 im Einzelhandel:
Hofer KG, Nußdorfer Straße 73, 1090 Wien | Produzent: Bellasan, Ölmühlen
Lehen GmbH, 49479 Ibbenbüren, Deutschland
- Methylheptadecanonat analytischer Standard | Sigma-Aldrich
- MTT-Reagenz, 4,5-(Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid | Sigma-Aldrich
- Penicillin/Streptomycin - Lösung (Sigma) (Endkonzentration = 1% (v/v);
Penicillin: 10000 Units/mL, Streptomycin: 10 mg/mL in isotonischer
Natriumchloridlösung (0,9%) | Gibco, Thermo Fisher Scientific

- Phosphate buffered saline (PBS) / Phosphatgepufferte Salzlösung | Sigma-Aldrich
- Serumfreies Medium (SFM) | Gibco, Thermo Fisher Scientific

3.1.3 Lagerung bei -20 °C

- QBT Fatty Acid Uptake Reagent Component A (dunkel lagernd) | Molecular Devices
- 3-sn-Phosphatidylethanolamin-Lösung, 10 mg Phospholipid pro mL CHCl₃ ≥ 97,0 % Reinheit | Sigma-Aldrich
- d12-Hexanal Isotop, 98,5 % Atom; 96 % Reinheit | CD₃(CD₂)₄CDO | CDN
- Glyceroltriheptadecanoat (TG 17:0/17:0/17:0), 1,2,3-Triheptadecanoylglycerol | [CH₃(CH₂)₁₅COOCH₂]₂CHOCO(CH₂)₁₅CH₃ | Sigma-Aldrich
- Hexanal, analytischer Standard | C₆H₁₂O | Sigma-Aldrich
- Linolsäure, 9-cis,12-cis-Linolsäure | C₁₈H₃₂O₂ | Sigma-Aldrich
- Linolsäurehydroperoxid, 13-hydroperoxy-9Z,11E-octadecadienoic acid, Reinheit ≥95 % (13-HpODE/LAOOH) | C₁₈H₃₂O₄ | Sigma-Aldrich
- Linolsäurehydroxid (±)-13-hydroxy-9Z,11E-octadecadienoic acid (13-HODE/LAOH) | C₁₈H₃₂O₃ | Caymen Chemical
- QBT Farbreagenzlösung (eine Lösung bestehend aus dem unbekannten Inhalt einer frisch geöffneten Flasche “QBT Fatty Acid Uptake Reagenz Component A“ und 10,5 mL HBSS/HEPES-Puffer (= 10,29 mL HBSS+210µL HEPES))
- Trypsin/EDTA-Lösung | Sigma-Aldrich

Nachstehend sind die Testsubstanzen für die zwei Versuche (vgl. Kapitel 4.4 und 4.5) gelistet. Diese wurden in DMSO gelöst und vor dem Einfrieren (-20 °C) immer mit Argon beschichtet.

- die polare Phase des kaltgepressten Sonnenblumenöls (SÖ)
- die polare Phase des mäßig erhitzen kaltgepressten Sonnenblumenöls (MED)
- die polare Phase des stark erhitzen kaltgepressten Sonnenblumenöls (HIGH)
- Linolsäure (LA) in den Konzentrationen [0,3 mM], [3 mM] und [30 mM]

- Linolsäurehydroxid (LAOH/13-HODE) in den Konzentrationen [0,3 mM], [3 mM] und [30 mM]
- Linolsäurehydroperoxid (LAOOH/13-HPODE) in den Konzentrationen [0,3 mM], [3 mM] und [30 mM]
- Hexanal (HEXA) in den Konzentrationen [0,3 mM], [3 mM] und [30 mM]

3.1.4 Verwendete Gase

- Argon 5.0 | Ar | Linde Gas GmbH
- Helium (verdichtet) | He | Linde Gas GmbH
- Stickstoff | N | Linde Gas GmbH

3.1.5 Verwendete Gegenstände

- 10 mL Amber Glass Vials | Sigma-Aldrich
- 1000 mL Becherglas | Carl Roth
- 2 mL Tubes (rot/gelb/grün/weiß/blau) | Eppendorf
- 20 mL Headspace Braunglasvial + gasdichter Metalldeckel | Shimadzu
- 400 mL Becherglas (sterilisiert in einem autoklavierten Plastikbeutel) | Carl Roth
- 6-Well-Platten, 96-Well Platten | Greiner bio-one, Cellstar
- Braunglas Vial 1,5 ml | Shimadzu
- Bürette; ±0,02 ml genau | B. Braun
- Dichtscheibe/Septa N17, Sil. Blau transp. PTFE weiß, 1,5 mm | Macherey-Nagel
- Einmalinjektionskanülen, ø 0,80 x 40 mm, 21G x 1½ | B. Braun
- Einmalspritzen 2 ml | B. Braun
- Falcon-Röhrchen, 50 mL | Sarstedt
- Kappen: P/N: 961-00914 | Shimadzu
- Magnetische Schraubkappen | Shimadzu
- Messkolben 10/25/50 mL | Carl Roth
- Messzylinder 100/500/1000 mL | Carl Roth
- Mikroeinsatz, Borosilikatglas, Klarglas, flacher Boden, 0,2 ml | Carl Roth

- Mikroreaktionsgefäße 2,0 mL | Eppendorf
- Mikrotubes 1,5 ml | Eppendorf
- Nylon Membran Filter, 0,45µm, Durchmesser: 47 mm | Whatman
- Pipetten 2,5/100/200/1000/5000 µL | Eppendorf
- Rotilabo®-Spritzenfilter, PVDF (unsteril, Porengröße 0,22 µm, Durchmesser 0,13 mm) | Carl Roth
- Schraubröhre, 15 ml, PP mit Spitzboden, steril | Sarstedt
- Strata® SI-1 Silica (55 µm, 70 Å), 500 mg / 6 mL, Tubes | Phenomenex
- T175 cell culture flask / 175 mL Zellkultur-Flasche | Greiner bio-one, Cellstar
- Zentrifugentubes 15 ml, 50 ml | Greiner bio-one, Cellstar

3.1.6 Verwendete Geräte

- (U)HPLC-DAD, UltiMate 3000RS | Dionex
- Centrifuge 5804 R | Eppendorf AG
- CO₂ Inkubator (Midi 40) | ThermoFisher Scientific
- GCMS-QP 2010 Ultra mit AOC 5000 Plus | Shimadzu
- Heizblock | VWR International GmbH
- Infinite M200 Pro-Plattenlesegeräts | Tecan
- NCU-Line, ILS4 (Inkubationsschüttler) | VWR International GmbH
- Shimadzu LCMS-8040 – Triple Quadrupole MS | Shimadzu
- Synergy HT-Plattenlesegerät, Fluoreszenz-Mikroplattenreader | Biotek Instruments Inc.
- Ultraschallbad USC TH | VWR International GmbH
- Vakuumpumpe V-700 | Büchi
- Vortex, RS-VA 10 | Phoenix Instruments
- Waage PioneerTM Serie; max. Kapazität 110 g; Ablesbarkeit: 0,0001 g | Ohaus
- Waage PioneerTM Serie; max. Kapazität: 2100 g; Ablesbarkeit: 0,01 g | Ohaus

3.1.7 Verwendete Software

- LabSolutions | Shimadzu
- SigmaPlot 11 | Systat Software
- Word 2019 | Microsoft
- Excel 2019 | Microsoft
- MS Convert | ProteoWizard
- Chromeleon Client Program 6.80 SR9 | Dionex
- Mendeley Desktop (Version 1.19.8 | Elsevier/Mendeley Ltd.
- Xcalibur (Version 4.1.31.9) | Thermo Fisher Scientific
- GC/MS-Solution Version 2.6 | Shimadzu

4 Studiendesign und Methoden

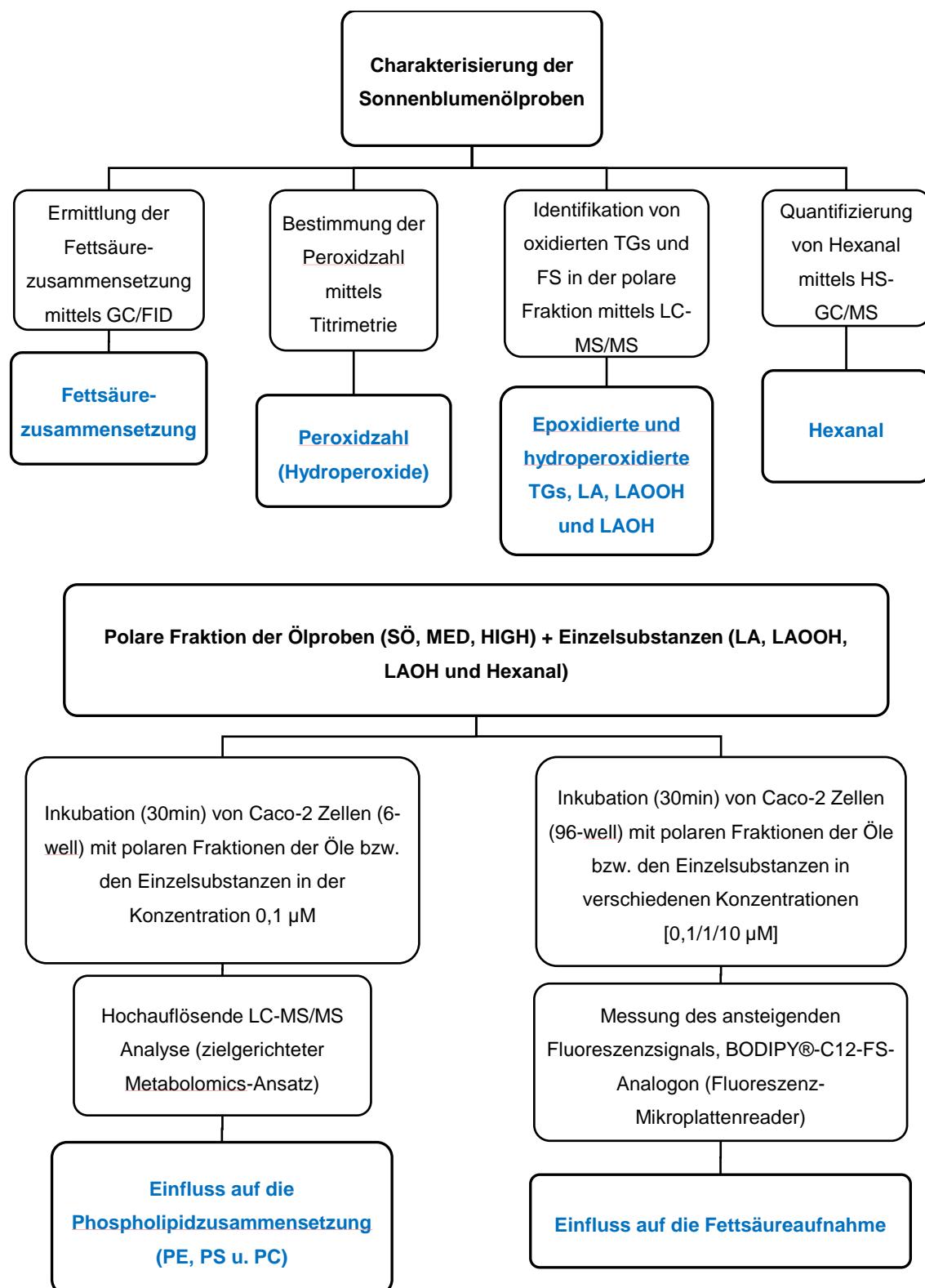


Abbildung 6: Studiendesign – Charakterisierung der Sonnenblumenölproben sowie Einfluss von Lipidoxidationsprodukten auf die Zusammensetzung der Phospholipide und auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen.

4.1 Aufarbeitung der Sonnenblumenölproben

4.1.1 Thermische Behandlung

Zur Überprüfung der Hypothesen wurde ein Sonnenblumenöl in verschiedenen Oxidationsstufen benötigt. Um verschiedene Oxidationsgrade zu erhalten, wurde das kaltgepresste Sonnenblumenöl einmal auf mittlerer Stufe erhitzt (\rightarrow MED), einmal auf hoher Stufe erhitzt (\rightarrow HIGH) und einmal unbehandelt untersucht (\rightarrow SÖ). Das kaltgepresste Sonnenblumenöl wurde vom Produzenten (Bellasan, Ölmühlen Lehen GmbH) in ein lichtdurchlässiges Weißglas abgefüllt.

Mäßig erhitztes Sonnenblumenöl (MED)

Etwa 100 Milliliter kaltgepresstes, unbehandeltes Sonnenblumenöl wurden in ein offenes Becherglas (1000 Milliliter) überführt und dann in einem vorgeheizten Trockenschrank (80°C) für 60 Minuten erhitzt. Anschließend wurde das erhitzte Öl langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, mit Argon beschichtet und dann bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

Stark erhitztes kaltgepresstes Sonnenblumenöl (HIGH)

Etwa 100 Milliliter kaltgepresstes, unbehandeltes Sonnenblumenöl wurden in ein mit einer Petrischale geschlossenes Becherglas (1000 Milliliter) überführt und dann in einem vorgeheizten Ofen mit einer Temperatur von 150°C für 60 Minuten erhitzt. Das Becherglas wurde geschlossen, um sicher zu gehen, dass das Öl im Ofen nicht überkocht. Anschließend wurde das Öl langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, mit Argon beschichtet und dann bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

4.1.2 Auftrennung der polaren Fraktionen mittels Festphasenextraktion

Methode

Die Festphasenextraktion wurde mit einigen Modifikationen nach der Methode von Marquez *et al.* (1996)⁷⁸ angewandt.⁷⁸

Vorbereitung der Vials (ein Tag vor der Extraktion)

Im Vorfeld wurden ausreichend zehn Milliliter Amber Glass Vials durch einen speziellen Waschvorgang auf die Festphasenextraktion vorbereitet. Dieser spezielle Waschvorgang beinhaltete eine einstündige Tränkung der Vials mit in Natriumhydroxid gesättigten Ethanol(vergällt). Anschließend wurden die Gläser dreimal mit bidestilliertem Wasser gut gespült. Daraufhin erfolgte eine einstündige Tränkung der Vials mit einmolarer Salzsäure. Bevor Vials anschließend über Nacht in den auf 50 °C vorgeheizten Trockenschrank kamen wurden sie noch dreimal mit bidestilliertem Wasser gut gespült. Am nächsten Morgen wurden die Vials mittels Schraubverschlusses geschlossen und waren nun für die Festphasenextraktion bereit.

Durchführung

Bei der Festphasenextraktion kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen flüssiger, mobiler Phase und fester Phase bzw. dem Sorbens. Das Sorbens befindet sich in einer oben offenen Säule, einer polymerbasierten Kartusche (Strata® SI-1 Silica, Phenomenex). Die Analyten wurden mithilfe einer Vakuumpumpe durch die Säulen abgesaugt. Zuerst wurde die Säule zwei Mal mit fünf Milliliter Petroleumether-Diethylether (90:10) befüllt. Die Drehhähne wurden so eingestellt, dass die Tropfgeschwindigkeiten bei allen Säulen gleich und so langsam wie möglich waren. Anschließend wurden 50 Mikroliter der Öle in einem Milliliter Petroleumether-Diethylether (90:10) gelöst und gevortext. Diese Lösung wurde auf die Säule aufgetragen und die Elution dieser apolaren Fraktion wurde entsorgt, da für die nachfolgenden Experimente lediglich die polare Fraktion von Bedeutung war. Für die polare Fraktion wurden zwei Milliliter Diethylether auf die Säulen aufgebracht und das Eluat dann in den speziell gesäubert und über Nacht getrockneten zehn Milliliter Amber Glass Vials

gesammelt. Die polare Fraktion wurde mit Stickstoff eingeengt und in 500 Mikroliter Dimethylsulfoxid (DMSO) (bzw. in zwei Millilitern Isopropanol für die Messung von oxidierten Triglyceriden) gelöst und gevortext. Von dieser Lösung wurden 60 Mikroliter in ein zwei Milliliter Eppendorf Tube überführt, 40 Mikroliter DMSO zu pipettiert (Verdünnungsfaktor 3:5) und die Lösung gevortext. Die Vials und die Eppendorf Tubes wurden zuletzt vorsichtig mit Argon beschichtet, bevor sie zur Lagerung bei -20 °C in den Gefrierschrank gegeben wurden.

4.2 Charakterisierung der Studienöle

In diesem Kapitel werden die in Rahmen dieses Projektes angewandten Methoden zur Charakterisierung des verwendeten Sonnenblumenöls detailliert beschrieben.

Folgende für die Lipidoxidation relevante Marker wurden analysiert:

Ermittlung der Fettsäurezusammensetzung des kaltgepressten Sonnenblumenöls mittels GC/FID (siehe Kapitel 4.2.1)

– primäre Oxidationsprodukte

Bestimmung der Peroxidzahl (Hydroperoxide) der Öle mittels Titrimetrie (siehe Kapitel 4.2.2)

Messung von oxidierten Triglyceriden (oxTG) in den polaren Ölphasen mittels LC-MS (siehe Kapitel 4.2.3)

– sekundäre Oxidationsprodukte

Quantifizierung von Hexanal im Öl mittels HS-GC/MS (siehe Kapitel 4.2.4)

4.2.1 Ermittlung der Fettsäurezusammensetzung mittels GC/FID

Methode und Prinzip

Bei der Untersuchung der Lipidoxidation wird der Fettsäurezusammensetzung stets große Bedeutung zugeschrieben. Generell gilt: je höher der Anteil an PUFA desto mehr Doppelbindungen und damit eine höhere Anfälligkeit des Öls für oxidative Prozesse. Für eine Charakterisierung der FS wurde das Prinzip der Gaschromatographie gekoppelt mit einem Flammenionisationsdetektor (GC/FID) verwendet. Die Methode orientiert sich im Großen und Ganzen an die beschriebenen Bedingungen und der Durchführung der FAME-Bestimmung von Pignitter *et al.* (2014).² Für die Aufbereitung der Sonnenblumenölproben und die Synthese der korrespondierenden FAME wurde somit ebenfalls eine konventionelle, basenkatalysierte Makro-Methode angewendet.⁷⁹ Die von Azlan *et al.* (2010)⁸⁰ beschriebenen Analysebedingungen des Flammenionisationsdetektors wurden somit ebenfalls in abgewandelter Form (siehe Tabelle 5 und 6) angewendet.⁸⁰

Tabelle 5: Analysebedingungen der FAME-Bestimmung.

GC-Anlage	GC-2010 Plus, AOC 20is
Detektor	Hydrogen-FID
Detektortemperatur	270° C
Injektortemperatur	220° C
Stationäre Phase	ZB-Wax Zebron™ (PEG), Kapillarsäule, 30m x 0,25mm x 0,25µm
Trägergas	Helium
Injektionsvolumen	1 µL
Säulenfluss und -temperatur	3 mL / min; 60° C
Split-Ratio	20
Gesamtdauer des Analyseprogramms	53 Minuten und 12 Sekunden

Tabelle 6: Verlauf des Temperaturgradienten bei der FAME-Bestimmung.

Rate [°C/min]	Temperatur [°C]	Haltezeit [min]
	60	2
13	150	0
2	240	0

Nach dem *Codex Alimentarius* (1999) sind die mengenmäßig wichtigsten FS im Sonnenblumenöl Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure und Linolsäure.⁹ Für eine Detektion mussten FS in Form der entsprechenden FAME vorliegen.⁸¹ Die spezifischen Retentionszeiten der FAME sind in Tabelle 7 veranschaulicht.

Tabelle 7: Spezifische Retentionszeiten der Fettsäuremethylester.

FAME	Retentionszeit [min]
Methylpalmitat	17,5 – 17,6
Methylstearat	23,4 – 23,65
Methyloleat	24,0 – 24,3
Methyllinoleat	25,5 – 25,85
Heptadecansäure-Methylester (HME)	20,3 – 20,4

Durchführung

Zu Beginn wurden 100 Milligramm Ölprobe in ein 50 Milliliter Falcon Tube eingewogen. Anschließend wurde eine einprozentige Heptadecansäure-Methylester-Lösung (HME - interner Standard) in Methanol vorbereitet, wovon 500 Mikroliter in die Probe hinzugefügt wurden. Danach wurden 100 Milligramm Pyrogallol, zwei Milliliter Toluol und vier Milliliter einer 0,5 molaren Natriummethoxidlösung zur Probe hinzugefügt und mit Stickstoff begast.⁸² Das Gemisch wurde daraufhin zur chemischen Reaktion für zwölf Minuten ins heiße Wasserbad bei 50°C gegeben. Nach diesem Schritt wurden die Proben für fünf Minuten im Kühlschrank gekühlt. Hierauf wurden 200 Mikroliter Eisessig hinzugefügt. Eisessig hemmt die Bildung von Natriumhydroxiden, welche

Methylester hydrolyseren können. Anschließend kamen je fünf Milliliter Hexan und fünf Milliliter bidestilliertes Wasser in die Tubes. Nach zweiminütigem Vortexen trennten sich die Phasen. Die abgewonnene Hexanphase wurde in ein neues 25 Milliliter Röhrchen überführt. Diese Extraktion wurde ein weiteres Mal mit Hexan vorgenommen. Am Ende wurde die gesammelte Hexanphase mit Natriumsulfat getrocknet und durch 0,45 Mikrometer PVDF-Filter in GC-Vials filtriert.

Auswertung

Die Fläche der Peaks konnte mit der Software GC-Solution Version 2.4 automatisch integriert werden. Zur Quantifizierung der FS wurden vier Standardkalibriergeraden im Dreifachansatz gemessen (siehe Abbildung 7). Die Konzentrationsbereiche sind in der nachfolgenden Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8: Ermittelte Konzentrationsbereiche der Kalibriergeraden.

