

Einfluß von α - und γ -Tocopherol sowie Cholesterin auf die Lipidperoxidation

C. Landvogt und I. Elmadfa

Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität,
Gießen

Zusammenfassung: In einer 15wöchigen Ernährungsstudie an Ratten wurde der Einfluß äquimolarer Mengen an α - und γ -Tocopherol (180 bzw. 174 ppm) sowie Mischungen aus α - und γ -Tocopherol (3:1; 1:1; 1:3) ohne und mit Cholesterinbelastung (1 % Cholesterin im Futter) auf die Lipidperoxidation in der Leber und die Lebertocopherolretention untersucht. Zur weiteren Beurteilung des Tocopherolstatus wurden die Aktivitäten der Kreatin-Kinase und der Transaminasen (GOT, GPT) im Plasma sowie die Hämolyseneigung der Erythrozyten bestimmt.

Lediglich das α -Tocopherol und die Mischungen aus α - und γ -Tocopherol waren in der Lage, die Hämolyse der Erythrozyten zu senken. Bezuglich der Lipidperoxidation in der Leber erwies sich das α -Tocopherol als das wirksamere Antioxidans; demgegenüber zeigte das γ -Tocopherol im Futter die höhere Effizienz.

Vom Cholesterin ging sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine hemmende Wirkung auf die Lipidperoxidation aus; darüber hinaus hatte das Cholesterin in Kombination mit α -Tocopherol einen stabilisierenden Effekt auf die Erythrozytenmembran. Außerdem wurde die Tocopherolspeicherung in der Leber durch Cholesterin begünstigt.

Die biologische Wirksamkeit des γ -Tocopherol in Relation zum α -Tocopherol wurde berechnet; sie lag in Abhängigkeit vom jeweiligen Beurteilungskriterium zwischen 22 und 100 %.

Summary: For a period of 15 weeks growing rats were fed low fat diets containing equimolar doses of α - and γ -tocopherol (180 and 174 ppm) as well as mixtures of α - and γ -tocopherol (3:1; 1:1; 1:3) without cholesterol or with 1 % cholesterol. The influence of these supplements on lipid peroxidation and tocopherol retention in the liver were investigated.

The tocopherol status was estimated by measuring the activities of creatine kinase and transaminases (GOT, GPT) in plasma as well as by *in vitro* hemolysis of erythrocytes.

The *in vitro* hemolysis rate was only lowered by α -tocopherol and the mixtures of α - and γ -tocopherol. In response to lipid peroxidation in the liver, α -tocopherol was the more efficient antioxidant, whereas γ -tocopherol was more efficient in the diet.

Cholesterol had a lowering effect on lipid peroxidation *in vitro* and *in vivo*; cholesterol in combination with α -tocopherol had a stabilizing effect on the erythrocyte membrane. Moreover, there was a positive effect of cholesterol on tocopherol retention in the liver.

The biological activity of γ -tocopherol in relation to α -tocopherol was calculated according to the test criterium; it ranged from 22 to 100 %.

Schlüsselwörter: Tocopherole, Lipidperoxidation, Vitamin-E-Status, Ratte

Einleitung

In neueren Untersuchungen wurde für das γ -Tocopherol eine höhere biologische Wirksamkeit in Relation zum α -Tocopherol gefunden, die von der bislang gültigen Berechnungsgrundlage abweicht^(1,2). Bislang geht man von einer biologischen Wirksamkeit des γ -Tocopherols von 13% in Relation zum α -Tocopherol aus; ermittelt wurde dieser Wert im Antisterilitätstest und Hämolysetest an Ratten.

Im Rahmen unserer Untersuchungen sollte anhand ausgewählter Untersuchungsparameter überprüft werden, ob γ -Tocopherol in der Lage ist, das α -Tocopherol in seinen Funktionen im Organismus zu ersetzen.

Es wurde außerdem überprüft, ob organabhängige Unterschiede hinsichtlich der relativen Wirksamkeit der beiden Tocopherole bestehen.

Darüber hinaus sollte im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen die Wirkung von Cholesterin auf die Tocopherolverfügbarkeit und auf die von uns untersuchten Parameter getestet werden.

Versuchsaufbau

Die Untersuchungen wurden an entwöhnten männlichen Wistar-Ratten mit einem durchschnittlichen Anfangsgewicht von $80,4 \pm 7,8$ g durchgeführt.

Die Versuchsdauer betrug 15 Wochen. Die Tiere wurden mit einer semisynthetischen Kost ad libitum ernährt. Die Zusammensetzung der Kost ist der Tabelle 1 zu entnehmen.

Als Fettkomponente wurde ein Triglyceridgemisch verwendet, das aus Maiskeimöl hergestellt wurde und durch Molekulardestillation weitgehend von den unverseifbaren Komponenten befreit wurde.

Das Fettsäremuster entspricht demnach weitgehend dem Fettsäremuster des Maiskeimöles und enthält etwa 60% Polyenfettsäuren (P/S-Quotient = 4,13).

Nach der Eingewöhnungsphase wurden die Tiere in zwei Kollektive unterteilt, wobei das eine Kollektiv cholesterinfreies (Gruppen 0 bis V) und das andere cholesterinreiches Grundfutter (1 g Cholesterin/100 g; Gruppen 0_c bis V_c) erhielten. Die Gruppen innerhalb der Kollektive unterschie-

Tab. 1. Futterzusammensetzung

Bestandteile	g/100 g Futter	Anteil an der Energieaufnahme (%) ²⁾
Protein (Casein)	20	21
Kohlenhydrate (Maisstärke)	64	65
Fett	6	14
Ballaststoffe (Cellulose)	4	0
Vitaminmischung (Vit.-E-frei)	1	0
Mineralstoffmischung	5	0
Cholesterin	1	0

¹⁾ Der Cholesterinzusatz erfolgte im Austausch gegen 1 Gewichtsprozent Maisstärke

²⁾ Energiegehalt: 1664 kJ/100 g Futter

Tab. 2. Gruppeneinteilung

Tocopherolzusatz	Konzentration im Futter		Gruppenbezeichnung	
	1.-10. Wo.	11.-15. Wo.	chol.-frei	1 % Chol.
kein Zusatz	Spuren		0	0 _c
d ₁ - α -Tocopherol	60 ppm	180 ppm	I	I _c
d ₁ - γ -Tocopherol	58 ppm	174 ppm	II	II _c
d ₁ - α + d ₁ - γ -Toc.	46/15 ppm	138/45 ppm	III	III _c
d ₁ - α + d ₁ - γ -Toc.	31/29 ppm	92/88 ppm	IV	IV _c
d ₁ - α + d ₁ - γ -Toc.	15/44 ppm	45/132 ppm	V	V _c

den sich lediglich in der Zusammensetzung des Tocopherolzusatzes. Die Höhe des Tocopherolzusatzes betrug 60 ppm d₁- α -Tocopherol; der Austausch von d₁- α - (Grp. I und I_c) gegen d₁- γ -Tocopherol (Grp. II und II_c) erfolgte hierbei in äquimolaren Mengen. In den Gruppen III, IV und V bzw. III_c, IV_c und V_c erfolgte der Tocopherolzusatz in Form von Mischungen an d₁- α - und d₁- γ -Tocopherol im Verhältnis 3:1, 1:1 und 1:3. Die Darstellung der Gruppeneinteilung ist in Tab. 2 aufgeführt.

