

1 Einleitung und Zielstellung

Konjugierte Linolsäure (CLA)-Isomere sind C18-Fettsäuren mit zwei Doppelbindungen, d. h. Isomere der Linolsäure (LA) mit aufeinander folgenden (konjugierten) und nicht isolierten Doppelbindungen. Die biologisch bedeutendsten Isomere sind die *cis*-9, *trans*-11 CLA und die *trans*-10, *cis*-12 CLA. *Cis*-9, *trans*-11 CLA, als so genannte »Pansensäure«, wird hauptsächlich aus Linolsäure (LA) im Pansen von Wiederkäuern während der mikrobiellen Biohydrierung durch das Pansenbakterium *Butyrivibrio fibrisolvens* isomerisiert. In wesentlich geringerer Konzentration wird auch *trans*-10, *cis*-12 CLA bakteriell im Pansen gebildet. Ein Teil der CLA-Isomere wird absorbiert und ist daher in Milch und Milchprodukten sowie Fleisch und Wurstwaren von Wiederkäuern enthalten (FRITSCHKE u. STEINHART 1998; MCGUIRE et al. 1999; SUGANO et al. 1999; MARTIN u. VALEILLE 2002; MATHERS 2003).

In den letzten Jahren ist das Interesse für CLAs gewachsen. Diesen Fettsäuren werden physiologisch positive Eigenschaften, z. B. antikanzerogene, antiatherogene, antidiabetogene und antiadipogene Effekte, zugesprochen (HA et al. 1990; IP et al. 1991; PICH et al. 1993; LEE et al. 1994; LIEW et al. 1995; BELURY et al. 1996; BELURY u. VANDEN HEUVEL 1997; CHEW et al. 1997; NICOLSI et al. 1997; SUGANO et al. 1997; CESANO et al. 1998; HOUSEKNECHT et al. 1998; PARK u. PARIZA 1998; SUGANO et al. 1998; DE DECKERE et al. 1999; IP et al. 1999a, b; BELURY 2002; YU et al. 2002; TOOMEY et al. 2003; CHENG et al. 2004).

Derzeit sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie koronare Herzkrankheit (KHK), Herzinfarkt, Schlaganfall, periphere Durchblutungsstörungen und Aneurysmen, die Haupttodesursachen in den Industrieländern. Diese Erkrankungen sind klinische Manifestationen der Atherosklerose (BIESALSKI u. GRIMM 1999; LEITZMANN et al. 2001; LIBBY 2002; MONACO u. PALEOLOG 2004). Das Atherosklerose-Risiko steht in enger Beziehung mit der Ernährungs- und Lebensweise der Menschen, wobei die Ernährung der wichtigste exogene Faktor ist. In den meisten westlichen Industrieländern ist eine hyperkalorische

und fettreiche Kost mit einem hohen Anteil an gesättigten Fettsäuren üblich, die entscheidend zur Entstehung der Risikofaktoren Übergewicht, Fettstoffwechselstörungen, aber auch Bluthochdruck und Diabetes mellitus und somit zu hohen Herzinfarkttraten beiträgt (BIESALSKI u. GRIMM 1999; LEITZMANN et al. 2001).

Mehrere Studien deuten darauf hin, dass CLAs atherosklerotische Prozesse beeinflussen. In einigen tierexperimentellen Versuchen mit Ratten, Kaninchen, Hamstern und Mäusen wurde eine Verringerung von Plasma- oder Lipoprotein-Lipiden bzw. atherosklerotischen Plaques beobachtet (LEE et al. 1994; PICH et al. 1993; NICOLOSI et al. 1997; STANGL 2000a, b; SHER et al. 2003; TOOMEY et al. 2003). Wobei in Studien von LEE et al. (1994) und NICOLOSI et al. (1997) trotz verminderter Plasma- und Lipoproteine keine signifikante Verminderung der Fettstreifenbildung in der Aorta von Kaninchen und von Hamstern beobachtet wurde. Bei c57BL/6-Mäusen begünstigten CLAs sogar die Bildung von Läsionen in arteriellen Blutgefäßen (MUNDAY et al. 1999). Es gibt bisher nur wenige Studien über die Wirkung der CLAs auf atherogene Parameter in Blutgefäßzellen. Deshalb bildete die Untersuchung dieser Parameter die Grundlage für die Zielstellung der vorliegenden Arbeit.

Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist die Atherosklerose bzw. Arteriosklerose eine variable Kombination von Veränderungen der Intima, die mit einer herdförmigen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, von Blut und Blutbestandteilen, ferner mit Bildung eines fibrösen Gewebes und mit Kalkablagerungen einhergeht sowie mit Veränderungen der Media verbunden ist (BÖCKER et al. 2004; RIEDE et al. 2004). Die Intima ist die luminale Auskleidung der Arterien und Venen und besteht aus einem einschichtigen Endothel mit Basalmembran und subendotheliale Bindegewebe. Sie wird von der Media durch die *Membrana interna elastica* abgegrenzt (BENNINGHOFF u. DRENCKHAHN 2004). Die Endothelzellen der Intima und die glatten Muskelzellen der Media stehen in engem Kontakt. Das gesunde Endothel ist als dynamische Schnittstelle zwischen Gefäßwand und zirkulierendem Blut bei der Aufrechterhaltung des vaskulären Gleichgewichts der Gefäße durch die Produktion von Faktoren, die den Gefäßtonus, die Koagulation, die Zellproliferation, die Adhäsion und die Migration von Leukozyten regulieren, von zentraler Bedeutung (VOGEL et al. 1997; KUNSCH u. MEDFORD 1999; PRICE u. LOSCALZO 1999; TOBOREK u. KAISER 1999; PEARSON 2000; COEN et al. 2004). Wiederholte oder kontinuierliche Schädigungen des Endothels durch chemische, mechanische, immunologische oder toxische Einflüsse führen zu Dysfunktionen, unter

anderem zu einem funktionellen Ungleichgewicht zwischen vasoaktiven (gefäßerweiternd und -verengend) Substanzen, wie Eicosanoide, Stickstoffmonoxid (NO) und Endothelin-1 (ET-1), und zu einer verstärkten Adhäsion von Leukozyten (LEITZMANN et al. 2001; COEN et al. 2004). Die erhöhte Rekrutierung und Adhäsion von Leukozyten zum Ort der Endothelschädigung werden durch die Freisetzung von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, deren Expressionen durch proinflammatorische Transkriptionsfaktoren wie den *nuclear factor-κB* (NF-κB) reguliert werden, vermittelt (PRICE u. LOSCALZO 1999; RICHTER et al. 1999; TOBOREK u. KAISER 1999; COEN et al. 2004; REITERER et al. 2004a, b).