FAME Standard	Konzentration [mg/mL]
Methylpalmitat	0,05 - 1,6
Methylstearat	0,025 - 0,8
Methyloleat	0,25 - 8
Methyllinoleat	1 - 10

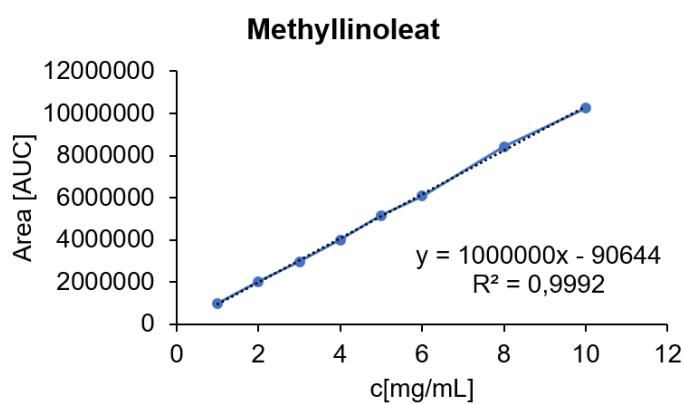
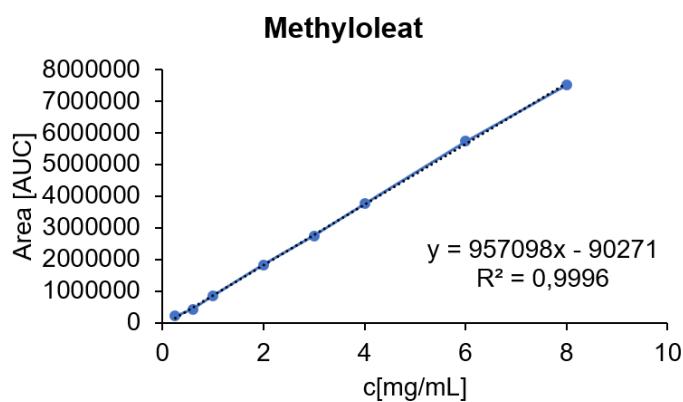
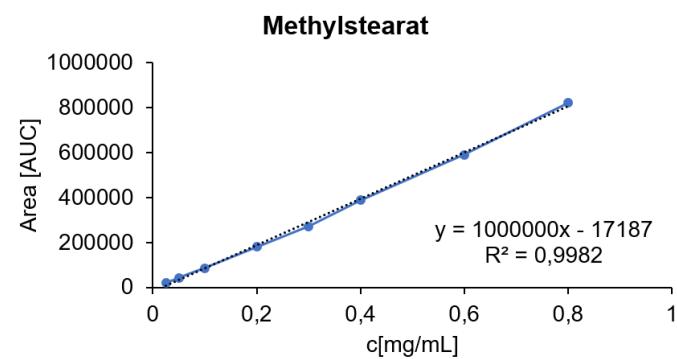
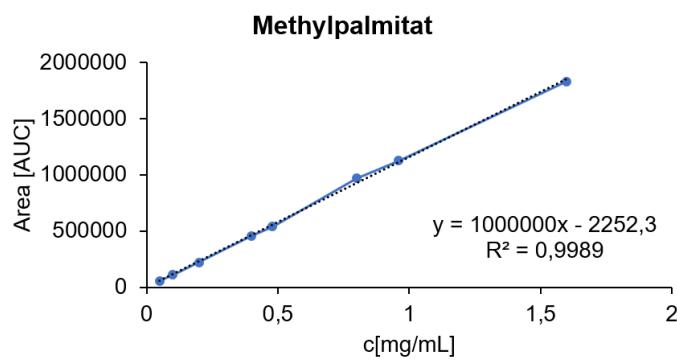


Abbildung 7: Externe Kalibrationsgeraden der vier untersuchten Fettsäuremethylester, n = 3.

Ermittlung der Wiederfindungsrate

Die Quantifizierung der Fettsäuremethylester erfolgte durch externe Kalibrierung unter Berücksichtigung der Wiederfindung von HME [0,42 mg/mL]. Eine HME-Standardlösung mit ebendieser Konzentration wurde sechs Mal extern in die GC injiziert und den Proben hinzugefügt. Die ermittelte Wiederfindung betrug $96,2 \pm 4,88$ Prozent. Die spezifischen Wiederfindungen der einzelnen Analysen wurde auch bei der Berechnung der Absolutkonzentration der FAME berücksichtigt. Die folgende Formel zeigt wie die Konzentrationen ermittelt wurden:

$$\text{FAME } \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] = \frac{\text{MW(Area) [AUC]} - d}{k} * \text{VF} * \frac{100}{\text{WF [\%]}}$$

MW (Area) [AUC] Mittelwert der „area under the curve“

(deutsch: „Fläche unter der Kurve“)

d Achsenabschnitt der zugehörigen Kalibriergerade

k Steigung der zugehörigen Kalibriergerade

VF Verdünnungsfaktor 10

WF Wiederfindung in %

Ermittlung der Nachweis- und Quantifizierungsgrenze

Die Werte für die Nachweisgrenze (LOD) und die Bestimmungsgrenze (LOQ) wurden nach Angaben des Deutschen Instituts für Normung (DIN 32645) ermittelt und sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD, LOQ)

Fettsäuremethylester	LOD [mg/mL]	LOQ [mg/mL]
Methylpalmitat	0,0443	0,0886
Methylstearat	0,0244	0,0488
Methyloleat	0,145	0,290
Methyllinoleat	0,201	0,403

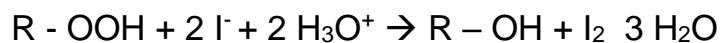
4.2.2 Bestimmung der Peroxidzahl der Ölproben mittels Titrimetrie

Methode

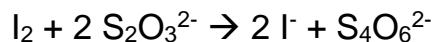
Zur Charakterisierung der drei für dieses Projekt verwendeten Sonnenblumenöle wurde unter anderem auch die POZ mittels Titrimetrie modifiziert nach der Methode von Wheeler angewendet.⁸³ Die POZ ermöglicht eine Beurteilung des Oxidationsgrades einer Probe und quantifiziert primäre Oxidationsprodukte wie Hydroperoxide und Peroxide.²⁵ Hydroperoxide entstehen in den frühen Phasen der Lipidoxidation, der Initiation und Propagation.^{21,24,25} (vgl. Kapitel 2.1.1) Die POZ wird als die erfassbare Menge an aktivem Sauerstoff in einem Kilogramm Probe definiert und wird in 1/8 mmol aktiver Sauerstoff pro Kilogramm Probe angegeben.^{25,84}

Prinzip

Die Probe wird in einem Gemisch aus konzentrierter Essigsäure und Chloroform gelöst und anschließend mit gesättigter Kaliumiodidlösung versetzt. Durch die Reaktion von Iodid mit Peroxidgruppen entsteht Iod. Als Indikator wurde Stärke verwendet, welche die Lösung braun färbte. (Siehe Reaktionsgleichung [1]) Anschließend wird bis zum Umschlag ins Farblose mit einer Thiosulfatlösung zurücktitriert und das hierfür benötigte Volumen dokumentiert (siehe Reaktionsgleichung [2]).⁸⁴



[1] Iodid wird durch Peroxide zu Iod oxidiert.⁸⁴



[2] Rücktitration mit Thiosulfat.⁸⁴

Durchführung

Zu Beginn wurden auf 0,1 Milligramm genau fünf Gramm der erhitzten bzw. nicht erhitzten Ölproben in einen sorgfältig gereinigten 100-Milliliter-Erlenmeyerkolben eingewogen. Anschließend wurden den Ölproben je 50 Milliliter eines Eisessig-Chloroform-Gemisches (im Verhältnis 3:2) hinzugefügt und der Inhalt unter Schwenken gelöst. Der Erlenmeyerkolben wurde verschlossen und stark für 60

Sekunden geschüttelt, nachdem 0,5 Milliliter einer gesättigten Kaliumiodidlösung zu pipettiert wurden. Direkt im Anschluss wurde die Lösung mit Stärke und einer 0,1 N Natriumthiosulfat-Maßlösung bis zum Farbumschlag von braun ins Farblose titriert.

Auswertung

Die Peroxidzahl wurde mit Hilfe folgender Formel ermittelt:

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

- a Verbrauch an Natriumthiosulfat-Maßlösung beim Hauptversuch in Milliliter
- b Verbrauch an Natriumthiosulfat-Maßlösung beim Blindversuch in Milliliter
- N Normalität der Natriumthiosulfat-Maßlösung in mol/L
- E Masse der Probe in Gramm (auf 0,1 mg genau eingewogen)

Durch Multiplikation der POZ (mVal O₂/kg) mit der Äquivalentmasse des Sauerstoffs (8) erhält man die Milligramm des aktiven Sauerstoffs je Kilogramm der Probe. Über die bekannte Dichte von Sonnenblumenöl (0,92 kg/L bei 15 °C) konnten die Parameter auf Liter umgerechnet werden. Bei Angabe des Ergebnisses in mmol O₂/kg Fett ist das Ergebnis, berechnet in mVal O₂/kg Fett, durch den Faktor 2 zu teilen.²⁵ Geringe POZ bedeuten nicht, dass Ölproben frei von Oxidationsprodukten sind, vielmehr können verringerte Mengen an Hydroperoxiden unter Umständen ein Indiz für eine fortgeschrittene Lipidoxidation sein (vgl. Kapitel 2.1).²⁴

4.2.3 Messung von oxidierten Triglyceriden mittels LC-MS

Im Zuge der Charakterisierung der Sonnenblumenöle wurden unter anderem auch die oxTG bestimmt. Massenionen und Fragmente von epoxidierten und hydroperoxydierten Triglyceriden in den polaren Fraktionen der Sonnenblumenölproben konnten mittels Flüssigkeitschromatographie gekoppelt an einem triple quadrupole Massenspektrometer (LC-MS) bestimmt werden. Dabei wurde eine Methode modifiziert nach Grüneis *et al.* (2019)⁸⁵ verwendet.⁸⁵ Zu Beginn wurden die nach Kapitel 4.1.2 in Isopropanol gelösten Proben (Verdünnungsfaktor 1:400) der polaren Ölfraktionen mit dem internen Standard Glyceroltriheptadecanoat (TG 17:0/17:0/17:0) versetzt, sodass die Konzentration des Standards in der Fraktion 5 Mikromolar (μM) betrug. Danach wurden die Proben durch einen 0,22 Mikrometer PVDF-Filter in ein kleines braunes HPLC-Gefäß überführt. Anschließend wurden 2 Mikroliter der Proben in ein UltiMate 3000 Series HPLC-System (Dionex/Thermo Fisher Scientific) injiziert und auf einer C18 Säule (Kinetex EVO, 150 × 3.0 mm, 5 μm , Phenomenex,) bei einer Temperatur von 25 °C aufgetrennt. Bei der C18 Säule handelt es sich um eine unpolare „reversed phase“ Säule mit einer Kette aus 18 Kohlenstoffatomen, die an Silica-Kugeln gebunden sind.

Tabelle 10: Einstellungen der LC-MS zur Bestimmung der oxidierten Triglyceride (oxTG).

Shimadzu LCMS-8040

Säule	Kinetex EVO C18 100 Å, 150 x 3.0 mm, 5 μm
Injektionsvolumen	2 μL
Fluss	0,5 mL / min
Säulenofen	25 °C
Nebulizing Gas Flow	3,0 L / min
Drying Gas Flow	12 L / min
DL Temperatur	250 °C
Heating Block	350 °C
Collision Energy	20 eV
Interface Voltage	4,5 kV

Die mobile Phase war polar. Die Analyten konnten somit aufgrund ihrer Polarität aufgetrennt werden. In Tabelle 10 sind die Einstellungen der LC/MS gelistet. Tabelle 11 zeigt die Komponenten der beiden Laufmittel der mobilen Phase. Dabei wurde den Fließmitteln Ameisensäure zugefügt, um die Ionisation der Analyten zu Kationen für das Massenspektrometer zu erleichtern. Ammoniumformiat wurde hinzugefügt, um die Bildung von Ammoniumaddukten zu induzieren, was zu einer höheren Sensitivität des Massenspektrometers führen kann.⁸⁵

Tabelle 11: Komponenten der mobilen Phase.

Laufmittel A	Laufmittel B
60 % Acetonitril	20 % Acetonitril
40 % bidestilliertes Wasser	80 % Isopropanol
0,1 % Ameisensäure	0,1 % Ameisensäure
10 mM Ammoniumformiat	10 mM Ammoniumformiat

Das Programm des Gradienten der Elution der HPLC wurde nach Liu *et al.* (2016)⁸⁶ ist in Tabelle 12 veranschaulicht.⁸⁶

Tabelle 12: Gradient-Elution der HPLC.

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	40	60
8	0	100
28	0	100
30	40	60
35	40	60

Die Epoxide und Hydroperoxyde in den Proben wurden mit vier verschiedenen MS Fragmentierungstechniken gemäß Grüneis *et al.* (2019)⁸⁵, der METLIN-

Datenbank und der MoNa (MassBank of North America) identifiziert. Die Strukturen der oxidierten TG wurden basierend auf ihrem charakteristischen Fragmentierungsmuster für jede Hauptklasse von Oxidationsprodukten identifiziert. Es wurden dabei stets MS-Spektren im Bereich m/z von 50 bis 2300 (m/z = Verhältnis: Masse zu Ladung) aufgenommen. Drei weitere LC-MS Methoden wurden hingegen im manuellen MS/MS Modus, auch „multiple reaction mode“ (MRM) genannt, durchgeführt. Mit Hilfe dieser Versuche wurden je drei bis vier verschiedene Precursor-Ionen-Massen isoliert. Die MRM-Übergänge sind $[M + NH_4]^+$ -Addukte und sind als „qualifier- und „quantifier-Ionen“ in Tabelle 13 gelistet. Die Einstellungen für die MRM waren folgende: $\Delta m/z = 3$ für die Isolationsbreite, 20 eV für die Kollisionsenergie der Precursor Ionen Masse, Aufnahme der Spektren von m/z 50 bis 1100.⁸⁵

Tabelle 13: MRM-Übergänge: „qualifier- und quantifier-Ionen“ der oxTG.⁸⁵

Oxidiertes	Precursor-Ion	quantifier	qualifier
Triglycerid (oxTG)	$[M + NH_4]^+$	$[M + H]^+$	$[M + H]^+$
TG 54:3 [OOH]			635.5
TG 18:1/18:1/18:1 [OOH]	934.8	601.5	617.5
TG 18:0/18:2/18:1 [OOH]			603.5
TG 54:4 [OOH]			633.5
TG 18:1/18:1/18:2 [OOH]	932.8	603.5	615.5
TG 18:0/18:1/18:3 [OOH]			601.5
TG 54:5 [OOH]			633.5
TG 18:1/18:2/18:2 [OOH]			631.5
TG 18:1/18:1/18:3 [OOH]	930.8	601.5	615.5
TG 18:0/18:2/18:3 [OOH]			613.5
TG 54:6 [OOH]			629.5
TG 18:1/18:2/18:3 [OOH]	928.8	601.5	617.5
TG 18:2/18:2/18:2 [OOH]			613.5
			611.5

TG 54:0 [O]			621.5
TG 18:0/18:0/18:0 [O]	922.8	603.5	602.5
TG 54:1 [O]	920.8	603.5	621.5
TG 18:0/18:0/18:1 [O]			619.5
			603.5
			601.5
			399.3
TG 54:2 [O]			619.5
TG 18:0/18:1/18:1 [O]	918.8	601.5	617.5
			603.5
TG 54:3 [O]			617.5
TG 18:1/18:1/18:1 [O]	916.8	599.5	603.5
TG 18:0/18:2/18:1 [O]			601.5
TG 54:4 [O]			617.5
TG 18:1/18:1/18:2 [O]	914.8	597.5	615.5
TG 18:0/18:1/18:3 [O]			601.5
TG 18:0/18:2/18:2 [O]			599.5

Tabelle 14: Analyse von freier Linolsäure (LA), Linolsäurehydroxid (LAOH) und Linolsäurehydroperoxid (LAOOH) mittels LC-MS (nach Frühwirth *et al.*, 2020).⁸

[M-H] ⁻ Ionen	Precursor-Ion m/z	Produkt-Ion m/z
LA	279.2	261.2
		59.0
		71.0
LAOH	295.5	277.3
		195.5
LAOOH	311.0	113.0

Tabelle 15: Analyse von Phytosterolen als auch ihren Estern mit LA mittels LC-MS (nach Frühwirth *et al.*, 2020).⁸

[M-H] ⁺ Ionen	Phytosterole	Phytosterole verestert mit LA
	Precursor-Ion m/z	Produkt-Ion m/z
Sitosterol	415.3940	677.6236
Campesterol	401.3783	663.6079
Stigmasterol/ Δ 5-	413.3783	675.6079
Avenasterol		
Cholesterol	387.3627	649.5923
Cholestanol	389.3783	651.6079
Brassicasterol	399.3627	661.5923
Campestanol	403.3490	665.6236
Sitostanol	417.4096	679.6392

Außerdem wurden noch andere Komponenten in den polaren Fraktionen der Sonnenblumenöle, wie freies LA, LAOH, LAOOH sowie eine Reihe von Phytosterolen als auch ihre Ester mit LA, analysiert. (vgl. Tabelle 14 und 15)

Auswertung

Die Quantifizierung erfolgte über eine Kalibriergerade mit Glyceroltriheptadecanoat (TG 17:0/17:0/17:0) als Standard in den Konzentrationen 0,05-5 μ M ($R^2= 0,9985$) (vgl. Abbildung 8). Vor jeder Messung wurde ein Waschschnitt mit Isopropanol durchgeführt und anschließend ein Lösungsmittelblank mit Isopropanol gemessen. Der Flächenwert unter der Intensitäts-Zeit-Kurve (AUC) des Lösungsmittelblanks wurde stets von den Flächen der Proben abgezogen. Die Wiederfindung des internen Standards Glyceroltriheptadecanoat (TG 17:0/17:0/17:0) betrug $80,9 \% \pm 15,1 \%$ und wurde bei der Quantifizierung berücksichtigt.

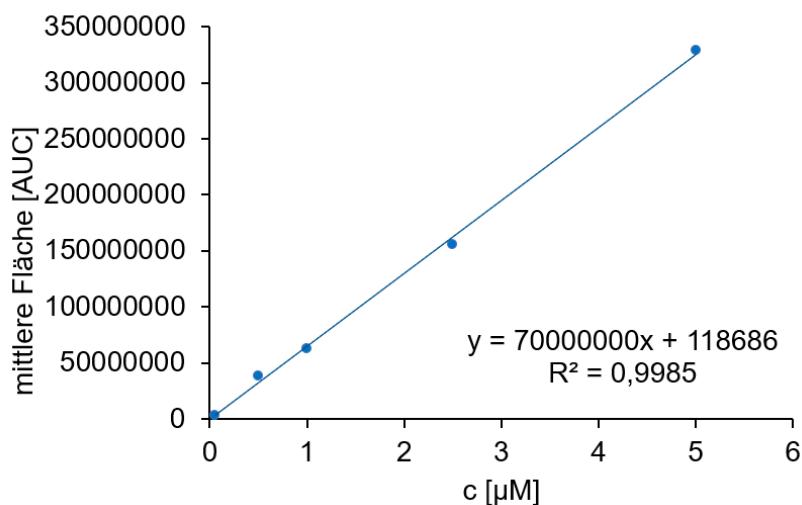


Abbildung 8: Kalibrationsgerade mit Glyceroltriheptadecanoat, n = 4.

Ermittlung der Nachweis- und Quantifizierungsgrenze

Die Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) für hydroperoxidierte und epoxidierte Triglyceride wurden mit Hilfe der Blank-Methode, beschrieben von Shrivastava *et al.* (2011)⁸⁷ mit den nachstehenden Formeln ermittelt und betragen 0,00481 μM (LOD) und 0,0157 μM (LOQ).⁸⁷

$$\text{LOD} = \text{MW} + 3 \text{ SA}$$

$$\text{LOQ} = \text{MW} + 10 \text{ SA}$$

MW Mittelwert der Konzentration (interner Standard) im Blank

SA Standardabweichung der Konzentration (interner Standard) im Blank

4.2.4 Quantifizierung von Hexanal in den Ölproben mittels HS-GC/MS

Methode und Prinzip

Die Messung von Hexanal wurde nach Pignitter *et al.* (2014)² durchgeführt.² Bei dem verwendeten Verfahren handelt es sich um die sogenannte Headspace-GC-MS, die sehr häufig in der Lebensmittelanalytik verwendet wird. Dabei werden flüchtige Verbindungen in der Gasphase oberhalb der Lösung überführt. Es erfolgte die Auftrennung der Gemische mithilfe von Gaschromatographie und die Detektion von Hexanal mit Massenspektrometrie.⁸⁸ Dabei wurde dieselbe Säule verwendet, die auch für die Analyse der Fettsäurezusammensetzung verwendet wurde. Die Bedingungen der GC/MS-Anlage während der Hexanal-Bestimmung werden in Tabelle 16 und Tabelle 17 aufgezeigt.

Tabelle 16: Parameter der GC/MS-Anlage während der Hexanal-Bestimmung.

GC/MS-Anlage	GCMS-QP 2010 Ultra mit AOC 5000 Plus (Shimadzu, Vienna, Austria)
Injektionstemperatur	250 °C
Spritzentemperatur	70 °C
stationäre Phase	ZB-Wax Zebron™ (PEG), Kapilarsäule, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Trägergas	Helium, lineare Geschwindigkeit
Flussrate	4,3 ml/min
Säulenfluss	1,31 ml/min;
Säulenofentemperatur	35 °C
Injectivolumen	1000 µl
Split-Ratio	5
Temperatur der Ionenquelle	200 °C

Tabelle 17: Verlauf des Temperaturgradienten.

Rate [°C/min]	Temperatur [°C]	Haltezeit [min]
	35	2
15	65	0
2	80	0
30	230	5

Durchführung

Zu Beginn wurden zweieinhalf Gramm der kaltgepressten Sonnenblumenöle in einem 20 Milliliter HS-Braunglasvial mit 2,717 Milliliter Methanol/H₂O (1:1, v/v) vermischt. Anschließend wurde das Gemisch mit internem Standard d₁₂-Hexanal versetzt (Endkonzentration d₁₂- Hexanal: 3,96 Mikrogramm pro Milliliter). Direkt im Anschluss wurden die Vials rasch mit gasdichten Metaldeckel verschlossen und die Lösung für 15-20 Sekunden gevortext. Danach wurden die Vials bei einer Temperatur von 70 °C und einer Agitationsgeschwindigkeit von 750 rpm für 15 Minuten inkubiert.