Eine Überprüfung des Tocopherolstatus nach der 10. Woche anhand des Parameters Hämolysetest mit Dialursäure ergab für die Gruppe I (60 ppm d₁- α -Tocopherol) eine unzureichende Tocopherolversorgung. Die zugeführte Tocopherolmenge wurde daher auf das Dreifache der ursprünglichen Tocopherolsupplementation aufgestockt.

Untersuchungsparameter und Methoden

Eine Parameterübersicht gibt die Tabelle 3. Die Literaturzitate beziehen sich auf die angegebenen Methoden. Die statistische Auswertung des Datenmaterials erfolgt mit der einfaktoriellen Varianzanalyse und dem Anschlußtest nach Scheffé sowie dem t-Test.

Ergebnisse und Diskussion

Futterperoxyde

In Abbildung 1 ist die Entwicklung der Futterperoxyde bei einer Lagerungstemperatur von -18°C dargestellt. Das γ -Tocopherol erwies sich hier zu allen Untersuchungszeitpunkten als das effizientere Antioxidans. Demgegenüber lagen die Peroxidgehalte des Futters mit α -Tocopherolzusatz

Tab. 3. Parameterübersicht.

- Peroxide im Futter (3)
- in vitro Hämolyseneigung der Erythrozyten (4)
- Aktivität der Kreatin-Kinase (E.C.2.7.3.2.) im Plasma (5)
- Aktivitäten der GOT (E.C.2.6.1.1) und der GPT (E.C.2.6.1.2) im Plasma (6,7)
- Tocopherolgehalt der Leber (8,9)
- Peroxidgehalt der Leber [die Originalmethode (10) wurde modifiziert nach (11)]

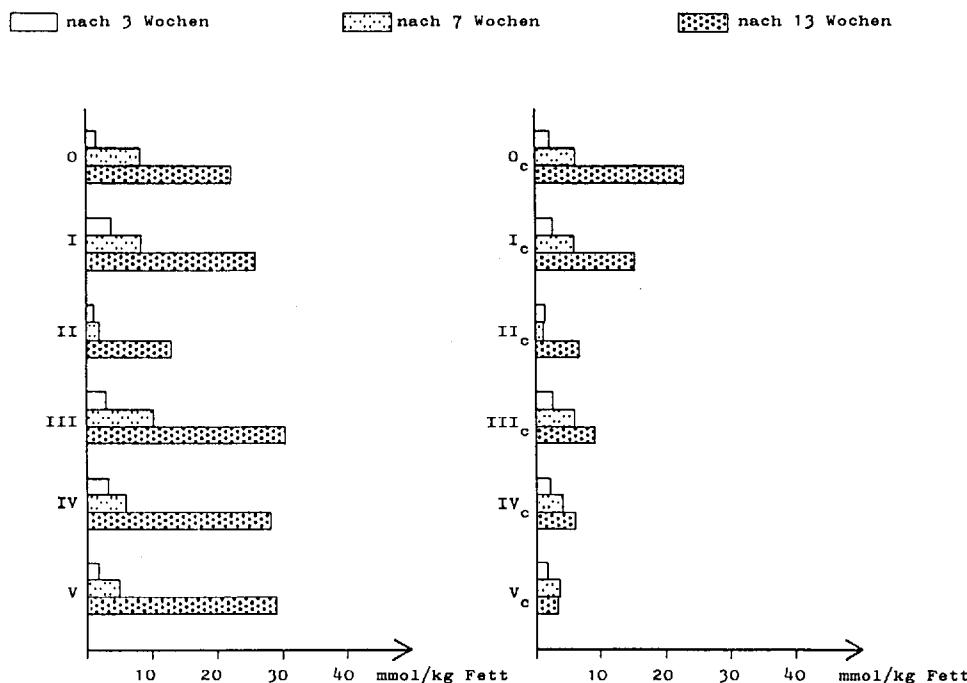


Abb. 1. Einfluß von Tocopherolen und Cholesterin auf die Bildung von Lipidperoxyden in den einzelnen Versuchsdäten; Lagerung bei -18°C für 13 Wochen (mmol Peroxide/kg extrahierbares Fett; 6 g Fett/100 g Futter); Mittelwert aus zwei Parallelbestimmungen.

etwa ebenso hoch wie beim tocopherolfreien Futter. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß vom α -Tocopherol, im Vergleich zur 0-Gruppe, in der von uns zugesetzten Menge kein Schutzeffekt vor Oxidation ausging.

Bestätigt werden die Ergebnisse auch durch eine Langzeitstudie von Schäfer und Elmada (12). Auch dort war das γ -Tocopherol dem α -Tocopherol bei äquimolarer Dosierung und einer Lagerungstemperatur von -20°C überlegen.

Bei den Mischgruppen III bis V lagen die Peroxidwerte ebenso hoch wie bei der α -Tocopherolgruppe; hier machte sich wahrscheinlich der prooxidative Effekt des α -Tocopherols bemerkbar.

Beachtenswert ist außerdem die Wirkung des Cholesterinzusatzes im Futter (I_c – V_c) auf die Entwicklung der Peroxide im Futter. Nach sieben Lagerungswochen lagen die Peroxidwerte der cholesterinhaltigen Futterproben tendenziell niedriger als bei den cholesterinfreien Futterproben; dieser Effekt verstärkte sich mit zunehmender Lagerungsdauer. Am ausgeprägtesten war der Effekt bei den Mischgruppen; demgegenüber hatte das Cholesterin bei dem Tocopherolmangelfutter (0_c) keine Wirkung auf die Peroxidbildung.

Das Cholesterin weist aufgrund seiner Molekülstruktur keine antioxidativen Eigenschaften auf; daher beruht die stabilisierende Funktion auf

einem rein physikalischen Effekt. Wahrscheinlich hat das Cholesterin einen Verdünnungseffekt auf die oxidationsempfindlichen Lipide, so daß es zu einer Verlangsamung der Lipidperoxidation kommt.

In Abbildung 2 sind die Ergebnisse der Futterperoxide bei einwöchiger Lagerung und einer Lagerungstemperatur von +25 °C dargestellt. Bei den cholesterinfreien Futterproben bestanden keine Unterschiede zwischen dem Zusatz an α - und γ -Tocopherol im Futter. Dies schließt jedoch nicht aus, daß das γ -Tocopherol in der Induktionsphase wirksamer war. Das Cholesterin hatte bei allen Futterproben einen senkenden Effekt auf die Lipidperoxidation.

Zu den Lipidperoxidwerten läßt sich zusammenfassend feststellen, daß das γ -Tocopherol bei niedriger Lagerungstemperatur das effizientere Antioxidans war.

Bestätigt werden diese Ergebnisse von Chow und Draper (13) und Mead (14); andererseits fanden Kaufmann et al. (15) und Kunkel (16), daß γ -Tocopherol das wirksamere Antioxidans ist. Eine Erklärung für die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse liegt sicherlich in den unterschiedlichen Untersuchungsbedingungen begründet. So ist bekannt, daß die relative Wirksamkeit der Tocopherole zum einen von der Konzentration der Antioxidantien und zum anderen von der Temperatur abhängt (17, 18).