Die Eicosanoide mit zwei Doppelbindungen, so genannte Eicosanoide der Serie 2, Prostaglandine (PG) wie PGI₂ (Prostacyclin), PGE₂ PGF_{2α} und Thromboxane (TX) wie TXA₂, sind an der Regulierung des Gefäßtonus beteiligt (TOBOREK u. KAISER 1999). Vor allem das Verhältnis zwischen dem Vasodilatator PGI₂ und dem Vasokonstriktor TXA₂ ist bei der Aufrechterhaltung des vaskulären Gleichgewichts von besonderer Bedeutung (BUNTING et al. 1983; OATES et al. 1988; LÖFFLER u. PETRIDES 1997). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass CLAs die Bildung von Eicosanoiden in verschiedenen Zellkultur- und Tiermodellen reduzieren (LI u. WATKINS 1998; LIU u. BELURY 1998; KAVANAUGH et al. 1999; PARK et al. 2001; WIGHAM et al. 2001; COEN et al. 2004). Auch in Studien mit humanen Endothelzellen verminderten CLA-Isomere die Eicosanoid-Freisetzung konzentrations- und zeitabhängig (URQUHART et al. 2002; TORRES-DUARTE u. VANDERHOEK 2003). Ein Grund dafür ist die Reduzierung der Konzentration des Eicosanoid-Präkursors Arachidonsäure (AA) in den Membranphospholipiden durch die Behandlung von Zellen bzw. Fütterung von Tieren mit CLAs (OATES et al. 1988; BELURY u. KEMPA-STECZKO 1997; SUGANO et al. 1999; BANNI et al. 2001; PARK et al. 2001; URQUHART et al. 2002). Die AA wird durch Phospholipasen A₂ (PLA₂) freigesetzt (TOBOREK u. KAISER 1999) und führt über den Cyclooxygenase-Weg (COX) der Enzyme COX-1 bzw. COX-2 in fast allen Körperzellen zur Bildung der Eicosanoide der Serie 2 (VOET u. VOET 1994; MIRALPEIX et al. 1997; CAMACHO et al. 1998; FORTH et al. 1998; MICHAL 1998; MARKS u. FÜRSTENBERGER 1999; URQUHART et al. 2001). Die reduzierte Aktivität der COX-1 bzw. eine Hemmung der COX-2-mRNA-Expression ist als eine mögliche Ursache für die verminderte Eicosanoidsynthese durch CLAs zu betrachten. So wurde in einigen Studien ein senkender Effekt der CLAs auf die Aktivität bzw. Genexpression der COX nachgewiesen

(BULGARELLA et al. 2001; IWAKIRI et al. 2002; YAMASAKI et al. 2002; YU et al. 2002). Jedoch fehlen bisher Untersuchungen zum Einfluss der CLAs auf die Aktivität des AA-freisetzenden Enzyms PLA₂ als limitierende Größe. Einen weiteren Aspekt bei der Reduzierung der Eicosanoide und der verminderten AA-Konzentration nimmt der Einfluss von CLA-Isomeren auf die Desaturierung der n-6-Fettsäuren ein. *In vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen zeigten, dass CLA-Isomere die Zusammensetzung der Lipide bzw. das Fettsäuremuster über eine veränderte Desaturaseaktivität beeinflussten (LIU u. BELURY 1997; BRETILLON et al. 1999; SUGANO et al. 1999; AGATHA et al. 2004). Aufgrund ihrer ähnlichen Struktur zur LA werden CLAs analog zu dieser n-6-Fettsäure metabolisiert, d. h. zu höher ungesättigten konjugierten Dien-Fettsäuren (CD) desaturiert und verlängert. Hierbei entstehen unter anderem konjugierte Octadecatriensäure (CD18:3), Eicosatriensäure (CD20:3) und Eicosatetraensäure (CD20:4), was in verschiedenen Untersuchungen am Tiermodell nachgewiesen wurde (SEBEDIO et al. 1997; BANNI et al. 1999a, b; SUGANO et al. 1999; BANNI et al. 2004). So konkurrieren vermutlich CLAs mit der LA als Substrat um die Δ 5- und Δ 6-Desaturasen und hemmen dadurch die Desaturierung der n-6-Fettsäure zu AA in den Phospholipiden (BANNI et al. 1999a; SUGANO et al. 1999). Weiterhin wiesen PARK et al. (2005) nach, dass CLA-Metabolite wie CD20:2 und CD20:3 in Zellkultur ähnlich biologisch aktiv sind wie CLAs. CLA-Isomere werden wahrscheinlich auch durch peroxisomale β -Oxidation zu CD-Fettsäuren wie CD12:2, CD14:2 und CD16:2 verkürzt (BANNI et al. 1999a, 2004; PARK et al. 2005). Bisher gibt es jedoch keine Studien über den Einfluss der CLAs auf die Δ 5- und Δ 6-Desaturierung und die Bildung von CLA-Metaboliten in arteriellen Endothelzellen.