Auswertung

Die Quantifizierung von Hexanal erfolgte im Vierfachansatz und wurde unter Anwendung einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse unter Verwendung von Hexanal- d₁₂-Hexanal als internen Standard durchgeführt. Zur Datenerfassung und Auswertung wurde die Software GC/MS-Solution (Version 2.6, Shimadzu) verwendet. Die charakteristischen Fragment-Ionen von Hexanal (m/z 72 und 56) und d₁₂-Hexanal (m/z 80 und 64) wurden zur Identifizierung verwendet. Zur Quantifizierung wurden m/z 72 für unmarkiertes und m/z 80 für markiertes d₁₂-Hexanal verwendet. In Abbildung 9 wird die Isotopen-Verdünnungsreihe des Sonnenblumenöls dargestellt. Dafür wurde das Konzentrationsverhältnis von d₁₂-Hexanal zu Hexanal (x-Achse) gegen das Verhältnis der Peakfläche von d₁₂-Hexanal zu Hexanal (y-Achse) aufgetragen. Die Nachweis- (LOD) und Erfassungsgrenze (LOQ) wurden nach Angaben des Deutschen Instituts für

Normung (DIN 32645) ermittelt und betragen 0,112 bzw. 0,224 Mikrogramm pro Milliliter.⁸⁹

Die Wiederfindung 105,7 % ± 8,1 % wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$WF [\%] = \frac{MW (Proben)}{MW(Standards)} \times 100$$

WF [%]	Wiederfindung in Prozent [%]
MW (Proben)	Mittelwert des enthaltenen d ₁₂ -Hexanals in den Ölproben
MW (Standards)	Mittelwert des enthaltenen d ₁₂ -Hexanals in den Proben der Isotopenverdünnungsreihe

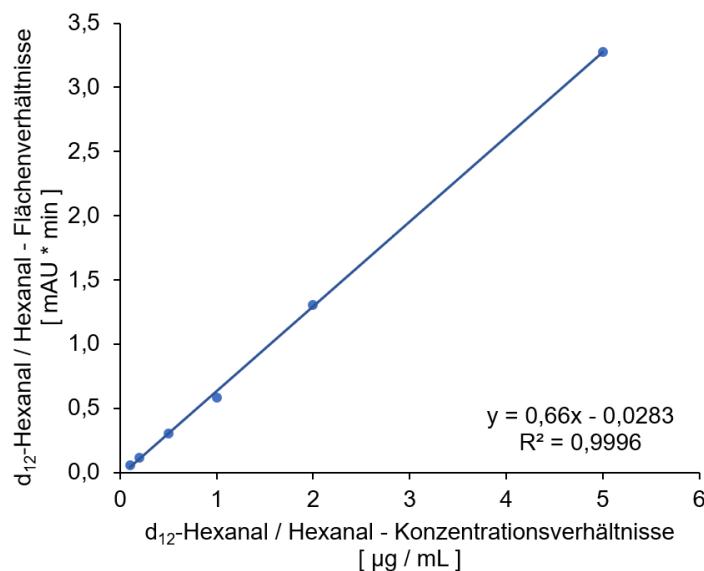


Abbildung 9: Isotopen-Verdünnungsreihe für die Hexanalbestimmung, n = 4.

4.3 Caco-2 Zellkultur

4.3.1 Caco-2 Zellen als geeignetes *in vitro* Modell

Caco-2 Zellen sind hervorragend zur Untersuchung des Lipidstoffwechsels geeignet. Sie besitzen ähnliche Eigenschaften wie reife Zottenepithelzellen des Dünndarms, wie die Bildung einer Bürstensaummembran, enge intrazelluläre Verbindungen sowie die Expression von Fettsäurebindungsproteinen.^{90,91} Etwa 21 Tage nach der Aussaat der Caco-2 Zellen (Dichte bei der Aussaat: ~3 x 10⁴ Zellen pro 96-Well, ~3 x 10⁵ Zellen pro 6-Well) waren diese ausdifferenziert und hatten eine Monolage ausgebildet. Für die Bestimmung der PL wurden Caco-2 Zellen in 6-well Platten, für den Versuch der FS-Aufnahme wurden Caco-2 Zellen in 96-well Platten kultiviert. Die Bedingungen der Kultivierung waren bei beiden dieselben. Die Wells am Rand der 96-well-Platten (insgesamt 36 Wells) enthielten keine Zellen und wurden lediglich mit Medium befüllt, welches ebenfalls regelmäßig ausgetauscht wurde.

4.3.2 Vorbereitung der Sicherheitswerkbank und Reagenzien

Zu Beginn wurde die Belüftung und Beleuchtung der Sicherheitswerkbank eingeschaltet. Das Fenster der Werkbank wurde bis zur Markierung geöffnet, damit ein gleichmäßiger Luftstrom gewährleistet war. Wenn beide Anzeigen der Werkbank grün leuchteten, wurde mit der Arbeit begonnen. Alle bereits in der Sicherheitswerkbank befindlichen Gegenstände wurden zunächst mit 70-prozentigem Ethanol besprüht und anschließend gründlich mit in 70-prozentigem Ethanol getränkten Papiertüchern gereinigt. Alle für die Arbeit benötigten Gegenstände wurden mit 70-prozentigen Ethanol besprüht und gründlich mit in 70-prozentigen Ethanol getränkten Papiertüchern gereinigt, bevor sie in die Sicherheitswerkbank gegeben wurden. Für den Abwurf von Pipettenspitzen bzw. Abfall wurde ein steriles 400 Milliliter Becherglas vorbereitet (sterilisiert in einem autoklavierten Plastikbeutel). Anschließend wurden sowohl das gekühlte Medium als auch die gekühlten beziehungsweise gefrorenen Zusatzstoffe PBS, Trypsin/EDTA-Lösung und Penicillin/Streptomycin-Lösung im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und aufgewärmt.

4.3.3 Zellen auftauen

Zu Beginn wurden neun Milliliter Medium in ein 15 Milliliter Falcon Tube mit einer sterilen Pipette hinzugefügt. Dann wurde ein Röhrchen mit zehn Millilitern Wasser in die Zentrifuge gegeben und das Gerät auf 25°C, 110 xg und zehn Minuten eingestellt. Daraufhin wurden die eingefrorenen Zellen dem Flüssigstickstoff entnommen und zum Auftauen in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C gegeben. Das gefrorene Medium besteht zu zehn Prozent aus DMSO und wirkt in dieser Konzentration bei 37°C toxisch auf die Zellen. Aus diesem Grund wurde etwa ein Milliliter der aufgetauten Zellen dem 15 Milliliter Tube mit neun Milliliter Medium zugeführt und die DMSO Konzentration somit 1:10 verdünnt (→ ein Prozent Gesamtgehalt). Dieses Röhrchen wurde nun auf die gegenüberliegende Seite der Zentrifuge gestellt und die Zentrifuge zu den bereits oben genannten Bedingungen gestartet. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, zehn Milliliter frisches Medium hinzufügt und das Pellet langsam und vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension in eine Zellkulturflasche überführt und diese in den Inkubator (37°C, 5% CO₂) gestellt.

4.3.4 Nährmedium wechseln

Als Nährmedium wurde eine Lösung aus etwa 90 Prozent Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit stabilem Glutamin, 10 Prozent fetales Kälberserum (FBS) und 1 Prozent Penicillin/Streptomycin-Lösung verwendet. Ein Austausch des Nährmediums ist aufgrund des Abbaus von Penicillin-Streptomycin und der Zunahme Antibiotika-resistenter Keime notwendig. Deshalb wurden die Kulturen täglich untersucht und das Medium nach Bedarf regulär nach zwei Tagen, spätestens jedoch nach vier Tagen gewechselt. Typische Tage für einen Mediumwechsel waren somit Montag, Mittwoch und Freitag. Für eine 96-well-Platte wurden pro Well 200-300 µL Austauschmedium benötigt (zwei Tage bis zum nächsten Mediumwechsel: 200 Mikroliter; drei Tage → 250 Mikroliter). Für eine 6-well-Platte wurden pro Well drei bis vier Milliliter Austauschmedium benötigt. Das Medium enthält einen pH-Indikator: sinkt der pH-Wert so färbt sich das Medium orange-gelb. Grund für die Abnahme des pH im Medium ist die Exkretion der Zellen von sauren Substanzen, welche im Laufe der Zeit akkumulieren. Ist das Medium unklar, die Zellkulturflasche oder -platte

beschlagen, so ist eine Kontamination sehr wahrscheinlich. Im Falle einer Kontamination müssen alle Einweggegenstände weggeworfen und der Zellkulturraum äußerst gründlich gereinigt werden. Die Sicherheitswerkbank wurde für den Medium-Wechsel vorbereitet, die benötigten Substanzen auf 37°C aufgewärmt (Trypsin/EDTA nur langsam und kurz aufwärmen) und die benötigten Materialien vorbereitet und gereinigt. 50 Milliliter des erwärmten Mediums (inklusive 1% Penicillin/Streptomycin) wurden in 50 Milliliter Falconröhrchen vorbereitet. Nun wurde die T175 Zellkulturflasche mit den Zellen aus dem Inkubator rasch zur Werkbank überführt. Es wurde stets darauf geachtet, dass das Medium nicht an den Deckel der Flasche gelangt. Nun wurde das alte Nährmedium langsam von der Flasche abgesaugt. Dazu brachte man eine gläserne Zwei-Milliliter-Pasteurpipette an den Schlauch der Vakuumpumpe an und saugt das alte Medium von einer Ecke des Bodens der Flasche ab. Besonders zu beachten gilt es hier die anheftenden Zellen nicht mit der Pipettenspitze zu beschädigen. Anschließend wurden circa 40 Milliliter Medium (inklusive 1% Penicillin/Streptomycin) hinzugefügt. Die Flasche wurde dann in den befeuchteten Inkubator zurückgestellt (37°C; 5% CO₂).

4.3.5 Passagieren

Die Sicherheitswerkbank wurde für den Medium-Wechsel vorbereitet, die benötigten Substanzen auf 37°C aufgewärmt (Trypsin/EDTA nur langsam und kurz aufwärmen) und die benötigten Materialien vorbereitet und gereinigt. 50 Milliliter des erwärmten Mediums (inklusive 1% Penicillin/Streptomycin) wurden in 50 Milliliter Falconröhrchen vorbereitet. Nun wurde die T175 Zellkulturflasche mit den Zellen aus dem Inkubator rasch zur Werkbank überführt. Es wurde stets darauf geachtet, dass das Medium nicht an den Deckel der Flasche gelangt. Nun wurde das alte Nährmedium langsam von der Flasche abgesaugt. Dazu brachte man eine gläserne Zwei-Milliliter-Pipette an den Schlauch der Vakuumpumpe an und saugt das alte Medium von einer Ecke des Bodens der Flasche ab. Besonders zu beachten galt es hier die anheftenden Zellen nicht mit der Pipettenspitze zu beschädigen. Dann wurden die Zellen mit fünf Milliliter PBS gewaschen indem man die Flasche langsam hin und her bewegte. Dabei war es wiederum besonders wichtig dafür zu sorgen, dass die Flüssigkeit nicht an den Deckel der Flasche gelangt. Anschließend wurde die Pufferlösung mit einer

gläsernen Zwei-Milliliter-Pipette von einer Ecke des Bodens der Flasche abgesaugt. Daraufhin wurden die Zellen mit ungefähr zweieinhalb Milliliter Trypsin/EDTA bedeckt und für vier bis fünf Minuten in den Inkubator befördert (37°C; 5% CO₂). Danach wurde einige Male gegen die Flasche geklopft und unter dem Mikroskop überprüft, ob sich die Zellen gelöst hatten. Die Zellen sollten nun rund sein und einzeln in der Lösung schwimmen. Sollten nach der Inkubation noch Zellkomplexe sichtbar gewesen sein, wurde die Platte nochmals für ein bis zwei Minuten inkubiert und die Zellen erneut unterm Mikroskop überprüft. Die Reaktion durch Trypsin / EDTA wurde gestoppt, indem siebeneinhalb Milliliter Medium (inklusive 1% Penicillin/Streptomycin) hinzugefügt wurden. Das Trypsin / EDTA in der Zellsuspension wurde durch das Serum im Medium inaktiviert und musste deshalb nicht entfernt werden. Die Zellen wurden nun durch mehrmaliges Resuspendieren (20-40x) mit einer Zehn-Milliliter-Pipette am Boden der Zellkulturflasche getrennt. Da danach meistens noch Zellklumpen vorhanden waren, wurde dieser Vorgang mit einer Ein-Milliliter-Pipette bis zur sichtbaren Auf trennung mehrmals wiederholt. Anschließend wurden die Multiwell-Platten mit dem Zelltyp, der Passagernummer, dem Datum als auch dem Namenskürzel beschriftet.

4.3.6 Herstellung einer Zellsuspension

Eine Flasche kann bis zu zweimal verwendet werden. Je nachdem, wann die nächste Trypsinierung geplant war, wurden für ein Tag Inkubation fünf Milliliter, für zwei Tage zweieinhalb Milliliter und für drei Tage 1,25 Milliliter an Zellsuspension in die alte Flasche (wenn erst eine Passage damit durchgeführt wurde) beziehungsweise, wenn bereits zweimal verwendet, in eine neue Flasche pipettiert. Anschließend wurde die Flasche mit etwa 40 Milliliter frischem, im 37°C Wasserbad aufgewärmten Nährmedium (inklusive 1% Penicillin/Streptomycin) aufgefüllt und vorsichtig geschwenkt, um die Zellsuspension zu mischen. Die bestehende Flaschenkennzeichnung wurde mit der neuen Passagernummer, Datum, Namenskürzel und dem zurückgeföhrten Volumen an Zellsuspension ergänzt. Sollte eine neue T175 Zellkulturflasche notwendig sein, wurde jene mit Zelllinie, Namenskürzel, Datum, Passagernummer neu beschriftet. Inkubiert wurde in einem angefeuchteten Inkubator (37°C, 5% CO₂). Eine ungefähre Anzahl der Zellen (~Anteil der Gesamtfläche) wurde, wenn möglich, täglich mit

einem Lichtmikroskop geschätzt. War eine T175 Zellkulturflasche reich an Zellen (etwa 60-90% der Fläche mit Zellen bedeckt), so musste die nächste Trypsinierung vorgenommen werden.

4.3.7 Bestimmung der Zellzahl

Die Oberfläche der Wells der 6-well-Platte betrug $9,6 \text{ cm}^2$, die Oberfläche der Wells der 96-well-Platten betrug $0,32 \text{ cm}^2$.

Der Ertrag der Zellernte wurde nach der Trypsinierung unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer im Lichtmikroskop bestimmt. Dazu wurde die verdünnte Zellsuspension mit Erythrosin B in einem Mikrozentrifugenröhrchen vorbereitet. Dabei muss rasch gearbeitet werden, da Erythrosin B toxisch auf die Zellen wirkt. Im Lichtmikroskop wurden die Zellen in den vier großen Quadranten (einschließlich der zwei Seitenlinien jedes Quadrats) gezählt.

Die Zellzahl pro Milliliter wurde folgendermaßen berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} = \frac{\text{MW der gezählten Zellen (pro 4 Quadranten)}}{4} \times 10^4 \times \text{VF (5)}$$

Beispiel: Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter der Zellsubstanz (Z)

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} = \frac{(17 + 21) / 2}{4} \times 10^4 \times 5 = \frac{2,375 \times 10^5 \text{ Zellen}}{\text{mL Zellsubstanz}} = (Z)$$

Beispiel: Herstellung einer Zellsuspension (S) mit einer definierten Zelldichte (3×10^4 Zellen pro 14,4 mL)

$$\begin{aligned} \frac{2,375 \times 10^5 \text{ Zellen}}{\text{mL Zellsubstanz}} \div (3 \times 10^4 \text{ Zellen}) &= \\ &= 7,916 \text{ mL Zellsubstanz (Z)} \\ &+ 6,484 \text{ mL Medium (M)} \\ &= 14,4 \text{ mL Zellsuspension (S)} \end{aligned}$$

(12 mL davon werden benötigt, 2,4 mL als Überstand)

Dichte = 3×10^4 Zellen für insgesamt 60 Wells (96 – well – Platte)
(200 μL Zellsuspension pro Well)

Eventuell einzelne gestorbene Zellen wurden nicht in die Zählung mit einberechnet. Anschließend wurde ein geeignetes Volumen berechnet, um die definierte Zelldichte pro Well-Oberfläche bei der Aussaat zu erreichen. Die Dichte bei der Aussaat betrug $\sim 3 \times 10^5$ Zellen pro 6-Well-Platte und $\sim 3 \times 10^4$ Zellen pro 96-well-Platte. Die Dichte pro cm^2 war somit dieselbe, da bei den 96-well-Platten der äußere Ring mit insgesamt 36 Wells frei von Zellsuspension war (36 Wells waren nur mit Nährmedium befüllt, 60 Wells enthielten die Zellsuspension mit der zuvor berechneten Zellzahl/mL).

4.4 Einfluss von Lipidoxidationsprodukten auf die Zusammensetzung von Phospholipiden in Caco-2 Zellen

Humane kolorektale Adenokarzinomzellen (Caco-2) wurden mit verschiedenen Testsubstanzen (LA, LAOH, LAOOH, HEXA) sowie polaren Fraktionen von nicht erhitzten, mäßig und hoch erhitzen Sonnenblumenöl (SÖ, MED, HIGH) für eine halbe Stunde inkubiert.

Ziel dieses Versuchs war es den Einfluss von oxidierten Sonnenblumenölen sowie von isolierten Oxidationsprodukten der LA (Hauptbestandteil im Sonnenblumenöl) auf PL der Caco-2 Zellen bewerten zu können. Nach 30-minütiger Inkubation mit den Substanzen und polaren Fraktionen der Öle wurden die Zellen speziell für die massenspektrometrische Messung vorbereit. Nach der Messung erfolgte die exakte Identifizierung der Substanzen durch hochauflösende MS/MS--Fragmentierung, die charakteristische Fragmentierungsmuster lieferte.

Anhand von drei Publikationen^{50–52}, welche die für Caco-2 Zellen typische Zusammensetzung von FS sowie PL aufzeigen, wurde eine Liste von relevanten PL erstellt. Bei der Versuchsplanung wurden zu Beginn die hauptsächlich in Caco-2-Membranen typischen PL ausfindig gemacht. Die wichtigsten PL-Unterklassen sind die Phosphatidylcholine (PC, auch als Lecithine bekannt), die Phosphatidylethanolamine (PE, auch Kephaline genannt) sowie die Phosphatidylserine (PS). Alle möglichen Zweierkombinationen der in Caco-2-Zellen typischen FS für die drei Phospholipidklassen sind in Tabelle 18, 19 und 20 auf den nachfolgenden Seiten gelistet. Dabei wurden folgende FS berücksichtigt: C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2 sowie C20:4.

Das spezifische Masse-zu-Ladung-Verhältnis (kurz m/z) der PL wurde mithilfe der Onlinedatenbank „lipidmaps.org“ berechnet. PC wurden im positiven Modus als [M+H]⁺-Addukte gemessen; PE und PS wurden im negativen Modus als [M-H]⁻-Addukte gemessen. Als QC-Probe wurde 3-sn-Phosphatidylethanolamin in Isopropanol [1 µg/mL] verwendet.

Tabelle 18: Analysierte Phosphatidylcholine (PC) und ihre berechneten spezifischen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z).

Spezifisches Phospholipid		
Phosphatidylcholine	berechnetes m/z	Pseudo-Molekülion [M+H]⁺
PC (16:1/16:1)	730.5381	730.5380
PC (16:1/16:0)	732.5538	732.5589
PC (16:1/18:0) bzw. PC (16:0/18:1)	760.5851	760.5844
PC (16:1/18:1)	758.5694	758.5691
PC (16:1/20:4)	780.5538	780.5535
PC (16:0/16:0)	734.5694	734.5691
PC (16:0/18:0)	762.6007	762.5906
PC (16:0/20:4)	782.5694	782.5692
PC (18:0/18:0)	790.6320	n.d.
PC (18:0/18:1)	788.6164	788.6160
PC (18:0/20:4)	810.6007	810.6003
PC (18:1/18:1) bzw. PC (18:2/18:0)	786.6007	786.6001
PC (18:1/20:4)	808.5851	808.5848
PC (20:4/20:4)	830.5694	830.5693
PC (18:2/18:2)	782.5694	782.5691
PC (18:2/16:1)	756.5538	756.5538
PC (18:2/18:1)	784.5851	784.5849
PC (18:2/20:4)	806.5694	806.5692

Tabelle 19: Analysierte Phosphatidylethanolamine (PE) und ihre berechneten spezifischen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z).

Spezifisches Phospholipid		
Phosphatidylethanolamine	berechnetes m/z	Pseudo-Molekülion [M-H]⁻
PE (16:1/16:1)	686.4766	686.4773
PE (16:1/16:0)	688.4923	688.4932
PE (16:1/18:0) bzw. PE (16:0/18:1)	716.5236	716.5246
PE (16:1/18:1)	714.5079	714.5088
PE (16:0/16:0)	690.5079	690.5088
PE (16:0/18:0)	718.5392	718.5395
PE (16:0/20:4)	738.5079	738.5089
PE (18:0/18:0)	746.5705	746.5784
PE (18:0/18:1)	744.5549	744.5557
PE (18:0/20:4)	766.5392	766.5402
PE (18:1/18:1) bzw. PE (18:2/18:0)	742.5392	742.5402
PE (18:1/20:4)	764.5236	764.5243
PE (20:4/20:4)	786.5079	786.5127
PE (18:2/18:2)	738.5079	738.5089
PE (18:2/16:1)	712.4923	712.4931
PE (18:2/18:1)	740.5236	740.5244
PE (18:2/20:4)	762.5079	762.5088

Tabelle 20: Analysierte Phosphatidylserine (PS) und ihre berechneten spezifischen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z).