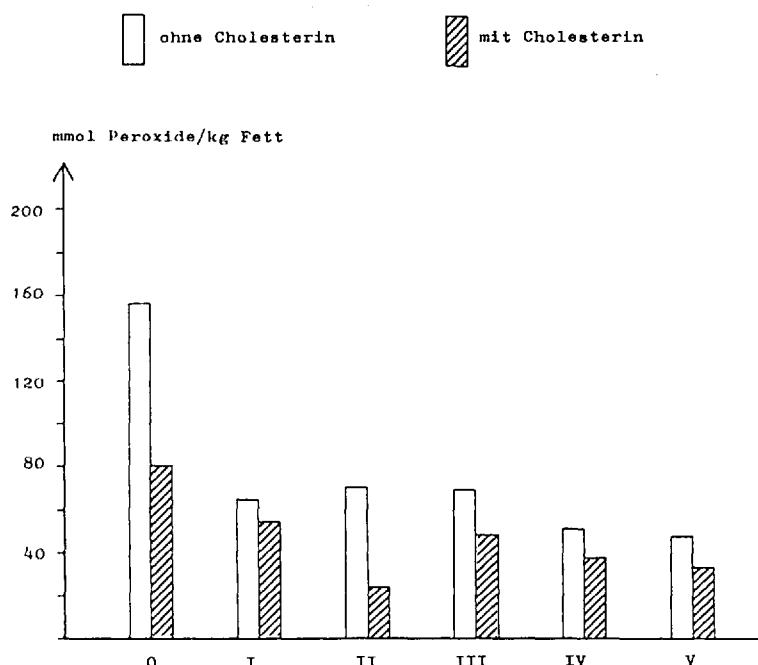


Abb. 2. Einfluß von Tocopherolen und Cholesterin auf die Bildung von Lipidperoxiden in den einzelnen Versuchsdiäten; einwöchige Lagerung bei +25 °C (mmol Peroxide/kg extrahierbares Fett; 6 g Fett/100 g Futter); Mittelwert aus zwei Parallelbestimmungen.

Hämolyseneigung der Erythrozyten

Die Hämolyseneigung der Erythrozyten gilt als aussagefähiges Kriterium zur Beurteilung des Tocopherolversorgungszustandes (19, 20).

In Abbildung 3 sind die Ergebnisse nach 2, 10 und 14 Wochen dargestellt. Dabei wiesen die nicht mit Tocopherol supplementierten Gruppen (0, 0_c) erwartungsgemäß die höchsten Hämolyseraten auf. Die von uns zugesetzte Menge an α -Tocopherol in Höhe von 60 ppm war nach 10

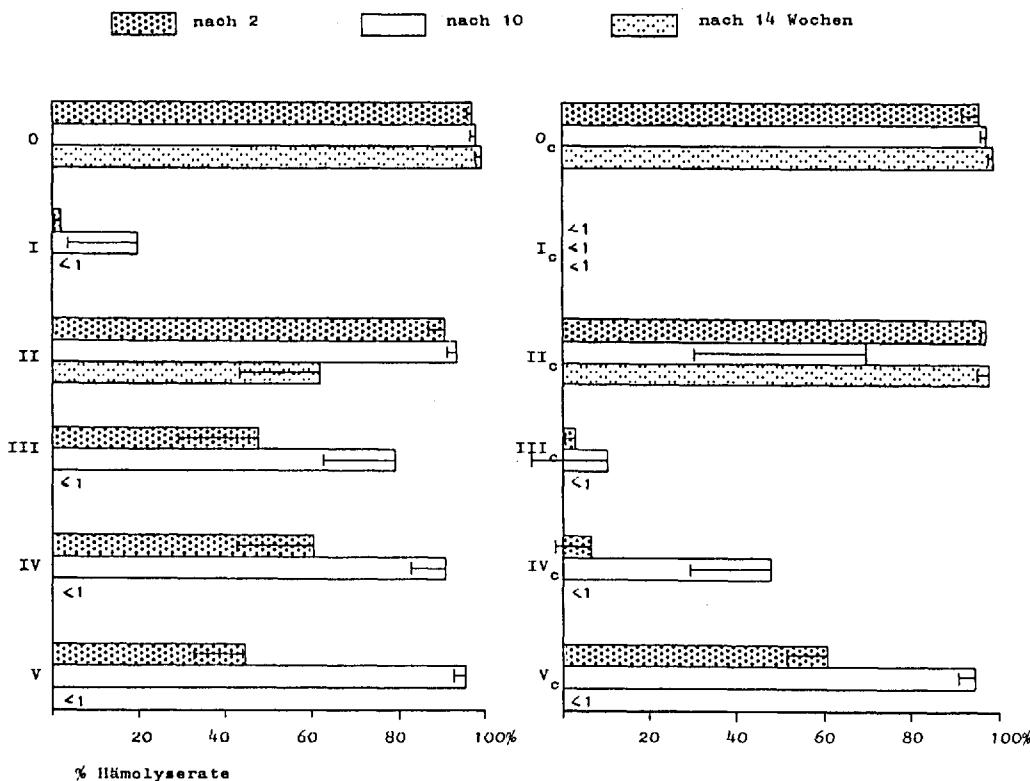


Abb. 3. Einfluß von d1- α - und d1- γ -Tocopherol sowie Mischungen der beiden Komponenten auf die Hämolyserate der Erythrozyten in vitro (%); ermittelt nach 2, 10 und 14 Wochen; $n = 9$; $x \pm s$.

Signifikanzen nach 2 Versuchswochen ($p < 0,05$)

-zwischen den Gruppen ohne Cholesterin: 0/I, II, III, IV, V; I, II/III, IV, V; I/II; mit Cholesterin: 0_c/I_c; 0_c/II_c/III_c; IV_c; I_c/II_c/III_c, IV_c; V_c/0_c, I_c, II_c, III_c, IV_c

-zwischen den Gruppen mit und ohne Cholesterinzusatz: II/II_c; III/III_c; IV/IV_c

Signifikanzen nach 10 Versuchswochen ($p < 0,05$)

-zwischen den Gruppen ohne Cholesterin: 0/II, III, IV; I/0, II, III, IV, V; mit Cholesterin: 0_c/III_c, IV_c, I_c/*_c, II_c, IV_c, V_c; V_c/III_c, IV_c

-zwischen den Gruppen mit und ohne Cholesterinzusatz: I_c; III/III_c; IV/IV_c

Signifikanzen nach 14 Versuchswochen ($p < 0,05$)

-zwischen den Gruppen ohne Cholesterin: 0/I, II, III, IV, V; II/I, IV, V; mit Cholesterin: 0_c, II_c, I_c, III_c, IV_c

-zwischen den Gruppen mit und ohne Cholesterinzusatz: II/II_c

Wochen nicht mehr ausreichend, um einen ausreichenden Schutz der Erythrozyten zu gewährleisten; die Hämolyserate lag bei etwa 20 %. Bestätigt werden diese Ergebnisse auch durch die Arbeit von Koop (8); dort zeigte die Triglyceridgruppe mit 60 ppm α -Tocopherol in der Diät schon nach 7 Wochen eine Hämolyserate von 20 %.

