Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. D. Reinhardt

Metabolismus der α-Linolensäure bei stillenden Frauen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Angelika Kuhn
aus
München
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. B. Koletzko
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. K. Parhofer Priv. Doz. Dr. O. Genzel-Boroviczény
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. H. Demmelmair
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	30.06.2005

Herrn Professor Dr. med. B. Koletzko danke ich für die Überlassung des Themas, für die angenehme Betreuung während der Anfertigung meiner Dissertation sowie für die Möglichkeit der Teilnahme an dem ESPGHAN Kongress in Taormina.

Herzlich danken möchte ich allen Mitarbeitern des Stoffwechsellabors der Kinderpoliklinik für ihre freundliche Unterstützung. Besonderer Dank gebührt Frau Dr. oec. troph. Katharina Dokoupil für die Auswertung der Ernährungsprotokolle sowie Frau Verena Knapp für die Durchführung der Milchfettanalysen.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Hans Demmelmair für die freundliche Begleitung, die Durchführung der GC-C-IRMS sowie für die sorgfältige Durchsicht und Verbesserung der Texte. Durch seine fachlichen Anregungen sowie seine konstruktive Kritik war er maßgeblich am Gelingen meiner Arbeit beteiligt.

Weiterhin möchte ich mich an dieser Stelle bei allen teilnehmenden Müttern bedanken, mit deren zuverlässiger Hilfe und engagierter Mitarbeit die Durchführung des klinischen Teils der Studie erst möglich wurde.

Herrn Michael Bode möchte ich ganz herzlich danken für seine Unterstützung bei allen Einsätzen und Transporten zu den Studienteilnehmerinnen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1	**Einleitung**	**8**
2	**Studienteilnehmer und Methoden**	**16**
2.1	Studienteilnehmer	16
2.2	Studiendesign	17
2.2.1	Ernährung der Mütter während der Studienphase	17
2.2.1.1	Ernährungsbeschränkungen	17
2.2.1.2	Dokumentation der Ernährung	18
2.2.2	Vorbereitung und Verabreichung der ^{13}C-markierten ALA	18
2.2.3	Atemproben	19
2.2.3.1	Gewinnung der Atemproben	19
2.2.3.2	Auswertung der ^{13}C-Anreicherung im CO_2 der Ausatemluft	21
2.2.4	Muttermilchproben	21
2.2.4.1	Gewinnung der Muttermilchproben	21
2.2.4.2	Berechnung der Fettsäuregehalte der Muttermilchproben	22
2.2.4.3	Auswertung der ^{13}C-Anreicherung in den Fettsäuren der Muttermilch	23
2.2.5	Blutproben	25
2.3	Statistik	25
2.4	Ethische Aspekte	26
2.4.1	Verwendung von stabilen Isotopen bei stillenden Müttern	26
2.4.2	Ethik-Kommission	26
2.5	Analytische Methoden	27
2.5.1	Geräte und Reagenzien	27
2.5.2	Methoden zur Fettsäureanalytik der Milchproben	29

2.5.2.1	Fettextraktion	29
2.5.2.2	Fettsäurederivatisierung	30
2.5.2.3	Gaschromatographie	30
2.5.2.4	Massenspektrometrie (GC-C-IRMS)	31
3	**Ergebnisse**	**32**
3.1	Fettsäureanalytik	32
3.2	Klinische Charakteristiken der Studienteilnehmer	33
3.3	Ernährung der Studienteilnehmer	34
3.4	Oxidation	36
3.4.1	^{13}C-Anreicherung im CO_2 der Ausatemluft	36
3.5	Muttermilch	39
3.5.1	Fettgehalt und Volumen der Muttermilch	39
3.5.2	Fettsäurezusammensetzung der Muttermilchproben	39
3.5.3	^{13}C-Anreicherung in den n-3 Fettsäuren der Muttermilch	41
3.5.3.1	^{13}C-Anreicherung in der ALA der Muttermilch	42
3.5.3.2	^{13}C-Anreicherung in der EPA der Muttermilch	44
3.5.3.3	^{13}C-Anreicherung in der DPA der Muttermilch	46
3.5.3.4	^{13}C-Anreicherung in der DHA der Muttermilch	48
3.5.4	Korrelation der ^{13}C-markierten Fettsäuren in der Muttermilch	50
3.5.5	Korrelation zwischen den n-3 und n-6 Fettsäuren	52
3.5.6	Zusammenhang zwischen der Oxidation und der Fettsekretion	53
4	**Diskussion**	**54**
4.1	Beurteilung der Ernährung, der Muttermilch und der metabolischen Situation der Studienteilnehmer	54
4.2	Beurteilung der verwendeten Methodik und des Studiendesigns	59
4.2.1	Verwendung von stabilen Isotopen	59

4.2.2	Studiendesign	62
4.3	Aspekte bei der Interpretation der Ergebnisse	62
4.4	Oxidation der [U-^{13}C]-markierten ALA	67
4.5	Muttermilch	71
4.5.1	Transfer der [U-^{13}C]-markierten ALA in die Muttermilch	71
4.5.2	Konversion der [U-^{13}C]-markierten ALA zu langkettigen hochungesättigten Fettsäuren	76
4.5.3	Oxidation und n-3 Fettsäure-Transfer in die Muttermilch	80
5	**Schlussfolgerungen**	**81**
6	**Zusammenfassung**	**84**
7	**Literaturverzeichnis**	**87**

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
ALA	α-Linolensäure
APE	Atom Percent Excess
DHA	Docosahexaensäure
DPA	Docosapentaensäure
EFA	essentielle Fettsäure (essential fatty acid)
EPA	Eicosapentaensäure
GC	Gaschromatographie
IRMS	isotope ratio mass spectrometry
KG	Körpergewicht
LA	Linolsäure
LCP/LC-PUFA	langkettige hochungesättigte Fettsäure (long-chain polyunsaturated fatty acid)
LDL	Lipoproteine von geringer Dichte (low density lipoproteins)
MUFA	einfach ungesättigte Fettsäure (monounsaturated fatty acid)
MW	Mittelwert
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäure (polyunsaturated fatty acid)
SEM	Standardfehler (standard error of mean)
SFA	gesättigte Fettsäure (saturated fatty acid)
VLDL	Lipoproteine von sehr geringer Dichte (very low density lipoproteins)

1 Einleitung

Die ideale Ernährungsform für das gesunde Neugeborene ist auch heute noch das Stillen, da es nicht nur den Kontakt zwischen Mutter und Kind intensiviert, sondern auch das richtige Verhältnis von Nährstoffen, Vitaminen und Spurenelementen liefert. In den ersten vier bis sechs Lebensmonaten, die im Leben eines jeden Kindes eine wichtige Periode darstellen, die von raschem Körperwachstum und großen Fortschritten in der neurologischen Entwicklung gekennzeichnet ist, gilt Muttermilch als alleinige Nahrungsquelle als empfehlenswert (Rodriguez-Palermo 99, Koletzko 01). Die wichtigste Energiequelle für den Säugling stellen die Lipide der Milch dar (Koletzko 99), die mit einem Anteil von etwa 4 Gramm pro 100 Milliliter die zweitgrößte Fraktion der Muttermilch sind und etwa 50% der zugeführten Energie ausmachen.

Milchfettbiosynthese. Innerhalb weniger Stunden nach der Nahrungsaufnahme werden die Fettsäuren im Darm resorbiert. Dabei werden sie in der intestinalen Mucosa wieder zu Triglyzeriden verestert und in Chylomikronen, very low density (VLDL) und low density Lipoproteine (LDL) verpackt zur Brustdrüse transportiert. Während einer Fastenperiode werden die Triglyzeride ausschließlich in Form von VLDL von der Leber zur Brustdrüse transportiert. Dort werden sie durch Lipoproteinlipasen zu freien Fettsäuren und Monoglyzeriden hydrolysiert. Die freien Fettsäuren können nun wiederum in die Triglyzeride der Milch resynthetisiert werden. Die Lipide der Milch bestehen hauptsächlich aus Triglyzeriden (etwa 98%) und beinhalten außerdem Phospholipide (etwa 0,8%) und Cholesterin (etwa 0,5%).

Metabolismus der PUFA. Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren α-Linolensäure (ALA, C18:3n-3) und Linolsäure (LA, C18:2n-6) gelten seit ihrer Entdeckung im Jahre 1930 für den Menschen als essentiell, da sie vom Organismus nicht selbst

synthetisiert werden können und daher mit der Nahrung zugeführt werden müssen (Burr 1930). Diese C18 Fettsäuren werden durch mehrere Schritte der Elongation und Desaturation zu ihren langkettigen mehrfach ungesättigten Derivaten (long chain poly unsaturated fatty acids, LC-PUFA) Docosahexaensäure (DHA, 22:6n-3) und Arachidonsäure (AA, C20:4n-6) metabolisiert (Sprecher 99) (s. **Abb. 1**).

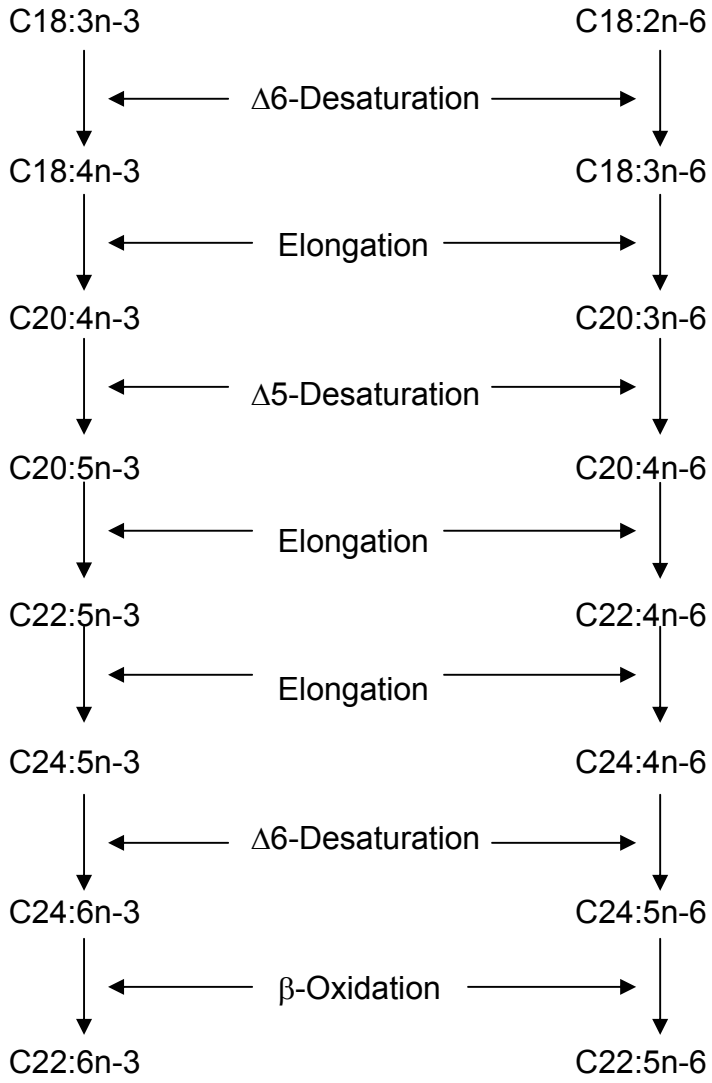

Abb. 1 Stoffwechselweg der n-3 und n-6 Fettsäuren

Zunächst werden ALA und LA durch Δ6-Desaturation zu C18:4n-3 bzw. C18:3n-6 (γ-Linolensäure) umgewandelt. Im nächsten Schritt werden die Fettsäuren zu C20:4n-3 bzw. C20:3n-6 elongiert und anschließend durch Δ5-Desaturation in C20:5n-3 bzw. C20:4n-6 konvertiert. Es folgt eine weitere Elongation zu C22:5n-3 (Docosapentaensäure, DPA) bzw. C22:4n-6. Daraufhin wird nicht etwa, wie früher angenommen, eine Δ4-Desaturase aktiv, sondern es wird ein sogenannter „alternativer" Stoffwechselweg beschritten (Voss 91, Mohammed 95, Moore 95). Hierbei werden C22:5n-3 bzw. C22:4n-6 zu C24:5n-3 bzw. C24:4n-6 elongiert, um anschließend einen zweiten Zyklus der Δ6-Desaturation zu durchlaufen. Hierbei entstehen die C24 Fettsäuren C24:6n-3 bzw. C24:5n-6, die in den Peroxisomen schließlich durch β-Oxidation zu C22:6n-3 bzw. C22:5n-6 umgewandelt werden.
In Isotopen-Studien wurde nachgewiesen, dass bereits Neugeborene über die notwendigen Enzymsysteme für die LC-PUFA-Synthese verfügen (Sauerwald 97).

Bedeutung der PUFA für das Neugeborene. Die herausragende Bedeutung der Fette für die Entwicklung des Neugeborenen wird deutlich, wenn man bedenkt, dass das menschliche Gehirn zu etwa 60% der Trockenmasse aus Lipiden besteht. Zum Zeitpunkt der Geburt nimmt das Gehirn etwa 15% der Körpermasse ein, verbraucht jedoch 70% der zugeführten Energie für seine Entwicklung (Crawford 97). Bei einer Wachstumsgeschwindigkeit von 1mg pro Minute werden *via* selektivem Transfer vor allem DHA und AA in das neurale Gewebe eingelagert (Sinclair 75).
In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass Säuglinge, die mit LCP-freien Formel-Nahrungen gefüttert wurden, niedrigere DHA- und AA-Konzentrationen in den Plasma -Lipiden erreichten (Sinclair 75, Carlson 86, Ghebremeskel 95). Die LCP-freie Ernährung führte sogar zu einer Verminderung des cerebralen DHA-Gehaltes (Farquharson 93).

Auch die Retina benötigt für ihre optimale Entwicklung LCP, da insbesondere die Membranen in ihren Photorezeptoren zu 60% aus DHA bestehen (Sun 74, Salem 01). Die negativen Folgen einer insuffizienten PUFA-Zufuhr für die Ausbildung retinaler und neurologischer Funktionen wurden zunächst an Tieren nachgewiesen. Diese zeigten im Vergleich zu gleichaltrigen Artgenossen Veränderungen in ihrem Lernverhalten und ihrer spontanen Aktivität sowie auffällige Elektroretinogramme (Lampty 76, Bourre 89, Neuringer 00).

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass insbesondere Frühgeborene von einer ausgewogenen LCP-Zufuhr profitieren und ihre visuelle sowie neurophysiologische Entwicklung hierdurch begünstigt wird (Agostoni 95, Carlson 99, SanGiovanni 00, Koletzko 01).

Einfluss von Körperspeichern und Ernährung auf das Fettsäuremuster der Muttermilch. Die beiden essentiellen Fettsäuren ALA und LA können aus zwei verschiedenen Quellen in die Muttermilch gelangen. Entweder sie stammen direkt aus der Nahrung der Mutter oder sie werden aus maternalen Körperspeichern mobilisiert. Für alle nicht-essentiellen Fettsäuren besteht außerdem die Möglichkeit der Synthese durch die Leber.

Bedeutung der Körperspeicher. Eine von Hachey *et al* mit stabilen Isotopen durchgeführte Studie konnte zeigen, dass etwa 60% der Lipide in der Muttermilch nicht direkt aus der mütterlichen Nahrung stammen (Hachey 87). Andere Studien ergaben noch höhere Anteile der aus Körperspeichern hervorgehenden Fraktion. So fanden Demmelmair *et al*, dass 70% der LA nicht direkt aus der Nahrung in die Muttermilch gelangt (Demmelmair 98). Ähnliche Ergebnisse wurden selbst bei Stillenden aus Mexiko gefunden, die sich traditionell fettarm, jedoch mit hohen Anteilen an LA ernähren (DelPrado 01). Fidler *et al* schätzten in einer weiteren Tracerstudie, dass etwa 75% der Palmitin- (C16:0) und Ölsäure (C18:1n-9) wie auch

der DHA in der Milch ihren Ursprung nicht unmittelbar in der mütterlichen Nahrung hat (Fidler 00).

Große Bedeutung kommt der Mobilisation aus Körperspeichern insbesondere bei Stillenden mit unzureichender Kalorienzufuhr zu. Es konnte gezeigt werden, dass die Fettsäure-Zusammensetzung der Muttermilch dem des eigenen Fettgewebes ähnelt, wenn man stillende Frauen mit einer energiearmen, fettfreien Diät ernährt (Insull 59). Die Unabhängigkeit der Qualität der Milch von der mütterlichen Nährstoffzufuhr garantiert dem Säugling so in seinen ersten Lebensmonaten eine suffiziente Versorgung.

Um dies sicherzustellen wird während der Stillzeit in den gynoiden Fettspeichern (beispielsweise der Femoralregion) die Aktivität der Lipoproteinlipase erniedrigt sowie die Zahl der α_2-Rezeptoren reduziert (Rebuffe-Scrive 85). Dies lässt in diesen Fettzellen die Katecholaminempfindlichkeit ansteigen und führt so zu einer gesteigerten Mobilisation von Fettsäuren aus dem Gewebe.

Dass die Zusammensetzung des mütterlichen Fettgewebes einen qualitativen Effekt auf das Fettsäuremuster der Muttermilch hat zeigten Martin *et al* in ihren Studien (Martin 91+93). Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass es eine direkte Korrelation zwischen dem Anteil an LA im Fettgewebe und in der Milch gibt. Dies gilt ebenso für das Verhältnis von ALA zu LA, was die interindividuelle Variabilität im Sekretionsmuster der PUFA erklären könnte. Erstaunlicherweise ergab sich jedoch keine Korrelation für ALA in Fettgewebe und Milch. Da ALA im Gegensatz zu LA in der Milch in höheren Konzentrationen als in den mütterlichen Fettzellen vorkommt, könnte dies auf eine selektive Aufnahme von ALA durch die Brustdrüse hinweisen.

Bedeutung der mütterlichen Ernährung. Die Fettsäuren in den Lipiden der Milch sind der einzige Faktor, der durch die mütterliche Ernährung beeinflusst werden kann (Jensen RG 99). Francois *et al* berichten, dass bereits sechs Stunden nach

hochdosierter Gabe von verschiedenen Pflanzen- und Fischölen die jeweiligen Fettsäuren in der Muttermilch ansteigen (Francois 98). Dies wird dadurch erklärt, dass sich etwa drei bis fünf Stunden nach einer Mahlzeit die Chylomikronämie einstellt und die Lipoproteinlipase der Mamma zu extrem schneller hydrolytischer Spaltung der Triglyzeride fähig ist. Nach einer einmaligen Dosis blieb die DHA in der Milch jedoch noch zwei Tage erhöht, bei EPA konnten sogar drei Tage nach Verabreichung noch signifikant höhere Werte gemessen werden. Dies wiederum ist ein Argument für die Speicherung der Fettsäuren in einem weiteren Pool, der nicht den Körperfettspeichern entspricht.