Spezifisches Phospholipid		
Phosphatidserine	berechnetes m/z	Pseudo-Molekülion [M-H]⁻
PS (16:1/16:1)	730.4665	730.4650
PS (16:1/16:0)	732.4821	n.d
PS (16:1/18:0) bzw. PS (16:0/18:1)	760.5134	760.5157
PS (16:1/18:1)	758.4978	n.d
PS (16:1/20:4)	780.4821	n.d
PS (16:0/16:0)	734.4978	n.d
PS (16:0/18:0)	762.5291	762.5281
PS (16:0/20:4)	782.4978	782.4959
PS (18:0/18:0)	790.5604	790.5602
PS (18:0/18:1)	788.5447	788.5456
PS (18:0/20:4)	810.5291	810.5274
PS (18:1/18:1) bzw. PS (18:2/18:0)	786.5291	786.5284
PS (18:1/20:4)	808.5134	808.5114
PS (20:4/20:4)	830.4978	830.4962
PS (18:2/18:2)	782.4978	782.4959
PS (18:2/16:1)	756.4821	756.4804
PS (18:2/18:1)	784.5134	784.5117
PS (18:2/20:4)	806.4978	806.4960

Durchführung

Die polaren Fraktionen der (erhitzten) Sonnenblumenöle SÖ, MED und HIGH wurden nach dem im Kapitel 4.1 beschriebenen Verfahren für diesen Versuch vorbereitet. Alle anderen Substanzen wurden nachfolgend beschrieben im Vorfeld vorbereitet. Dazu wurden die Substanzen in der 3000-fach höheren Konzentration der Endkonzentration in DMSO gelöst, mit Argon bedeckt und bei -20°C eingefroren. Die 3000-fach höhere Konzentration wurde gewählt, da die Testsubstanzen zuerst 1:1000 in HBSS/HEPES-Pufferlösung und später noch einmal 1:3 in serumfreiem Medium (SFM) verdünnt wurden. Bevor die Zellen inkubiert werden konnten, mussten die in DMSO gelösten Testsubstanzen zuerst aufgetaut werden. Währenddessen wurde eine HBSS/HEPES-Pufferlösung auf 37°C aufgewärmt. Anschließend wurde ein Mikroliter der im Vorfeld vorbereiteten, in DMSO gelösten Testsubstanzen in 999 Mikrolitern HBSS/HEPES-Pufferlösung gelöst. Die Testsubstanzen wurden nun zum Pipettieren bereitgestellt. Nach dem Pipettieren wurde versucht die Testsubstanz unter circa zweiminütigem, leichtem Schütteln gleichmäßig auf der Membran zu verteilen. Für jede Passage wurden zwei Platten benötigt, da insgesamt acht Substanzen getestet wurden. Danach kamen die 6-Well-Platten für 30 Minuten in den Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂. Die ausdifferenzierten Caco-2 Zellen auf 6-Well-Platten wurden mit folgenden Testsubstanzen in den angegebenen Konzentrationen/Verdünnungen für 30 Minuten inkubiert:

- | | |
|--|------------------|
| - Kontrolle (99,9 % Puffer + 0,1 % DMSO) | - LA [0,1 µM] |
| - SÖ [VF 1:1000] | - LAOH [0,1 µM] |
| - MED [VF 1:1000] | - LAOOH [0,1 µM] |
| - HIGH [VF 1:1000] | - HEXA [0,1 µM] |

Anschließend wurden die Zellen zweimal mit einem Milliliter PBS (zuvor im Wasserbad auf 37°C erwärmt) gewaschen. Dann wurde für die Zelllyse 300 Mikroliter kaltes, bidestilliertes Wasser hinzugegeben. Nachfolgend wurden die 6-Well-Platten komplett in flüssigem Stickstoff getaucht und danach in den Inkubator bei 37°C zum Auftauen gestellt. Dann konnte das Zelllysat abgeschabt und in Mikroreaktionsgefäß (Eppis) überführt werden. Die Wells wurden anschließend nochmal mit 200 Mikroliter bidestilliertem Wasser nachgespült, um

letzte Reste noch in die Mikroreaktionsgefäße zu übertragen. Danach wurden die Mikroreaktionsgefäße zum Einfrieren in Flüssigstickstoff gebadet und anschließend im Heizblock bei 95°C wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Hinterher wurden die Mikroreaktionsgefäße für fünf Minuten bei 4°C und 16.000 rcf zentrifugiert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration (via Bradford Protein Assay) wurden jeweils fünf Mikroliter aus jeder Probe entnommen und bei -80°C tiefgekühlt. Zur restlichen Lösung wurden 250 Mikroliter kaltes Methanol (im Kühlschrank bei 4°C für einen Tag gekühlt) hinzugefügt und das Ganze zur Proteinfällung gevortext. Danach kamen die Mikroreaktionsgefäße für fünf weitere Minuten bei gleichen Bedingungen in die Zentrifuge. Anschließend wurde der Überstand in neue Mikroreaktionsgefäße überführt und die Proben mit Stickstoff für etwa 20 Minuten eingeengt. Danach wurden die Proben mit einer durchlöcherten Alufolie geschlossen, in Flüssigstickstoff gefroren und rasch zum Gefriertrockner überführt. Der Prozess des Gefriertrocknens dauerte bis zum nächsten Tag an. Jede Probe wurde genau überprüft, ob sie auch wirklich trocken war. Anschließend wurden die Proben mit jeweils 200 Mikroliter Isopropanol/Methanol (1:1) aufgefüllt und bei 4°C und 16.000 rcf für fünf Minuten zentrifugiert. 100 Mikroliter davon kamen für die Phospholipid-Analyse in HPLC Vials. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden die Proben mit Argon bedeckt und bei -80°C tiefgekühlt.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte mittels der Software „Thermo Scientific Xcalibur (Version 4.1.31.9)“. Dabei wurde für die Identifikation mit mehreren verschiedenen Layouts, worin die jeweils spezifischen „Ranges“ der PL hinterlegt waren, gearbeitet. Die Massenpräzision betrug vier Dezimalstellen (< 5 ppm). Tabellarisch notiert wurden dabei jeweils die exakt gemessenen Masse-zu-Ladung-Verhältnisse m/z der spezifischen PL, deren Retentionszeiten als auch die Fläche unter der Kurve (vgl. Kapitel 5.2).

4.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration via Bradford Analyse

Die Proteinkonzentration der einzelnen Caco-2-Proben wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt.⁹² Damit konnten natürliche Schwankungen durch zwischen den Wells abweichende Zellzahlen angepasst werden. Bei der Bradford Analyse wird die Gesamtproteinkonzentration photometrisch quantifiziert.

Prinzip

Die kationischen Seitenketten von Proteinmolekülen bilden zusammen mit dem Farbstoff „Coomassie Brilliant Blue G250“ einen Komplex. Unter sauren Bedingungen kommt es zu einem Farbumschlag von Braunrot nach Blau. Durch die Farbverschiebung wechselt das Absorptionsmaximum von 465 Nanometer zu 595 Nanometer. Diese Verschiebung zu einer höheren Wellenlänge ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung. Die Absorption verhält sich proportional zur Menge des Proteins in der Probe.

Vorbereitung

Zu Beginn wurde das Bradford Reagenz hergestellt: dafür wurden 100 Milligramm Coomassie Brilliant Blue G250 in 50 Milliliter 95 % Ethanol gelöst. Nach Zusatz von 100 Milliliter 85 % Phosphorsäure wurde die Lösung auf 100 Milliliter aufgefüllt. Für die Kalibriergerade wurde eine Stammlösung aus 2 mg/mL Bovines Serum Albumin (BSA) in doppelt destilliertem Wasser verdünnt. Es wurden sieben Punkte zwischen 0 und 2 mg/mL für die Standardgeraden gewählt (siehe Abbildung 10).

Durchführung

Die zuvor auf -80°C tiefgefrorenen, bereits inkubierten und nachbehandelten Caco-2-Proben wurden für die Bradford-Analyse aufgetaut (vgl. Kapitel 4.4 - Durchführung) und zentrifugiert. Ein Mikroliter jeder Probe, des Standards und des Leerwerts wurden jeweils auf eine 96-Well-Platte übertragen und mit 100 Mikroliter des zuvor hergestellten Bradford Reagenzes versetzt. Nach zehn Minuten Inkubation kamen die 96-Well-Platten in ein Tecan Infinite M200 Mikrotiterplatten-Lesegerät. Bei einer Wellenlänge von 595 Nanometer und einer Referenzwellenlänge von 850 Nanometer wurde die Extinktion im Dreifachansatz bestimmt.

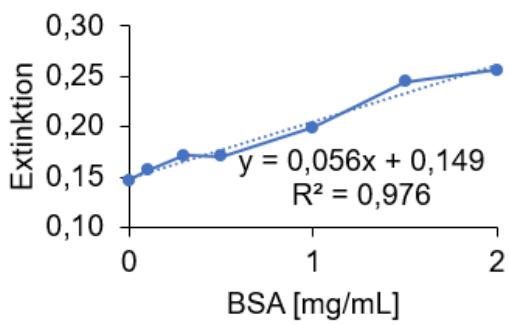
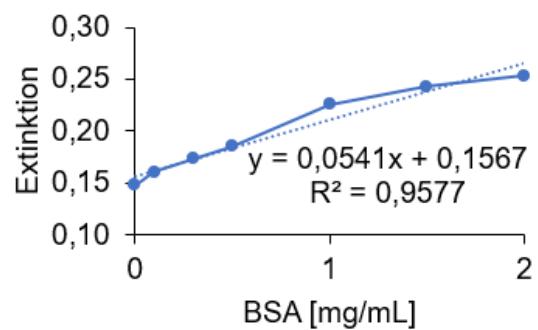
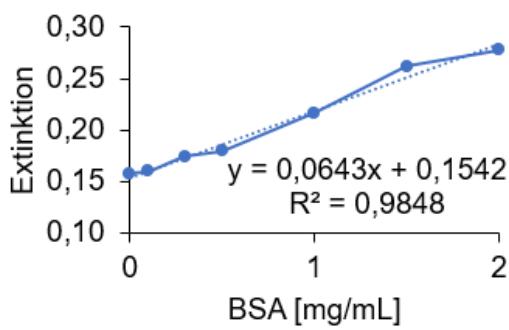


Abbildung 10: Standardgeraden (BSA, $c = 0 - 2 \text{ mg/mL}$) der drei biologischen Replikate zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen.

4.5 Einfluss von Lipidoxidationsprodukten auf die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen

Assay zur Bestimmung der Fettsäureaufnahme

Der QBT™ FS-Aufnahme-Assay ist ein einstufiger homogener Fluoreszenz-Assay, der eine Echtzeit-Aufnahmekinetik bietet und sich besonders gut für Screening-Anwendungen im 96-Well-Format eignet. Das Kit verwendet ein fluoreszierendes BODIPY®-Dodecansäure-FS-Analogon in Verbindung mit der proprietären Quench-Technologie von Molecular Devices. Der BODIPY®-Marker ist ein langketiges FS-Analogon mit ähnlichen Eigenschaften wie natürliche FS. So wird das FS-Analogon beispielsweise auch durch die Acyl-CoA-Bindung aktiviert, in DG und TG eingebaut und reichert sich in intrazellulären Lipidtröpfchen an (vgl. Abbildung 11).

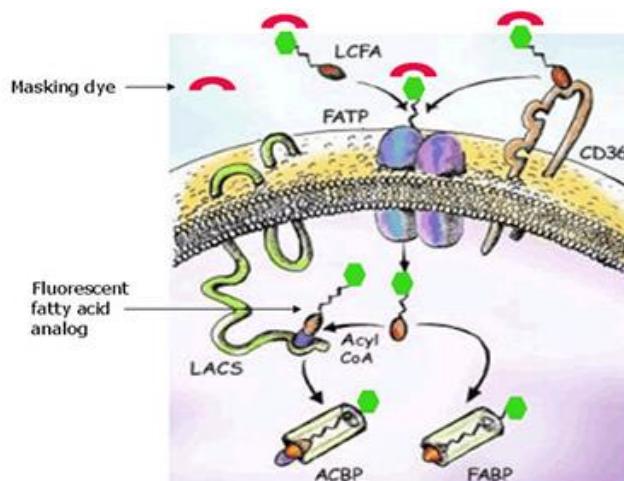


Abbildung 11: Prinzip des Assays zur Bestimmung der Fettsäureaufnahme.⁹³

Darüber hinaus ist das FS-Analogon ein bekanntes Substrat für Fettsäuretransporter, da seine Aufnahme durch Adipozyten durch nicht markierte FS konkurriert werden kann (vgl. Kapitel 2.2.4). Die Eliminierung radioaktiver Verbindungen führt zu einer einfacheren Handhabung der Reagenzien, reduzierten Entsorgungskosten und eliminiert Sicherheitsrisiken, welche mit radioaktiven Markierung-Assays verbunden sind.⁹⁴

Vorbereitung

Etwa 21 Tage nach der Ausstreuung der Caco-2 Zellen auf 96 Mikrowellplatten waren diese ausdifferenziert und hatten somit eine Monolage ausgebildet. Die Caco-2-Membranen wurden vor Versuchsbeginn mit dem Mikroskop erneut Well für Well auf Schäden untersucht. Waren die Membranen intakt, einheitlich und klar konnte mit der Analyse der FS-Aufnahme fortgeführt werden. Wells mit beschädigten Membranen wurden vom weiteren Vorgang ausgeschlossen. Das Schema der verwendeten Testsubstanzen und Konzentrationen wird in Abbildung 12 abgebildet. Die Endkonzentration bzw. Verdünnungsfaktoren während der 30-minütigen Inkubation sind jeweils in der eckigen Klammer angegeben. Es wurden jeweils 2 technische und 3 biologische Replikate kultiviert.

Puffer	SÖ [VF 1:1000]	LA [0,1 µM]	LAOH [0,1 µM]	LAOOH [0,1 µM]	Hexanal [0,1 µM]
Puffer	SÖ [VF 1:1000]	LA [0,1 µM]	LAOH [0,1 µM]	LAOOH [0,1 µM]	Hexanal [0,1 µM]
Puffer [99,9%] +DMSO [0,1%]	MED [VF 1:1000]	LA [1 µM]	LAOH [1 µM]	LAOOH [1 µM]	Hexanal [1 µM]
Puffer [99,9%] +DMSO [0,1%]	MED [VF 1:1000]	LA [1 µM]	LAOH [1 µM]	LAOOH [1 µM]	Hexanal [1 µM]
	HIGH [VF 1:1000]	LA [10 µM]	LAOH [10 µM]	LAOOH [10 µM]	Hexanal [10 µM]
	HIGH [VF 1:1000]	LA [10 µM]	LAOH [10 µM]	LAOOH [10 µM]	Hexanal [10 µM]

Abbildung 12: Schema der für die Inkubation verwendeten Testsubstanzen.

SÖ, MED und HIGH wurden nach dem im Kapitel 4.1 beschriebenen Verfahren für diesen Versuch vorbereitet. Alle anderen Substanzen wurden nachfolgend beschrieben im Vorfeld vorbereitet. Dazu wurden die Substanzen in der 3000fach höheren Konzentration der Endkonzentration in DMSO gelöst, mit Argon bedeckt und bei -20°C eingefroren. Die 3000fach höhere Konzentration wurde gewählt, da die Testsubstanzen zuerst 1:1000 in HBSS/HEPES-Pufferlösung und später noch einmal 1:3 in serumfreiem Medium (SFM) verdünnt wurden.

Durchführung

Bevor der Versuch der FS-Aufnahme durchgeführt werden konnte, mussten die in DMSO gelösten Testsubstanzen zuerst aufgetaut werden. Währenddessen wurde eine HBSS/HEPES-Pufferlösung auf 37°C aufgewärmt. Anschließend wurde ein Mikroliter der im Vorfeld vorbereiteten, in DMSO gelösten Testsubstanzen in 999 Mikrolitern HBSS/HEPES-Pufferlösung gelöst. Die Testsubstanzen wurden nun zum Pipettieren bereitgestellt.

Sind die Testsubstanzen in Pufferlösung bereitgestellt, kann mit dem Starven („Hungern“) der Zellen begonnen werden. Dazu wurde das Nährmedium von den Zellen aspiriert. Anschließend wurden pro Well vorsichtig 66 Mikroliter serumfreies Medium hinzugefügt und die Mikrotiterplatte bei 37 °C für eine Stunde inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde das Farbreagenz vorbereitet. Dafür wurde das Reagenz „QBT Fatty Acid Uptake Reagent Component A“ im Dunkeln aufgetaut und mit 10,5 Milliliter HBSS/HEPES-Puffer (10,29 Milliliter HBSS + 210 Mikroliter HEPES) versetzt. Für 17 Testsubstanzen wurden inklusive technisches Replikat etwa dreieinhalb Milliliter QBT Farbreagenzlösung benötigt. Ein kleiner Überstand (insgesamt vier Milliliter) an QBT Farbreagenzlösung wurde vorbereitet, um blasenfrei pipettieren zu können. Das Farbreagenz wie auch die Farbreagenzlösung wurden nach Gebrauch sofort wieder bei -20°C eingefroren. Nach einer Stunde Inkubation konnten die Zellen wieder aus dem Inkubator entnommen werden. Jeweils 33 Mikroliter der Testsubstanz wurden vorsichtig nach einem vorher zurechtgelegten Schema auf die Membran aufgetragen. Die Mikrotiterplatte wurde nun rasch in den Inkubator (37°C) gelegt. Nach 30 Minuten Inkubation wurde die Platte aus dem Inkubator entfernt und vorsichtig 98 Mikroliter QBT Farbreagenzlösung auf jedes Well mit der Multikanalpipette pipettiert. Die FS-Aufnahme wurde durch Zugabe des BODIPY®-C12 enthaltenden Beladungsfarbstoffs gestartet, der an einen Fluoreszenzlöscher gekoppelt war. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte rasch zum Fluoreszenz-Mikroplattenreader (Synergy HT-Plattenlesegerät, Biotek Instruments) transferiert. Das Gerät misst im dunklen Raum für 60 Minuten alle 24 Sekunden (485nm Erregung, 515 nm Emission) das ansteigende Fluoreszenzsignal. Die Fläche unter der Kurve (AUC) wurde aus den jeweiligen Zeit-Intensitäts-Plots

ermittelt. Dabei gilt: je niedriger die AUC, desto höher ist das Hemmpotential der Testsubstanz. Umgekehrt wirkt eine Testsubstanz bei höheren AUC stimulierend auf die FS-Aufnahme.⁹⁵

Nach diesem Versuch folgte unmittelbar der Test auf Zellviabilität, auch MTT-Test genannt.

4.5.1 MTT-Test auf Zellviabilität

Die Zelllebensfähigkeit wurde unter Verwendung des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Tests, auch MTT-Test genannt, bewertet. Die Vorgangsweise wurde nach jener Methode von Liszt *et al.* (2015)⁹⁶ mit einigen Modifikationen angepasst.⁹⁶ Vor Beginn des MTT Tests wurde ausreichend MTT-Arbeitsreagenz vorbereitet. Dazu wurden 833 Mikroliter MTT-Reagenz [5mg/mL PBS] zu 4,167 Milliliter SFM pipettiert und die Lösung für einige Sekunden gevortext. Das Verhältnis von MTT-Reagenz zu SFM betrug damit 1 zu 6. Nachdem der Versuch der FS-Aufnahme abgeschlossen war, wurde die Farbstofflösung vorsichtig mit einer gelben Pipettenspitze von der Membran abgesaugt. Anschließend wurden pro Well 100 Mikroliter des im Vorfeld vorbereiteten MTT-Arbeitsreagenz hinzugefügt. Dann wurde die Mikrotiterplatte für zwei bis drei Minuten bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde das MTT-Arbeitsreagenz zügig mithilfe einer gelben Pipettenspitze von den Zellen abgesaugt. Zum Stoppen der Reaktion wurden am Ende pro Well 150 Mikroliter DMSO hinzugefügt. Nun wurde die Extinktion bei 570 Nanometer und Referenzwellenlänge von 650 Nanometer unter Verwendung des Infinite 200 Pro-Plattenlesegeräts (Infinite M200, Tecan) gemessen.

Auswertung

Die berechnete Differenz zwischen Messung und Referenzmessung der jeweiligen Testsubstanzen bzw. der Kontrollen wurden notiert. Anschließend konnte die Lebensfähigkeit der Zellen relativ zu den Kontrollzellen, die nur mit Lösungsmittelkontrolle (99,9 % Puffer + 0,1% DMSO) behandelt wurden, berechnet werden.

4.6 Statistische Analyse

Statistische Analysen wurden unter Verwendung von SigmaPlot 11 (Systat Software) durchgeführt. Zur Bestimmung der statistischen Unterschiede wurde, wenn nicht anders angegeben eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way-ANOVA) gefolgt von einem Holm-Sidak Post-Hoc Test durchgeführt. P-Werte unter 0,05 zeigen statistische Signifikanz an. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (SA) angegeben, sofern nicht anders angegeben.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Charakterisierung der Studienöle

Bevor Effekte von Lipidoxidationsprodukten auf Caco-2 Zellen untersucht werden konnten, war eine genauere Charakterisierung des verwendeten Studienöls notwendig. Zu Beginn wurde anhand der für Sonnenblumenöle charakteristischen FS untersucht, ob es sich um ein Sonnenblumenöl handelt.

5.1.1 Ermittlung der Fettsäurezusammensetzung mittels GC/FID

Nach dem *Codex Alimentarius* (1999) sind die mengenmäßig wichtigsten FS im Sonnenblumenöl Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure und Linolsäure. Außerdem wird zwischen Züchtungen der Sonnenblume mit unterschiedlichem Ölsäuregehalt („sunflower oil, „high oleic acid sunflower oil“ und „mid oleic acid sunflower oil“) unterschieden.⁹

Der Weltölmarkt fordert unterschiedliche Züchtungen und somit unterschiedliche Ölqualitäten. Dabei erhalten sowohl die Fettsäurezusammensetzung als auch der Gesamtgehalt natürlicher Antioxidantien (vor allem Tocopherole) besondere Beachtung. In den letzten 30 Jahren wurden diese Komponenten in Sonnenblumen durch konventionelle Selektion aus natürlich vorkommenden Variationen und durch Mutagenese umfassend modifiziert. Die Fettsäurezusammensetzung wird von einer reduzierten Anzahl von Genen bestimmt, was ihre Verwaltung in Pflanzenzüchtungsprogrammen zur Entwicklung von Sorten mit verbesserter Ölqualität erheblich erleichtert. Derzeit gibt es eine große Vielfalt von Sonnenblumenölsorten, zum Beispiel: niedrig gesättigte (Anteil geringer als 7 Prozent), hohe Palmitinsäure (Anteil größer als 25 Prozent), hohe Stearinsäure (Anteil größer als 25 Prozent), hohe Ölsäure (Anteil größer als 85 Prozent), hohe Linolsäure (Anteil größer als 75 Prozent) sowie eine Reihe von Sonnenblumenölen mit mittleren Gehalten und unterschiedliche Kombinationen.⁹⁷

Tabelle 21: Fettsäurezusammensetzung des für die Studie verwendeten kaltgepressten Sonnenblumenöls. Die Referenzwerte für Sonnenblumenöle variieren, je nach Pflanzenzüchtung, besonders im Gehalt an Ölsäure (C18:1) und Linolsäure (C18:2).⁹

Fettsäuremethylester	MW ± SA [%]	Referenzwerte modifiziert nach Codex Alimentarius [%] ⁹
Methylpalmitat C16:0	4,85 ± 0,12	[2,6 - 7,6]
Methylstearat C18:0	3,06 ± 0,06	[2,1 - 6,5]
Methyloleat C18:1	37,28 ± 0,90	[14,0 - 90,7]
Methyllinoleat C18:2	54,80 ± 1,33	[2,1 - 74,0]

n = 5, Ergebnisse ausgedrückt als Prozentsatz der gesamten Fettsäuren.

Abkürzungen: MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung.

Auf der Etikette der Flasche des Studienöls gab es keinen Hinweis darauf, um welche Sorte beziehungsweise Züchtung es sich handelt. Es wurde lediglich deklariert, dass es ein kaltgepresstes Sonnenblumenöl ist.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse (siehe Tabelle 21) handelt es sich beim Studienöl jedenfalls um ein Sonnenblumenöl. Der Anteil des Studienöls an LA beläuft sich auf rund 55 Gewichtsprozent.