Ein weiterer Vasodilatator, dem bei der Aufrechterhaltung des vaskulären Gleichgewichts im Endothel eine sehr bedeutende Rolle zukommt, ist das NO. Es wird durch NO-Synthasen (NOS) aus L-Arginin gebildet (FORTH et al. 1998; TOBOREK u. KAISER 1999; VASSALLE et al. 2003). Wie in Untersuchungen an Zellkultur- und Tiermodellen nachgewiesen wurde, hemmten CLAs die Expression der induzierbaren NOS (iNOS) und die Produktion von NO (IWAKIRI et al. 2002; YU et al. 2002; CHENG et al. 2004; SHEN et al. 2004; CORINO et al. 2005). Die Behandlung von murinen Makrophagen mit *cis*-9, *trans*-11 CLA führte hingegen zu einer erhöhten mRNA-Konzentration der iNOS (WANG et al. 2004). Keinen Einfluss hatten die CLAs auf die Freisetzung des

Nitrits als Indikator für NO und auf die Enzymaktivität der endothelialen NOS (eNOS) in bovinen Endothelzellen der Aorta (COEN et al. 2004).

Trotz zahlreicher Studien fehlen bislang systematische Untersuchungen zur Wirkung von CLAs auf die Eicosanoid- und die NO-Synthese in humanen arteriellen Endothelzellen. Der Einfluss von CLA-Isomeren auf das ET-1 wurde bisher nicht untersucht. Deshalb nahm die Untersuchung zur Wirkung der CLAs auf die genannten vasoaktiven Substanzen einen wichtigen Teilkomplex der vorliegenden Arbeit ein.

Die Schädigung des Endothels bedingt während der frühen Phase der Atherogenese die verstärkte Bildung der Adhäsionsmoleküle *intracellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), *vascular cellular adhesion molecule-1* (VCAM-1) und E-Selektin, die Freisetzung der Chemokine *monocyte chemoattractant* bzw. *chemotactic protein-1* (MCP-1) und Interleukin (IL)-8 und die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen (DAVIES et al. 1993; PRICE u. LOSCALZO 1999; LUSIS 2000; CHEN et al. 2002; LI u. GLASS 2002; LIBBY 2002; BLANKENBERG et al. 2003; LIU et al. 2004; YANG et al. 2004). Erste Hinweise über eine mögliche antiatherogene Schutzwirkung der CLAs auf die genannten Parameter in Endothelzellen geben FARQUHARSON et al. (1999). Die Autoren berichteten über eine verminderte Expression der Adhäsionsmoleküle in CLA-behandelten humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC). In humanen Magenkrebszellen wurde durch die Behandlung mit *cis-9, trans-11* CLA eine schwächere Adhäsion an eine extrazelluläre Matrix über die Reduzierung der Proteinexpression von VCAM-1 und ICAM-1 beobachtet (CHEN et al. 2004). Die mRNA-Konzentration des IL-8 war in humanen Epithelzellen der Bronchien durch die Behandlung mit *cis-9, trans-11* CLA vermindert (JAUDSZUS et al. 2005). Die Inkubation von Adipozyten mit *trans-10, cis-12* CLA führte hingegen zu einer Hypersekretion des IL-8 (BROWN et al. 2004). Die Effekte der CLAs auf proatherogene Prozesse wie die Freisetzung der Chemokine und die Expression der Adhäsionsmoleküle sind durch eine veränderte Vermittlung des NF- κ B-Signalweges erklärbar (SONG et al. 2002a; BANNI et al. 2003; CHENG et al. 2004). Es wurde gezeigt, dass CLAs ihre inhibierende Wirkung auf NF- κ B-vermittelte Entzündungsreaktionen auch über die Aktivierung des Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor (PPAR) γ entfalten. In Versuchen mit Mäusen und mit verschiedenen Zellmodellen, wie z.B. Makrophagen und Adipozyten, wurde eine Aktivierung des PPAR γ durch CLAs nachgewiesen (CHOI et al. 2000; KOHNO et al.

2001; CLEMENT et al. 2002; YU et al. 2002; TOOMEY et al. 2003; CHANGHUA et al. 2005; WARGENT et al. 2005). In anderen Studien mit Makrophagen und Adipozyten wurden hingegen keine bzw. negative Effekte der CLAs auf die Aktivierung des PPAR γ beobachtet (WELDON et al. 2004; BRANDENBOURG u. HU 2005; GARLUND et al. 2005).