Beeindruckend sind auch die Studien über die Auswirkung langfristiger Ernährungsgewohnheiten auf die Fettsäurezusammensetzung der Muttermilch. Es zeigt sich, dass insbesondere der Gehalt an den essentiellen Fettsäuren ALA und LA großen interindividuellen Schwankungen unterliegt. Hierbei ist der Einfluss von kultureller Tradition, geographischer Region sowie dem sozioökonomischen Status der Mutter auf die Ernährungsweise und damit auf den EFA-Gehalt der Muttermilch seit langem bekannt (Pita 85).

Im Gegensatz dazu ist die Menge an der n-6 LCP AA in der Milch von Frauen aus unterschiedlichen Kulturen erstaunlich konstant und weitgehend unabhängig von der mütterlichen Ernährung. Der Gehalt der Muttermilch an der korrespondierenden n-3 Fettsäure DHA zeigt jedoch eine stärkere Variabilität und wird in einem größeren Maße von der mütterlichen Ernährung bestimmt (Rodriguez 99). So führt beispielsweise der regelmäßige Verzehr von Meeresfisch zu einer Zunahme des DHA-Gehaltes in der Milch (Jensen RG 99).

Des weiteren sind die LCP in der Muttermilch nicht mit der mütterlichen Aufnahme von deren Präkursoren ALA und LA assoziiert. Dies wird besonders deutlich beim Vergleich der Fettsäuremuster in der Milch von Veganern zur Fleisch essenden

Bevölkerung. Diese Frauen, die meist aus religiösen oder weltanschaulichen Gründen Fleisch, Fisch und sonstige tierische Produkte von ihrem Speiseplan streichen, ernähren sich dadurch LCP-frei, jedoch ist ihre Nahrung reich an ALA sowie LA. In ihrer Milch finden sich folglich hohe Konzentrationen an ALA und LA, jedoch nur geringe Mengen an DHA (Sanders 92).

Bemerkenswert ist die Korrelation zwischen dem Anteil der n-3- und n-6-LCP in der Muttermilch (Koletzko 88+92). Da bei der Synthese von DHA und AA aus ALA bzw. LA die gleichen Enzyme verwendet werden (s. **Abb.1**), deutet dies auf interindividuell verschiedene Enzymkapazitäten sowie Unterschiede in der Fähigkeit, LCP zu synthetisieren, hin. Der biologische Sinn, ein Gleichgewicht zwischen den n-3- und n-6-Fettsäuren zu schaffen, könnte in ihrer Funktion als physiologische Antagonisten begründet sein, da beide Gruppen als Präkursoren in der Synthese von Prostaglandinen und Eicosanoiden dienen .

Fragestellungen der vorliegenden Arbeit. In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse einer klinischen Studie bei stillenden Müttern vorgestellt, in der die Stoffwechselwege der α-Linolensäure während der Stillperiode untersucht wurden. Den Frauen wurden am ersten Tag der fünften Laktationswoche 0,6 mg uniform markierter ^{13}C-α-Linolensäure, einem stabilen Isotop, verabreicht. An den folgenden fünf Studientagen wurden in regelmäßigen Abständen Atem- und Milchproben gewonnen. Um auch Einblick in die Ernährungsgewohnheiten der Frauen zu erhalten, führten diese während der gesamten Studienwoche ein Ernährungsprotokoll.

Fragestellungen:

1. In welchem Umfang und in welcher zeitlichen Abfolge wird die mit der Nahrung aufgenommene ALA von den stillenden Frauen oxidiert?

2. Welcher Anteil der mit der Nahrung zugeführten ALA gelangt in die Muttermilch? Welcher Anteil der ALA und ihrer Derivate in der Muttermilch entstammt der mit der Nahrung zugeführten ALA?

3. Wie hoch ist der Prozentsatz der zu ihren langkettigen Derivaten EPA, DPA und DHA metabolisierten ALA?

2 Studienteilnehmer und Methoden

2.1 Studienteilnehmer

Die Teilnehmerinnen der Muttermilchstudie wurden in der I. Frauenklinik der LMU München, Maistraße, rekrutiert. In den ersten Tagen nach der termingerechten Entbindung wurden Mütter zu ihrer Bereitschaft an der Teilnahme an der Studie befragt.

Als Einschlusskriterien wurden festgelegt:

1. Bei der Mutter:
    - Alter der Mutter 19 - 35 Jahre
    - BMI > 19 und < 33 kg/m^2
    - Keine bekannten Stoffwechselstörungen oder gastrointestinale Erkrankungen
    - Keine akuten Infektionskrankheiten
    - Keine Medikamenteneinnahme
    - Keine Diäten
    - Nichtraucher
    - Wunsch der Mutter, ausschließlich zu stillen
2. Beim Neugeborenen:
    - Offenbar gesundes Neugeborenes
    - Termingeburt (zwischen der 38. und 42. SSW)
    - Geburtsgewicht > 3000 und < 4000 Gramm

Bevor die Mütter ihr schriftliches Einverständnis gaben, wurden sie mündlich, sowie mit Hilfe eines Informationsblattes über die Ziele und den Ablauf der Studie und insbesondere über die Unbedenklichkeit des verwendeten Tracers informiert (Anhang). Jede Mutter wurde darauf aufmerksam gemacht, dass sie zu jedem Zeitpunkt der Studie diese ohne Angabe von Gründen abbrechen könne.

2.2 Studiendesign

2.2.1 Ernährung der Mütter während der Studienphase

2.2.1.1 Ernährungsbeschränkungen

Die Studie begann am Montag Morgen der fünften Laktationswoche mit einem standardisierten Frühstück, bestehend aus einer Semmel, 10 Gramm Butter und 15 Gramm Marmelade. Zu diesem Frühstück wurde auch der Tracer verabreicht. Die Teilnehmerinnen wurden gebeten, während der folgenden zwei Stunden nichts zu essen, um die Aufnahme des Tracers nicht zu beeinflussen.
Während der gesamten Studiendauer konnten die Mütter ihre Mahlzeiten frei wählen. Die Teilnehmerinnen wurden lediglich gebeten, in den zwei Tagen vor der Tracergabe und bis zur Abgabe der letzten Probe am Freitag Abend keinen Fisch zu essen, da dieser hohe Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthält. Dies wiederum hätte zu starken Schwankungen in der Zusammensetzung der Proben führen können. Des weiteren durften die Mütter im selben Zeitraum keinen Mais und keine Mais-haltigen Produkte wie z.B. Cornflakes zu sich nehmen. Mais enthält

natürlicherweise einen hohen Anteil an ^{13}C, was wiederum die Messwerte beeinflusst hätte.

2.2.1.2 Dokumentation der Ernährung

Die Ernährung der Mütter während der Studienphase wurde durch Ernährungsprotokolle erfasst. Die Teilnehmerinnen wurden gebeten, die Bezeichnung, die genaue Beschreibung und die Zubereitungsart aller Nahrungsmittel zu notieren, sowie jeden Nahrungsbestandteil vor dem Essen zu wiegen. Zwei Tage vor Studienbeginn wurde mit dem Führen der Protokolle begonnen, so dass die Ernährungsgewohnheiten jeder Mutter über eine ganze Woche dokumentiert werden konnten.
Die Ernährungsprotokolle wurden von einer Ernährungswissenschaftlerin mit Hilfe der Datenbank Prodi 4.4 expert, BLS Version 2.1 ausgewertet.

2.2.2 Vorbereitung und Verabreichung der ^{13}C-markierten α-Linolensäure

Zur Abschätzung der Oxidation und des Transfers der mit der Nahrung aufgenommenen α-Linolensäure in die Muttermilch verabreichten wir die untersuchte Fettsäure gewichtsadaptiert. Die Teilnehmerinnen erhielten 0,6 mg uniform ^{13}C-markierte α-Linolensäure ($^{13}C18:3n-3$) pro Kilogramm Körpergewicht. Zur Berechnung der Tracermenge wurde drei Tage vor Studienbeginn das Gewicht der Mutter erfragt und die errechnete Tracerdosis auf ein Zuckerstück pipettiert. Das

exakte Gewicht der Fettsäure auf dem Zuckerstück wurde für jede Teilnehmerin notiert.

Uniform markierte ^{13}C-α-Linolensäure (98% ^{13}C) wurde von der Firma Martek Biosciences Corp., Columbia, USA, bezogen.

Bis zum Studienbeginn wurde die Fettsäure mit dem Zuckerstück bei –20°C eingefroren, um Verluste durch Oxidation zu vermeiden. Die Mütter wurden angewiesen, den Tracer direkt auf dem Zuckerstück zu sich zu nehmen, ohne den Zucker aufzulösen. Hiermit sollte verhindert werden, dass Teile des Tracers durch Kohäsion am Tassenrand verloren gehen.

2.2.3 Atemproben

2.2.3.1 Gewinnung der Atemproben

Zur Bestimmung des $^{13}CO_2$-Gehaltes in der Ausatemluft wurden die Teilnehmerinnen angeleitet, in einen Atembeutel zu atmen und ein Aliquot der ausgeatmeten Luft anschließend in einen Vaccutainer zu überführen.

Am ersten Studientag wurden nach dieser Methode zunächst zwei Atemproben vor der Tracergabe abgenommen, um den individuellen Basiswert zu erhalten, auf den sich alle nachfolgenden Messungen bezogen (s. **Abb. 2**). Nach Verabreichung des Tracers wurden in stündlichen Intervallen zwölf weitere Atemproben abgegeben, die letzte zwölf Stunden nach Tracergabe. Ab dem zweiten Studientag wurden nur noch drei Atemproben pro Tag abgenommen, die erste 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der Tracergabe und jeweils sechs und zwölf Stunden danach.

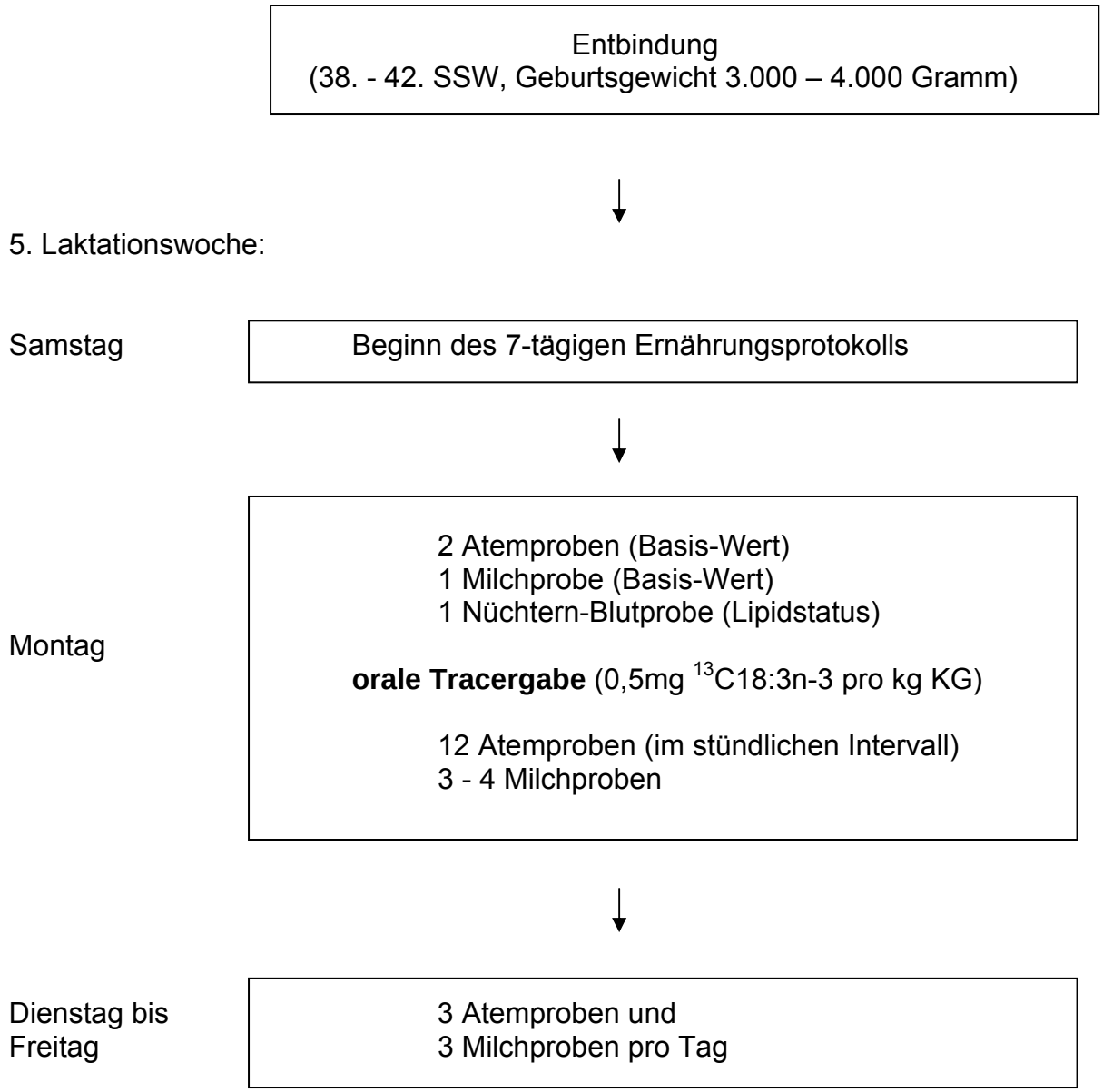

Abb.2: Flussdiagramm des Studienablaufs

Für die durchschnittliche CO_2-Produktion wurde ein Wert von 300 mmol CO_2 pro m^2 Körperoberfläche und Stunde angenommen. Die Körperoberfläche wurde nach der Formel von Haycock, Schwartz und Wisotsky aus der Körpergröße und dem Gewicht der Probanden abgeschätzt (Haycock 78):

$$\text{Körperoberfläche } (m^2) = \text{Gewicht (kg)}^{0,5378} \times \text{Größe (cm)}^{0,3964} \times 0,024265$$

2.2.3.2 Auswertung der ^{13}C-Anreicherung im CO_2 der Ausatemluft

^{13}C-Anreicherung ($\delta^{13}C$). Die Zunahme des ausgeatmeten $^{13}CO_2$ aus der Oxidation der ^{13}C-markierten ALA wurde als $\delta^{13}C$-Wert angegeben. Hierbei wird die ^{13}C-Anreicherung relativ zum Isotopenverhältnis eines natürlichen internationalen Standards (PDB, Pee Dee Belemnite) angegeben.

$\delta^{13}C_{CO2}$ [$^0/_{00}$] = $(R_{CO2} - R_{PDB})/R_{PDB}$ x 1000

R_{CO2} = $^{13}C/^{12}C$ im CO_2 der Ausatemluft

R_{PDB} = $^{13}C/^{12}C$ im PDB-Standard = 0,0112372

Die Berechnung von DOB, des Isotopenverhältnisses R_{CO2}, sowie der APE-Werte und der prozentualen Wiederfindung wurden analog der Muttermilch-Auswertung durchgeführt (vgl. 2.2.4.3).

2.2.4 Muttermilchproben

2.2.4.1 Gewinnung der Muttermilchproben

Zur Analyse der Fettsäurezusammensetzung der Muttermilch sowie der Abschätzung des Transfers der mit der Nahrung aufgenommenen ^{13}C-α-Linolensäure in die Muttermilch wurden zu mehreren Zeitpunkten Milchproben abgenommen.
Die Teilnehmerinnen wurden angeleitet, die Milch entweder mit Hilfe einer elektronischen Milchpumpe oder durch manuelles Ausstreichen der Brust zu gewinnen. Es wurden jeweils 2 ml Vormilch mit 2 ml Nachmilch in einem Plastikröhrchen gemischt, um den ansteigenden Fettgehalt der Muttermilch während

des Stillens zu erfassen (Harzer 83). Die Milchproben wurden von den Müttern im Kühlschrank aufbewahrt und am darauf folgenden Morgen in der Kinderpoliklinik bei –80°C eingefroren.

Am ersten Studientag wurde zunächst eine Milchprobe vor der Verabreichung des Tracers abgegeben und anschließend bei jeder Fütterung des Kindes bis etwa zwölf Stunden nach Tracergabe. An den Studientagen zwei bis fünf wurden jeweils drei Milchproben - morgens, mittags und abends – gewonnen (s. **Abb.2**), wobei der Zeitpunkt der Probenabgabe vom Fütterungswunsch des Kindes abhängig war.

Zur Bestimmung des sezernierten Milchvolumens wurden die Säuglinge jeweils vor und nach dem Stillen gewogen.

2.2.4.2 Berechnung der Fettsäuregehalte der Muttermilchproben

Prozentualer Anteil der Fettsäuren (Gew.%) in der Muttermilch. Zur Bestimmung des prozentualen Anteils der einzelnen Fettsäuren ($Gew\%_{FS}$) wurde die integrierte Fläche jeder Fettsäure durch die Gesamtfläche aller analysierten Fettsäuren dividiert:

$$Gew.\%_{FS} = (Fläche_{FS}/Gesamtfläche) \times 100$$

Absolut sezernierte Menge der Fettsäuren (FS_{abs}). Durch Multiplikation des durchschnittlichen Fettgehalts der Muttermilch mit dem prozentualen Anteil der einzelnen Fettsäuren (Gew.%) und dem Milchvolumen (V_{MM}) wurde die absolute Menge der pro Tag sezernierten Fettsäuren berechnet:

$$FS_{abs}\ (g/Tag) = Fettgehalt\ (g/100ml) \times Gew.\%_{FS} \times V_{MM}\ (ml)/10000$$

2.2.4.3 Auswertung der ^{13}C-Anreicherung in den Fettsäuren der Muttermilch

^{13}C-Anreicherung ($\delta^{13}C$). Zur Bestimmung des $\delta^{13}C$-Wertes wurde die ^{13}C-Anreicherung der untersuchten Fettsäure in der Muttermilch mit dem Isotopen-Verhältnis des PDB-Standards verglichen.

$\delta^{13}C_{FS}$ [$^0/_{00}$] = ($R_{FS} - R_{PDB}$)/R_{PDB} x 1000

R_{FS} = $^{13}C/^{12}C$ der untersuchten Fettsäure

R_{PDB} = $^{13}C/^{12}C$ im PDB-Standard = 0,0112372

Delta over baseline (DOB). Die ^{13}C-Anreicherungen werden in dieser Arbeit als DOB-Werte dargestellt. Hierbei wird der am ersten Tag vor der Tracer-Gabe gemessene Basiswert als Nulllinie deklariert, auf den sich die im Folgenden gemessenen Anreicherungen beziehen.