5.1.2 Bestimmung der Peroxidzahl der Ölproben mittels Titrimetrie

Die größten Einflussfaktoren auf die Entstehung von Lipidhydroperoxiden und anderen Lipidoxidationsmarkern in Ölen sind sowohl Produktions- und Lagerbedingungen, aber auch die Art und Weise wie Öle in der Küche verwendet werden. (vgl. Kapitel 2.1) Das in dieser Studie verwendete kaltgepresste Sonnenblumenöl wurde bewusst in zwei Stufen mit Hitze behandelt, um unterschiedlich hohe POZ zu erhalten. (vgl. Kapitel 4.1.1) Generell ist bei der Beurteilung der POZ zu beachten, dass der Peroxidwert sowohl oxidierte Lipide als auch oxidierte freie FS berücksichtigt.⁹⁸ Im Zuge der Propagation abstrahiert ein Peroxylradikal ein Wasserstoffatom von einer anderen FS und bildet ein Lipidhydroperoxid. Lipidhydroperoxide sind Marker für frühe Oxidationsstufen und können somit zu den primären Lipidoxidationsprodukten gezählt werden.^{21,24}

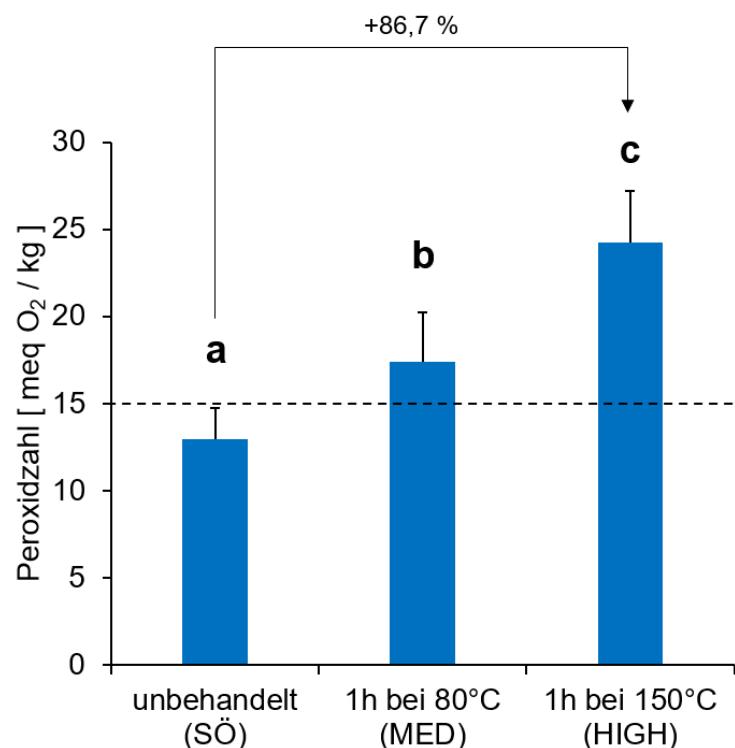


Abbildung 13: Bestimmung der Peroxidzahl der drei Sonnenblumenöle; n = 5, p < 0,009.

Die POZ des kurz nach dem Kauf, frisch geöffneten, un behandelten Sonnenblumenöls (SÖ) betrug $13,0 \pm 1,75$ Milliäquivalent Sauerstoff pro Kilogramm Öl (meq O₂/kg Öl). Eine mäßige Erhitzung (MED) desselben

Sonnenblumenöls in einem vorgeheizten Trockenschrank (80°C) für 60 Minuten führte zu einer signifikanten Steigerung der POZ auf $17,4 \pm 2,80$ meq O_2/kg Öl (entspricht im Mittel plus 34,3 Prozent; verglichen zur Baseline/SÖ). Eine starke Erhitzung (HIGH) im Ofen bei 150°C für 60 Minuten führte zu einer POZ von $24,2 \pm 3,01$ meq O_2/kg Öl (entspricht im Mittel plus 86,7 Prozent; verglichen zur Baseline/SÖ) (vgl. Abbildung 13). Die thermische Behandlung von kaltgepresstem Sonnenblumenöl sorgte somit für signifikant höhere Konzentrationen von Hydroperoxiden in den Ölen. Diese Daten verhalten sich analog zu den Ergebnissen der Quantifizierung von Hexanal in den Ölproben SÖ, MED und HIGH (vgl. Kapitel 5.1.4).

Der *Codex Alimentarius* (1999)⁹ gibt für kaltgepresste Sonnenblumenöle einen Grenzwert von 15 meq O_2/kg an. Kaltgepresste Öle, welche diesen Grenzwert überschreiten, sollten nicht im Lebensmittelhandel verkauft werden. MED und HIGH überschreiten diesen Grenzwert deutlich, SÖ liegt knapp unter diesen Grenzwert. Pignitter *et al.* (2014)² zeigten, dass kaltes fluoreszierendes Licht im Zuge der Lagerung einen großen Einfluss auf die Bildung von Hydroperoxiden haben kann. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass die Lagerung von Öl in transparenten Flaschen unter Haushaltsbedingungen für das erhöhte Risiko einer beschleunigten Lipidoxidation verantwortlich sein kann. Der Grund für eine solche beschleunigte Lipidoxidation lag in der vermehrten Einwirkung von kaltem fluoreszierendem Licht, die im Vergleich zu nicht transparenten Flaschen deutlich größer war.² SÖ wurde vom Produzenten in einer transparenten Glasflasche abgefüllt. Dies könnte ein wesentlicher Faktor für die hohe POZ von SÖ und somit indirekt auch für die hohen Parameter von MED und HIGH mitverantwortlich sein.

Anhand dieser Daten kann angenommen werden, dass es zwischen dem Grad der thermischen Behandlung und der POZ eine positive Korrelation gibt.

5.1.3 Messung von oxidierten Triglyceriden in der polaren Ölfraktion mittels LC-MS

Zur Charakterisierung des oxidativen Status der Sonnenblumenöle wurde die polare Fraktion von den Ölen abgetrennt und die darin enthaltenen hydroperoxidierten und epoxidierten TG gemessen (vgl. Kapitel 4.2.3). Freie LA, LAOH und LAOOH konnten in der polaren Fraktion der Sonnenblumenöle nicht nachgewiesen werden. Phytosterole und ihre Esterverbindungen konnten ebenfalls nicht in den polaren Phasen der Sonnenblumenöle nachgewiesen werden.

Im Öl kommt es im Laufe der Zeit vor allem durch die Verfügbarkeit von Sauerstoff, Wärme und Licht zur Oxidation der darin enthaltenen TG. Dadurch bilden sich im Zuge der Initiation und Propagation unter anderem TG-Hydroperoxide sowie TG-Epoxide (vgl. Kapitel 2.1.1).²¹

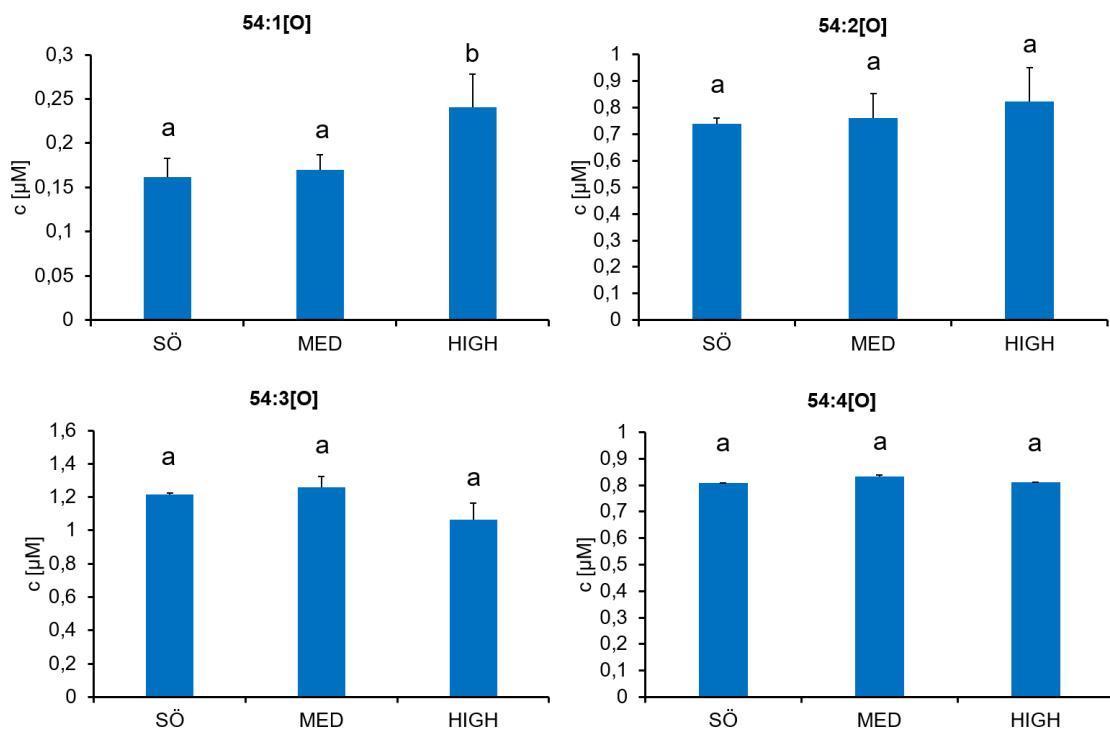


Abbildung 14: Epoxidierte Triglyceride[O] ($n = 3$; unterschiedliche Buchstaben weisen auf statistische Signifikanz ($p < 0,05$) hin. Ermittelt durch eine einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von einem Holm-Sidak-Test (Post-Hoc)).

Insgesamt konnten mithilfe dieser Methode vier verschiedene epoxidierte TG in allen polaren Fraktionen der Sonnenblumenölproben (SÖ, MED und HIGH) nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 14). Dabei führte lediglich die einstündige thermische Behandlung des Öls bei 150°C (HIGH) zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration des epoxidierten TG 54:1[O], im Vergleich zu SÖ und MED ($p<0,032$), im Öl. Die polaren Fraktionen der Sonnenblumenölproben (SÖ, MED und HIGH) unterschieden sich ansonsten hinsichtlich der mit dieser Methode nachgewiesenen epoxidierten TG nicht voneinander ($p>0,05$).

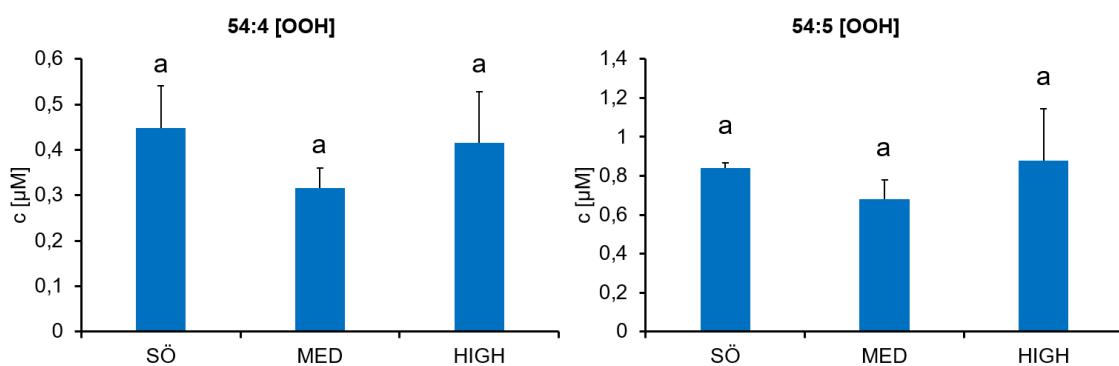


Abbildung 15: Hydroperoxidierte Triglyceride [OOH] ($n = 3$; $p > 0,05$. Ermittelt durch eine einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von einem Holm-Sidak-Test (Post-Hoc)).

Zudem konnten zwei verschiedene hydroperoxidierte TG (vgl. Abbildung 15) in allen polaren Fraktionen der Sonnenblumenölproben (SÖ, MED und HIGH) nachgewiesen werden. Die polaren Fraktionen der Sonnenblumenölproben (SÖ, MED und HIGH) unterschieden sich hinsichtlich der mit dieser Methode nachgewiesenen hydroperoxidierten TG nicht voneinander ($p>0,05$).

Diese Daten deuten, anders als erwartet, auf keine direkte Korrelation zwischen einer thermischen Behandlung von Sonnenblumenöl und der Entstehung von epoxidierten und hydroperoxidierten TG hin. Die Daten verhalten sich somit auch nicht analog zu den Ergebnissen der Bestimmung der POZ bzw. der Quantifizierung von Hexanal in den Ölproben SÖ, MED und HIGH (vgl. Kapitel 5.1.2 und Kapitel 5.1.4).

Es kann auf verschiedene Weisen diskutiert werden, warum die Konzentrationen an epoxidierten und hydroperoxidierten TG im Großen und Ganzen nicht signifikant angestiegen sind. Eine Hypothese ist, dass in Sonnenblumenölen durch Hitzeinwirkungen andere Lipidperoxidationsprodukte als epoxidierte und

hydroperoxidierte TG gebildet werden oder die Hitzeeinwirkung nicht ausreichend stark beziehungsweise lange war. Eine weitere Hypothese ist, dass das verwendete Studienöl sich bereits beim Kauf in einem solch stark oxidierten Zustand befunden hat, dass sich durch die thermische Behandlung keine weiteren epoxidierten und hydroperoxidierten TG bildeten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass epoxidierte und hydroperoxidierte TG in allen Ölproben im mikromolaren Bereich nachgewiesen werden konnten. Die thermische Behandlung für eine Stunde auf 80° (MED) beziehungsweise 150 °C (HIGH) hatte jedoch kaum bis gar keinen Einfluss auf die Konzentration von epoxidierten und hydroperoxidierten TG.

5.1.4 Quantifizierung von Hexanal in den Ölproben mittels HS-GC/MS

Hexanal ist ein Aldehyd, welcher beispielsweise durch Oxidation von ungesättigten FS, wie der Linolsäure, entsteht. Die Analyse muss rasch erfolgen, da Hexanal sehr flüchtig ist. Hexanal zählt zu den sekundären Lipidoxidationsprodukten und ist somit bei der Beurteilung von Lipiden von besonderer Bedeutung.⁹⁹ Hexanal wurde quantifiziert, um die Auswirkungen der Lagerung und Erhitzung von Sonnenblumenöl im späten Stadium der Lipidoxidation zu analysieren und um die Studienöle somit genauer charakterisieren zu können.

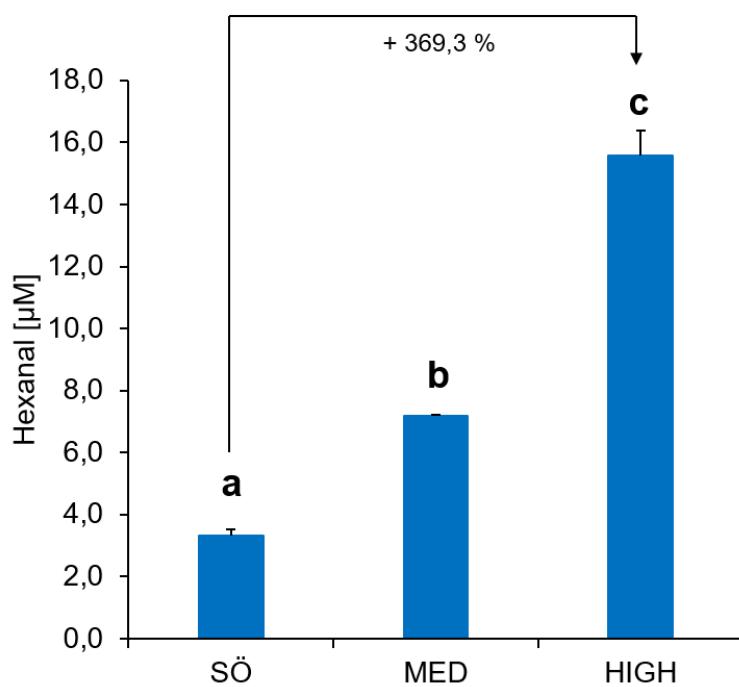


Abbildung 16: Bestimmung des Hexanalgehaltes in den (erhitzten) Sonnenblumenölproben; $n = 3$, $p \leq 0,003$.

Der Hexanalgehalt des kurz nach dem Kauf, frisch geöffneten, unbehandelten Sonnenblumenöls (SÖ) betrug $3,32 \pm 0,21 \mu\text{M}$ (vgl. Abbildung 16). Eine mäßige Erhitzung (MED) desselben Sonnenblumenöls in einem vorgeheizten Trockenschrank (80°C) für 60 Minuten führte zu einer signifikanten Steigerung des Hexanalgehaltes auf $7,17 \pm 0,06 \mu\text{M}$ (entspricht im Mittel plus 116,2 Prozent; verglichen zur Baseline/SÖ) im Öl. Eine starke Erhitzung (HIGH) im Ofen bei 150°C für 60 Minuten führte zu einem Hexanalgehalt von $15,57 \pm 0,82 \mu\text{M}$ (entspricht im Mittel plus 369,3 Prozent; verglichen zur Baseline/SÖ) im Öl.

Die thermische Behandlung von kaltgepresstem Sonnenblumenöl sorgte insgesamt für deutliche, signifikant höhere Konzentrationen von Hexanal in den Ölen.

Anhand dieser Daten kann angenommen werden, dass es zwischen dem Grad der thermischen Behandlung und dem Hexanalgehalt eine positive Korrelation gibt. Die Daten verhalten sich analog zu den Ergebnissen der Bestimmung der Hydroperoxide in den Ölproben (vgl. Kapitel 5.1.2). Es ist jedoch für die nachfolgenden Versuche (vgl. Kapitel 5.4 und 5.5) wichtig zu beachten, dass die polaren Fraktionen der Sonnenblumenölproben SÖ, MED und HIGH kein Hexanal enthielten. Der Grund dafür könnte sein, dass Hexanal während der doch recht langen Festphasenextraktion verdampft.

5.2 MTT-Test auf Zellviabilität

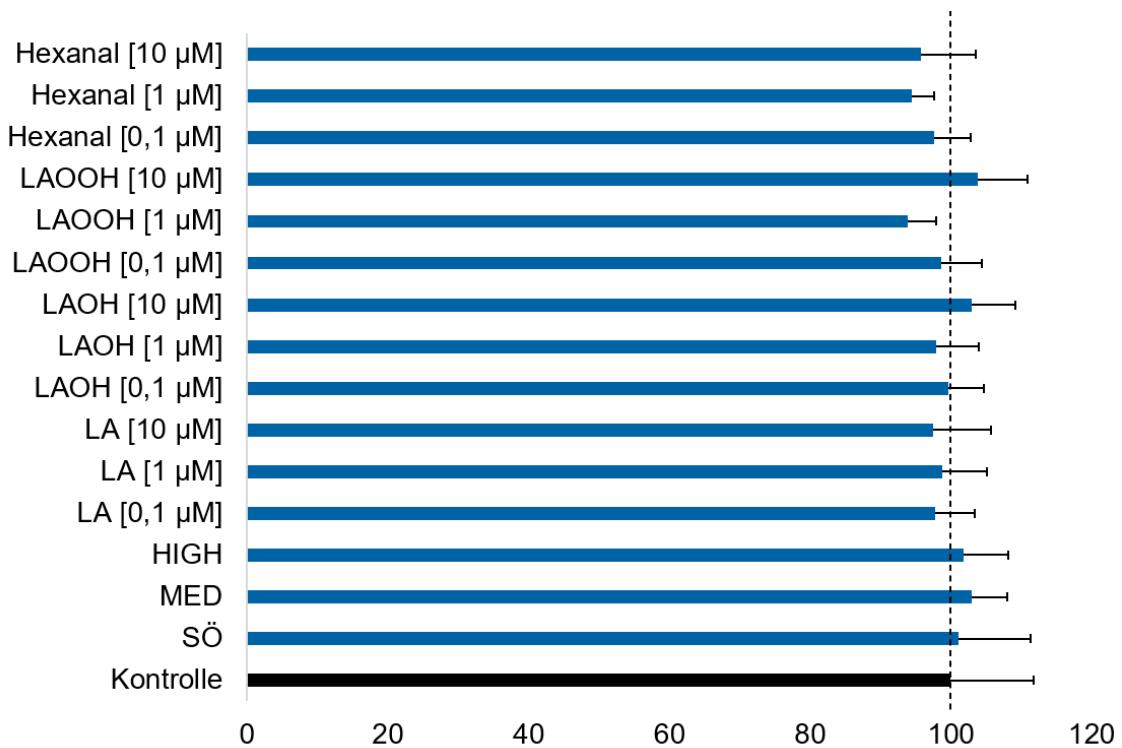


Abbildung 17: Einfluss der Lipidoxidationsprodukte auf die Zellviabilität. Einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von einem Holm-Sidak-Test (Post-Hoc); n = 3 (3 biologische Replikate, je 2 technische Replikate); p > 0,05; Kontrolle = 99,9 % Puffer + 0,1% DMSO.

Die relativen Zellviabilitäten der Caco-2-Monolayer, die für 30 Minuten mit verschiedenen Testsubstanzen inkubiert wurden, unterschieden sich nicht von jenen der Kontrolle (vgl. Abbildung 17). Sowohl die polaren Fraktionen der oxidierten Sonnenblume als auch die isolierten Oxidationsprodukte der LA (LAOOH, LAOH und HEXA) in den Konzentrationen 0,1, 1 und 10 µM haben sich nicht negativ auf die Zellviabilität ausgewirkt.

5.3 Einfluss von Lipidoxidationsprodukten auf die Zusammensetzung von Phospholipiden in Caco-2 Zellen

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit dem Einfluss oxiderter Sonnenblumenöle (SÖ, MED und HIGH) sowie dem Einfluss von LA und Oxidationsprodukten der LA (LAOOH, LAOH, HEXA) [0,1 μ M], Hauptbestandteil im Sonnenblumenöl (vgl. Kapitel 5.1.1), auf die Zusammensetzung der PL von Caco-2 Zellen.

Abbott *et al.* (2010)¹⁰⁰ beschrieben, dass Nahrungslipide in Zellmembranen bei Ratten eingebaut werden können und wiesen anschließend im Jahr 2012 nach, dass dieser Einbau in die Membran einen Einfluss auf die Zusammensetzung der PL hat.^{100,101} PL zeigen außerdem großen Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften von Membranen.⁷

Auf den nächsten Seiten werden die Ergebnisse der 30-minütigen Inkubation mit oxidierten Sonnenblumenölen (SÖ, MED und HIGH), LA sowie isolierten Oxidationsprodukten der LA (LAOOH, LAOH, HEXA) auf die Zusammensetzung der wichtigsten PL (PC, PE und PS) in Caco-2 Zellen dargestellt (vgl. Tabelle 22, 23 und 24). Die PL wurden im Zuge dieser Studie nicht quantifiziert. Eine große Reihe an PE und PS mit unterschiedlichen FS konnten mittels hochauflösender LC-MS/MS Analyse (zielgerichteter Metabolomics Ansatz) in allen Gruppen (Kontrolle, SÖ, MED, HIGH, LA, LAOH, LAOOH und HEXA) nachgewiesen werden. Die Phosphatidylserine PS (16:1/16:0), PS (16:1/18:1), PS (16:1/20:4) und PS (16:0/16:0) befanden sich in allen Gruppen unter der Nachweisgrenze.