Die Aufstockung der Tocopheroldosis auf das Dreifache der ursprünglichen Konzentration ergab schon nach zwei Wochen eine meßbare Verbesserung der Hämolseneigung. Bei allen Gruppen, die α -Tocopherol erhielten, lag die Hämolyserate unter 1 %.

Beachtenswert ist vor allem die Gruppe V; hier wird deutlich, daß schon der Austausch geringer Mengen an γ -Tocopherol durch α -Tocopherol einen signifikant positiven Einfluß auf die Hämolyserate hat.

In den Gruppen, die als alleinige Tocopherolquelle das γ -Tocopherol erhielten (Grp. II und II_c), konnte über die gesamte Versuchsdauer, auch nach der Aufstockung, kein ausreichender Schutz vor Hämolyse gewährleistet werden. Auch Aftergood und Alfin-Slater (21) konnten zeigen, daß die Schutzwirkung des γ -Tocopherols entscheidend von der Höhe der Tocopherolsupplementation abhängt.

Als Erklärung für die geringere biologische Wirksamkeit des γ -Tocopherols in der Erythrozytenmembran kommt entweder die schnellere Elimination aus dem Blutkreislauf in Betracht (22, 23), oder die Erythrozytenmembran ist obligat auf das α -Tocopherol angewiesen.

Beachtenswert ist außerdem der Effekt des Cholesterins auf die Stabilität der Erythrozytenmembran. Bei nahezu allen Gruppen, deren Diät α -Tocopherol enthielt, war ein positiver Effekt des Cholesterins auf die Stabilität der Erythrozytenmembran festzustellen. Bei unzureichender Tocopherolversorgung (Gruppen 0_c, II_c und V_c) ging jedoch vom Cholesterin kein stabilisierender Effekt auf die Erythrozytenmembran aus. Als Erklärung für den Cholesterineffekt kommt zum einen in Betracht, daß der Tocopherolgehalt der Erythrozytenmembran infolge der Cholesterinbelastung erhöht war. So fanden Bitman et al. (24) und Tsai et al. (25) bei Verzehr cholesterinreicher Diäten eine Erhöhung des Plasmatocopherolgehaltes. Zwischen Plasmatocopherolkonzentration und Erythrozytentocopherolkonzentration besteht eine positive Korrelation (26), möglicherweise war der Tocopherolgehalt der Erythrozyten erhöht. Andererseits führt der Verzehr cholesterinreicher Diäten auch zur Erhöhung des Cholesteringehaltes der Erythrozytenmembran, so daß das Cholesterin aufgrund seiner membranstabilisierenden Eigenschaften möglicherweise direkt zu einer Verlangsamung der Lipidperoxidation geführt hat.

Aktivitäten der Plasmaenzyme

Im Tocopherolmangel kann ein Anstieg der Kreatin-Kinase-Aktivität im Plasma beobachtet werden (20, 27). Ein Anstieg der Kreatin-Kinase-Aktivität im Plasma deutet auf eine Schädigung der Muskelatur hin (28). Tabelle 4 ist zu entnehmen, daß die Tocopherolmangelgruppen erwartungsgemäß die höchste Kreatin-Kinase-Aktivität im Plasma aufweisen.

Zwischen den tocopherolsupplementierten Gruppen waren weder bei den cholesterinfrei noch bei den cholesterinreich ernährten Gruppen signifikante Unterschiede festzustellen.

Tab. 4. Einfluß von Tocopherolen und Cholesterin auf die Aktivität der Kreatin-Kinase (E.C.2.7.3.2), der L-Aspartat-Aminotransferase (GOT) (E.C.2.6.1.1) und der Aspartat-Aminotransferase (GPT) (E.C.2.6.1.2) im Plasma nach 14 Versuchswochen (U/l); n = 9–10; $\bar{x} \pm s$.

Kreatin-Kinase

Gruppe	Cholesterin im Futter		
	ohne	mit	
0)	245,8 \pm 75,7	175,8 \pm 75,8	n.s.
I)	27,2 \pm 19,2	48,4 \pm 36,0	n.s.
II)	39,6 \pm 23,4	59,2 \pm 26,2	n.s.
III)	29,2 \pm 23,3	39,3 \pm 25,5	n.s.
IV)	21,7 \pm 14,9	44,3 \pm 32,3	n.s.
V)	28,9 \pm 15,3	36,9 \pm 20,0	n.s.
0:I, II, III, IV, V +++		0:I, II, III, IV, V +++	Signifikanzen +++ p < 0,001

GOT

Gruppe	Cholesterin im Futter		
	ohne	mit	
0)	152,0 \pm 30,2	93,7 \pm 34,1	++
I)	16,3 \pm 8,5	31,0 \pm 12,8	+
II)	22,4 \pm 6,1	41,6 \pm 9,4	+++
III)	21,6 \pm 9,5	33,2 \pm 20,7	n.s.
IV)	16,3 \pm 3,8	43,2 \pm 22,1	++
V)	17,8 \pm 7,0	40,8 \pm 15,4	++
0:I, II, III, IV, V +++		0:I, II, III, IV, V +++	Signifikanzen + p < 0,05 ++ p < 0,01 +++ p < 0,001

GPT

Gruppe	Cholesterin im Futter		
	ohne	mit	
0)	28,6 \pm 5,2	26,3 \pm 10,9	n.s.
I)	13,7 \pm 4,8	29,6 \pm 8,1	+++
II)	13,3 \pm 2,0	28,1 \pm 9,2	+++
III)	11,8 \pm 2,6	21,4 \pm 5,6	+++
IV)	13,6 \pm 3,3	34,6 \pm 17,7	+
V)	13,5 \pm 3,9	34,3 \pm 13,3	++
0:I, II, III, IV, V +++		n.s.	Signifikanzen + p < 0,05 ++ p < 0,01 +++ p < 0,001

Interessant ist, daß die γ -Tocopherolgruppe im Vergleich zur α -Tocopherolgruppe eine relative Wirksamkeit von über 90 % aufweist; demnach besitzt das γ -Tocopherol im Muskel eine höhere Effizienz als in den Erythrozyten.

Als Erklärung hierfür kommt in Betracht, daß das γ -Tocopherol eher im Muskel als in der Leber gespeichert wird (21, 29).

Das Cholesterin hatte bei Abwesenheit von Antioxidantien einen stabilisierenden Effekt auf die Membran der Muskelzelle, da in der cholesterinreichen ernährten Mangelgruppe (Grp. 0_c) der Anstieg der Kreatin-Kinase-Aktivität im Plasma schwächer ausfiel als bei der korrespondierenden Gruppe ohne Cholesterinbelastung (Grp. 0). Andererseits hatte das Cholesterin bei den tocopherolsupplementierten Gruppen eher einen negativen Effekt auf die Membranstabilität.