DOB_x = $\delta^{13}C_{FSx}$ [$^0/_{00}$] - $\delta^{13}C_{FS\ Basis\text{-}Wert}$ [$^0/_{00}$]

Berechnung des Isotopenverhältnisses ($^{13}C/^{12}C$) der Fettsäuren (R_{FS}). Die in der Gaschromatographie erhaltenen $\delta^{13}C$-Werte ($\delta^{13}C_{FS}$) wurden mit Hilfe der folgenden Formel für die individuellen Fettsäuren umgerechnet:

R_{FS} = R_{PDB} + ($\delta^{13}C_{FS}$ x R_{PDB}/1000)

R_{PDB} = 0,0112372

Atom Percent Excess (APE-Werte). Aus dem Isotopenverhältnis konnten wiederum die APE-Werte berechnet werden, die angeben, um wie viel Prozentpunkte sich die

Anreicherung der jeweiligen Substanz zum Zeitpunkt x (AP_{FSx}) von der natürlichen Anreicherung (AP_{FS0}) unterscheidet.

Der AP-Wert (^{13}C Atom-Prozent) drückt den prozentualen Anteil der ^{13}C-Atome an allen Kohlenstoffatomen einer Fettsäure aus.

$AP_{FS} = R_{FS}/(R_{FS} + 1) \times 100$

$APE_{FS} = AP_{FSx} – AP_{FS0}$

^{13}C-Anteil in µMol. Der ^{13}C-Anteil der untersuchten Fettsäuren in der Muttermilch ($µMol_{FS}$) an der Gesamtheit der C-Atome (C_{FS}) wurde mit folgender Formel berechnet:

$µMol_{FS} = (C_{FS}[mMol] \times APE_{FS}/100) \times 1000$

Prozentualer Anteil des Tracers. Der in der Muttermilch zum Zeitpunkt x wiedergefundene Tracer (% Tracer) wurde auch als prozentualer Anteil der zugeführten Tracerdosis ausgedrückt.

$\%\ Tracer_x = µMol_{FS} \times 100/(µMol_{Anreicherung} \times Gew.\%_{FS})$

Kumulative Wiederfindung. Durch Addition der zu den unterschiedlichen Zeitpunkten erhaltenen prozentualen Anteile des Tracers konnte die kumulative Wiederfindung berechnet werden.

$kum.\ Wiederfindung_{FS,\ Zeit\ n}\ (\%) = \%Tracer_n + kum.\ Wiederfindung_{FS\ n-1}$

2.2.5 Blutproben

Um den Lipidstatus der Mütter zu Beginn der Studie zu erfassen, erfolgte am Morgen des ersten Studientages eine Blutentnahme. Die Teilnehmerinnen waren zu diesem Zeitpunkt nüchtern. Dabei wurden 5 ml Blut durch Venenpunktion gewonnen, in Serum-Röhrchen gefüllt und im Stoffwechsel-Labor der Kinderpoliklinik zentrifugiert (5 Minuten, 2000 rpm). Das Serum wurde in Plastikröhrchen pipettiert und im Institut für Klinische Chemie in Großhadern gemäß den Routine-Methoden des Labors analysiert.

2.3 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS für Windows (Version 8.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Zur Beurteilung von Korrelationen zwischen den einzelnen Parametern wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient (r) berechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ gesetzt.

Die klinischen Daten sowie die Auswertungen der Tracer-Studie sind als Mittelwert und Standardfehler (MW $\pm$ SE) angegeben.

2.4 Ethische Aspekte

2.4.1 Verwendung von stabilen Isotopen bei stillenden Müttern

Die Verwendung von stabilen Isotopen hat sich in der pädiatrischen Forschung bereits vor vielen Jahren etabliert. Stabile Isotope, insbesondere ^{13}C, gelten als gesundheitlich unbedenklich und sind frei von Nebenwirkungen (Sauerwald 96). In vielen Studien an stillenden Müttern und Neugeborenen hat sich gezeigt, dass selbst vergleichsweise hohe Anreicherungen von ^{13}C keine nachteiligen Effekte auf die Stillende oder ihr Baby haben (Fidler 2000.1, Demmelmair 95 u. 97, Koletzko 97, Sauerwald 97)

2.4.2 Ethik-Kommission

Das Studienprotokoll wurde vor Beginn der Rekrutierung der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München, vorgelegt.
Die Studie wurde von der prüfenden Kommission genehmigt.

2.5 Analytische Methoden

2.5.1 Geräte und Reagenzien

Geräte:

Analysenwaage, Sartorius R-200 D, Göttingen

Entwicklungskammer, Desaga, Heidelberg

Exsikkator

Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator, Merck 1925.1000, Darmstadt

Metallblock-Thermostat, Bachhofer GmbH, Typ 2102, Reutlingen

Pipette, Brand Transferpette 10-100 µl, Wertheim

Pipetten, abimed 1-10 µl, 10-100µl, 50-250 µl, Langenfeld

Pipetten, Eppendorf 1-10 µl, 10-100 µl, 50-250 µl, 200-1000 µl, 500-2500 µl

Thermoplatte S Desaga, Heidelberg

Ultraschallbad Sonorex Super, Bandelin electronic, Berlin

UV-Lampe, „no name“, Hongkong

Vortexer, Janke und Kunkel IKA-Labortechnik VF 2, Heitersheim

Zentrifuge Universal 30 F, Hetterich, Tuttlingen

Verbrauchsmaterialien:

Bördelkappe R 11-1.0, Nr. 301014, CS-Chromatographie Service, Langerwehe

Dichtscheibe G 13, Nr. 300357, CS-Chromatographie Service, Langerwehe

Dichtscheibe G 15, Nr. 300326, CS-Chromatographie Service, Langerwehe

Dichtscheibe, Nr. 18083, Merck, Darmstadt

Federn, Chromacol 500 X MTS-1, Trumbull (USA)

Flasche G 4, braun, Nr. 300106, CS-Chromatographie Service, Langerwehe

Flasche G 8, klar, Nr. 300130, CS-Chromatographie Service, Langerwehe

Flasche R 1, braun, Nr. 300005, CS-Chromatographie Service, Langerwehe

Microvials, Chromacol 1000 X 02-MTV, Trumbull (USA)

Pasteurpipetten, Brand 7477 15, Wertheim

Pipettenspitzen für CP 10 und CP 100, abimed, Langenfeld

Pipettenspitzen für Eppendorf-Pipetten, Greiner, Frickenhausen

Rollrandfläschchen G 1, braun, Nr. 300102, CS-Chromatographie Service, Langerwehe

Schraubkappe G 8-L, Nr. 300305, CS-Chromatographie Service, Langerwehe

Schraubkappe G 13, Nr. 300307, CS-Chromatographie Service, Langerwehe

Schraubkappe G 15, Nr. 300328, CS-Chromatographie Service, Langerwehe

Chemikalien:

2,6 Di-tert.-butyl-p-kresol (BHT), Fluka 34750, Buchs (Schweiz)

2,7 Dichlorfluorescein, Merck 9676, Darmstadt

2-Propanol, Merck 1.09634.1000, Darmstadt

Aqua ad iniectabilia, Pharmacia, Erlangen

Chloroform, Rathburn RG 2009, Walkerburn (Schottland)

DC-Platten Kieselgel 60, Merck 1.05721, Darmstadt

Diisopropylether, Baker 8072, Deventer (Holland)

Essigsäure 100% (Eisessig), Merck 1.00063, Darmstadt

Ethanol absolut, Merck 1.00983.2500, Darmstadt

Kaliumoxalat, Sigma P-3917, Steinheim

Methanol LiChrosolv, gradient grade, Merck 1.06007.2500, Darmstadt

Methanolische-HCl 3N, Supelco 3-3050, Bellefonte (USA)

Natriumcarbonat, Merck 6392.0500, Darmstadt

Natriumhydrogencarbonat, Merck 1.06329.1000, Darmstadt

Natriumsulfat, Merck 1.06649.1000, Darmstadt

n-Hexan LiChrosolv, Merck 1.04391.1000, Darmstadt

Petroleumbenzin Kp. 40-60°C, Merck 1.01775, Darmstadt

Tert.-butyl-methylether, Fluka 20249, Neu-Ulm

2.5.2 Methoden zur Fettsäureanalytik der Milchproben

2.5.2.1 Fettextraktion

Der Fettgehalt der Milch wurde gravimetrisch nach einer modifizierten Methode von Brühl (Brühl 94) und Matissek et al. (Matissek 89) bestimmt.
Zunächst wurden die Milchproben auf Zimmertemperatur aufgetaut und anschließend auf 38°C im Wasserbad temperiert, um eine homogene Verteilung des Fettes zu erreichen (Jensen RG 89). Ein Aliquot von 1 ml der Muttermilch wurde in 10-ml Glasröhrchen pipettiert und das Fett mit der Zugabe von 100 µl Kaliumoxalatlösung (3,5 g Kaliumoxalat/100 ml destilliertes Wasser), 1 ml Ethanol, 1ml Tert.-butyl-methylether und 1 ml Petrolether extrahiert. Nach jeder Zugabe von Chemikalien wurden die Proben gut geschüttelt. Die Proben wurden bei 2000 rpm 10 Minuten lang zur Phasentrennung zentrifugiert. Die obere organische Phase wurde in vorher abgewogene 4 ml-Braungläschen überführt und unter einem Stickstoffstrom eingeengt. In der zweiten Stufe der Extraktion wurde zu der verbliebenen Ethanolphase 1 ml Tert.-butyl-methylether und 1 ml Petrolether zugegeben, gut geschüttelt, zentrifugiert (10 Minuten, 2000 rpm), die obere organische Phase mit dem vorher getrockneten Extrakt vereinigt und ebenfalls unter Stickstoff eingeengt.

Das Fettextrakt wurde 24 Stunden im Exsikkator nachgetrocknet und durch erneutes Wiegen des 4 ml-Braungläschen die extrahierte Fettmenge ermittelt, und der Fettgehalt der Milch (g Fett/ml Muttermilch) berechnet.

2.5.2.2 Fettsäurederivatisierung

Das extrahierte Fett wurde in 1 ml methanolischer HCl (3N), 1 ml Methanol und 0,5 ml Hexan aufgelöst, gut umgeschwenkt und im Thermoblock bei 90°C eine Stunde lang erhitzt. Nach Überführung der gesamten Probe in Schliffröhrchen wurden zur Phasentrennung 2 ml Aqua dest. und 3 ml Hexan + BHT (2 g/l), enthaltend 0.2% 2,6 Di-tert.-butyl-p-kresol (BHT), zugegeben. 200 µl der Hexanphase wurden in GC-Vials eingefüllt und bis zur gaschromatographischen Analyse bei –80°C gelagert.

2.5.2.3 Gaschromatographie

Die Fettsäuren wurden mittels Gaschromatographie (GC) an einem Hewlett Packard 5890, Serie II, Gaschromatograph aufgetrennt, der mit einem HP 7376 Autosampler, einem split/splitless-Injektionssystem mit einem Splitverhältnis von 1:20 und einem Flammenionisationsdetektor (FID) ausgestattet ist. Die Injektion von 3 µl Probenvolumen erfolgte bei einer Injektortemperatur von 250°C. Als Trennsäule wurde eine 60 m Sinterquarz-Kapillare (BPX-70-Trennsäule, SGE GmbH, Weiterstadt, Deutschland) mit einem Innendurchmesser von 0.32 mm und einer polaren Belegung aus Bicyanopropyl-polysiloxan (mittlere Schichtdichte 0,25 µm) verwendet. Zur Analyse wurde die Temperatur des Säulenofens von einer

Ausgangstemperatur von 130°C zuerst mit 4°C/min auf 180°C, anschließend mit 3°C/min von 180°C auf 200°C und zuletzt mit 1°C/min von 200°C auf die Schlusstemperatur von 210°C erhöht. Diese Temperatur wurde bis zum Abschluss der Gaschromatographie gehalten. Die Temperatur des Detektors betrug 250°C. Als Trägergas diente Helium. Der Vordruck des Heliums wurde von einem Startdruck von 1,0 bar mit 0,02 bar/min während der gesamten Laufzeit des Chromatogrammes erhöht.

Zur Quantifizierung wurden die Peakflächen integriert und die Flächenprozente als Gewichtsprozente (Gw%) angegeben. Die Peak-Identifikation erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten mit geeigneten Standardsubstanzen (GLC Reference Standard). Die „Response“ -Faktoren in der quantitativen Referenzmischung (Nu Chek Prep, Inc.) lagen im Bereich von 0,95 bis 1,03.

2.5.2.4 Massenspektrometrie (GC-C-IRMS)

Die Isotopen-Analyse der individuellen Fettsäuremethylester wurde am gaschromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometer (GC-C-IRMS), der einen HP 5890 GC und einen IRMS (Finnigan MAT delta S, Bremen, Deutschland) umfasste, durchgeführt. Jede Probe wurde doppelt gemessen (Demmelmair 95 und 98).

3 Ergebnisse

3.1 Fettsäureanalytik

Durch den Vergleich mit den Peaks des Standardgemisches konnten durch die in 2.5.2 beschriebene Methode mittels gaschromatographischer Auftrennung folgende Fettsäuren in der Muttermilch identifiziert werden:

Gesättigte Fettsäuren: C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0.

Einfach ungesättigte Fettsäuren: C14:1t, C14:1n-5, C15:1n-5, C16:1t, C16:1n-7, C17:1n-7, C18:1n-9, C18:1n-7, C20:1n-9, C22:1t, C22:1n-9, C24:1n-9.

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren: C18:2tt, C18:2n-6, C18:3n-6, C18:3n-3, C18:4n-3, C20:3n-9, C20:2n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C20:3n-3, C20:5n-3, C22:2n-6, C22:4n-6, C22:5n-6, C22:5n-3, C22:6n-3.

Die identifizierten Fettsäuren dienten als Basis für die Bestimmung der prozentualen Fettsäuregehalte in den Muttermilchproben. **Abb. 3** zeigt exemplarisch die gaschromatographische Auftrennung von Fettsäuren nach Isolierung aus der Muttermilch.

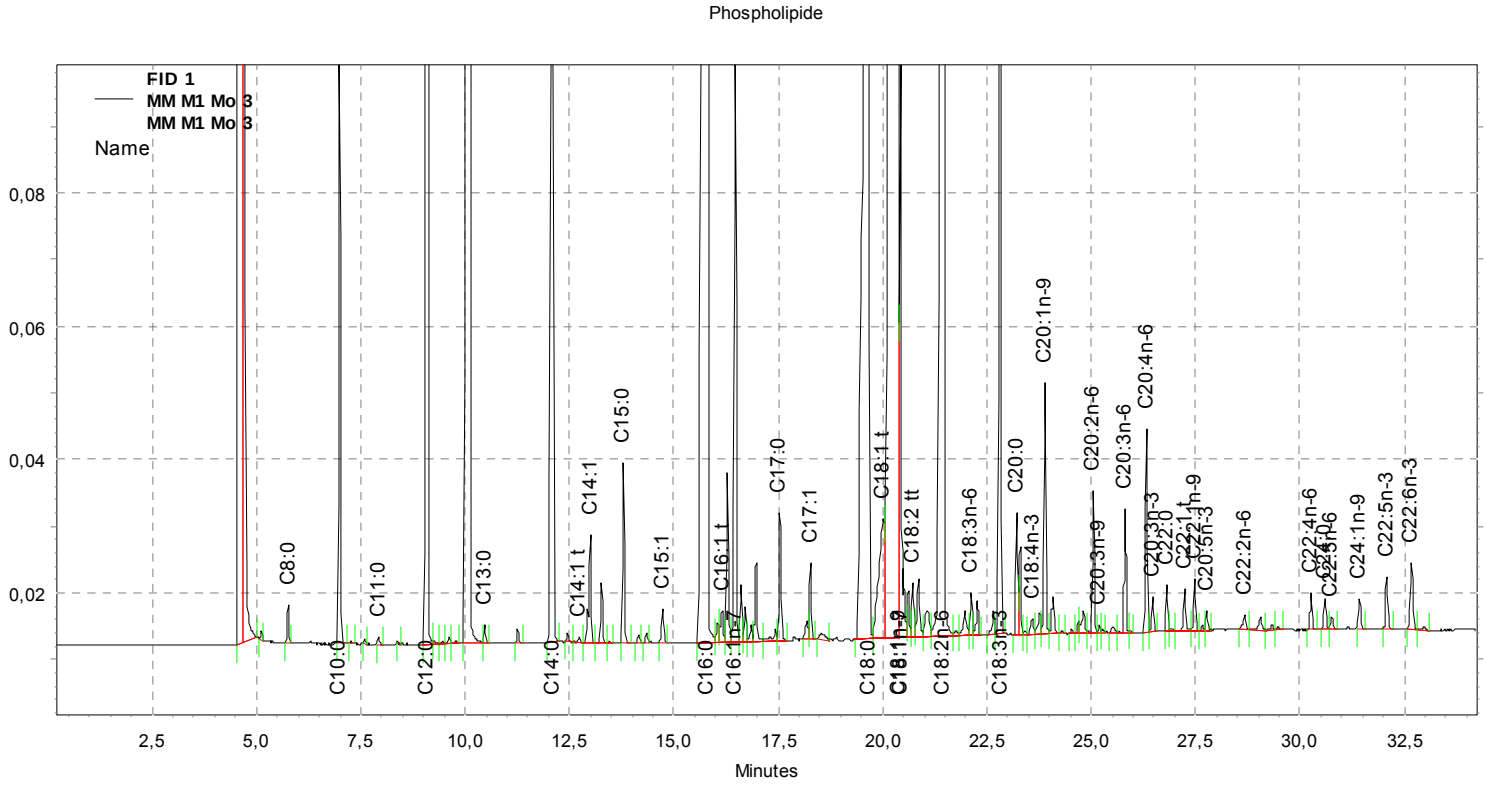

Abb.3 Gaschromatographische Auftrennung von Fettsäuren der Muttermilch.

3.2 Klinische Charakteristiken der Studienteilnehmerinnen

Die Rekrutierung der Studienteilnehmerinnen erfolgte von Oktober 1999 bis April 2000 auf der Wöchnerinnenstation der I. Frauenklinik, Maistraße. Wie geplant wurden zehn Frauen nach Prüfung der Einschlusskriterien in die Studie aufgenommen. **Tab.1** zeigt die klinischen Charakteristika der zehn teilnehmenden Mütter und ihrer Säuglinge.

Die Studie wurde von allen Teilnehmerinnen vollständig abgeschlossen.

Tab. 1 Klinische Charakteristika der Mütter und ihrer Säuglinge (MW ± SEM)

Alter (Jahre)	32,6 ± 0,8
Größe (cm)	169 ± 2
Gewicht vor Schwangerschaft (kg)	62,8 ± 2,4
BMI (kg/m^2)	22,0 ± 0,9
Gewicht vor Entbindung (kg)	78,4 ± 2,6
BMI (kg/m^2)	27,5 ± 1,0
Gewicht bei Studienbeginn (kg)	67,3 ± 2,3
BMI (kg/m^2)	23,6 ± 0,9
Serum Cholesterin (mg/dl)	222 ± 16
LDL (mg/dl)	129 ± 13
HDL (mg/dl)	80 ± 5
Serum Triglyzeride (mg/dl)	75 ± 11
Geburtsgewicht des Kindes (g)	3536 ± 111
Gewicht bei Studienbeginn (g)	4640 ± 227

3.3 Ernährung der Studienteilnehmerinnen

Zur Auswertung der Ernährungsprotokolle der Mütter wurde das Programm Prodi 4.4 expert (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Germany; BLS version 2.1) verwendet. Hierdurch wurde die Berechnung der alimentären Zufuhr folgender Fettsäuren ermöglicht:

Gesättigte Fettsäuren: C14:0, C15:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0.