PC (18:0/18:0) lag in allen Gruppen unter der Nachweisgrenze. Die anderen PC-Varianten lagen in der Kontrolle, SÖ und LAOOH unter der Nachweisgrenze. In allen anderen Gruppen (MED, HIGH; LA, LAOH, HEXA) konnten PC nachgewiesen werden.

Bei der Auswertung dieser Ergebnisse (PC, PE und PS) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen SÖ, MED, HIGH, LA, LAOH, LAOOH, HEXA, in denen PL nachgewiesen wurden, festgestellt werden.

Tabelle 22: Phosphatidylcholine (PC) in Caco-2 Zellen nach 30 min Inkubation mit oxidierten Lipiden.

Phosphatidylcholine berechnetes m/z	Mittelwert gemessenes m/z	RT [min]	Kontrolle [AUC]	SÖ [AUC]	MED [AUC]	HIGH [AUC]	LA [AUC]	LAOH [AUC]	LAOOH [AUC]	HEXA [AUC]	
PC (16:1/16:1)	730.5381	730.5380	12.23	n.d.	40190392	69129428	52996836	45227126	n.d.	41093044	
PC (16:1/16:0)	732.5538	732.5589	12.92	n.d.	n.d.	577072111	506048916	493762668	453782013	n.d.	448101445
PC (16:1/18:0) & PC (16:0/18:1)	760.5851	760.5844	13.69	n.d.	n.d.	1198114170	1356998749	1196074602	1017566856	n.d.	1108051901
PC (16:1/18:1)	758.5694	758.5691	13.09	n.d.	n.d.	306922273	302896954	309515645	276159921	n.d.	321961721
PC (16:1/20:4)	780.5538	780.5535	12.46	n.d.	n.d.	177402591	137677564	152540862	148502687	n.d.	123083058
PC (16:0/16:0)	734.5694	734.5694	13.71	n.d.	n.d.	32110468	40757534	34519409	37098671	n.d.	32428976
PC (16:0/18:0)	762.6007	762.5906	14.48	n.d.	n.d.	959553	896637	1362089	1044769	n.d.	945609
PC (16:0/20:4)	782.5694	782.5692	12.90	n.d.	n.d.	226689505	203118008	272798084	206890591	n.d.	203578101
PC (18:0/18:0)	790.6320	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
PC (18:0/18:1)	788.6164	788.6160	14.65	n.d.	n.d.	389048587	360249036	383649181	353017973	n.d.	442194487
PC (18:0/20:4)	810.6007	810.6003	13.79	n.d.	n.d.	47547368	41885672	41445078	44268848	n.d.	44754010
PC (18:1/18:1) & PC (18:2/18:0)	786.6007	786.6001	13.65	n.d.	n.d.	366501435	445513609	435688126	459956016	n.d.	402707644
PC (18:1/20:4)	808.5851	808.5848	12.95	n.d.	n.d.	103907468	84674315	92867295	90336392	n.d.	91558010
PC (20:4/20:4)	830.5694	830.5693	12.17	n.d.	n.d.	6213307	5182071	5766406	5652481	n.d.	3599498
PC (18:2/18:2)	782.5694	782.5691	12.90	n.d.	n.d.	226689505	203118008	272798084	206890591	n.d.	203578101
PC (18:2/16:1)	756.5538	756.5538	12.38	n.d.	n.d.	15127733	26424103	15739367	15140798	n.d.	14464832
PC (18:2/18:1)	784.5851	784.5849	13.28	n.d.	n.d.	168566036	158519580	177932735	147821202	n.d.	142875317
PC (18:2/20:4)	806.5694	806.5692	12.74	n.d.	n.d.	147913370	170672909	149481154	143193257	n.d.	155284511

n = 3, einfaktorielle Varianzanalyse (p > 0,05), die Daten wurden auf den Proteingehalt (via Bradford) normalisiert. Abk.: n.d. = not detectable

Tabelle 23: Phosphatidylethanolamine (PE) in Caco-2 Zellen nach 30 min Inkubation mit oxidierten Lipiden.

Phosphatidylethanolamine (PE)	berechnetes m/z	Mittelwert gemessenes m/z	RT [min]	Kontrolle [AUC]	SÖ [AUC]	MED [AUC]	HIGH [AUC]	LA [AUC]	LAOH [AUC]	LAOOH [AUC]	HEXA [AUC]
PE (16:1/16:1)	686.4766	686.4773	12.12	104755	132749	105108	194672	135385	108738	123071	99515
PE (16:1/16:0)	688.4923	688.4932	12.66	984836	132749	1343953	1376786	1296625	1067032	1202695	1078043
PE (16:1/18:0) & PE (16:0/18:1)	716.5236	716.5246	13.53	3910791	4310179	4749672	5519509	4915635	4477953	5510044	4419889
PE (16:1/18:1)	714.5079	714.5088	12.78	1539287	1939056	2314389	2450093	2291244	1829115	1993694	1805578
PE (16:1/20:4)	736.4923	736.4933	12.36	677156	559659	588840	569239	900062	629398	626387	581890
PE (16:0/16:0)	690.5079	690.5088	13.51	34828	39734	38159	46153	40578	42829	48596	44158
PE (16:0/18:0)	718.5392	718.5395	14.35	31707	22239	43033	46155	38563	34722	37061	31716
PE (16:0/20:4)	738.5079	738.5089	12.80	2491144	2259777	2191804	2132231	2559440	2204834	2301702	2200743
PE (18:0/18:0)	746.5705	746.5784	12.81	38998	36046	41551	47707	38626	38552	41094	34760
PE (18:0/18:1)	744.5549	744.5557	14.35	4150219	4161790	4371118	4357607	6583299	6055848	4864130	4510303
PE (18:0/20:4)	766.5392	766.5402	13.58	3607371	3953962	4072089	3941382	4225506	4131447	4202893	3840795
PE (18:1/18:1) & PE (18:2/18:0)	742.5392	742.5402	13.51	8048559	7437324	7738192	9965450	8940204	8163639	10333319	7769056
PE (18:1/20:4)	764.5236	764.5243	12.72	2980732	2711434	2649750	2544114	3131874	2775941	3593470	2657359
PE (20:4/20:4)	786.5079	786.5127	12.13	16320	20561	19069	23648	21543	17731	22535	17474
PE (18:2/18:2)	738.5079	738.5089	12.80	2491144	2259777	2191804	2132231	2559440	2204834	2301702	2200743
PE (18:2/16:1)	712.4923	712.4931	12.27	55693	62242	86690	186102	77551	66577	79311	66578
PE (18:2/18:1)	740.5236	740.5244	12.94	612525	648649	724365	596012	797434	742700	702188	640878
PE (18:2/20:4)	762.5079	762.5088	12.63	1813549	1471949	1509911	1553149	2449932	1719890	1701877	1610104

n = 3, einfaktorielle Varianzanalyse (p > 0,05), die Daten wurden auf den Proteingehalt (via Bradford) normalisiert. Abk.: n.d. = not detectable

Tabelle 24: Phosphatidylserine (PS) in Caco-2 Zellen nach 30 min Inkubation mit oxidierten Lipiden.

Phosphatidylserine (PS)	berechnetes m/z	Mittelwert gemessenes m/z	RT [min]	Kontrolle [AUC]	SÖ [AUC]	MED [AUC]	HIGH [AUC]	LA [AUC]	LAOH [AUC]	HEXA [AUC]
PS (16:1/16:1)	730.4665	730.4650	12.67	793	381	790	1570	793	880	602
PS (16:1/16:0)	732.4821	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PS (16:1/18:0) & PS (16:0/18:1)	760.5134	760.5157	12.60	80946	66401	85554	88955	103858	93901	94369
PS (16:1/18:1)	758.4978	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PS (16:1/20:4)	780.4821	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PS (16:0/16:0)	734.4978	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PS (16:0/18:0)	762.5291	762.5281	12.54	221600	147424	221345	232961	203669	227348	193118
PS (16:0/20:4)	782.4978	782.4959	12.78	128495	148933	140830	208058	185515	172240	190206
PS (18:0/18:0)	790.5604	790.5602	13.31	2272200	1973118	1707670	1667003	2342118	1649239	1775153
PS (18:0/18:1)	788.5447	788.5456	13.32	545320	312905	312482	281663	382855	336037	479171
PS (18:0/20:4)	810.5291	810.5274	13.50	550890	592160	668977	653967	661936	666632	735093
PS (18:1/18:1) & PS (18:2/18:0)	786.5291	786.5284	12.63	21210	19331	33373	26602	29663	26890	18969
PS (18:1/20:4)	808.5134	808.5114	12.96	43781	42253	55290	63450	68708	54124	56153
PS (20:4/20:4)	830.4978	830.4962	12.62	226523	218283	229805	233713	284405	264649	263960
PS (18:2/18:2)	782.4978	782.4959	12.78	128495	148933	140830	208058	185515	172240	190206
PS (18:2/16:1)	756.4821	756.4804	12.77	86519	99865	114550	123062	113894	101166	112307
PS (18:2/18:1)	784.5134	784.5117	13.52	323742	342604	382002	378925	382062	382126	415837
PS (18:2/20:4)	806.4978	806.4960	12.80	179895	209685	232405	199642	233066	222169	231224

n = 3, einfaktorielle Varianzanalyse (p > 0,05), die Daten wurden auf den Proteingehalt (via Bradford) normalisiert. Abk.: n.d. = not detectable

Die PC lagen in der Kontrolle und in SÖ unter der Nachweisgrenze, in MED und HIGH konnten PC nachgewiesen werden. Somit kann angenommen werden, dass die thermische Behandlung von Ölen zu einem Anstieg der Konzentrationen an PC in den Membranen führen kann. Frühwirth *et al.* (2020)⁸ zeigten, dass oxTG die Zusammensetzung der PL beeinflussen können.⁸ Die Gehalte an oxTG (epoxidierten und hydroperoxidierten TG) in den Ölproben (SÖ, MED und HIGH) unterschieden sich in dieser Studie jedoch nicht voneinander (vgl. Kapitel 5.1.3). Es kann somit, nicht deckend mit den Ergebnissen von Frühwirth *et al.* (2020)⁸ an Magenzellen (HGT-1), bei Caco-2 Zellen nicht argumentiert werden, dass dieser Anstieg auf höhere Konzentrationen von oxidierten TG zurückzuführen ist. Möglicherweise könnten die erhöhten Gehalte an Fettsäurehydroperoxide (vgl. Kapitel 5.1.2), oder an sekundären Lipidoxidationsprodukten, wie Hexanal (vgl. Kapitel 5.1.4), für die stimulierte Bildung von PC verantwortlich sein. Die PL-Zusammensetzung in Membranen ist ein wichtiger Faktor für die passive Lipidabsorption, die unter anderem die Absorption mit der Nahrungsaufnahme koppelt. Es ist anzunehmen, dass Änderungen beim Einbau von PUFA in PL den Lipidtransport durch Zellmembranen beeinflussen könnten.⁷ Bauer *et al.* (2005)⁵ führen solche möglichen Auswirkungen auf die FS-Aufnahme auf die pro- beziehungsweise antioxidativen Effekte von PL zurück. Außerdem beschreiben die Autoren positive Effekte durch MG und PL auf die Mizellisierung im Lumen, wodurch die Absorption von Lipidmetaboliten verbessert werden kann.⁵

In dieser Studie konnte nach 30 Minuten Inkubation von Caco-2-Zellen mit LA als auch ihren Lipidoxidationsprodukten LAOH und Hexanal, ein Anstieg von PC in den Membranen festgestellt werden.

Besonders hervorzuheben ist der Anstieg an PC nach Inkubation mit den polaren Phasen von MED und HIGH verglichen mit der Inkubation der Caco-2 Zellen mit den nicht erhitzen Proben (SÖ), wo der Gehalt an PC unter der Nachweisgrenze lag. Eine Inkubation mit LAOOH führte, entgegen der Erwartungen, verglichen mit den Proben, die mit Hexanal oder LA inkubiert wurden, zu keinem nachweisbaren Anstieg von PC.

Ob dieser Anstieg diverser PC auch folglich zu einer erhöhten FS-Aufnahme führen könnte, wird im nächsten Kapitel 5.4 näher untersucht.

5.4 Einfluss von Lipidoxidationsprodukten auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit dem Einfluss oxiderter Sonnenblumenöle (SÖ, MED und HIGH) sowie dem Einfluss von LA und Oxidationsprodukten der LA (LAOOH, LAOH, HEXA) [0,1/1/10 µM], Hauptbestandteil im Sonnenblumenöl (vgl. Kapitel 5.1.1), auf die FS-Aufnahme von Caco-2 Zellen.

Die FS-Aufnahme wurde durch Zugabe des Bodipy®-C12 enthaltenden Beladungsfarbstoffs gestartet, der an einen Fluoreszenzlöscher gekoppelt war. Das fluoreszierende BODIPY®-Dodecansäure-FS-Analogon ist ein langketziges FS-Analogon mit ähnlichen Eigenschaften wie natürliche FS (vgl. Kapitel 2.2.5). Es ist ein bekanntes Substrat für Fettsäuretransporter, da seine Aufnahme durch Adipozyten durch nicht markierte FS konkurriert werden kann.⁹⁴

Die AUC, die durch das ansteigende Fluoreszenzsignal für 60 Minuten im dunklen Raum gemessen wurde, wurde aus den jeweiligen Zeit-Intensitäts-Plots ermittelt. Dabei gilt: je niedriger die AUC, desto höher ist das Hemmpotential der Testsubstanz. Umgekehrt wirkt eine Testsubstanz bei höheren AUC stimulierend auf die FS-Aufnahme.⁹⁵ Es folgen die Ergebnisse des Assays.

5.4.1 Einfluss von (erhitztem) Sonnenblumenöl auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Einflüsse auf die PL-Zusammensetzung (PC, PE, PS, vgl. Kapitel 5.3), kam es zwischen den Gruppen der Inkubation mit den polaren Fraktionen der (erhitzten) Sonnenblumenöle lediglich bei der Betrachtung der PC zu Unterschieden. Es konnte folglich angenommen werden, dass die polaren Fraktionen thermisch behandelter Öle zu einem Anstieg der Konzentrationen von PC in den Membranen führen kann. Die PL-Zusammensetzung in Membranen ist ein wichtiger Faktor für die passive Lipidabsorption, die unter anderem die Absorption mit der Nahrungsaufnahme koppelt.⁷ Es wurden Ergebnisse erwartet, dass es durch den Einbau von PUFA (wie sie im Sonnenblumen reich enthalten sind, vgl. Kapitel 5.1.1) in die PL der Zellmembranen zu einem verbesserten Lipidtransport kommt.

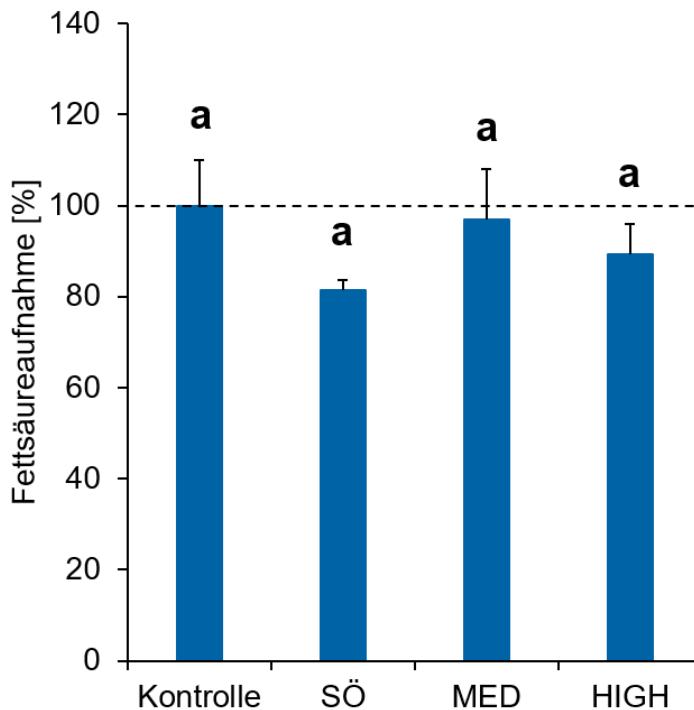


Abbildung 18: Einfluss von oxidiertem kaltgepresstem Sonnenblumenöl auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen; Verdünnungsfaktor 1:1000; n = 3 (3 biologische Replikate, je 2 technische Replikate); p > 0,05, einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von einem Holm-Sidak-Test (Post-Hoc).

Bei der Betrachtung der Daten der FS-Aufnahme durch Caco-2 Membranen konnte jedoch kein Trend in Richtung Stimulation der FS-Aufnahme festgestellt werden. Die polaren Fraktionen der oxidierten, kaltgepressten Sonnenblumenöle SÖ, MED und HIGH zeigten insgesamt keinen signifikanten Einfluss auf die FS-Aufnahme von Caco-2 Zellen (vgl. Abbildung 18), obwohl die Inkubation mit MED/HIGH, verglichen zu SÖ, signifikante Effekte auf die Zusammensetzung von PC zeigte (vgl. Kapitel 5.3). Eine längere Inkubationszeit oder eine geringere Verdünnung der Öle ist möglicherweise notwendig, um einen stimulierenden Effekt auf die FS-Aufnahme beobachten zu können. Dies könnte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

5.4.2 Einfluss von Linolsäure auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Einflüsse auf die PL-Zusammensetzung (vgl. Kapitel 5.3) konnte nach 30 Minuten Inkubation von Caco-2-Zellen mit LA

[0,1 µM] ein Anstieg von PC, im Vergleich zur Kontrolle, festgestellt werden. Die PL-Zusammensetzung in Membranen ist ein wichtiger Faktor für die passive Lipidabsorption, die unter anderem die Absorption mit der Nahrungsaufnahme koppelt.⁷ Es wurden Ergebnisse erwartet, dass es durch den Einbau von PUFA (wie LA) in PL der Caco-2-Zellen zu einem verbesserten Lipidtransport kommt. Bei der Betrachtung der Daten der FS-Aufnahme durch Caco-2 Membranen konnte jedoch kein Trend in Richtung Stimulation der FS-Aufnahme festgestellt werden.

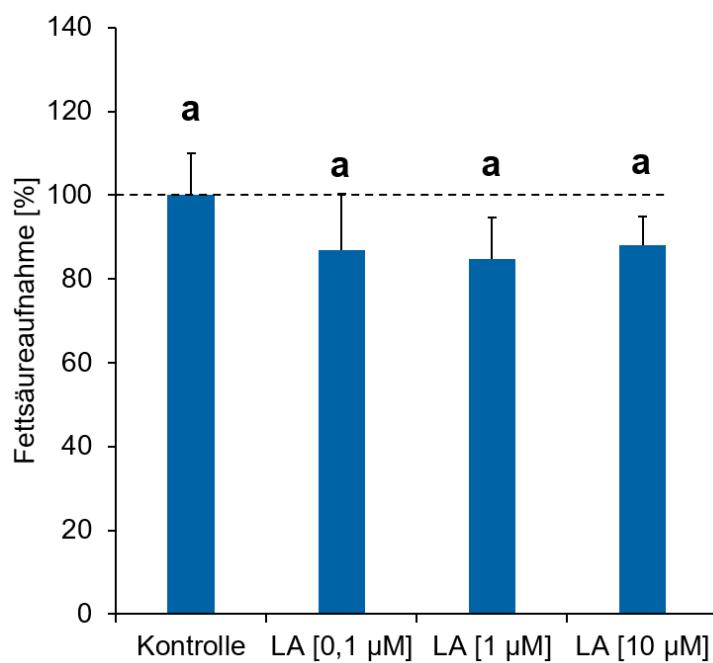


Abbildung 19: Einfluss von Linolsäure (LA) auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen; n = 3 (3 biologische Replikate, je 2 technische Replikate); p > 0,05, einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von einem Holm-Sidak-Test (Post-Hoc).

Eine Inkubation (30 Minuten) mit LA [0,1/10 µM] führte, im Vergleich zur Kontrolle, zu keinen signifikanten Unterschieden (p>0,05) der FS-Aufnahme durch Caco-2 Zellen (vgl. Abbildung 19). Offenbar scheint ein Zusammenhang zwischen einer Remodellierung von PL und der Aufnahme von FS nicht gegeben zu sein. Möglicherweise ist eine längere Inkubationszeit oder eine höhere Konzentration der LA notwendig, um einen stimulierenden Effekt auf die FS-Aufnahme beobachten zu können. Dies sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

5.4.3 Einfluss von Linolsäurehydroperoxid auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen

Bei LAOOH handelt es sich um ein primäres Lipidoxidationsprodukt der LA mit potenziell schädlichen Wirkungen auf den menschlichen Körper.¹¹ oxidative Prozesse im Menschen werden mit dem Altern als auch der Entstehung einer Reihe von degenerativen Erkrankungsbildern, wie Krebs, Atherosklerose, Makuladegeneration, Alzheimer sowie Parkinson in Verbindung gebracht und schon seit vielen Jahren wissenschaftlich diskutiert (vgl. Kapitel 2.1).^{12–14} Es wurde daher vor der Durchführung dieser Studie vermutet, dass Lipidoxidationsprodukte wie LAOOH eine hemmende Wirkung auf die FS-Aufnahme von Caco-2 Zellen besitzen. Diese Vermutung konnte durch die nachfolgenden Ergebnisse nicht bestätigt werden.

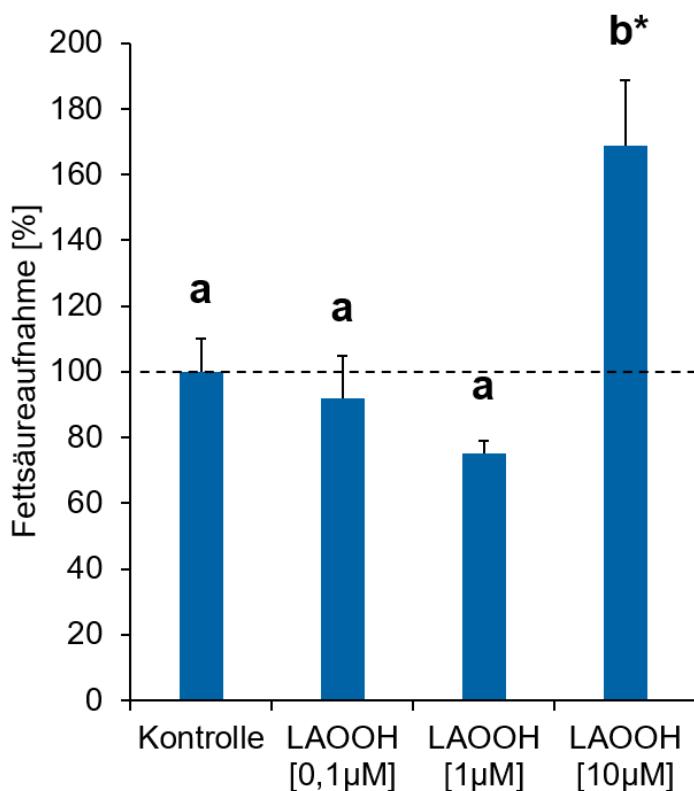


Abbildung 20: Einfluss von Linolsäurehydroperoxid (LAOOH) auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen; n = 3 (3 biologische Replikate, je 2 technische Replikate); p < 0,001, einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von einem Holm-Sidak-Test (Post-Hoc).