Bei der Aktivität der L-Aspartat-Aminotransferase (GOT-Aktivität, Tab. 4), die auch zur Beurteilung des Tocopherolstatus herangezogen wurde, hatte die Tocopherolsupplementation dieselben Effekte wie bei der Kreatin-Kinase-Aktivität im Plasma. Auch hier hatte das γ -Tocopherol in Relation zum α -Tocopherol eine biologische Wirksamkeit von über 90 %. Diese höhere Effizienz des γ -Tocopherols bezüglich der GOT-Aktivität läßt sich mit der geringeren Sensitivität von Leber und Muskel für einen Tocopherolmangel im Vergleich zu der Erythrozytenmembran erklären. Bestätigt werden diese Ergebnisse auch von Machlin (30). Er konnte zeigen, daß 0,3 mg d1- α -Tocopherylacetat pro kg Körpergewicht eine signifikante Normalisierung der GOT-Aktivität im Plasma bewirkten; diese Dosis war jedoch unzureichend, um die Hämolyserate der Erythrozyten zu senken.

Der Anstieg der L-Alanin-Aminotransferase (GPT-Aktivität, Tab. 4) im Tocopherolmangel fiel schwächer aus als bei der GOT. Da die GPT vor allem in der Leber in hoher Aktivität zu finden ist, deutet dies darauf hin, daß die Leberzellen durch den Vitamin E-Mangel weniger stark geschädigt wurden als die Muskelzellen. Auffällig ist auch hier die hohe Effizienz des γ -Tocopherols in Relation zum α -Tocopherol; so waren zwischen den tocopherolsupplementierten Gruppen (Grp. I-V) keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

Lipidperoxidation in der Leber

In Abbildung 4 sind die Ergebnisse der Lipidperoxidation in der Leber dargestellt. Die höchsten Lipidperoxidwerte waren bei der tocopherolfreien ernährten 0-Gruppe festzustellen. Durch den α -Tocopherolzusatz wurde eine Verminderung der Lipidperoxidwerte um mehr als 80 % erzielt. Das γ -Tocopherol erwies sich demgegenüber als weniger effizient. Beachtenswert sind auch die Ergebnisse der Gruppen IV und V. Die Effizienz lag bei 95 % im Vergleich zur α -Tocopherolgruppe. Interessant sind die Ergebnisse vor allem deshalb, weil die Tocopherolsupplementation dieser Gruppen zu 50 % bzw. 75 % aus γ -Tocopherol bestand. Möglicherweise deutet dies auf einen synergistischen Effekt hin, der auftritt, wenn beide Tocopherole zusammen verabreicht werden.

Ähnliche Ergebnisse fanden auch Schäfer und Elmadfa (2) in vorangegangenen Untersuchungen.

Interessant ist außerdem die Hemmwirkung des Cholesterins auf die Lipidperoxidation. Der Vergleich der beiden 0-Gruppen zeigt, daß auch

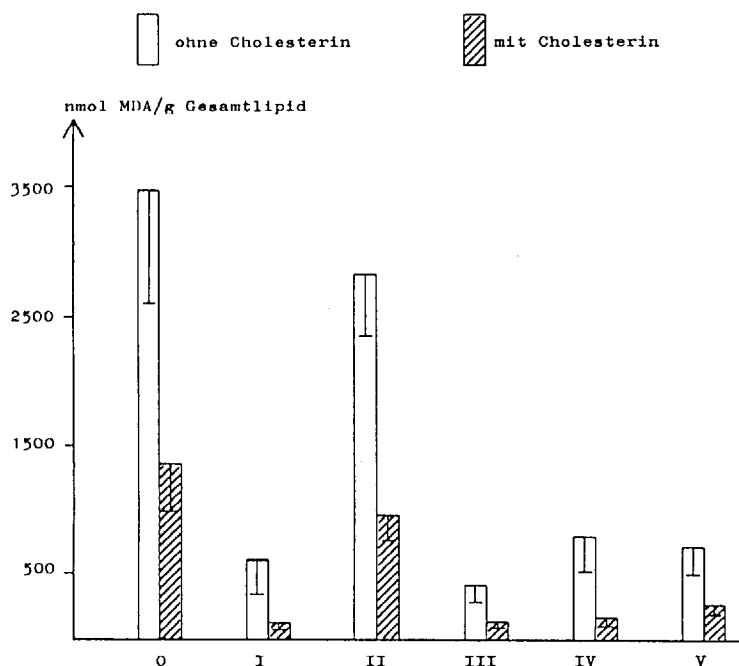


Abb. 4. Einfluß von Tocopherolen und Cholesterin auf den Gehalt an Lipidperoxyden in der Leber (nmol Malondialdehyd/g Gesamtlipid) $n = 9$; $\bar{x} \pm s$. Signifikanzen: +p < 0,05; ++p < 0,01; +++p < 0,001; 0, II/I, III, IV, V+++; 0_c, II_c/I_c, III_c, IV_c, V_c+++; 0/0_c+++; I/I_c+++; II/II_c+++; III/III_c+++; IV/IV_c+++; V/V_c+++.

vom Cholesterin allein eine Hemmwirkung auf die Lipidperoxidation ausgeht, und dies obwohl das Cholesterin per se keine antioxidativen Eigenschaften aufweist. Möglicherweise führte der massive Cholesterinanstieg in der Leber über einen Verdünnungseffekt der oxidationsempfindlichen Lipide zu einer Verlangsamung der Lipidperoxidation in der Leber. Diese Ergebnisse werden durch die Untersuchungen von Tsai et al. (25) jedoch nicht bestätigt. Als Erklärung für diese Unterschiede kommt die im Vergleich zu unseren Untersuchungen ungünstigere Relation von Vitamin E zu Polyenfettsäuren im verfütterten Nahrungsfett in Betracht.

Tocopherolgehalt der Leber

Die Lebertocopherolgehalte sind in Abbildung 5 dargestellt. Auffällig ist der relativ hohe Tocopherolgehalt der beiden Tocopherolmangelgruppen. Bei dem nachgewiesenen Tocopherol handelt es sich vermutlich um Resttocopherolgehalte, die den Tieren über die Plazenta oder während der Stillzeit durch die Muttertiere zugeführt wurden. Resttocopherolgehalte sind nach Aftergood und Alfin-Slater (21) immer dann nachweisbar, wenn nicht schon die vorangegangene Generation tocopherolfrei ernährt wurde.