Einfach ungesättigte Fettsäuren: C14:1n-5, C16:1n-7, C18:1n-9, C20:1n-9, C22:1n-9, C24:1n-9.

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren: C18:2n-6, C18:3n-3, C20:4n-6, C20:5n-3, C22:5n-3, C22:6n-3.

Tab. 2 zeigt die mittlere Energie- und Nahrungszufuhr der teilnehmenden Mütter während des Studienzeitraums. Diese lag im Rahmen der für mitteleuropäische Verhältnisse üblichen Werte (Heseker).

Tab. 2 Energie- und Nährstoffzufuhr der Studienteilnehmerinnen im Studienzeitraum (MW ± SEM)

Energiezufuhr (MJ/d)	9,4 ± 0,1
Fett (Energie%)	41,4 ± 1,1
Kohlenhydrate (Energie%)	44,5 ± 1,9
Protein (Energie%)	14,4 ± 0,4
ALA (mg/d)	1404 ± 102
EPA (mg/d)	13 ± 3
DPA (mg/d)	60 ± 27
DHA (mg/d)	107 ± 24
LA (mg/d)	8633 ± 790
AA (mg/d)	214 ± 46

3.4 Oxidation

3.4.1 ^{13}C-Anreicherung im CO_2 der Ausatemluft

Die ^{13}C-Anreicherungen im CO_2 der Ausatemluft sind in **Abb. 4** dargestellt.

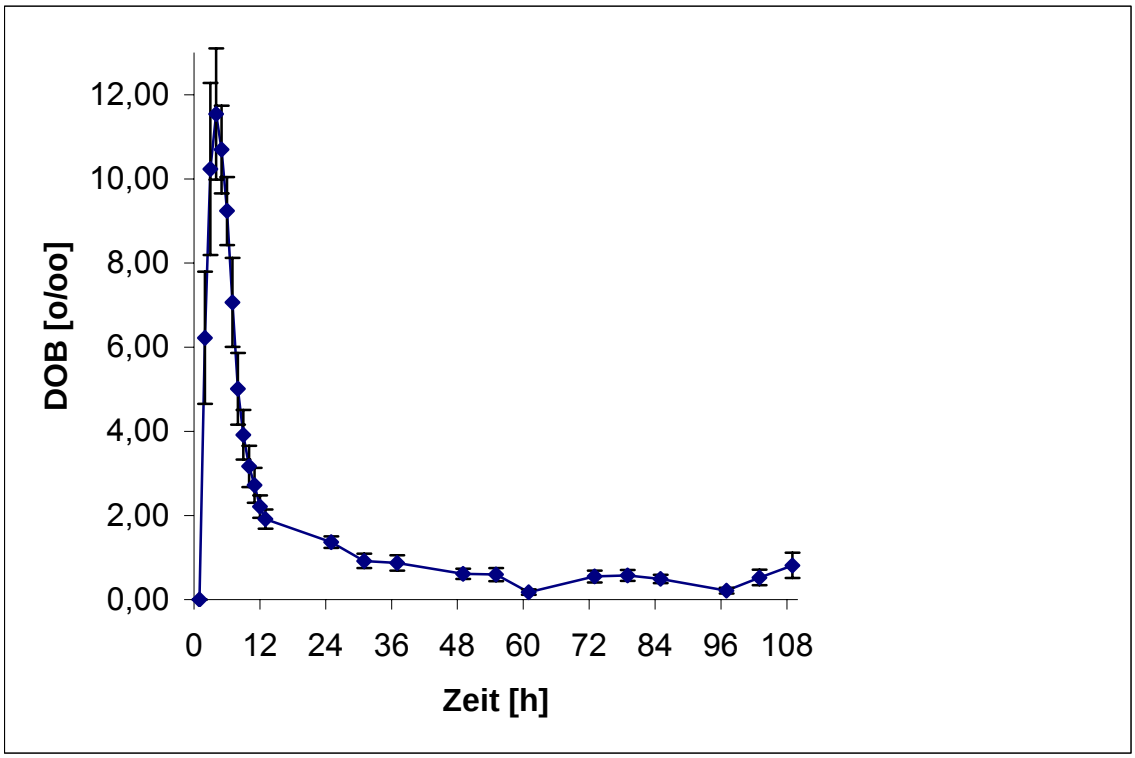

Abb. 4 ^{13}C-Anreicherung im CO_2 der Ausatemluft (DOB, $^{o}/_{oo}$, MW $\pm$ SEM).

Wie in der Graphik erkennbar, nimmt die ^{13}C-Anreicherung im CO_2 der Ausatemluft während der ersten drei Stunden nach Verabreichung des Tracers stark zu. In weiteren neun Stunden fällt die Kurve steil ab, um sich in den folgenden Tagen ihrem Basiswert anzunähern.

Diese Tendenz zeigt sich auch in der kumulativen Wiederfindung des Tracers in der Ausatemluft (**Abb. 5**). Nach etwa 48 Stunden wird hier ein Plateau erreicht, da in den letzten drei Studientagen nur noch minimale Tracermengen oxidiert wurden.
Die maximale ^{13}C-Anreicherung im CO_2 der Ausatemluft trat durchschnittlich drei Stunden nach Tracergabe auf. Jedoch wurde bei zwei Müttern bereits nach zwei Stunden Maximalwerte gefunden, während zwei weitere Teilnehmerinnen erst sechs Stunden nach Verabreichung des Tracers die höchste $^{13}CO_2$-Anreicherung in der Ausatemluft zeigten.
Am Ende der Studienwoche, 108 Stunden nach Tracerapplikation, zeigt sich eine kumulative Wiederfindung von 37,5 $\pm$ 2,7 % der verabreichten Tracerdosis in der Ausatemluft.

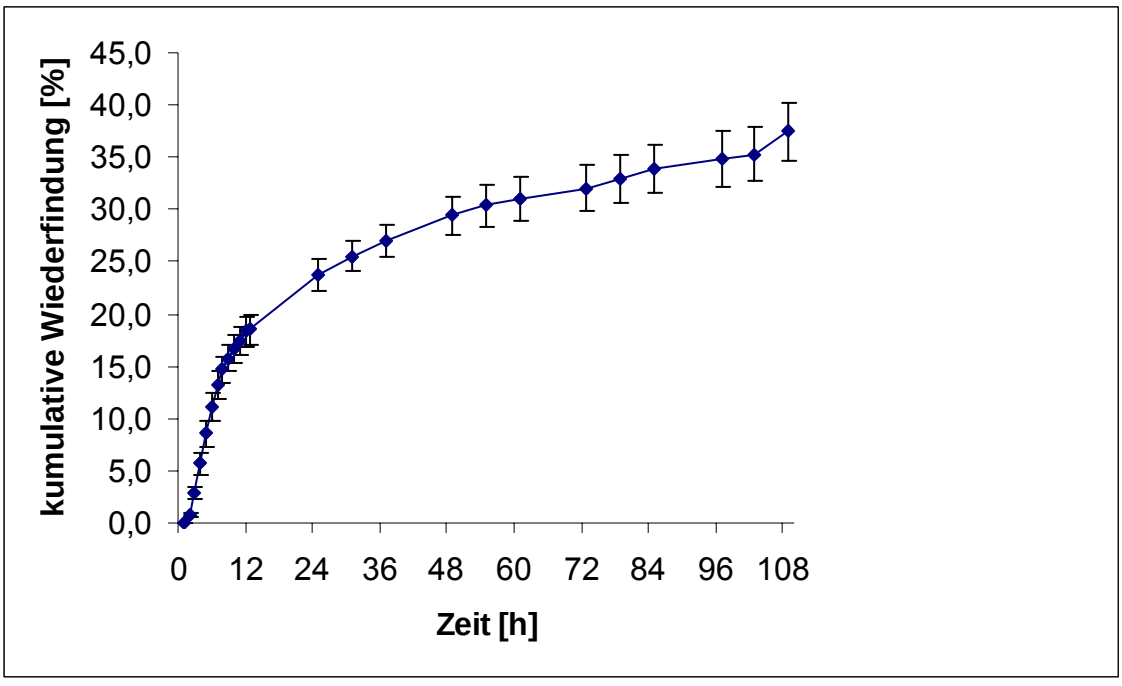

Abb. 5 Kumulative Wiederfindung von $^{13}CO_2$ in der Ausatemluft

Die Oxidation der mit der Nahrung aufgenommenen α-Linolensäure variierte erheblich zwischen den Studienteilnehmerinnnen. So lag die kumulative Oxidationsrate zwölf Stunden nach Tracergabe zwischen 9,0 und 23,2 % (18,5 $\pm$ 1,5 %, M $\pm$ SEM), sowie zwischen 20,3 und 44,0 % nach 108 Stunden (37,5 $\pm$ 2,7 %).

3.5 Muttermilch

3.5.1 Fettgehalt und Volumen der Muttermilch

Die mittlere Trinkmenge der Säuglinge in der fünften Woche nach der Geburt lag bei 696 ± 25 ml Milch pro Tag. Die Muttermilch-Proben wiesen einen durchschnittlichen Fettgehalt von 2,9 ± 0,3 g/100ml auf.

Tab. 3 zeigt die durchschnittlich täglich sezernierte Menge verschiedener Fettsäuren der n-3 und n-6 Reihe im Studienzeitraum.

Tab. 3 Tägliche Sekretion ausgewählter Fettsäuren (mg/die, MW ± SEM)

ALA-Sekretion	168,7 ± 23,1
EPA-Sekretion	13,3 ± 2,6
DPA-Sekretion	34,3 ± 3,0
DHA-Sekretion	49,7 ± 4,8
LA-Sekretion	1972 ± 112
AA-Sekretion	90,0 ± 1,2

3.5.2 Fettsäurezusammensetzung der Muttermilchproben

Die durchschnittliche prozentuale Fettsäurezusammensetzung der Muttermilchproben ist in **Tab. 4** dargestellt.

Das Verhältnis von LA zu ALA lag mit 13,07 ± 0,89 (MW ± SEM) im Bereich der von anderen Autoren veröffentlichen Werte (Jensen CL 97, Jensen RC 99). Gleiches gilt für das Verhältnis von AA zu DHA (1,94 ± 0,12).

Für die Summe der n-6 LCP (1,23 ± 0,07%) und der n-3 LCP (0,52 ± 0,05%), sowie deren Verhältnis (2,37 ± 0,06) wurden vergleichbare Werte in anderen Studien publiziert (Fidler 00, JensenR 99, Koletzko 88+92).

Tab.4 Fettsäuregehalte der Muttermilchproben [% Gesamtfettsäuren] (MW ± SEM)

SFA:	
C12:0	4,68 ± 0,28
C14:0	6,61 ± 0,21
C16:0	24,22 ± 0,50
C18:0	7,75 ± 0,44
C20:0	0,23 ± 0,01
Summe SFA	45,97 ± 0,88
MUFA:	
C14:1n-5	0,44 ± 0,03
C16:1n-7	2,71 ± 0,20
C18:1n-7	1,83 ± 0,07
C18:1n-9	34,29 ± 0,72
C20:1n-9	0,44 ± 0,01
C22:1n-9	0,08 ± 0,00
C24:1n-9	0,06 ± 0,01
Summe MUFA	41,38 ± 0,75
Trans-FA:	
C16:1t	0,17 ± 0,03
C18:1t	0,82 ± 0,09
C18:2tt	0,20 ± 0,01
C22:1t	0,09 ± 0,00
Summe trans-FA	1,30 ± 0,12
PUFA :	
C20:3n-9	0,02 ± 0,00
C18:2n-6	9,70 ± 0,55
C18:3n-6	0,15 ± 0,01
C20:2n-6	0,26 ± 0,02
C20:3n-6	0,36 ± 0,02
C20:4n-6	0,44 ± 0,03
C22:2n-6	0,03 ± 0,00
C22:4n-6	0,09 ± 0,01
C22:5n-6	0,04 ± 0,00
C18:3n-3	0,79 ± 0,09
C18:4n-3	0,06 ± 0,01
C20:3n-3	0,05 ± 0,00
C20:5n-3	0,07 ± 0,01
C22:5n-3	0,17 ± 0,01
C22:6n-3	0,24 ± 0,02
Summe PUFA	12,67 ± 0,65
Summe LCP	1,78 ± 0,18
LA/ALA	13,07 ± 0,89
AA/DHA	1,94 ± 0,12
PUFA/SFA	0,28 ± 0,02
MUFA/SFA	0,91 ± 0,03

3.5.3 ^{13}C-Anreicherung in den n-3 Fettsäuren der Muttermilch nach Gabe von ^{13}C-markierter α-Linolensäure

Die ^{13}C-Anreicherungen in der Muttermilch wurden in den n-3 PUFA C18:3n-3 (ALA), C20:5n-3 (EPA), C22:5n-3 (DPA) und C22:6n-3 (DHA) bestimmt.

7,3 ± 1,1% der mit der Nahrung zugeführten ALA wurde während des Studienzeitraumes in der Muttermilch wiedergefunden. Im Vergleich hierzu konnten nur sehr geringe Mengen des Tracers in Form der Konversionsprodukte der ALA detektiert werden. So wurden 0,09 ± 0,02% der Tracerdosis als EPA in der Muttermilch gefunden, 0,10 ± 0,00% als DPA, sowie 0,01 ± 0,00% als DHA (s. **Abb.6**).

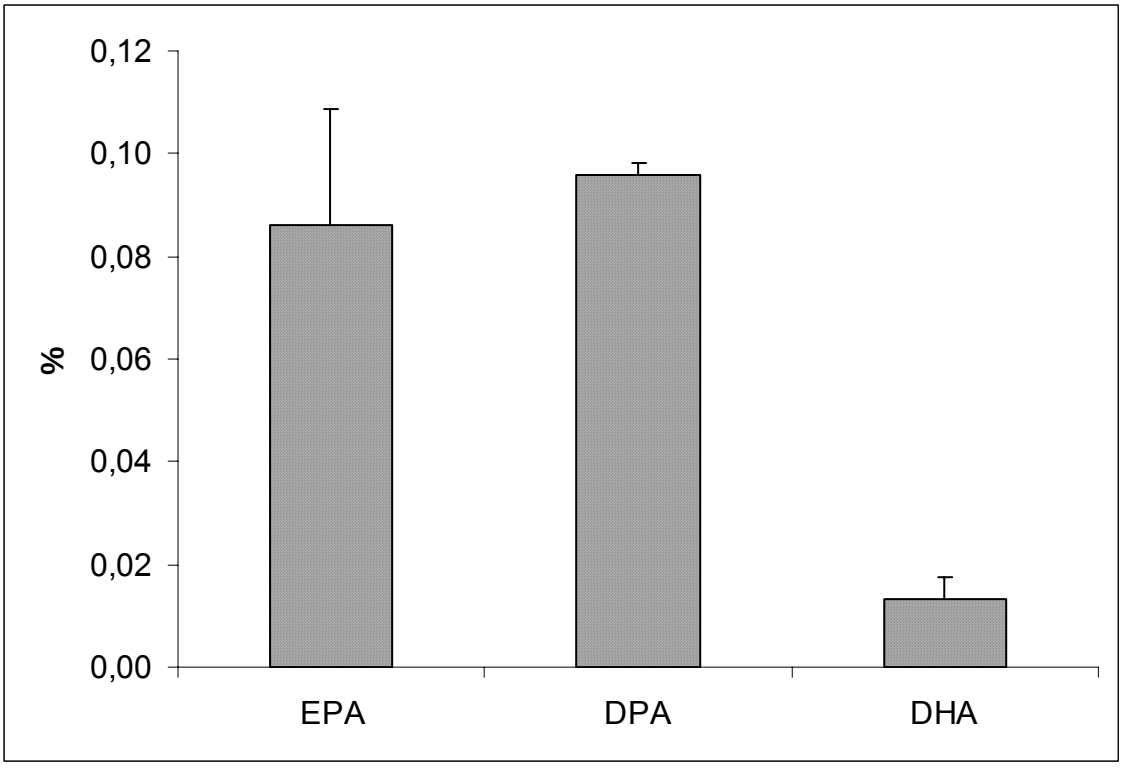

Abb.6 Anteil der der Nahrungs-ALA entstammenden n-3 LCP in der Muttermilch

Durch Berechnung der täglich absolut sezernierten Menge an n-3 Fettsäuren und durch Extrapolation der Tracerdaten konnte geschätzt werden, dass etwa 65% der ALA in der Muttermilch direkt aus der mütterlichen Nahrung stammt. Weiterhin kommen 11% der EPA in der Milch sowie 4% der DPA und 0,4% der DHA direkt aus der alimentär zugeführten ALA.

3.5.3.1 ^{13}C-Anreicherung in der α-Linolensäure (ALA) der Muttermilch

Abb. 7 zeigt die Anreicherung von ^{13}C-α-Linolensäure in der Muttermilch.

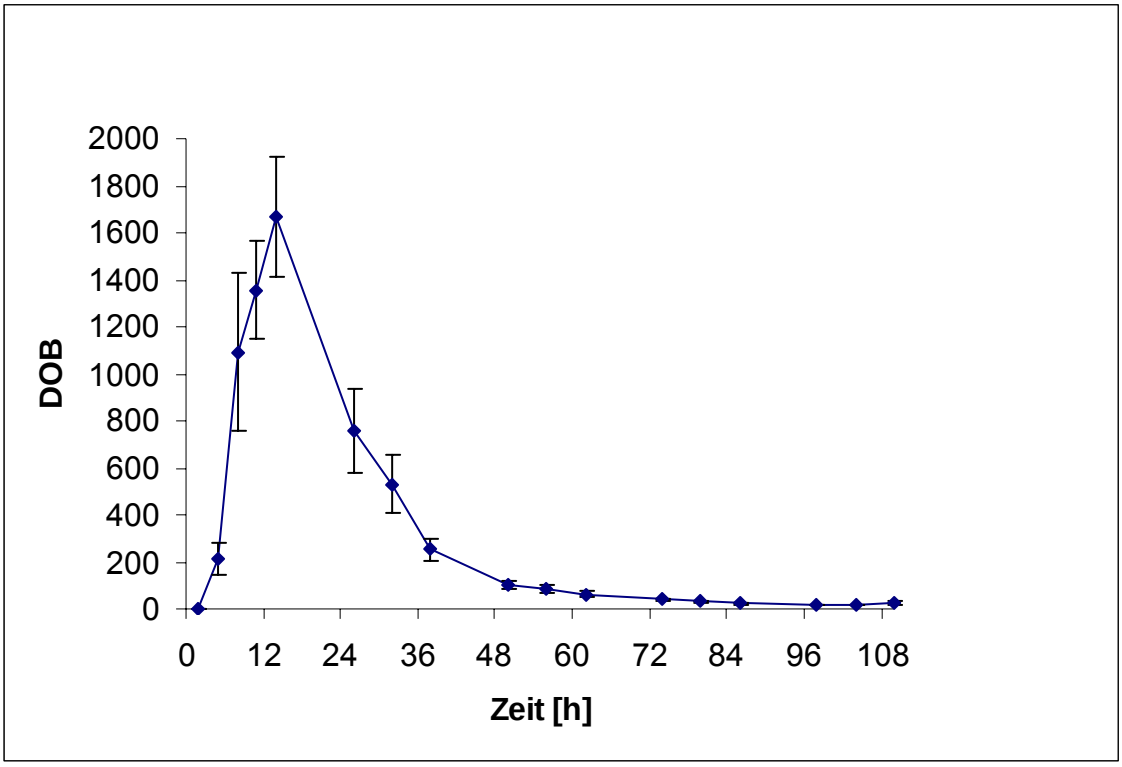

Abb. 7 ^{13}C-Anreicherung in der α-Linolensäure (DOB, $^{o}/_{oo}$, M ± SEM).