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Einflüsse auf die PL-Zusammensetzung (vgl. Kapitel 5.3) konnte nach 30 Minuten Inkubation von Caco-2-Zellen mit LAOOH [0,1 µM] kein Anstieg von PL, im Vergleich zur Kontrolle, festgestellt werden. Ob es bei einer Inkubation mit höheren Konzentrationen an LAOOH [1/10 µM] zu signifikanten Unterschieden in der Zusammensetzung der PL kommt, wurde in dieser Studie leider nicht untersucht. Daher kann man anhand dieser Daten leider keinen Zusammenhang zwischen PL und FS-Aufnahme schlussfolgern. Dies sollte ein wesentlicher Teil zukünftiger Studien sein. Denn eine Inkubation (30 Minuten) mit LAOOH führte bei einer Konzentration von 10 µM (b*), im Vergleich zur Kontrolle (a), zu einem signifikanten Anstieg ($p<0,001$) der FS-Aufnahme durch Caco-2 Zellen (vgl. Abbildung 20).

5.4.4 Einfluss von Linolsäurehydroxid auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen

Bei der Interpretation der Ergebnisse der Einflüsse auf die PL-Zusammensetzung konnte nach 30 Minuten Inkubation von Caco-2-Zellen mit LAOH [0,1 µM] ein Anstieg von PC in Caco-2 Zellen festgestellt werden. Die PL-Zusammensetzung in Caco-2 Zellen ist ein wichtiger Faktor für die passive Lipidabsorption, die unter anderem die Absorption mit der Nahrungsaufnahme koppelt.⁷ LAOH ist ein Abbauprodukt von LAOOH und konnte nach einer Studie von Zaunschirm *et al.* (2019)³ an der basolateralen Seite von Magenzellen (HGT-1) nach einer Inkubation mit LAOOH beziehungsweise LA quantifiziert werden. Die Autoren vermuten, dass LAOOH ein direkter Vorläufer von LAOH ist. Im Gegensatz dazu müsste LA zuerst zu LAOOH oxidiert werden, bevor sie möglicherweise zu LAOH gespalten werden kann, was LAOOH im Verdauungstrakt zu einer Quelle für LAOH macht.^{3,102}

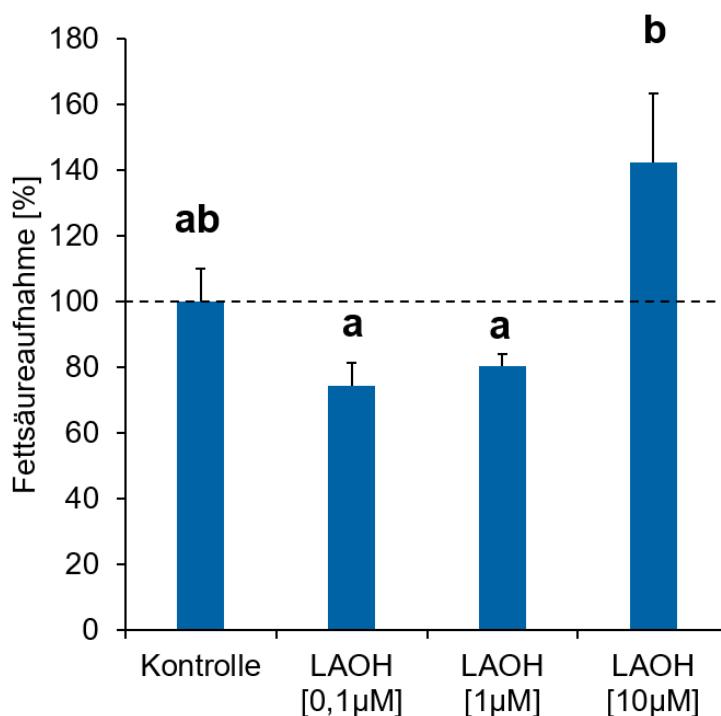


Abbildung 21: Einfluss von Linolsäurehydroxid (LAOH) auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen; n = 3 (3 biologische Replikate, je 2 technische Replikate); p > 0,05, einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von einem Dunn's-Test (Post-Hoc).

Eine Inkubation (30 min) mit LAOH zeigte im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Einfluss ($p>0,05$) auf die FS-Aufnahme von Caco-2 Zellen. Die FS-Aufnahme erhöhte sich, im Vergleich zu den niedrigeren Konzentrationen von LAOH [0,1/1 µM] (a), signifikant ab einer Konzentration von 10 µM LAOH (b) ($p<0,042$) (vgl. Abbildung 21).

Zusammenfassend zeigte LAOH in den Konzentrationen 0,1, 1 und 10 µM, im Vergleich zur Kontrolle, keinen stimulierenden oder hemmenden Effekt auf die FS-Aufnahme. Die Daten lassen vermuten, dass eine höhere Konzentration beziehungsweise eine größere Stichprobe notwendig ist, um potenziell stimulierende Effekte (ähnlich wie nach einer Inkubation mit LAOOH, vgl. Kapitel 5.4.3) feststellen zu können. Dies könnte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

5.4.5 Einfluss von Hexanal auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen

Bei der Interpretation der Ergebnisse der PL konnte nach 30 Minuten Inkubation von Caco-2-Zellen mit Hexanal [0,1 µM] ein Anstieg von PC, im Vergleich zur Kontrolle, festgestellt werden.

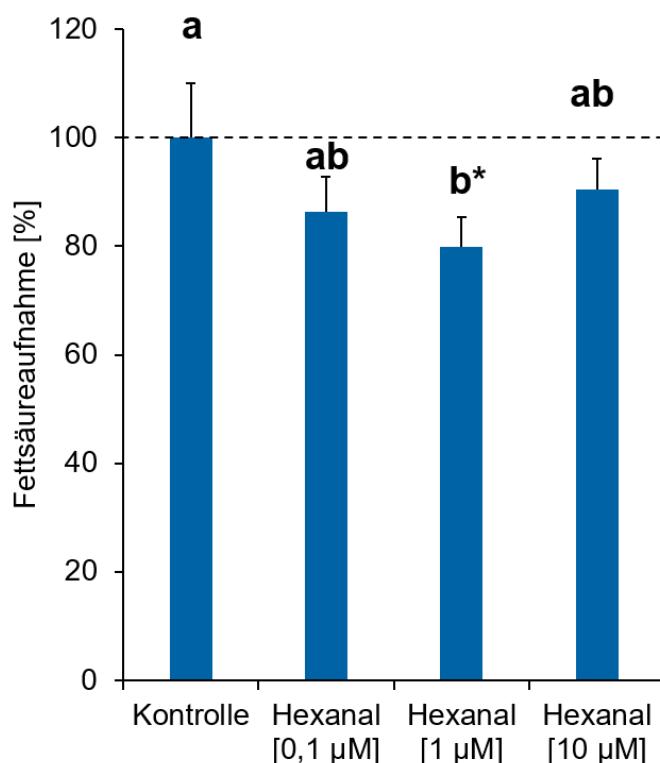


Abbildung 22: Einfluss von Hexanal auf die Fettsäureaufnahme von Caco-2 Zellen; n = 3 (3 biologische Replikate, je 2 technische Replikate); p = 0,005, einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von einem Holm-Sidak-Test (Post-Hoc).

Die PL-Zusammensetzung in Membranen ist ein wichtiger Faktor für die passive Lipidabsorption, die unter anderem die Absorption mit der Nahrungsaufnahme koppelt.⁷ Bei Hexanal handelt es sich um ein sekundäres Lipidoxidationsprodukt mit potenziell schädlichen Wirkungen auf den menschlichen Körper.¹¹ Insbesondere von Lipiden abgeleitete Elektrophile (typischerweise Aldehyde) können Reaktionen mit der Desoxyribonukleinsäure, mit Proteinen und anderen nukleophilen Biomolekülen induzieren. oxidative Prozesse im Menschen werden mit dem Altern als auch der Entstehung einer Reihe von degenerativen Erkrankungsbildern wie Krebs, Atherosklerose, Makuladegeneration, Alzheimer

sowie Parkinson in Verbindung gebracht und schon seit vielen Jahren wissenschaftlich diskutiert (vgl. Kapitel 2.1).^{12–14}

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Einflüsse auf die PL-Zusammensetzung (vgl. Kapitel 5.3) konnte nach 30 Minuten Inkubation von Caco-2-Zellen mit HEXA [0,1 µM] ein Anstieg von PC, im Vergleich zur Kontrolle, festgestellt werden. Ob es bei einer Inkubation mit höheren Konzentrationen an HEXA [1/10 µM] ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg an PC kommt, was stark zu erwarten wäre, wurde in dieser Studie leider nicht untersucht.

Eine Inkubation mit Hexanal [1 µM] führte, im Vergleich zur Kontrolle (a), zu einer signifikanten Hemmung (b*) ($p=0,005$) der FS-Aufnahme durch Caco-2 Zellen (vgl. Abbildung 22).

Dieses Ergebnis steht ganz im Gegensatz zu der Erwartung, dass ein höherer Gehalt an PL, eine gesteigerte FS-Aufnahme zur Folge haben muss. Eine essenzielle Untersuchung zukünftiger Studien zu dieser Thematik sollte die Analyse der PL nach Inkubation von Hexanal in höheren Konzentrationen (>1 µM) sein, um einen direkten Zusammenhang zwischen der PL-Zusammensetzung und FS-Aufnahme ziehen zu können. Die Daten lassen ebenfalls vermuten, dass eine größere Anzahl an biologischen Replikaten notwendig wäre, um potenziell hemmende Effekte auch bei niedrigeren oder höheren Konzentrationen feststellen zu können.

6 Schlussbetrachtung

Das verwendete unbehandelte, kaltgepresste Sonnenblumenöl (SÖ) entspricht der FS-Zusammensetzung eines handelsüblichen Sonnenblumenöls. Nach einer einstündigen thermischen Behandlung von SÖ auf 80° (MED) beziehungsweise auf 150°C (HIGH) stieg die POZ von durchschnittlich 13,0 signifikant auf durchschnittlich 17,4 beziehungsweise signifikant auf durchschnittlich 24,2 meq O₂ pro kg Öl. Dies entspricht einen prozentuellen Anstieg (SÖ→HIGH) von plus 87,7 Prozent.

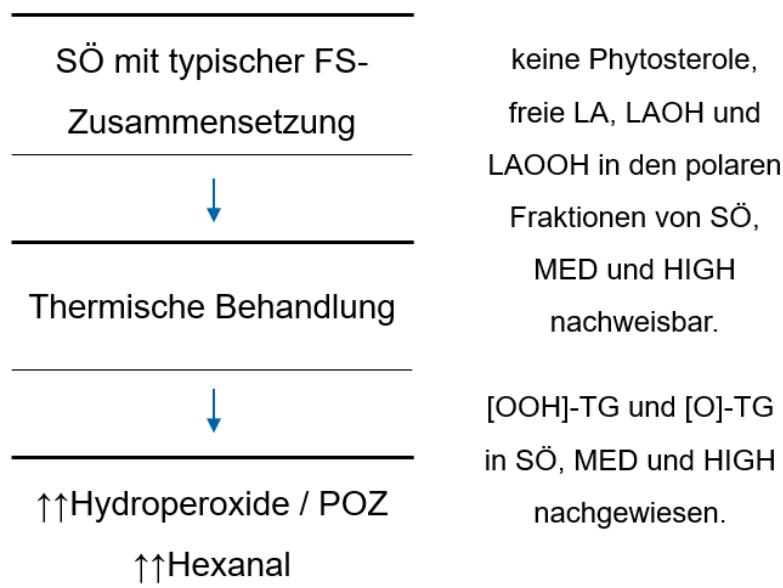


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Charakterisierung der verwendeten Sonnenblumenöle.

Analog dazu stieg der Hexanalgehalt im Öl signifikant von durchschnittlich 3,32 auf durchschnittlich 7,17 beziehungsweise auf durchschnittlich 15,57 µM. Dies entspricht einen prozentuellen Anstieg (SÖ→HIGH) von plus 369,3 Prozent. Epoxidierte und hydroperoxidierte TG konnten in allen polaren Fraktionen der Ölproben (SÖ, MED, HIGH) im mikromolaren Bereich nachgewiesen werden. Die thermische Behandlung hatte jedoch kaum Auswirkungen auf die Konzentrationen von epoxidierten und hydroperoxidierten TG. Phytosterole und ihre Esterverbindungen, freie LA, LAOH und LAOOH konnten in der polaren Fraktion der Sonnenblumenöle (SÖ, MED, HIGH) nicht nachgewiesen werden.

Die 30-minütige Inkubation von humanen Darmkrebszellen (Caco-2) mit den polaren Fraktionen von oxidierten, kaltgepressten Sonnenblumenölen sowie mit isolierten Oxidationsprodukten der LA hatte Auswirkungen, sowohl auf die Zusammensetzung der PL als auch auf die FS-Aufnahme der Zellen. Die Zellviabilität der Caco-2 Monolagen war nach der Inkubation noch bei allen Testsubstanzen auch in den höchsten Konzentrationen (10 µM) der Einzelsubstanzen gewährleistet.

Bei der Auswertung der PL (PC, PE und PS) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (SÖ, MED, HIGH, LA, LAOH, LAOOH, HEXA), in denen die PL über der Nachweisgrenze lagen, festgestellt werden. Die PL wurden im Zuge dieser Studie nicht quantifiziert. PC konnten in der Kontrolle und den mit SÖ inkubierten Caco-2 Zellen nicht nachgewiesen werden.

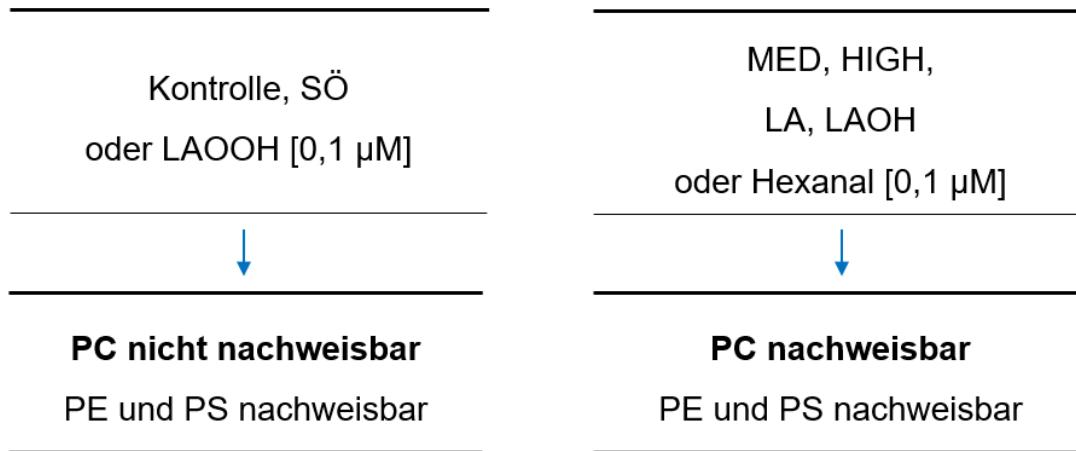


Abbildung 24: Eine 30-minütige Inkubation mit Lipidoxidationsprodukten wirkte sich unterschiedlich auf die Gehalte an Phosphatidylcholinen (PC) in Caco-2 Zellen aus.

Die thermische Behandlung von Ölen führte, ähnlich wie bei einer Studie der Kolleg*innen (Frühwirth *et al.*, 2020)⁸, zu einem Anstieg der Konzentrationen an PC in den Caco-2 Zellen. Dieser Anstieg konnte jedoch nicht auf höhere Konzentrationen von epoxidierte und hydroperoxydierte TG zurückgeführt werden. Es muss berücksichtigt werden, dass Frühwirth *et al.* (2020)⁸ Magenzellen (HGT-1 Zellen) untersucht hatten. Die Fettabsorptionsraten und Transportmechanismen von Magenzellen unterscheiden sich wesentlich von Dünndarmzellen. Während FS im Magen in einem niedrigeren Ausmaß passiv diffundieren, werden im Dünndarm vermehrt Fettsäurebindungsproteinen (FSBP) exprimiert, welche die FS-Absorption erheblich verbessern

können.^{66,67,74,91} (vgl. Kapitel 2.2.4) Weiters konnte nach einer 30-minütigen Inkubation mit LA als auch mit ihren Lipidoxidationsprodukten LAOH und Hexanal, ein Anstieg von PC in den Caco-2 Zellen festgestellt werden.

Die 30-minütige Inkubation mit Lipidoxidationsprodukten hatte heterogene Effekte auf die FS-Aufnahme von Caco-2 Zellen. Die polaren Fraktionen der oxidierten, kaltgepressten Sonnenblumenöle SÖ, MED und HIGH zeigten insgesamt keinen signifikanten Einfluss ($p>0,05$) auf die FS-Aufnahme von Caco-2 Zellen. Eine Inkubation mit LA [0,1/1/10 μM] führte zu keinen signifikanten Unterschieden ($p>0,05$) der FS-Aufnahme von Caco-2 Zellen. Die Inkubation mit LAOOH führte hingegen bei einer Konzentration von 10 μM zu einem signifikanten Anstieg ($p>0,001$) der FS-Aufnahme durch Caco-2 Zellen. LAOH zeigt keinen signifikanten Einfluss ($p>0,05$) auf die FS-Aufnahme von Caco-2 Zellen, jedoch erhöhte sich die FS-Aufnahme ab einer Konzentration von 10 μM signifikant im Vergleich zu den niedrigeren Konzentrationen [0,1/1 μM] ($p<0,042$). Hexanal hingegen führte bei einer Konzentration von 1 μM zu einer signifikanten Hemmung ($p=0,005$) der FS-Aufnahme durch Caco-2 Zellen. In den bereits beschriebenen Studien von Arnis Kuksis (1986)⁶, Wang *et al.* (2016)⁷ und Dasilva *et al.* (2018)⁶² wurde gezeigt, dass eine PUFA-reiche Ernährung sich sowohl auf die PL-Zusammensetzung als auch auf die FS-Aufnahme auswirken kann.^{6,7,62} Nach Wang *et al.* (2016)⁷ ist eine Remodellierung von intestinalen PL notwendig, um die Diffusion von Lipiden durch die Zellmembran zu ermöglichen. Es war anzunehmen, dass Änderungen beim Einbau von PUFA sowie von Lipidoxidationsprodukten in PL den Lipidtransport durch die Zellmembranen beeinflussen. Doch anders als bei der Studie von Wang *et al.* (2016)⁷, muss bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit beachtet werden, dass es nach der Inkubation mit Lipidoxidationsprodukten nicht nur zu einem Anstieg von PUFA, sondern auch von SFA und MUFA in den PL kam. (vgl. Kapitel 5.3) Eine gesteigerte oder gehemmte FS-Aufnahme kann somit auch nicht ausschließlich auf einen Anstieg von PUFA in der PL der Caco-2 Zellen zurückgeführt werden. Die Wirkung von Lipidoxidationsprodukten auf die FS-Aufnahme sollte ebenfalls differenziert betrachtet werden. Während LAOOH, ein primäres Lipidoxidationsprodukt, die FS-Aufnahme steigern konnte, wirkte sich Hexanal, ein sekundäres Lipidoxidationsprodukt, eher hemmend auf die FS-Aufnahme aus.

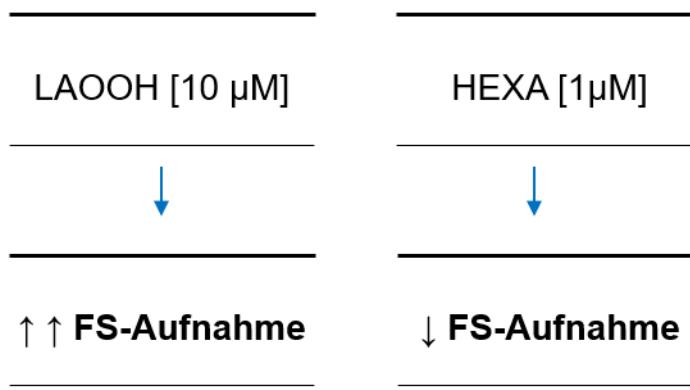


Abbildung 25: Eine 30-minütige Inkubation mit Lipidoxidationsprodukten wirkte sich unterschiedlich auf die FS-Aufnahme von Caco-2 Zellen aus.

Eine Schutzwirkung des Körpers auf potenzielle schädliche Substanzen wie sekundäre Lipidoxidationsprodukte kann anhand dieser Daten vermutet werden und sollte, wie mögliche physiologische Mechanismen, in zukünftigen Studien genauer untersucht werden. Die PL-Zusammensetzung in Caco-2 Zellen scheint jedenfalls nicht ausschließlich für den Einfluss auf die FS-Aufnahme verantwortlich zu sein.

7 Zusammenfassung

Die Erwärmung von pflanzlichen Ölen kann zu einem Anstieg von Lipidoxidationsprodukten führen. Der Einfluss von mit der Nahrung aufgenommenen Lipidoxidationsprodukten auf die Aufnahme von Lipiden wurde bisher kaum untersucht. Die aktuelle Studienlage zeigt, dass ein Einbau von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) in die Phospholipide (PL) von Membranen wichtig für die passive Lipidabsorption ist.

Ziel dieser Studie war es, die Auswirkungen von Lipidoxidationsprodukten auf die Zusammensetzung der PL sowie die Fettsäure (FS)-Aufnahme von Caco-2 Zellen zu untersuchen. Sonnenblumenöl (SÖ) wurde mäßig (MED) und stark erhitzt (HIGH) und anschließend charakterisiert. Humane Adenokarzinomzellen (Caco-2) wurden mit den polaren Fraktionen der oxidierten Sonnenblumenöle (SÖ, MED und HIGH) beziehungsweise mit Linolsäure (LA) als auch mit einer Reihe einzelner Oxidationsprodukte der LA (LAOOH, LAOH und HEXA) für 30 Minuten inkubiert.