Den höchsten Tocopherolgehalt der cholesterinfrei ernährten Gruppen wies die Gruppe I auf. Bei den Mischgruppen III, IV und V bestand eine lineare Beziehung zwischen dem α -Tocopherolgehalt im Futter und dem

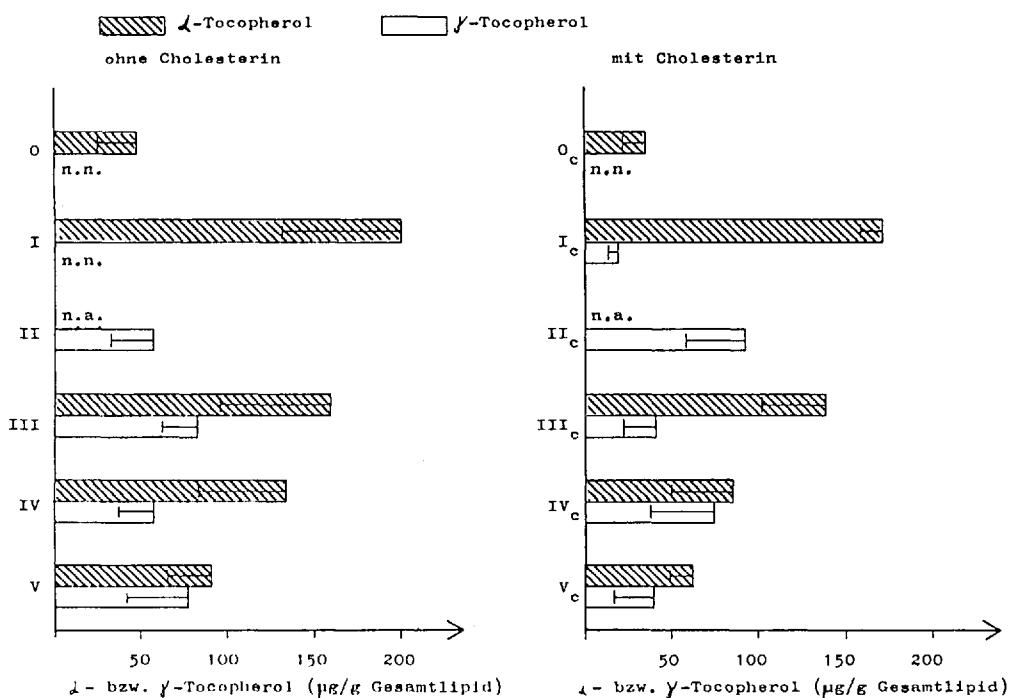


Abb. 5. Einfluß von Tocopherolen und Cholesterin auf den α - und γ -Tocopherolgehalt der Leber ($\mu\text{g/g}$ Gesamtlipid) $n = 9$; $\bar{x} \pm s$.

Signifikanzen für α -Tocopherol ($p < 0,05$)

– zwischen den Gruppen ohne Cholesterin: 0/I, II, III, IV; I/V; mit Cholesterin:

0_c/I_c, III_c; I_c/IV_c, V_c; III_c/V_c

– zwischen den Gruppen mit und ohne Cholesterinzusatz: IV/IV_c; V/V_c

Signifikanzen für γ -Tocopherol ($p < 0,05$)

– zwischen den Gruppen ohne Cholesterin: keine; mit Cholesterin: I_c/II_c, IV_c;

II_c/III_c, V_c

– zwischen den Gruppen mit und ohne Cholesterinzusatz: II/II_c; III/III_c. n.n.: nicht nachweisbar; n.a.: nicht auswertbar.

α -Tocopherolgehalt der Leber. Auch von anderen Arbeitskreisen wurde festgestellt, daß eine lineare Beziehung zwischen dem Lebertocopherolgehalt und dem Logarithmus der mit der Nahrung verabreichten Dosis besteht (31, 32, 33).

Bemerkenswert sind noch die synergistischen Effekte, die bei den Mischgruppen (Grp. III-V) auftraten. So lag die α -Tocopheroldosis der Gruppe V bei 25 % der Gruppe I, demgegenüber lag der α -Tocopherolgehalt der Leber bei 44 % im Vergleich zur α -Tocopherolgruppe.

Dieser synergistische Effekt beruht entweder auf einer Förderung der Absorption oder der Speicherung des α -Tocopherols durch γ -Tocopherol; möglicherweise läßt sich der α -tocopherolsparende Effekt von γ -Tocopherol auch mit einer antioxidativen Schutzfunktion des γ -Tocopherols erklären.

Bezüglich der γ -Tocopherolkonzentration der Leber war kein linearer Zusammenhang zwischen der γ -Tocopherolkonzentration im Futter und der γ -Tocopherolkonzentration der Leber festzustellen. Darüber hinaus ist noch der Befund bemerkenswert, daß die γ -Tocopherolkonzentration der Leber in Gruppe II trotz äquimolarer Dosierung nur bei 25% der α -Tocopherolkonzentration der α -Tocopherolgruppe lag.

Eine Erklärung hierfür ist zum einen die schnellere Elimination des γ -Tocopherols aus dem Gewebe (27, 34); darüber hinaus dürfte jedoch außerdem von Bedeutung sein, daß das γ -Tocopherol eher in Muskel und Fettgewebe als in der Leber gespeichert wird (21, 27).

Das Cholesterin hatte einen Einfluß auf die Tocopherolspeicherung der Leber. Deutlicher ist dieser Effekt, wenn die Tocopherolgehalte bezogen auf Frischgewebe dargestellt sind (Abb. 6). Infolge der Cholesterinbelastung stieg der Gesamtlipidgehalt der Leber um 100 bis 160 % an; daher

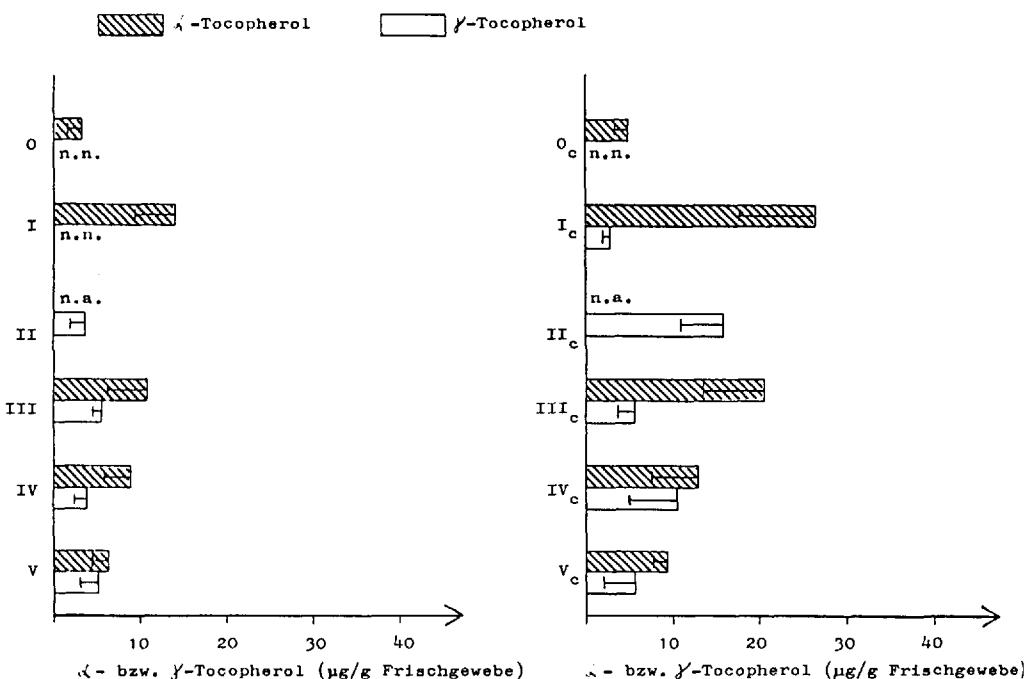


Abb. 6. Einfluß von Tocopherolen und Cholesterin auf den α - und γ -Tocopherolgehalt der Leber ($\mu\text{g/g}$ Frischgewebe) $n = 9$; $\bar{x} \pm s$.