Wie in **Abb. 7** ersichtlich, nimmt die Sekretion der ^{13}C-markierten α-Linolensäure in die Muttermilch in den ersten Stunden nach Tracergabe massiv zu, um nach zwölf

Stunden ihr Maximum zu erreichen. Am zweiten Studientag vermindern sich die ^{13}C-Anreicherungen kontinuierlich, um sich 48 Stunden nach Tracerverabreichung langsam dem Ausgangswert anzunähern.

Abb. 8 zeigt die kumulative Wiederfindung der ^{13}C-markierten α-Linolensäure in der Muttermilch. Hier zeigt sich, dass bereits 30 Stunden nach Tracerverabreichung ein Plateau erreicht wird und der größte Anteil der mit der Nahrung aufgenommenen α-Linolensäure in den ersten 24 Stunden nach Aufnahme in die Muttermilch sezerniert wird.

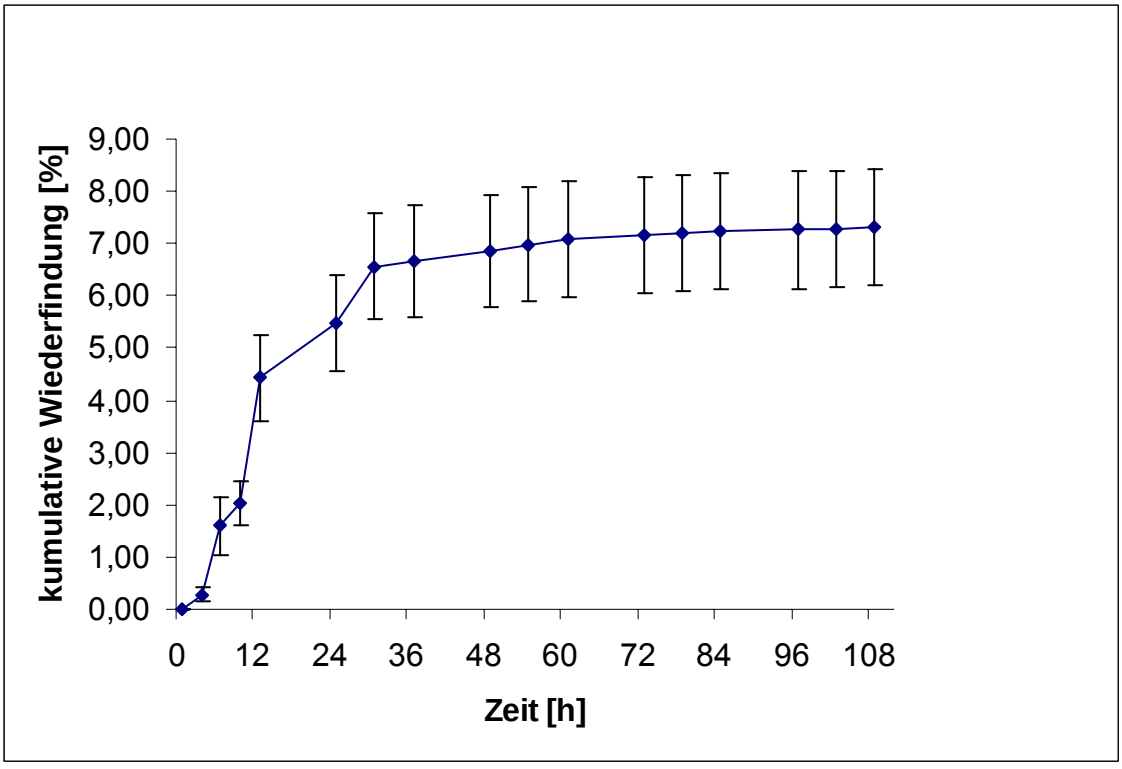

Abb. 8 Kumulative Wiederfindung von ^{13}C-markierter α-Linolensäure (ALA)

3.5.3.2 ^{13}C-Anreicherung in der Eicosapentaensäure (EPA) der Muttermilch

Abb. 9 zeigt die Anreicherung von ^{13}C-Eicosapentaensäure in der Muttermilch.

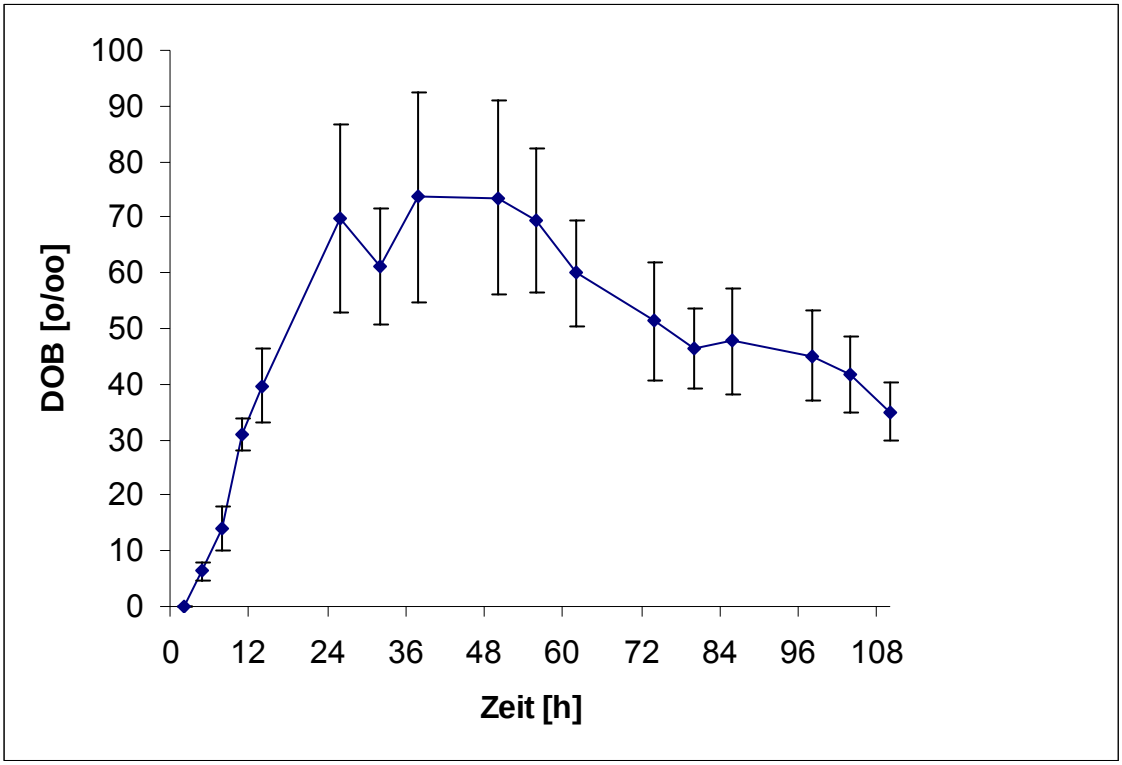

Abb. 9 ^{13}C-Anreicherung in der Eicosapentaensäure (DOB, $^{o}/_{oo}$, M $\pm$ SEM).

Die Graphik (**Abb. 9**) zeigt einen im Vergleich zur α-Linolensäure langsameren Anstieg der ^{13}C-Anreicherung der EPA in der Muttermilch. Maximale Anreicherungen werden erst 36 bis 48 Stunden nach Tracergabe erreicht. Auch der Abfall der Kurve verläuft träge und erreicht bei Studienende erst 50% der maximalen Anreicherung. Dies spiegelt sich auch in der Kurve der kumulativen Wiederfindung der EPA in der Muttermilch wider (**Abb. 10**), die bei Studienende noch kein Plateau erreicht und weiterhin ansteigt.

Ein weiterer Unterschied zur α-Linolensäure besteht darin, dass die EPA lediglich maximale Werte von 70°/₀₀ DOB erreicht, während die Anreicherungen der ALA bis zu 1700°/₀₀ DOB betragen. Dies spiegelt sich auch in der kumulativen Wiederfindung der beiden Fettsäuren in der Muttermilch wider (**Abb. 8** und **10**). So wurden 7,3 % der verabreichten Tracerdosis als ALA in der Muttermilch gefunden, jedoch lediglich 0,1 % in Form der EPA (**Abb.6**).

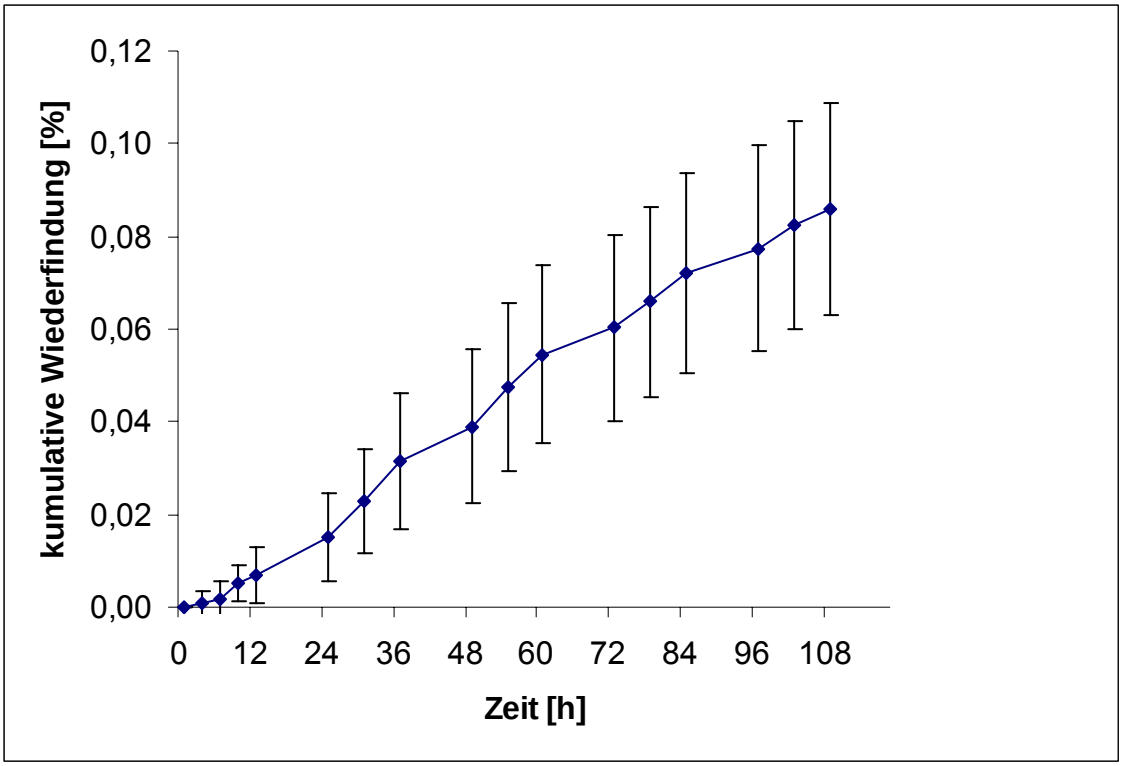

Abb. 10 Kumulative Wiederfindung von ^{13}C-markierter Eicosapentaensäure (EPA)

3.5.3.3 ^{13}C-Anreicherung in der Docosapentaensäure (DPA) der Muttermilch

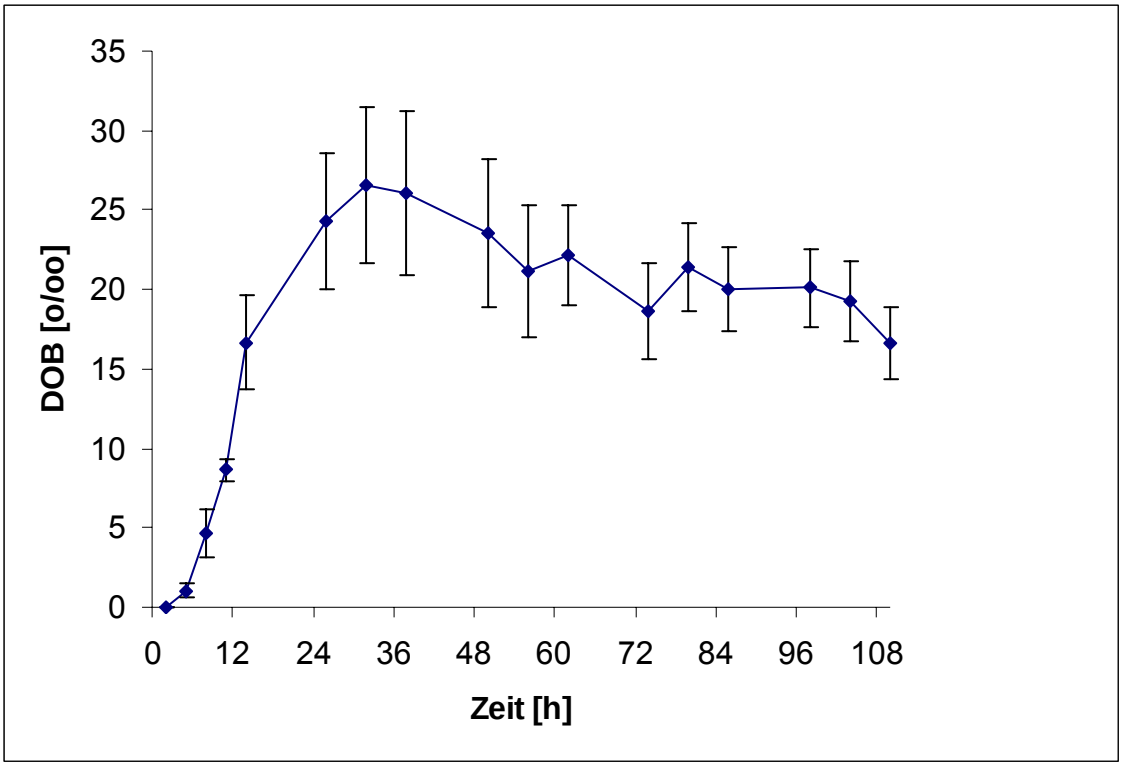

Abb. 11 ^{13}C-Anreicherung in der Docosapentaensäure (DOB, $^{o}/_{oo}$, MW ± SEM).

Der Verlauf der Anreicherung der ^{13}C-markierten Docosapentaensäure in der Muttermilch ähnelt weitgehend dem der EPA (**Abb. 9** und **11**). Die maximale Anreicherung wird nach etwa 30 Stunden erreicht und auch die ^{13}C-DPA fällt bis Studienende nur bis etwa 60% ihrer maximalen Anreicherung ab.

Für die kumulative Wiederfindung der DPA und der EPA ergeben sich nahezu identische Werte (**Abb. 6** und **12**). Aus **Abb. 12** ist ersichtlich, dass die ^{13}C-markierte DPA bei Studienende noch kein Plateau erreicht hat, sondern weiterhin ansteigt.

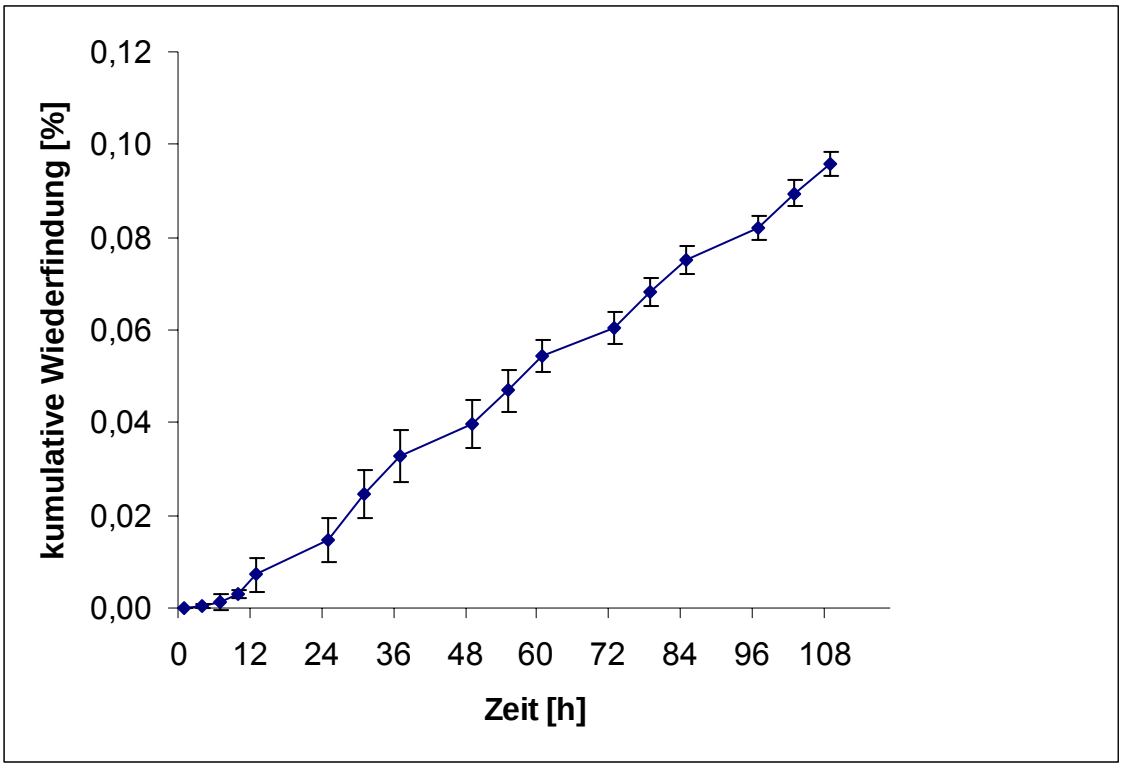

Abb. 12 Kumulative Wiederfindung von ^{13}C-markierter Docosapentaensäure (DPA)