Nach der Inkubation mit MED, HIGH, LA, LAOH oder HEXA ($0,1 \mu\text{M}$) konnte ein Anstieg von PC, im Vergleich zur Kontrolle bzw. der Inkubation mit SÖ, in den Caco-2 Zellen festgestellt werden. Dieser Anstieg von PC betraf sowohl PC mit PUFA als auch gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren. Die Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ LAOOH führte zu einer erhöhten, die Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ HEXA zu einer reduzierten FS-Aufnahme.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Auswirkungen des Verzehrs von Lipiden und ihren Oxidationsprodukten auf den Menschen jedenfalls differenziert betrachtet werden sollten. Die PL-Zusammensetzung scheint nicht allein für den Einfluss auf die FS-Aufnahme verantwortlich zu sein. In zukünftigen Studien sollen, die durch oxidierte Lipide hervorgerufenen Änderungen der FS-Transportmechanismen untersucht werden, um mögliche Zusammenhänge genauer bestimmen zu können.

8 Abstract

Heating vegetable oils can lead to an increase in lipid oxidation products. The influence of lipid oxidation products ingested with food on the uptake of lipids has so far scarcely been investigated. The current literature shows that the incorporation of polyunsaturated fatty acids (PUFA) into the phospholipids (PL) of membranes is important for passive lipid absorption.

The aim of this study was to investigate the effects of lipid oxidation on the composition of PL and the fatty acid (FA) uptake by human adenocarcinoma cells (Caco-2). Caco-2 cells were incubated for 30 minutes with the polar fractions of the moderately (MED) and highly (HIGH) oxidized sunflower oils (SO, MED and HIGH) or with linoleic acid (LA) as well as with several individual oxidation products of the LA (LAOOH, LAOH and HEXA).

After incubation with MED, HIGH, LA, LAOH or HEXA (0.1 µM), an increase in PC with PUFA, saturated and monounsaturated FA could be determined in Caco-2 cells, compared to the control or the incubation with SO. The incubation with 10 µM LAOOH led to an enhanced, the incubation with 1 µM HEXA to a reduced FA uptake.

In summary, the PL composition does not appear to be the solely factor influencing the FA uptake. In future studies, investigations in oxidized lipids-induced changes of the FA transport mechanisms are necessary to be able to determine possible relationships more accurately.

9 Literaturverzeichnis

1. Barden and Decker. Lipid oxidation in low-moisture food: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56**, 2467–2482 (2013).
2. Pignitter *et al.* Cold Fluorescent Light as Major Inducer of Lipid Oxidation in Soybean Oil Stored at Household Conditions for Eight Weeks. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 2297–2305 (2014).
3. Zaunschirm *et al.* Exposure of human gastric cells to oxidized lipids stimulates pathways of amino acid biosynthesis on a genomic and metabolomic level. *Molecules* **24**, (2019).
4. Armand. *Lipases and lipolysis in the human digestive tract: Where do we stand?* *Clinical Nutrition and Metabolic Care* **10**, (2007).
5. Bauer *et al.* Principles of Physiology of Lipid Digestion. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **18**, 282–295 (2005).
6. Kuksis. *Fat Absorption: Volume I.* (CRC Press, 1986).
7. Wang *et al.* Intestinal phospholipid remodeling is required for dietary-lipid uptake and survival on a high-fat diet. *Cell Metab.* **23**, 492–504 (2016).
8. Fruehwirth *et al.* In vitro digestion of grape seed oil inhibits phospholipid-regulating effects of oxidized lipids. *Biomolecules* **10**, (2020).
9. FAO/WHO. *Codex Alimentarius. Standard for named vegetable oils.* CXS 210-1999. Adopted in 1999. Revised in 2001, 2003, 2009, 2017, 2019. Amended in 2005, 2011, 2013, 2015, 2019. **4**, (1999).
10. Barden and Decker. Lipid oxidation in low-moisture food: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56**, 2467–2482 (2013).
11. Gaschler and Stockwell. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **482**, 419–425 (2017).
12. Zielinski and Pratt. Lipid Peroxidation: Kinetics, Mechanisms, and Products. *J. Org. Chem.* **82**, 2817–2825 (2017).
13. Niki *et al.* Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 668–676 (2005).
14. Lee *et al.* Different patterns of oxidized lipid products in plasma and urine of dengue fever, stroke, and parkinson's disease patients: Cautions in the use of biomarkers of oxidative stress. *Antioxidants Redox Signal.* **11**, 407–420 (2009).

15. Choe and Min. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **5**, 169–186 (2006).
16. Chaiyasit *et al.* Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **47**, 299–317 (2007).
17. Kamal-Eldin and Appelqvist. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* **31**, 671–701 (1996).
18. Wilczek *et al.* Trans-Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Urgent Need for Legislation. *Cardiol.* **138**, 254–258 (2017).
19. Michels *et al.* Dietary trans-fatty acid intake in relation to cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Nutr. Rev.* **0**, 1–19 (2020).
20. Wolfram *et al.* Evidenzbasierte Leitlinie: Fettzufuhr und Prävention ausgewählter ernährungsmittelbedingter Krankheiten. *DGE* **2**, 135–162 (2015).
21. Frankel. Lipid oxidation: Mechanisms, products and biological significance. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61**, 1908–1917 (1984).
22. Velasco and Dobarganes. Oxidative stability of virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **104**, 661–676 (2002).
23. Velasco *et al.* Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry. *Food Chem.* **85**, 623–632 (2004).
24. Pignitter and Somoza. Critical Evaluation of Methods for the Measurement of Oxidative Rancidity in Vegetable Oils. *J. Food Drug Anal.* **20**, 772–777 (2012).
25. Fiebig and Godelmann. Bestimmung der Peroxidzahl (Methode nach Wheeler) - Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen: Analyse von Fetten XXXVII. *Lipid / Fett* **99**, 194–196 (1997).
26. Guillen and Cabo. Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food Chem.* **77**, 503–510 (2002).
27. Schaich. Challenges in Elucidating Lipid Oxidation Mechanisms. When, Where, and how Do products arise? *J. Chem. Inf. Model.* **53**, 1689–1699 (2013).
28. Hofmann and Borgstroem. The Intraluminal Phase of Fat Digestion in Man: the Lipid Content of the Micellar and Oil Phases of Intestinal Content Obtained During

- Fat Digestion and Absorption. *J. Clin. Invest.* **43**, 247–257 (1964).
- 29. Armand *et al.* Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach. *Am J Physiol.* **266**, G372-81 (1994).
 - 30. Abrams *et al.* Gastric Lipase: Localization in the Human Stomach. *Gastroenterology* **95**, 1460–1464 (1988).
 - 31. DiPalma *et al.* Lipase and pepsin activity in the gastric mucosa of infants, children, and adults. *Gastroenterology* **101**, 116–121 (1991).
 - 32. Moreau *et al.* Human preduodenal lipase is entirely of gastric fundic origin. *Gastroenterology* **95**, 1221–1226 (1988).
 - 33. Carriere *et al.* Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology* **105**, 876–888 (1993).
 - 34. N’Goma *et al.* Understanding the lipid-digestion processes in the GI tract before designing lipid-based drug-delivery systems. *Ther. Deliv.* **3**, 105–124 (2012).
 - 35. Winkler *et al.* Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343**, 771–774 (1990).
 - 36. Boyer. Bile formation and secretion. *Compr. Physiol.* **3**, 1035–1078 (2013).
 - 37. Ticho *et al.* Intestinal absorption of bile acids in health and disease. *Compr. Physiol.* **10**, 21–56 (2020).
 - 38. Clark *et al.* Fat absorption in essential fatty acid deficiency: a model experimental approach to studies of the mechanism of fat malabsorption of unknown etiology. *J. Lipid Res.* **14**, 581–588 (1973).
 - 39. Werner *et al.* Fat malabsorption in essential fatty acid-deficient mice is not due to impaired bile formation. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **283**, 900–908 (2002).
 - 40. Barnes *et al.* Fat Absorption in Essential Fatty Acid Deficiency. *J. Biol. Chem.* **140**, 773–778 (1941).
 - 41. Levy *et al.* Intraluminal and intracellular phases of fat absorption are impaired in essential fatty acid deficiency. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **262**, (1992).
 - 42. Minich *et al.* Intestinal absorption of essential fatty acids under physiological and essential fatty acid-deficient conditions. *J. Lipid Res.* **38**, 1709–1721 (1997).
 - 43. Frey *et al.* Lipid- and Cholesterol-Mediated Time-Scale-Specific Modulation of the Outer Membrane Protein X Dynamics in Lipid Bilayers. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 15402–15411 (2018).

44. Fahy *et al.* A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **46**, 839–861 (2005).
45. Cui and Decker. Phospholipids in foods: Prooxidants or antioxidants? *J. Sci. Food Agric.* **96**, 18–31 (2016).
46. Henna Lu *et al.* Oxidative stability of marine phospholipids in the liposomal form and their applications. *Lipids* **46**, 3–23 (2011).
47. Dannenberger *et al.* Diet alters the fatty acid composition of individual phospholipid classes in beef muscle. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 452–460 (2007).
48. Pan and Storlien. Dietary lipid profile is a determinant of tissue phospholipid fatty acid composition and rate of weight gain in rats. *J. Nutr.* **123**, 512–519 (1993).
49. Bell *et al.* Dietary lipid affects phospholipid fatty acid compositions, eicosanoid production and immune function in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **54**, 173–182 (1996).
50. Dias *et al.* Modulation of cellular phospholipid fatty acids and leukotriene B4 synthesis in the human intestinal cell (CaCo-2). *Gut* **33**, 622–627 (1992).
51. Bénédicte *et al.* Eicosapentaenoic acid and 3,10 dithia stearic acid inhibit the desaturation of trans -vaccenic acid into cis -9, trans -11-conjugated linoleic acid through different pathways in Caco-2 and T84 cells . *Br. J. Nutr.* **95**, 688–695 (2006).
52. Schneider *et al.* Conversion of t11t13 CLA into C9t11 CLA in Caco-2 cells and inhibition by sterculic oil. *PLoS One* **7**, (2012).
53. Van Nieuwenhuyzen and Tomás. Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **110**, 472–486 (2008).
54. Hidalgo *et al.* Antioxidative activity of amino phospholipids and phospholipid/amino acid mixtures in edible oils as determined by the rancimat method. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 5461–5467 (2006).
55. Cui *et al.* Impact of phosphatidylethanolamine on the antioxidant activity of α-tocopherol and trolox in bulk oil. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 3288–3294 (2015).
56. Koga and Terao. Phospholipids Increase Radical-Scavenging Activity of Vitamin E in a Bulk Oil Model System. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1450–1454 (1995).
57. Min and Ahn. Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products - A review. *Food Science and Biotechnology* **14**, 152–163 (2005).
58. Yoon and Min. Roles of Phospholipids in Flavor Stability of Soybean Oil. *Korean*

- J. Food Sci. Technol.* **19**, 20–25 (1987).
- 59. Cardenia *et al.* Antioxidant and prooxidant activity behavior of phospholipids in stripped soybean oil-in-water emulsions. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* **88**, 1409–1416 (2011).
 - 60. Taniguchi *et al.* Essential Role of Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 3 in the Induction of Macrophage Polarization in PMA-Treated U937 Cells. *J. Cell. Biochem.* **116**, 2840–2848 (2015).
 - 61. Staprans *et al.* Oxidized lipids in the diet are a source of oxidized lipid in chylomicrons of human serum. *Arterioscler. Thromb.* **14**, 1900–1905 (1994).
 - 62. Dasilva *et al.* Relative levels of dietary EPA and DHA impact gastric oxidation and essential fatty acid uptake. *J Nutr Biochem.* **55**, 68–75 (2018).
 - 63. Caspary. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *Am J Clin Nutr.* **55**, 299S–308S (1992).
 - 64. Siddiqi *et al.* Intestinal caveolin-1 is important for dietary fatty acid absorption. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1831**, 1311–1321 (2013).
 - 65. Tso *et al.* Enterocyte fatty acid uptake and intestinal fatty acid-binding protein. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 75–78 (2004).
 - 66. Stahl *et al.* Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Mol. Cell* **4**, 299–308 (1999).
 - 67. Chen *et al.* Gut expression and regulation of FAT/CD36: Possible role in fatty acid transport in rat enterocytes. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **281**, 916–923 (2001).
 - 68. Mishkin *et al.* The binding of fatty acids to cytoplasmic proteins: Binding to z protein in liver and other tissues of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, (1972).
 - 69. Ockner and Manning. Fatty acid binding protein in small intestine. Identification, isolation, and evidence for its role in cellular fatty acid transport. *J. Clin. Invest.* **54**, 326–338 (1974).
 - 70. Ho and Storch. Common mechanisms of monoacylglycerol and fatty acid uptake by human intestinal Caco-2 cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **281**, 1106–1117 (2001).
 - 71. Murota and Storch. Uptake of micellar long-chain fatty acid and sn-2-monoacylglycerol into human intestinal Caco-2 cells exhibits characteristics of

- protein-mediated transport. *J. Nutr.* **135**, 1626–1630 (2005).
- 72. Storch and Corsico. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu. Rev. Nutr.* **28**, 73–95 (2008).
 - 73. Storch and Gajda. Enterocyte Fatty Acid Binding Proteins (FABPs): Different Functions of Liver- and Intestinal- FABPs in the Intestine. *Prostaglandins Leukot Essent Fat. Acids.* **83**, 255–262 (2015).
 - 74. Guilmeau *et al.* Decreased expression of Intestinal I- and L-FABP levels in rare human genetic lipid malabsorption syndromes. *Histochem. Cell Biol.* **128**, 115–123 (2007).
 - 75. Trotter *et al.* Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells. *J. Lipid Res.* **37**, 336–346 (1996).
 - 76. Chow and Hollander. Linoleic acid absorption in the unaesthetized rat: Mechanism of transport and influence of luminal factors on absorption. *Lipids* **14**, 378–385 (1979).
 - 77. Ling *et al.* Mechanisms of linoleic acid uptake by rabbit small intestinal brush border membrane vesicles. *Lipids* **24**, 51–55 (1989).
 - 78. Márquez-Ruiz *et al.* Rapid, quantitative determination of polar compounds in fats and oils by solid-phase extraction and size-exclusion chromatography using monostearin as internal standard. *J. Chromatogr. A* **749**, 55–60 (1996).
 - 79. Lall *et al.* A rapid, micro FAME preparation method for vegetable oil fatty acid analysis by gas chromatography. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* **86**, 309–314 (2009).
 - 80. Azlan *et al.* Comparison of fatty acids, vitamin E and physicochemical properties of Canarium odontophyllum Miq. (dabai), olive and palm oils. *J. Food Compos. Anal.* **23**, 772–776 (2010).
 - 81. Aparicio and Aparicio-Ruiz. Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *J. Chromatogr. A* **881**, 93–104 (2000).
 - 82. Stevens and Sellers. Rt-2560 Columns Ensure Accurate, Reliable AOAC 996.06 and AOCS Ce 1j-07 FAMEs Analysis. (2017). Available at: www.restek.com. (Accessed: 6th April 2021)
 - 83. Wheeler. Peroxide formation as a measure of autoxidative deterioration. *Oil Soap* **9**, 89–97 (1932).
 - 84. Matissek *et al.* *Lebensmittelanalytik*. Springer-Verlag (2009).

85. Grüneis *et al.* Simultaneous Analysis of Epoxidized and Hydroperoxidized Triacylglycerols in Canola Oil and Margarine by LC-MS. *J. Agric. Food Chem.* **67**, 10174–10184 (2019).
86. Liu *et al.* Optimization of a single phase method for lipid extraction from milk. *J. Chromatogr. A* **1458**, 145–149 (2016).
87. Shrivastava and Gupta. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles Young Sci.* **2**, 21 (2011).
88. Giuffrida *et al.* Accurate determination of hexanal in beef bouillons by headspace solid-phase microextraction gas-chromatography mass-spectrometry. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **107**, 792–798 (2005).
89. Kolb *et al.* Ermittlung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 mit Hilfe eines Programms. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **21**, 308–311 (1993).
90. Grasset *et al.* Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: Effect of secretagogues. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **17**, (1985).
91. Hidalgo *et al.* Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability. *Gastroenterology* **96**, 736–749 (1989).
92. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
93. Molecular Devices. Technologie des QBT Fatty Acid Uptake Assay Kit. Assay-Prinzip. Available at: <https://de.moleculardevices.com/products/assay-kits/transporters/qbt-fatty-acid-uptake#Technology>. (Accessed: 6th April 2021)
94. Batchelor *et al.* Bringing Primary Cell Relevance to Screening: Clonetics Conditionally Immortalized Cells and QBT Fatty Acid Uptake Assay for High Throughput Screening. Available at: <https://www.moleculardevices.com/sites/default/files/en/assets/scientific-posters/reagents/bringing-primary-cell-relevance-to-screening-clonetics-conditionally-immortalized-cells-and-qbt-fatty-acid.pdf>. (Accessed: 6th April 2021)
95. Lieder *et al.* Biological evaluation of natural and synthesized homovanillic acid esters as inhibitors of intestinal fatty acid uptake in differentiated Caco-2 cells. *Molecules* **24**, (2019).
96. Liszt *et al.* Identification of Catechin, Syringic Acid, and Procyanidin B2 in Wine

- as Stimulants of Gastric Acid Secretion. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 7775–7783 (2015).
97. Fernández-Martínez *et al.* Breeding for specialty oil types in sunflower. *Helia* **30**, 75–84 (2007).
98. Barriuso *et al.* A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. *Eur Food Res Technol* **236**, 1–15 (2013).
99. Shahidi. *Headspace Volatile Aldehydes as Indicators of Lipid Oxidation in Foods. Headspace Analysis of Food and Flavors: Theory and Practice* (Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001).
100. Abbott *et al.* Membrane fatty acid composition of rat skeletal muscle is most responsive to the balance of dietary n-3 and n-6 PUFA. *Br. J. Nutr.* **103**, 522–529 (2010).
101. Abbott *et al.* Fatty acid composition of membrane bilayers: Importance of diet polyunsaturated fat balance. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818**, 1309–1317 (2012).
102. Shahidi and Zhong. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 4067–4079 (2010).

10 Anhang

10.1 Bestimmung der Peroxidzahl der Ölproben mittels Titrimetrie

(erhitzte) Ölprobe	MW ± SA [meq O ₂ /kg Öl]	RSA [%]
SÖ	13,0 ± 1,75	13,5
MED	17,4 ± 2,80	16,1
HIGH	24,2 ± 3,01	12,4

10.2 Messung von oxidierten Triglyceriden mittels LC-MS

oxTAG 54:4 [OOH]	MW ± SA [μM]	RSA [%]
SÖ	0,448 ± 0,0936	20,9
MED	0,316 ± 0,0437	13,8
HIGH	0,416 ± 0,112	26,9

oxTAG 54:5 [OOH]	MW ± SA [μM]	RSA [%]
SÖ	0,839 ± 0,0277	3,3
MED	0,682 ± 0,0972	14,3
HIGH	0,877 ± 0,269	30,7

oxTAG 54:1 [O]	MW ± SA [µM]	RSA [%]	
SÖ	0,162 ± 0,0207	12,8	
MED	0,170 ± 0,0171	10,1	
HIGH	0,241 ± 0,0367	15,2	
oxTAG 54:2 [O]	MW ± SA [µM]	RSA [%]	
SÖ	0,738 ± 0,0227	3,1	
MED	0,762 ± 0,0908	11,9	
HIGH	0,822 ± 0,127	15,5	
oxTAG 54:3 [O]	MW ± SA [µM]	RSA [%]	
SÖ	1,217 ± 0,00762	0,6	
MED	1,257 ± 0,0657	5,2	
HIGH	1,064 ± 0,0978	9,2	
oxTAG 54:4 [O]	Median [µM]	25%	75 %
SÖ	0,809	0,809	0,809
MED	0,834	0,831	0,838
HIGH	0,810	0,810	0,811

10.3 Quantifizierung von Hexanal in den Ölproben mittels HS-GC/MS

(erhitzte) Ölprobe	MW \pm SA [μM]	RSA [%]
SÖ	$3,318 \pm 0,209$	6,3
MED	$7,173 \pm 0,0614$	0,9
HIGH	$15,569 \pm 0,823$	5,3

Isotopenverdünnungsreihe für die Hexanal-Bestimmung

d ₁₂ -Hexanal/Hexanal	Konzentrationsverhältnis [µg/mL]	d ₁₂ -Hexanal/Hexanal	Konzentrationsverhältnis [µg/mL]
5		3,276	
2		1,305	
1		0,583	
0,5		0,301	
0,2		0,117	
0,1		0,058	

10.4 MTT-Test auf Zellviabilität

Relative Zellviabilität von Caco-2 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Testsubstanzen.

Gruppe	MW ± SA [%]	RSA [%]
Kontrolle	100,0 ± 11,7	11,7
SÖ	101,028 ± 10,2	10,2
MED	103,0 ± 5,0	4,8
HIGH	101,8 ± 6,4	6,3
LA [0,1µM]	97,7 ± 5,6	5,8
LA [1µM]	98,8 ± 6,3	6,4
LA [10µM]	97,5 ± 8,3	8,5
LAOH [0,1µM]	99,6 ± 5,2	5,2
LAOH [1µM]	97,9 ± 6,0	6,2
LAOH [10µM]	102,9 ± 6,3	6,1
LAOOH [0,1µM]	98,6 ± 5,9	5,9
LAOOH [1µM]	93,9 ± 4,0	4,3
LAOOH [10µM]	103,8 ± 7,1	6,9
HEXA [0,1µM]	97,6 ± 5,3	5,4
HEXA [1µM]	94,3 ± 3,3	3,5
HEXA [10µM]	95,7 ± 7,8	8,2

10.5 Einfluss von Lipidoxidationsprodukten auf die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen

(erhitzte) Ölprobe	MW ± SA [%]	RSA [%]	
Kontrolle	100,0 ± 10,0	10,0	
SÖ	81,4 ± 2,1	2,6	
MED	96,8 ± 11,2	11,6	
HIGH	89,3 ± 6,7	7,5	
Linolsäure (LA)	MW ± SA [%]	RSA [%]	
Kontrolle	100,0 ± 10,0	10,0	
LA [0,1 µM]	87,0 ± 13,3	15,3	
LA [1 µM]	84,7 ± 9,9	11,7	
LA [10 µM]	88,1 ± 6,9	7,8	
Linolsäurehydroxid (LAOH)	Median [%]	25 %	75 %
Kontrolle	100,0	69,6	80,6
LAOH [0,1 µM]	74,3	75,4	82,6
LAOH [1 µM]	80,3	112,8	148,0
LAOH [10 µM]	142,3	90,4	109,6

Linolsäurehydroperoxid (LAOOH)	MW ± SA [%]	RSA [%]
Kontrolle	100,0 ± 10,0	10,0
LAOOH [0,1 µM]	91,9 ± 12,9	14,0
LAOOH [1 µM]	75,1 ± 3,8	5,0
LAOOH [10 µM]	168,8 ± 20,1	11,9

Hexanal (HEXA)	MW ± SA [%]	RSA [%]
Kontrolle	100,0 ± 10,0	10,0
HEXA [0,1 µM]	86,4 ± 6,3	7,3
HEXA [1 µM]	79,9 ± 5,4	6,7
HEXA [10 µM]	90,5 ± 5,6	6,2