Signifikanzen für α -Tocopherol ($p < 0,05$)

– zwischen den Gruppen ohne Cholesterin: 0/I, III, IV; I/V; mit Cholesterin: 0_c/I_c, III_c/I_c, IV_c/V_c; III_c/V_c

– zwischen den Gruppen mit und ohne Cholesterinzusatz: I/I_c; III/III_c; V/V_c

Signifikanzen für γ -Tocopherol ($p < 0,05$)

– zwischen den Gruppen ohne Cholesterin: keine; mit Cholesterin: I_c/II_c, IV_c; II_c/III_c, V_c

– zwischen den Gruppen mit und ohne Cholesterinzusatz: II/II_c; IV/IV_c. n.n.: nicht nachweisbar; n.a.: nicht auswertbar.

war eine Abnahme der Tocopherolkonzentration bezogen auf Gesamtlipide zu beobachten. Eine Zunahme der Lebertocopherolgehalte infolge einer Cholesterinbelastung wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (24, 25). Als Erklärung für den Anstieg der Tocopherolkonzentration der Leber infolge der Cholesterinbelastung kommt eine Begünstigung der Tocopherolabsorption durch das Cholesterin nicht in Betracht, da das Cholesterin selbst keine emulgierenden Eigenschaften aufweist. Der steigernde Effekt auf die Tocopherolabsorption resultiert eher aus der vermehrten Bildung an Gallensäuren. Aufgrund der lipidperoxidsenkenden Wirkung des Cholesterins ist ferner anzunehmen, daß der Verbrauch der Tocopherole herabgesetzt war.

Relative biologische Wirksamkeit des γ -Tocopherols

In Tabelle 5 sind die Berechnungen der relativen biologischen Wirksamkeit des γ -Tocopherols für die untersuchten Parameter aufgeführt. Es ergaben sich für alle von uns untersuchten Parameter höhere relative biologische Wirksamkeiten als die bislang gültige von 13 %. Bestätigt werden diese Ergebnisse auch durch die Untersuchungen von Schäfer und Elmada (2), die anhand verschiedener Kriterien eine durchschnittliche relative biologische Wirksamkeit des γ -Tocopherols von etwa 25 % in Relation zum α -Tocopherol ermittelten.

Von Bieri (1) wurde aufgrund von In-vitro-Untersuchungen sogar eine noch höhere biologische Wirksamkeit des γ -Tocopherols von 38 % ermittelt.

Die Ergebnisse aus dem Hämolysetest deuten darauf hin, daß der Untersuchungszeitpunkt einen wesentlichen Einfluß auf die relative biologische Wirksamkeit des γ -Tocopherols hat. So ergab sich für das γ -Tocopherol zwei Wochen nach der Aufstockung eine relative biologische Wirksamkeit von 78 %, nach weiteren zwei Versuchswochen fiel diese jedoch auf 38 % ab.

Der Hauptgrund für die geringere relative biologische Wirksamkeit des γ -Tocopherols in den Erythrozyten dürfte seine schnellere Umsatzrate in den Erythrozyten sein. Möglicherweise sind die Erythrozyten jedoch obligat auf eine bestimmte Menge an α -Tocopherol angewiesen, um ihre Membranstabilität aufrechtzuerhalten. Denn bei der Mischgruppe V führte schon der Austausch von 25 % des γ -Tocopherols gegen α -Tocopherol zu einer signifikanten Verminderung der Hämolseneigung.

Tab. 5. Vitamin-E-Wirksamkeit des d1- γ -Tocopherols in Prozent des d1- α -Tocopherols (d1- α -Tocopherols = 100 %).

Untersuchungsparameter	relative Wirksamkeit des γ -Tocopherols
Hämolyserate nach 12 Wo.	78 %
Hämolyserate nach 14 Wo.	38 %
Plasmaenzyme GOT	96 %
GPT	102 %
Kreatin-Kinase	95 %
Peroxide der Leber	22 %

Anhand der gemessenen Aktivitäten der Plasmaenzyme GOT, GPT und Kreatin-Kinase zeigte sich, daß das γ -Tocopherol in den anderen Organen dieselbe Effizienz aufwies wie das α -Tocopherol. Daraus kann man schlußfolgern, daß einzelne Organe eine unterschiedliche Sensitivität für die Symptome eines Vitamin-E-Mangels haben. Gründe hierfür dürften zum einen in der unterschiedlichen Affinität verschiedener Organe zum γ -Tocopherol liegen. So ist die relative Speicherung von γ -Tocopherol im Muskel besser als in der Leber (21, 29). Ein weiterer Grund dürfte in unterschiedlichen Umsatzraten des γ -Tocopherols in den verschiedenen Organen liegen.

Der Cholesterinzusatz führte in den durchgeführten Untersuchungen zu einer Verdopplung der Tocopherolspeicherung in der Leber. Der Effekt beruhte wahrscheinlich auf der absorptionssteigernden Wirkung der vermehrt entstandenen Gallensäuren. Das Cholesterin war außerdem in der Lage, den Prozeß der Lipidperoxidation, vor allem auch bei Abwesenheit von Antioxidantien, zu verlangsamen. Dies ist deshalb so bemerkenswert, da das Cholesterin selbst keine antioxidativen Eigenschaften aufweist. Der Effekt des Cholesterins wurde sowohl bei der Entwicklung der Lipidperoxide im Futter als auch bei der Lipidperoxidation in der Leber beobachtet.

Schlußbetrachtung

Die relative biologische Wirksamkeit des γ -Tocopherols ist abhängig vom untersuchten Organ, vom Untersuchungsparameter sowie von der Höhe der Tocopherolzufuhr.

Unsere Untersuchungen ergaben, daß auch das γ -Tocopherol einen wesentlichen Beitrag zur Tocopherolversorgung des Organismus zu leisten vermag. Dies verdient vor allem im Hinblick darauf Beachtung, daß das γ -Tocopherol in verschiedenen Ölen in hoher Konzentration vorkommt. Diese stellen ja mit die Hauptquelle der Tocopherolversorgung im Organismus dar.

In unseren Untersuchungen wurde außerdem herausgearbeitet, daß verschiedene Organe eine unterschiedliche Präferenz für die einzelnen Tocopherole haben. Das γ -Tocopherol war nicht in allen Organen in der Lage, das α -Tocopherol in seiner Funktion voll zu ersetzen. Daraus kann geschlossen werden, daß einige Organe, wie beispielsweise die Erythrozyten, einen obligaten Bedarf für α -Tocopherol haben.

Darüber hinaus wurde festgestellt, daß verschiedene Organe unterschiedlich sensibel für das Auftreten eines Vitamin-E-Mangels sind.

Bei gleichzeitiger Applikation von α - und γ -Tocopherol wurden synergistische Effekte beobachtet. Dies war der Fall bei der Hämolyseneigung der Erythrozyten, bei den Lipidperoxidwerten sowie bei den Tocopherolgehalten der Leber.