Bislang gibt es jedoch keine systematischen Untersuchungen zum Einfluss der CLAs auf die Transkriptionsfaktoren PPAR γ und NF- κ B sowie die Freisetzung von Chemokinen, die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Leukozytenadhäsion in humanen Endothelzellen. Deshalb bildete die Untersuchung zur Wirkung der CLAs auf diese proinflammatorischen Parameter einen weiteren Teilkomplex der Zielstellung der vorliegenden Arbeit.

Mehrere Studien untersuchten bereits den Einfluss der LA auf die genannten inflammatorischen Parameter in Endothelzellen. Dabei wurde beobachtet, dass diese Fettsäure in der Lage ist, die Expression der Chemokine und der Adhäsionsmoleküle sowie die Adhäsion der Monozyten an Endothelzellen zu beeinflussen (PARK et al. 2001; TOBOREK et al. 2002; CHEN et al. 2003; REISSIG et al. 2003; REITERER et al. 2004b; SARASWATHI et al. 2004). Aufgrund dieser Befunde wurde die LA in diesem Teilkomplex neben den beiden CLA-Isomeren als Referenzsubstanz mitgeführt.

Obwohl *in vivo*-Studien eine Beziehung zwischen der CLA-Aufnahme und der Entstehung der Atherosklerose aufzeigen, ist bisher wenig über die Mechanismen, über die die natürlich vorkommenden CLA-Isomere auf atheroskleroserelevante Parameter im Endothel wirken, bekannt.

Aus den vorangegangenen Ausführungen ergab sich die Zielstellung der vorliegenden Arbeit:

Untersuchung des Einflusses der CLA-Isomere *cis*-9, *trans*-11 CLA und *trans*-10, *cis*-12 CLA auf atheroskleroserelevante Parameter in humanen arteriellen Endothelzellen.

Aus der Zielstellung wurden die beiden folgenden Teilfragen formuliert:

1. Wie beeinflussen die zwei CLA-Isomere die Bildung der vasoaktiven Substanzen Eicosanoide der Serie 2, NO und ET-1 in humanen arteriellen Endothelzellen?

Im Einzelnen sollten dabei folgende Parameter untersucht werden:

- Inkorporierung der CLA-Isomere in Abhängigkeit von der Konzentration in die Gesamtlipide und die Membranphospholipide Phosphatidylethanolamin (PE) und -cholin (PC)
 - Fettsäurezusammensetzung der Gesamtlipide und der Phospholipide unter besonderer Berücksichtigung der LA und der AA (als Ausgangssubstanz für die Eicosanoidsynthese)
 - Ermittlung von CD-Fettsäuren als Metabolite der CLA-Isomere in den Gesamtlipiden
 - Aktivität bzw. Genexpression der für die Eicosanoidsynthese relevanten Enzyme $\Delta 5$ - und $\Delta 6$ -Desaturase, sekretorische PLA₂, COX-1 und COX-2
 - Freisetzung der Eicosanoide PGI₂, TXA₂, PGE₂ und PGF_{2 α}
 - Freisetzung des NO und Genexpression des für die NO-Bildung relevanten Enzyms eNOS
 - Freisetzung des ET-1
2. Welchen Einfluss haben die beiden CLA-Isomere bzw. die LA, als Referenzsubstanz, auf proinflammatorische Parameter der frühen Entstehungsphase der Atherosklerose in humanen Tumornekrosefaktor α (TNF α)-stimulierten arteriellen Endothelzellen?

Im Einzelnen sollten dabei folgende Parameter untersucht werden:

- Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin
- Freisetzung der Chemokine MCP-1 und IL-8
- Adhäsion von Monozyten an die Endothelzellen
- Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und PPAR γ

Für die Durchführung der Inkubationsversuche wurden entsprechend der Zielstellung humane Endothelzellen der Aorta als Zellmodell gewählt.