3.5.3.4 ^{13}C-Anreicherung in der Docosahexaensäure (DHA) der Muttermilch

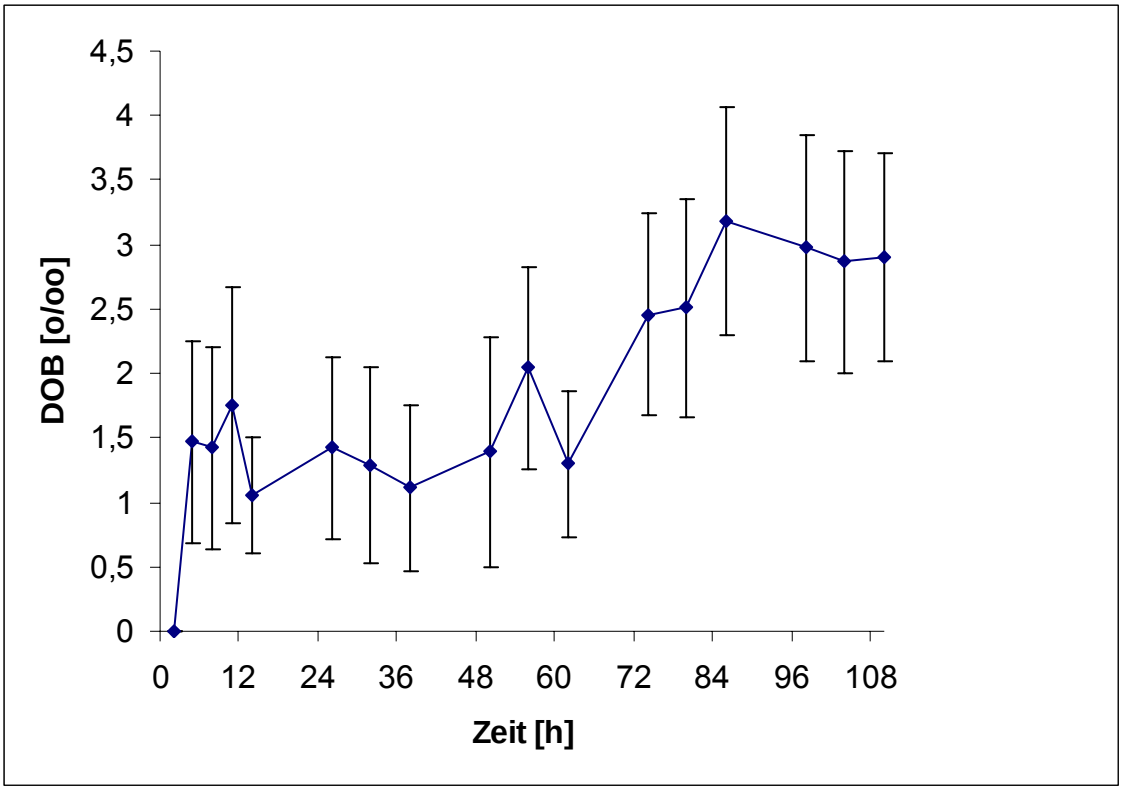

Abb. 13 ^{13}C-Anreicherung in der Docosahexaensäure (DOB, $^{o}/_{oo}$, MW ± SEM).

Die Messung der ^{13}C-markierten DHA bewegte sich an den Grenzen der technischen Möglichkeiten, was sich auch an den großen Standardfehlern zeigt (**Abb. 13**).

Jedoch war lediglich bei einer Studienteilnehmerin das Konversionsprodukt der α-Linolensäure in der Muttermilch nicht nachweisbar.

Wie bereits ihre beiden Präkursoren EPA und DPA zeigt die ^{13}C-DHA ihre maximale Anreicherung etwa 30 Stunden nach Tracergabe und fällt danach nur langsam ab. Auch die Kurve der kumulativen Wiederfindung deutet auf einen weiteren Anstieg über das Studienende hinaus hin (**Abb. 14**).

In der Kurve der kumulativen Wiederfindung zeigt sich ein erster deutlicher Anstieg erst bei 24 Stunden.

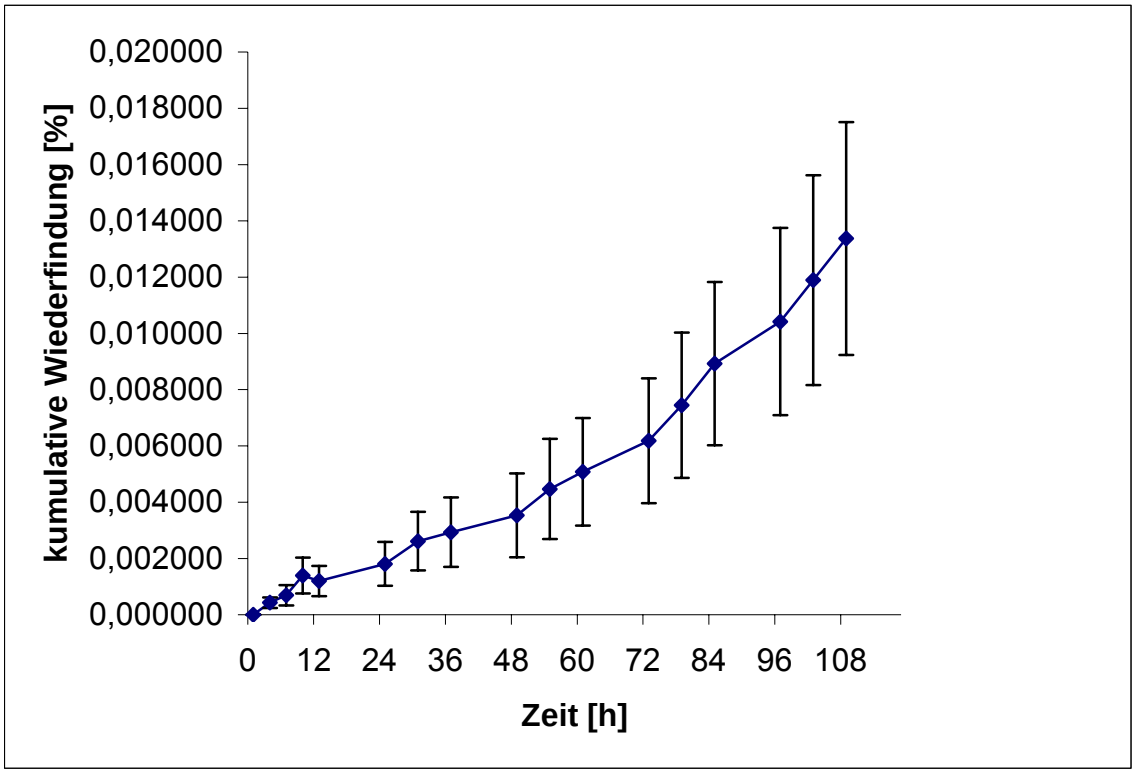

Abb. 14 Kumulative Wiederfindung von ^{13}C-markierter Docosahexaensäure (DHA)

3.5.4 Korrelation der ^{13}C-markierten Fettsäuren in der Muttermilch

Der Zusammenhang zwischen der kumulativen Wiederfindung der ^{13}C-markierten Fettsäuren ALA, EPA, DPA und DHA in der Muttermilch wurde mit Hilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten berechnet.

Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen der kumulativen Wiederfindung von ALA und DPA ($r = 0,64$; $p < 0,05$) (**Abb.15**). Weiterhin wurde eine hochsignifikante Korrelation für die kumulative Wiederfindung von EPA und DPA ($r = 0,90$; $p < 0,01$) (**Abb.16**) nachgewiesen.

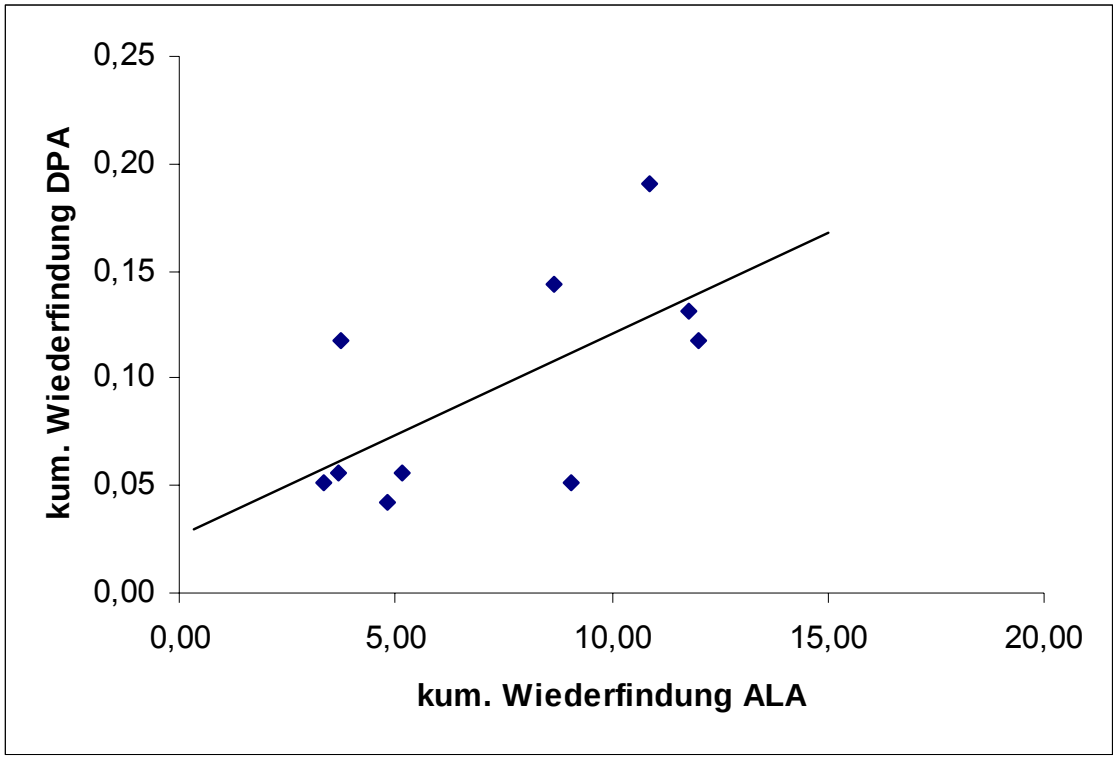

Abb. 15: Korrelation zwischen der kumulativen Wiederfindung von ^{13}C-markierter ALA und DPA in der Muttermilch

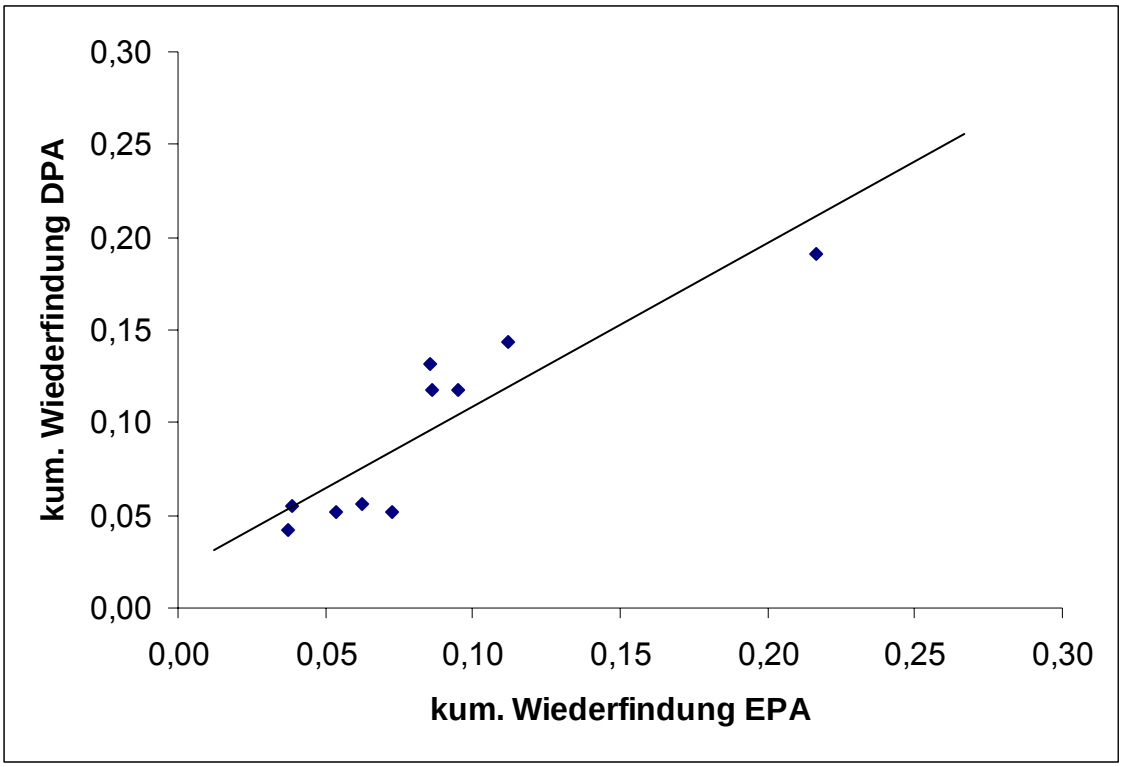

Abb. 16: Korrelation zwischen der kumulativen Wiederfindung von ^{13}C-markierter EPA und DPA in der Muttermilch

3.5.5 Korrelation zwischen den n-3 und n-6 Fettsäuren in der Muttermilch

Die Summe der n-3 und der n-6 Fettsäuren in der Muttermilch zeigte eine signifikante Korrelation ($r = 0,76$; $p < 0,05$).

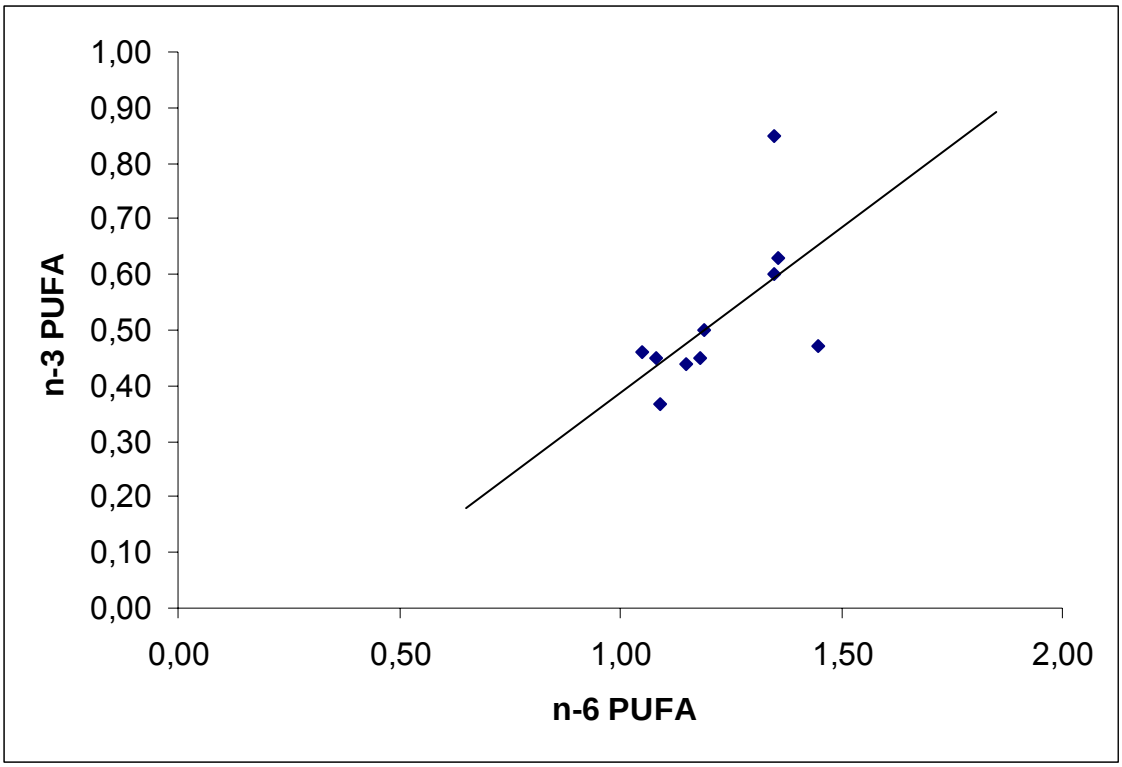

Abb. 17: Korrelation der n-3 und n-6 PUFA in der Muttermilch

3.5.6 Zusammenhang zwischen der Oxidation ^{13}C-markierter ALA und der Fettsekretion in die Muttermilch

Der Zusammenhang zwischen der Oxidation ^{13}C-markierter ALA und der Fettsekretion in die Muttermilch wurde mit Hilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten berechnet.

Der prozentuale Anteil der zum Zeitpunkt von zwölf Stunden nach Tracergabe oxidierten ^{13}C-ALA korrelierte hochsignifikant negativ mit dem Fettgehalt der Muttermilch ($r = -0,81$; $p < 0,01$).