Eine umfassende Erklärung der beobachteten Effekte kann bislang nicht gegeben werden. Bei gleichzeitiger Verabreichung der beiden Tocopherole ging jedoch vom γ -Tocopherol ein sparernder Effekt auf das α -Tocopherol aus.

Die geringere relative biologische Wirksamkeit des γ -Tocopherols ließ sich im wesentlichen mit der schnelleren Umsatzrate im Organismus erklären.

Hinsichtlich der antioxidativen Kapazität der beiden Tocopherole wurden Unterschiede zwischen der Wirkung im Futter und der Wirkung auf die In-vivo-Lipidperoxidation beobachtet.

Literatur

1. Bieri JG, Evarts PR, Gart JJ (1976) Relative activity of α -tocopherol and γ -tocopherol in preventing oxidative red cell hemolysis. *J Nutr* 106:124-127
2. Schäfer H, Elmadfa I, (1984) Relative bioactivity of alpha- and gamma-tocopherol calculated from respiration parameters in rat liver and mitochondria. *Ann Nutr Metab* 28:297-304
3. Wheeler DH (1932) Peroxide formation as a measure of autoxidative deterioration, *Oil and soap* 9:89-97
4. Friedman L, Weiss W, Wherry F, Kline OL (1958) Bioassay of vitamin E by the dialure acid hemolysis method, *J Nutr* 65:143-160
5. Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie (1977) Standard-Methode zur Bestimmung der Aktivität der Kreatin-Kinase. *Z klin Chem klin Biochem* 15:249-254
6. Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie (1972)a Standard-Methode zur Bestimmung der Aktivität der Aspartat-Transaminase (GOT). *Z klin Chem klin Biochem* 10:182-183
7. Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie (1972)b Standard-Methode zur Bestimmung der Aktivität der Alanin-Transaminase (GPT) *Z klin Chem klin Biochem* 10:183-184
8. Koop R (1984) Einfluß unverseifbarer Nahrungsfettkomponenten (α - und γ -Tocopherol, Ubichinon und β -Sitosterin) auf den Tocopherolstatus und die Plasmalipide. Dissertation, Gießen
9. Kayden HJ, Chow CK, Bjornson LK, (1973) Spectrophotometric method for determination of tocopherol in red blood cells. *J Lipid Res* 14:533-540
10. Kitabchi AE, Challoner DR, Williams RH (1968) Respiration and lipid peroxidation in tocopherol deficient rat hearts. *Proc Soc Exp Med Biol* 127:647-650
11. Landvogt C (1986) Beitrag zur Wirkungsweise von Tocopherolen und Cholesterin. Einfluß auf Struktur und Funktion von Mitochondrien sowie den Antioxidantienstatus bei Ratten. Dissertation, Gießen
12. Schäfer H, Elmadfa I (1984) Einfluß verschiedener Lagerungstemperaturen und Lagerungszeiten auf die Peroxidbildung in Futterproben bei Zusatz von α - oder γ -Tocopherol. *Z Tierphysiol Tierernährung u Futtermittekde* 51:229-236
13. Chow CK, Draper HH (1974) Oxidative stability and antioxidant activity of the tocopherols in corn- and soybean oils. *Int J Vit Nutr Res* 44:396-403
14. Mead JF (1980) Membrane lipid peroxidation and its prevention. *J Am Oil Chem Soc* 57:393-397
15. Kaufmann HP, Garloff H, Yekundi KG (1962) Pro- und Antioxidantien auf dem Fettgebiet V: Über natürlich vorkommende Antioxidantien 4. Mitteilung. Fette, Seifen, Anstrichmittel 64:309-318
16. Kunkel HO (1951) The effect of α - and γ -tocopherols on the photooxidation of methyl-linoleate. *Arch Biochem Biophys* 30:317-325
17. Hove EL, Hove Z (1944) The effect of temperature on the relative antioxidant activity of α -, β - and γ -tocopherols and gossypol. *J Biol Chem* 156:623-632
18. Elmadfa I, Thiele B (1982) Antioxidantien. Ihre chemische und physiologische Wirkungsweise als Zusatzstoffe, Schriftenreihe des Bundes für Lebensmittelrecht u. -kunde, Heft 98. B Behr's Verlag, Hamburg

19. Rose CS, György P (1952) Specificity of hemolytic reaction in vitamin E-deficient erythrocytes. *Am J Physiol* 168:414-420
20. Elmadfa I, Nimmannitaya S, Wisker E, Feldheim W (1977) Biochemische Parameter zur Feststellung des Tocopherolbedarfs; Versuche an Meerschweinchen. *Abstr. Ernährungsumschau* 24:377
21. Aftergood, Alfin-Slater RB (1978) Effect of administration of α - and γ -tocopherol on tissue distribution and red cell hemolysis in rats. *Int J Vit Nutr Res* 48:32-37
22. Chow CK, Csallany AS, Draper HH (1971) Relative turnover rates of the tocopherolchromanols in rabbit plasma. *Nutr Rep Int* 4:45
23. Peake IR, Windmüller HG, Bieri JG (1972) A comparison of the intestinal absorption, lymph and plasma transport and tissue uptake of α - and γ -tocopherols in the rat. *Biochem Biophys Acta* 260:679-688
24. Bitman J, Weyant J, Wood DL, Wrenn TR (1976) Vitamin E, cholesterol and lipids during atherogenesis in rabbits. *Lipids* 11:449-461
25. Tsai AC, Thie GM, Lin CR (1977) Effect of cholesterol feeding on tissue lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity and liver microsomal functions in rats and guinea pigs. *J Nutr* 107:310-319
26. Nordøy A, Strøm E (1975) Tocopherol in human platelets. *J Lip Res* 16:386-391
27. Bieri JG, Pouka-Evarts R (1975) Vitamin E adequacy of vegetable oils. *J Am Diet Ass* 66:134-139
28. Thomson WHS, (1971) Serum enzyme studies in inherited disease of skeletal muscle. *Clin Chem Acta* 35:183-191
29. Bieri JG, Pouka-Evarts R (1974) Gamma-tocopherol: metabolism, biological activity and significance in human vitamin E nutrition. *Am J Clin Nutr* 27:980-986
30. Machlin LJ, Gabriel E, Spiegel HE, Horn LR, Brin M, Nelson J (1978) Plasma activity of pyruvate kinase and glutaminacetic transaminase as indices of myopathy in the vitamin E-deficient rat. *J Nutr* 108:1963-1968
31. Yang NYJ, Desai ID (1977) Effect of high levels of dietary vitamin E on liver and plasma lipids and fat soluble vitamins in rats. *J Nutr* 107:1418-1426
32. Gallo-Torres HE (1980) Transport and metabolism (of vitamin E). *Basic Clin Nutr* 1:193-267
33. Machlin LJ, Gabriel E (1982) Kinetics of tissue α -tocopherol uptake and depletion following administration of high levels of vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* 393:48-59
34. Peake IR, Bieri JG (1971) Alpha- and gamma-tocopherol in the rat: in vitro and vivo tissue uptake and metabolism. *J Nutr* 101:1615-1622

Eingegangen 10. Januar 1986

Für die Verfasser:

Prof. Dr. I. Elmadfa, Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität Gießen, Wilhelmstr. 20, 6300 Gießen