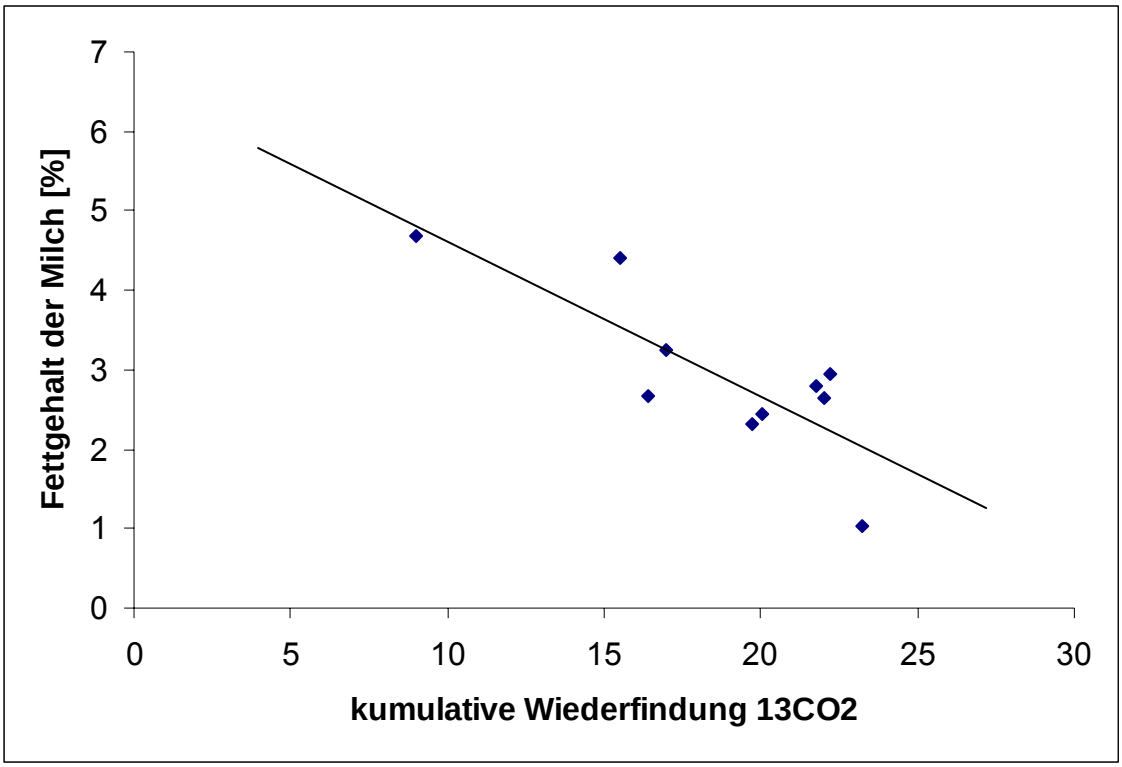

Abb. 18: Korrelation zwischen der Oxidation ^{13}C-markierter ALA und der Fettsekretion in die Muttermilch

4 Diskussion

4.1 Beurteilung der Ernährung, der Muttermilch und der metabolischen Situation der Studienteilnehmer

Die Rekrutierung der Studienteilnehmer erfolgte sowohl auf der Privat- wie auch auf der Allgemeinen Wöchnerinnenstation der I. Frauenklinik, Maistraße. Die häufigsten Gründe für die Nichterfüllung der Einschlusskriterien waren das Alter der Mutter (> 35 Jahre) und Nikotinkonsum. Eine der Probandinnen musste am ersten Studientag – jedoch noch vor der Tracergabe – aufgrund einer akuten Infektionskrankheit von der Teilnahme an der Studie ausgeschlossen werden. Eine weitere Mutter erkrankte am fünften Studientag an einem grippalen Infekt. In diesem Fall wurde die Probandin aufgrund der nicht zu erwartenden entscheidenden Beeinflussung der Ergebnisse am letzten Studientag trotzdem in der Studie belassen. Die Studie wurde von allen teilnehmenden Müttern bis zum Ende durchgeführt.
Unsere Studienteilnehmerinnen waren überwiegend von deutscher Nationalität, jedoch hatten wir ebenso eine britische und eine spanische Probandin.
Drei Teilnehmerinnen waren Primiparae, bei fünf Müttern wurde die Laktationsperiode nach der zweiten Geburt untersucht, bei weiteren zwei Frauen nach der dritten Geburt. In der Vergangenheit wurde spekuliert, dass sich die Muttermilch, die nach der Geburt des ersten Kindes produziert wird von derjenigen nach der Geburt der darauffolgenden Kinder unterscheidet. Spear *et al*, die zwei aufeinanderfolgende Laktationsperioden bei einer Frau untersuchten, konnten jedoch zeigen, dass – mit Ausnahme des Kolostrums – die prozentuale Verteilung der Fettsäuren in der Muttermilch wie auch im Serum beinahe konstant ist (Spear 92).

Voraussetzung hierfür ist selbstverständlich, dass sich die Ernährungsgewohnheiten der Frau nicht gravierend verändert haben.

Die Nahrungsaufnahme unserer Probandinnen, die von einer Ökotrophologin der Kinderklinik beurteilt wurde, spiegelte typische mitteleuropäische Ernährungsgewohnheiten wider. Hierbei besteht ein großer Anteil der Nahrung aus Fett, während die Kohlenhydratzufuhr prozentual zu niedrig liegt (Heseker 96).

Schwierig gestaltete sich die Evaluation der mit der Nahrung zugeführten Fettsäuren EPA, DPA und DHA. Die Beurteilung der Zufuhr dieser Fettsäuren muss als äußerst unpräzise betrachtet werden, da die Nahrung der Mütter – u.a. aufgrund des Verzichts auf Fischverzehr im Studienzeitraum – diese Fettsäuren nur in Spuren enthielt. Darüber hinaus stellte die von uns zur Evaluation der Ernährung verwendete Datenbank nicht für alle Arten von Nahrungsmitteln vollständige Informationen zur Verfügung.

An dieser Stelle muss jedoch betont werden, dass der Einfluss der Ernährung auf den Metabolismus der ALA keine Zielgröße dieser Studie darstellte. Daher ist auch das Studiendesign für definitive Schlussfolgerungen hinsichtlich der Ernährung nicht geeignet. Der Einfluss verschiedener Ernährungsweisen auf die Oxidation von Fettsäuren sowie auf die Fettsäurezusammensetzung der Muttermilch wurde im Rahmen anderer Studien untersucht (Vermunt 00, Fidler 00, Sanders 78, 92, 99).

Lipidstatus. Am Morgen des ersten Studientags wurde bei allen Müttern eine Nüchtern-Blutprobe gewonnen, um daraus ein Plasma-Lipidprofil zu bestimmen. Hierbei fiel auf, dass zwei der Probanden ein erhöhtes Lp(a) aufwiesen sowie fünf Mütter erhöhte Cholesterin-Werte hatten (Gesamt-Cholesterin > 200 mg/dl). Die Triglyzerid-Werte lagen jedoch bei allen Teilnehmerinnen im Normbereich. Eine passagere Hyperlipidaemie in den ersten Wochen der Stillzeit ist in der Literatur beschrieben worden (Qureshi 99). Erklären lässt sich diese durch den in dieser

Periode erhöhten Stoffwechselumsatz der Lipide und durch ihren Transport von Körperspeichern zur Brustdrüse.

Muttermilch. Die Gewinnung der Milchproben erfolgte – dem Fütterungswunsch des Kindes entsprechend – zu nicht näher definierten Zeitpunkten am Morgen, mittags und abends. Wie bereits vor vielen Jahren beschrieben konnte auch anhand unserer Milchproben verifiziert werden, dass die Fettsäurezusammensetzung der Muttermilch unabhängig von der Tageszeit ist (Harzer 83). Der prozentuale Anteil der Fettsäuren in der Muttermilch verändert sich außerdem auch während einer Stillmahlzeit nicht (Gibson 80). Die Fettkonzentration der Milch, die einen bedeutenden Faktor bei den Berechnungen unserer Studie darstellt, nimmt jedoch während des Stillvorgangs zu (Bitman 83, Harzer 83). Um den tatsächlichen durchschnittlichen Fettgehalt einer Milchmahlzeit zu bestimmen müsste man die Milch vor der Fütterung des Babys vollständig abpumpen und daraus eine Probe gewinnen. Da dies im Rahmen unserer Studie zu aufwändig erschien, dieser Aspekt aber trotzdem zu berücksichtigen war, wurden je gleiche Teile der fettarmen Vormilch mit der fetthaltigeren Nachmilch gemischt und daraus der mittlere Fettgehalt der Probe bestimmt.

Vor eine weitere Herausforderung stellte uns die Bestimmung der vom Säugling getrunkenen Milchmenge. Geplant war das Wiegen des Kindes jeweils vor und nach dem Stillen und die folgende Berechnung der Milchmenge aus der Differenz der erhaltenen Werte. Jedoch stellte uns die praktische Durchführung vor folgende Probleme: Erstens war es oft schwierig oder sogar unmöglich, das exakte Gewicht eines hungrigen, weinenden Säuglings vor dem Stillen zu bestimmen und zweitens weigerte sich die Mehrzahl der Mütter, auch nachts Messungen durchzuführen. Deshalb entschieden wir uns dafür, für jeden Säugling aus den gemessenen Werten eine durchschnittliche Trinkmenge pro Mahlzeit zu bestimmen. Diese galt dann als repräsentativ für jede zugeführte Mahlzeit.

Trotz großer interindividueller Unterschiede lag die Milchproduktion, die Milchfettkonzentration sowie die Fettsäurezusammensetzung der Muttermilch in unserer Studienpopulation innerhalb der Normgrenzen für die europäische Bevölkerung (Koletzko 88+92).

Entscheidend beim Vergleich der Fettsäuregehalte der Muttermilch mit anderen Studien ist es, die Laktationsdauer zu berücksichtigen, da es im ersten Monat nach der Geburt des Kindes zu beträchtlichen Schwankungen des Fettsäuremusters in der Milch kommt (Genzel 97). In ihrer Studie über die Fettsäurezusammensetzung der Muttermilch in den ersten 30 Tagen nach der Geburt fanden Genzel und Mitarbeiter einen signifikanten Anstieg der gesättigten Fettsäuren C10:0 und C12:0, sowie von ALA und LA bis zu Tag zehn, während sie einen Abfall der DHA und AA sowie der Summe der n-3 und n-6 LCP beobachten konnten (Genzel 97).

Die Summe der gesättigten Fettsäuren betrug in unserer Studie 45,97% und war mit den von Genzel 30 Tage nach Termingeburt gemessenen Werten vergleichbar (44,30%) (Genzel 96). Den Hauptvertreter der einfach ungesättigten Fettsäuren stellte die Ölsäure mit 34,29% dar, was im Bereich der Werte von Genzel (31,50%) und den von Koletzko bei deutschen Müttern gemessenen Werten (29,82-39,69%) liegt. Der Linolsäuregehalt der Muttermilch lag in unserer Studienpopulation mit 9,70% leicht unter dem Mittelwert von Genzel (11,33%), jedoch zeigte sich bereits in der Studie von Koletzko eine große Variationsbreite des Linolsäuregehalts (5,58-21,65%, Median 10,76%). Ähnliche Werte wie bei Genzel und Koletzko wurden für die γ-Linolensäure und die Arachidonsäure gemessen. Gleiches gilt für die Summe der n-6 LCP.

N-3 Fettsäuren in der Muttermilch. Im Unterschied zu anderen Fettsäuren der Muttermilch ist die ALA einer vergleichsweise großen Schwankungsbreite unterworfen (Koletzko 88). Ein Grund hierfür könnte sein, dass der ALA-Gehalt der

Muttermilch mehr als andere Fettsäuren von den Ernährungsgewohnheiten der Mutter abhängig ist. So konnte Sanders bei veganischen Frauen, deren Nahrung ALA-reich ist, im Vergleich zur Normalbevölkerung einen fast dreifach höheren ALA-Anteil in der Muttermilch messen (1,36% und 0,49%) (Sanders 92+99). Die höchsten ALA-Gehalte wurden von Chulei *et al* in der Milch chinesischer Mütter gemessen (2,08% - 3,03%), wobei extrem hohe Werte von über 3% vor allem bei Frauen, die nahe der Meeresküste lebten, auftraten (Chulei 95). Ein sehr niedriger ALA-Gehalt der Muttermilch von 0,09% wurde bei nigerianischen Frauen gemessen (Koletzko 91). In einer weiteren Studie an schwer mangelernährten nigerianischen Müttern mit einem BMI zwischen 16,4 und 20,2 war ALA in der Milch nicht mehr nachweisbar (Glew 95). Der ALA-Gehalt lag in unserer Studie mit 0,79% nahe den von Koletzko (0,81%) und Genzel (0,90%) gemessenen Werten, die für eine mitteleuropäische Ernährungsweise repräsentativ sind.

EPA lag in unserer Studie mit 0,07% etwas über den Werten von Genzel (0,04%) und Koletzko (0,05%). Ähnliche Werte wie in den beiden zitierten Studien konnten wiederum für DPA (0,17%; Koletzko: 0,17%; Genzel: 0,15%) und DHA (0,24%; Koletzko: 0,22%; Genzel: 0,23%) gemessen werden.

In unserer Studie korrelierte die Summe der n-3 Fettsäuren in der Muttermilch mit der Summe der n-6 Fettsäuren sowie der Gehalt an n-3 LCP und n-6 LCP signifikant. Diese Zusammenhänge wurden bereits in früheren Studien beschrieben (Koletzko 88+92). Man vermutet, dass neben der Ernährung auch individuelle Faktoren für den LCP-Gehalt der Muttermilch verantwortlich sind. Hierbei könnten Unterschiede in der Kapazität der Enzymsysteme zur LCP-Synthese oder der Sekretion von Fettsäuren in die Muttermilch von Bedeutung sein.

4.2 Beurteilung der verwendeten Methodik und des Studiendesigns

4.2.1 Verwendung von stabilen Isotopen

Durch den Einsatz von stabilen Isotopen wurde es möglich, Stoffwechselwege im Körper zu verfolgen und sogar qualitative und quantitative Aussagen über deren Anreicherung in Körpergeweben zu treffen. Mit Hilfe von Isotopen können so dynamische Stoffwechselvorgänge – wie beispielsweise die Oxidation einer Fettsäure im zeitlichen Verlauf – sichtbar gemacht werden. Dies erlaubt ein über die statische Beschreibung hinausreichendes Verständnis des Organismus und seiner metabolischen Situation.
Die Verwendung von radioaktiven Isotopen ist aufgrund der damit verbundenen gesundheitlichen Risiken beim Menschen – insbesondere bei stillenden Frauen – ethisch nicht vertretbar. Untersuchungen mit radioaktiv markierten Substanzen an Tieren können jedoch oft nur mit Einschränkungen Rückschlüsse auf die Stoffwechselsituation des Menschen zulassen. Erst mit der Einführung stabiler Isotope und der nachfolgenden Entwicklung sensitiver Messgeräte wurde es möglich, *in vivo* Untersuchungen auch beim Menschen durchzuführen.

Das in unserer Studie verwendete stabile Isotop ^{13}C ist eine natürlich vorkommende Variante des Kohlenstoffs, die auch in unserer Nahrung enthalten ist. Abhängig von der Ernährungsweise und Oxidationsvorgängen variiert die natürliche Anreicherung des Körpers an ^{13}C. Um dies zu berücksichtigen ist die Bestimmung eines Basiswertes der ^{13}C-Anreicherung in den zu untersuchenden Elementen vor der Tracer-Gabe erforderlich. Außerdem sollte während der gesamten Studiendauer eine Minimierung der Zufuhr ^{13}C-angereicherter Nahrungsmittel erfolgen, um einer

Verfälschung der Messwerte entgegenzuwirken. Diese Faktoren fanden bei unserer Studie Berücksichtigung.

4.2.2 Studiendesign

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten wurde der Beginn der Tracerstudie bei jeder Probandin in die fünfte Laktationswoche gelegt. Zu diesem Zeitpunkt kann man davon ausgehen, dass sich die Milchbildung bei den stillenden Müttern bereits eingespielt hat und auch anfängliche Schwankungen beim Übergang von Kolostrum zu reifer Muttermilch überwunden sind. In einer vorangegangenen Studie, in der nach Gabe von ^{13}C18:2n-6 die Desaturation und Elongation der Linolsäure zu C20:3n-6 und C20:4n-6 untersucht wurde, konnte in der zweiten, sechsten und zwölften Laktationswoche kein signifikanter Unterschied im Transfer der Fettsäuren in die Muttermilch sowie deren Metabolisierung zu LC-PUFA festgestellt werden (Demmelmair 98).

Der Basiswert zur Festlegung der natürlichen Anreicherung von ^{13}C in den n-3 Fettsäuren der Muttermilch wurde am ersten Studientag aus einer Milchprobe unmittelbar vor der Tracergabe festgelegt. Die Probandinnen wurden gebeten, bereits zwei Tage vor Studienbeginn keine Maisprodukte zu sich zu nehmen, um eine mögliche Verfälschung des Basiswertes zu vermeiden. Zum gleichen Zeitpunkt wurde auch eine Atemprobe zur Ermittlung des Ausgangswertes von $^{13}CO_2$ in der Ausatemluft gewonnen.

Als Menge des verabreichten Tracers wurde – sowohl aus ökonomischen Gründen wie auch aus Gründen der metabolischen Einflussnahme – eine vergleichsweise niedrige Dosierung gewählt (Wolfe 92). Es wurde angestrebt, dass die Menge der verabreichten ^{13}C-markierten ALA nicht mehr als 5% der täglich mit der Nahrung

aufgenommenen ALA betragen sollte, da andernfalls eine veränderte metabolische Reaktionslage möglich gewesen wäre. Die Tracerdosis musste jedoch auch ausreichend hoch und an das Körpergewicht der Probandin angepasst gewählt werden, da sich der Tracer trotz der erwarteten Verteilung in die verschiedenen Kompartimente des Körpers noch in den untersuchten Medien nachweisen lassen sollte.

In der bereits erwähnten Studie, in der der Metabolismus der Linolsäure bei stillenden Frauen untersucht wurde, zeigte sich eine Dosierung von 1mg ^{13}C18:2n-6 pro Kilogramm Körpergewicht als geeignet (Demmelmair 98). Da die alimentäre Zufuhr von ALA nur etwa 15% der Zufuhr von LA beträgt und die Menge von ALA in der Muttermilch nur etwa 9% derer von LA ausmacht, wurde eine Dosis von 0,5mg ^{13}C18:3n-3 pro Kilogramm Körpergewicht angestrebt. Dies entspricht etwa 3% der alimentär zugeführten ALA. Unter dieser Dosierung konnte bei allen Frauen die Oxidation der ^{13}C18:3n-3 sowie die über die natürliche Anreicherung hinausreichende Exkretion von ^{13}C-markierter ALA und ihrer Metabolite in die Muttermilch gemessen werden. Lediglich bei einer Probandin war der Nachweis von ^{13}C-markierter DHA nicht möglich.

Wie bereits erwähnt, besteht die Besonderheit einer Tracerstudie in der Möglichkeit, nicht nur statische Verhältnisse, sondern die Kinetik eines metabolischen Prozesses zu erfassen. Hierzu ist die genaue Planung der Zeitpunkte der Probennahme notwendig, um in Zeiträumen, in denen große Veränderungen zu erwarten sind, häufige Proben zu veranlassen. Um dies zu berücksichtigen wurden am ersten Studientag stündliche Atemproben gewonnen, in den darauf folgenden Tagen jedoch zur Entlastung der stillenden Mütter nur jeweils drei Proben pro Tag.

Die Zeitpunkte zur Gewinnung der Milchproben waren im voraus nur ungefähr planbar, da sie sich nach dem Fütterungswunsch der Babys richteten. Für den ersten

Studientag waren Milchproben bei jeder Fütterung vorgesehen, was dazu führte, dass – je nach Länge des Intervalls zwischen zwei Mahlzeiten – zwischen drei und sechs Proben von den Müttern gewonnen wurden. Bei der Auswertung der Milchproben erfolgte die Zuteilung einer Probe jeweils zu einem Zeitintervall nach Tracergabe – beispielsweise vier bis sechs Stunden nach Tracergabe. Weiter ist bei der Interpretation der Anreicherung des Tracers in der Muttermilch zu berücksichtigen, dass die Milchbildung ein Prozess ist, der jeweils seit der letzten Fütterung des Kindes stattgefunden hat. So ist die Konzentration des Tracers in einer Milchprobe nicht wie bei den Oxidationswerten repräsentativ für den Zeitpunkt der Probengewinnung, sondern für den Zeitraum seit der letzten Fütterung.

4.3 Aspekte bei der Interpretation der Ergebnisse

Neben den bereits erwähnten Faktoren müssen bei der Interpretation der Ergebnisse weitere Aspekte berücksichtigt werden, die Einfluss auf die Metabolisierung der ALA hatten. Diese Faktoren werden in **Abb. 15** veranschaulicht und werden im folgenden erläutert.

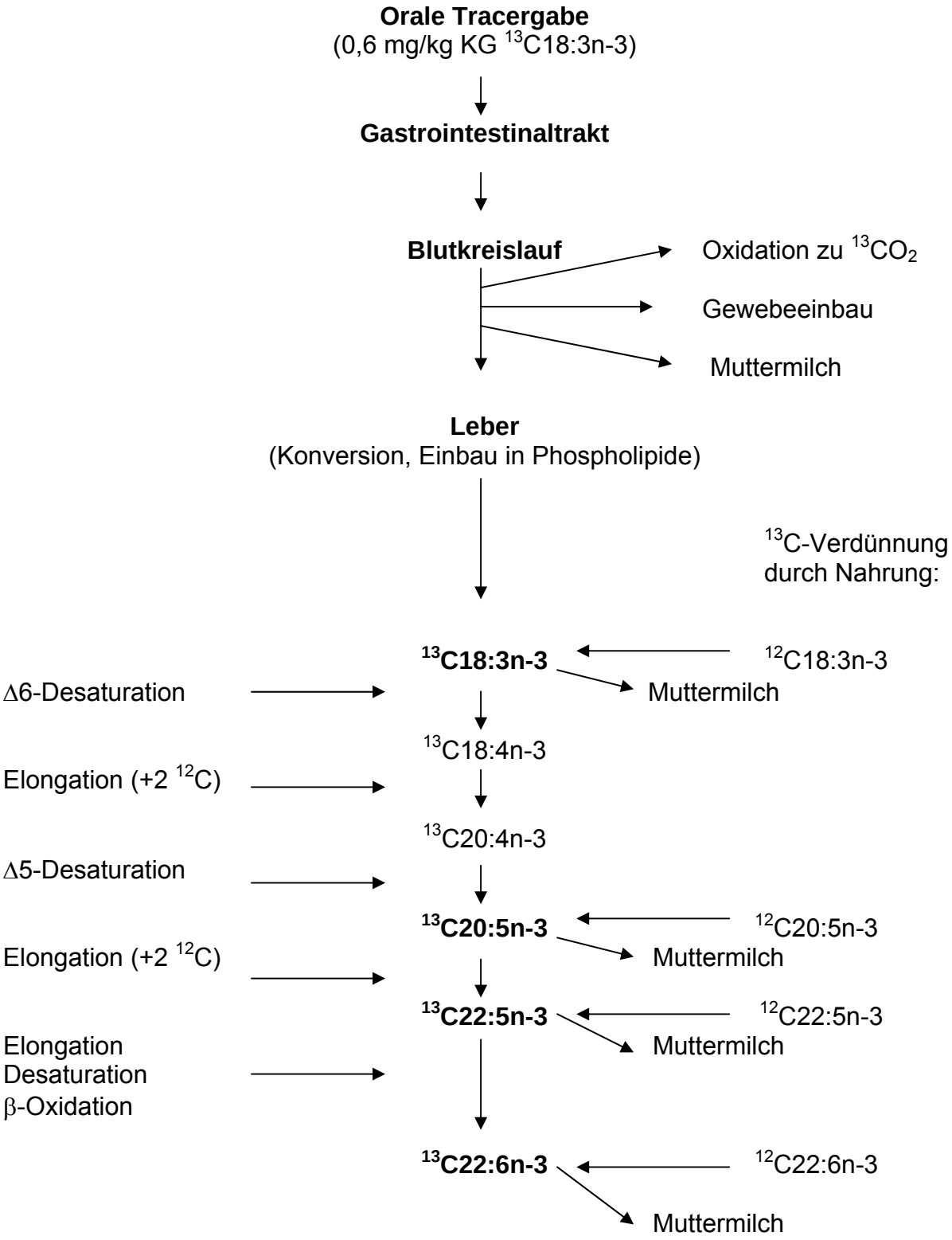

Abb.15 Einflussfaktoren auf die ^{13}C-Anreicherung in der Muttermilch

Wie in **Abb. 15** dargestellt, gelangen die Fettsäuren nach der oralen Gabe zunächst in den Gastrointestinaltrakt, wo sie schließlich resorbiert werden. Hier sind theoretisch die ersten Verluste durch unvollständige Resorption denkbar. Die gastrointestinale Resorptionsrate der ALA bei Erwachsenen wurde bisher noch nicht untersucht, jedoch konnten Jones *et al* in einer Studie an gesunden Frauen zeigen, dass die Resorption der Fettsäuren von ihrer Kettenlänge sowie ihrem Sättigungsgrad abhängig ist (Jones 99). Für die langkettigen hochungesättigten Fettsäuren betrugen die gastrointestinalen Verluste nur etwa 1% der verabreichten Dosis (Jones 99). Darum wurde dieser Faktor in unserer Studie als vernachlässigbar klein angesehen.

Da der Mensch jeden Tag einige Gramm Fett über die Talgdrüsen verliert (Braun-Falco 1996), besteht auch hierin ein denkbarer Weg für den Tracer, den Körper zu verlassen. Fu untersuchte 48 Stunden nach der oralen Verabreichung von ^{14}C-markierter ALA das Fell und die Haut von Meerschweinchen (Fu 00). Hierbei fanden sich 46% des verabreichten Tracers in Fell und Haut der Tiere, weshalb Fu einen neuen, qualitativ wichtigen Stoffwechselweg der ALA postulierte. Jedoch sind diese Daten mit Vorsicht zu interpretieren, da die Fettsäure möglicherweise nach der oralen Gabe nicht vollständig geschluckt bzw. regurgitiert wurde und durch Lecken des Tieres in seinem Fell verteilt wurde oder dass dieses durch nicht resorbierte Fettsäuren in den Fäzes kontaminiert wurde. Weiterhin lässt sich eine an Tieren durchgeführte Studie nicht direkt auf die menschliche Stoffwechselsituation übertragen, weshalb man derzeit noch keine Aussagen über die Bedeutung der Seborrhoe für den Metabolismus der ALA treffen kann. Hierfür sind weitere Untersuchungen notwendig.

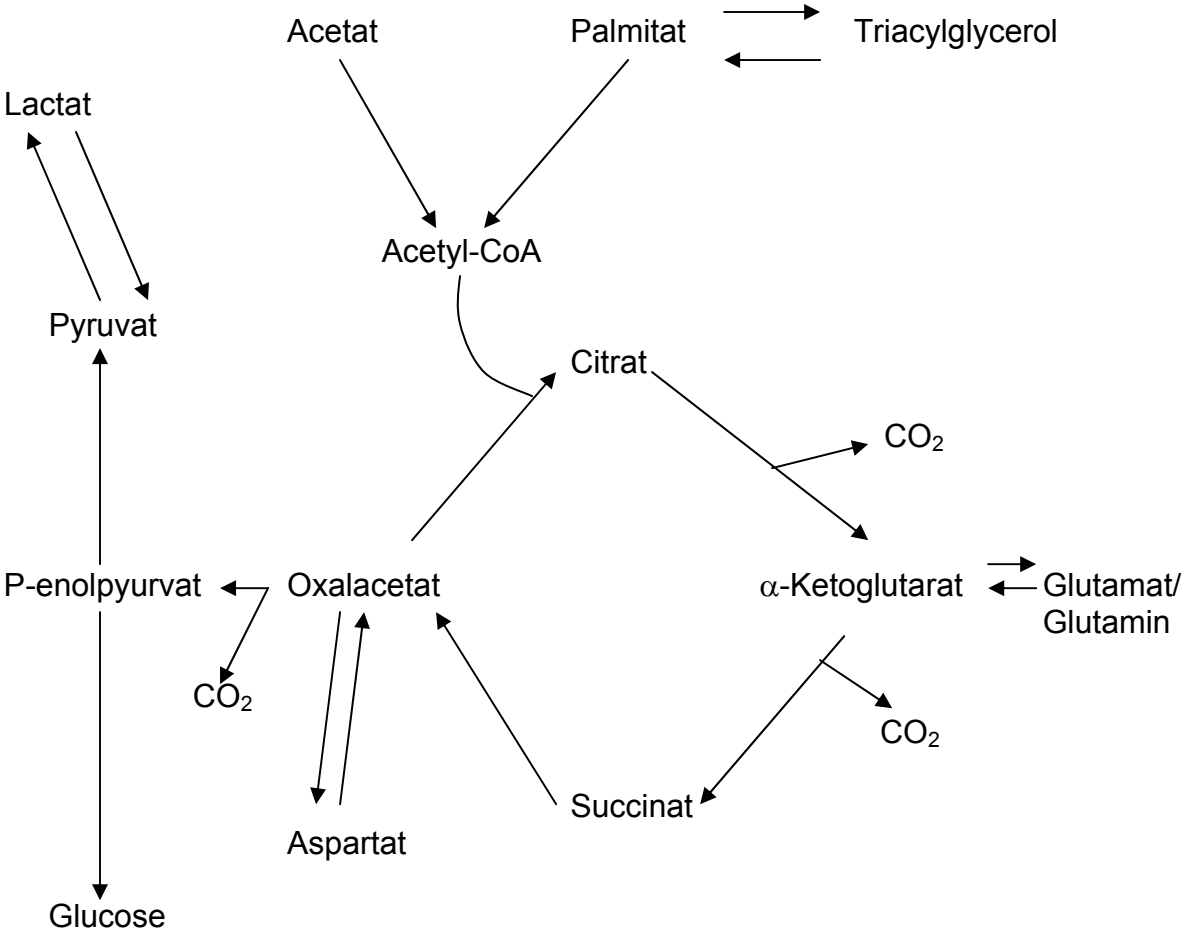

Abb.16 Stoffwechselwege, die für den Verlust von Tracer verantwortlich sein können

Ein weiterer wichtiger Faktor, der dazu beiträgt, dass Tracer während des Studienzeitraums nicht wiedergefunden wird, ist der Einbau von ^{13}C-markierten Kohlenstoffatomen in Zwischensubstrate und deren Verbleib in größeren Körperpools. Bevor eine Fettsäure oxidiert werden kann, muss sie zunächst zu mehreren Einheiten Acetyl-CoA gespalten werden, die dann den Zitratzyklus durchlaufen können (s. **Abb.16**). Jedoch wird nicht jedes Kohlenstoffatom des Acetyl-CoA zu CO_2 metabolisiert. Wolfe und Jakoor konnten zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit eines Kohlenstoffatoms, zu CO_2 verstoffwechselt zu werden, von seiner Position im Acetyl-CoA abhängig ist (Wolfe 90). In ihrer Studie führte eine Markierung des Kohlenstoffatoms in Position 2 ([2-^{13}C]) im Vergleich zu dem in

Position 1 markierten Pendant ([1-^{13}C]) zu einer beachtlichen Reduktion in der Wiederfindung des ^{13}C als $^{13}CO_2$ von 81% auf 53% (Wolfe 90). Die Autoren erklärten dieses Ergebnis damit, dass die Kohlenstoffatome in Position 2 des Acetyl-CoA mit einer größeren Wahrscheinlichkeit direkt der Glukoneogenese zugeführt werden und somit in den Glukose-Pool des Körpers eingehen, während Kohlenstoffatome in Position 1 des Acetyl-CoA hauptsächlich zu Kohlendioxid konvertiert werden (Wolfe 90). Jedoch können Kohlenstoffatome ebenso in Bicarbonat-Pools akkumulieren oder während des Durchlaufens des Zitratzyklus in Glutamin, Glutamat, Pyruvat oder Aspartat eingebaut werden (Sidossis 95, Schrauwen 98, Pouteau 98). Dies wiederum hat zur Folge, dass sich die ^{13}C-markierten Kohlenstoffatome in Pools mit meist nur langsamer Stoffwechselaktivität befinden und es daher selbst mit sensitiven Methoden schwierig ist, den in diesen Pools befindlichen Tracer während des Studienzeitraums nach seiner verzögerten Metabolisierung zu quantifizieren. Gleiches gilt für die ^{13}C-markierte ALA, die – als ALA oder in Form ihrer langkettigen Derivate EPA, DPA und DHA – zunächst in Fettdepots des Körpers eingebaut wurde und nur langsam daraus freigesetzt wird.

Andererseits ist es jedoch auch denkbar, dass aus der natürlichen ^{13}C-Anreicherung des Körpers n-3 Fettsäuren in die Muttermilch sezerniert werden, bzw. ^{13}C-haltige Substrate, die nicht dem verabreichten Tracer entstammen oxidiert werden und somit den Prozentsatz der kumulativen Wiederfindung erhöhen. Dieser theoretisch mögliche Faktor wurde jedoch – da nicht quantifizierbar und als nur geringfügig zu betrachten – in den Berechnungen nicht berücksichtigt.

Weiterhin wurde ein Teil des Tracers, der, wie oben beschrieben, in diverse metabolische Produkte wie Proteine und Glukose, sowie Fettsäuren, die nicht der n-3 Reihe angehören, umgewandelt wurde, zwar in die Muttermilch sezerniert, jedoch wurden diese Substrate nicht analysiert. Clandinin wies in einer Untersuchung des

Stoffwechsels der Palmitinsäure auf die Möglichkeit der partiellen Kettenverkürzung hin (Clandinin 88), was auch beim Metabolismus der ALA denkbar ist.
In einer Studie an Rhesusaffen konnte gezeigt werden, dass nach Gabe von ^{13}C-markierter ALA etwa 4% des Tracers in n-6 Fettsäuren sowie in SFA und MUFA nachweisbar waren (Sheaff Greiner 96). Die Anreicherung in diesen Fettsäuren wurde jedoch in unserer Studie nicht berücksichtigt.

4.4 Oxidation der [U-^{13}C]-markierten ALA

Seit der Einführung stabiler Isotope in der wissenschaftlichen Forschung ist die Messung der Oxidation von Fettsäuren und anderen Substraten zu einer einfach durchführbaren, nicht-invasiven Methode geworden. In den letzten Jahren war die Messung der Oxidationsraten verschiedener Fettsäuren und ihre Interpretation Gegenstand einer Reihe von Untersuchungen (Vermunt 00, DeLany 00, Demmelmair 98, Pouteau 98, Fidler 99). Hierbei zeigte sich, dass die unterschiedliche Struktur der Fettsäuren, die sich unter anderem aus Unterschieden in ihrer Kettenlänge, dem Grad ihrer Sättigung sowie der Zahl und Lokalisation ihrer Doppelbindungen ergibt, in einer unterschiedlichen Oxidationsrate resultiert.
In mehreren an Tieren durchgeführten Studien mit ^{14}C-markierten Fettsäuren konnte gezeigt werden, dass langkettige Fettsäuren prinzipiell langsamer oxidiert werden als mittel- und kurzkettige, während ungesättigte Fettsäuren schneller als gesättigte Fettsäuren oxidiert werden (Cenedella 69, Lynn 59, Mead 56). Jedoch scheint die Oxidationsrate der Fettsäuren auch von der Ernährung abhängig zu sein, da in einer weiteren Studie Ratten, die mit einer fettfreien Nahrung gefüttert wurden, keine Unterschiede bei der Oxidation von Linolsäure und Palmitinsäure zeigten (Toorop 79).

In einer neueren Untersuchung von DeLany wurden die Oxidationsraten verschiedener Fettsäuren miteinander verglichen (DeLany 00). In dieser Studie wurden Fettsäuren, die entweder an der Carboxyl- oder an der Methylgruppe mit ^{13}C markiert waren, als Tracer verwendet. Es zeigte sich, dass die kumulative Wiederfindung von $^{13}CO_2$ innerhalb von neun Stunden für ALA mit 23% höher lag als für Ölsäure (17%) und LA (16%). Die Wiederfindungsraten schwankten – abhängig von der Markierung der Fettsäure am Methyl- bzw. Carboxyl-Ende – beträchtlich. Die Gründe hierfür wurden in dieser Arbeit bereits erläutert. Für ALA wurden Oxidationsraten zwischen 20% (Methyl-Markierung) und 27% (Carboxyl-Markierung) gemessen. Der neun Stunden-Wert der kumulativen $^{13}CO_2$-Wiederfindung lag in unserer Studie bei 16,7%. Dies scheint zunächst den von DeLany gefundenen Werten ähnlich zu sein, jedoch lassen sich die beiden Studien nicht problemlos vergleichen. Bei unseren Untersuchungen wurde – im Gegensatz zu DeLany – uniform ^{13}C-markierte ALA verwendet. Denkbar ist bei der Metabolisierung der Kohlenstoffatome der Carboxyl- bzw. Methylgruppe ein unterschiedliches Stoffwechselverhalten vor oder nach der Doppelbindung. Während Metges nach der Verabreichung von [1-^{13}C]- bzw. [8-^{13}C]-Triloein wie erwartet eine 31% niedrigere Wiederfindung für letzteres Substrat detektierte, konnte DeLany keinen signifikanten Unterschied bei der kumulativen Wiederfindung von Carboxyl- bzw. Methyl-markierter Ölsäure feststellen (Metges 93).

Ein weiterer Grund, weshalb die von uns gemessenen Oxidationsraten möglicherweise nicht direkt mit den Ergebnissen anderer verglichen werden können, ist die unseren Berechnungen zugrunde gelegte Annahme, dass die totale CO_2-Produktion unserer Probandinnen derjenigen gesunder, in Ruhe befindlicher Erwachsener entspricht. Diese Annahme könnte jedoch für stillende Frauen nicht

umfassend gültig sein, da in der Laktationsperiode zusätzliche Energie für die Synthese der Milch erforderlich ist.

Die Auswirkungen einer ALA-reichen bzw. einer Ölsäure-reichen Ernährung auf die Oxidation von [U-^{13}C]-markierter ALA wurden von Vermunt untersucht (Vermunt 00). Die kumulative Wiederfindung von $^{13}CO_2$ innerhalb von zwölf Stunden betrug in der ALA-Gruppe 20%, in der Ölsäure-Gruppe 15%. Dieser Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Die Ergebnisse dieser Studie ähneln sehr den von uns innerhalb von zwölf Stunden detektierten 18% des Tracers, obwohl die erwähnte Studie nicht an stillenden Frauen, sondern gesunden Probanden beiderlei Geschlechts durchgeführt wurde. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Oxidation der alimentär zugeführten ALA nicht durch die Laktation der Frau beeinflusst wird. Dies erscheint auch wahrscheinlich, wenn man bedenkt, dass die tägliche Aufnahme von ALA etwa acht mal höher ist als ihre Sekretion in die Muttermilch.

Eine weitere mögliche Erklärung für die ähnlichen Oxidationsraten ist die Annahme, dass ALA bei den stillenden Müttern im Überfluss vorhanden war und dies somit keinen limitierenden Faktor für die Oxidation darstellte.

In Zusammenschau mit unseren Ergebnissen deutet die Studie von Vermunt darauf hin, dass die Ernährung keinen bedeutenden Einfluss auf die Oxidation der mit der Nahrung zugeführten ALA hat. Analoge Ergebnisse lieferten die Untersuchungen von Fidler, bei denen die Oxidation eines DHA-reichen Öls zwei Wochen nach Supplementierung mit 200mg DHA pro Tag bzw. Placebogabe gemessen wurde (Fidler 99). Auch hier wurden in beiden Gruppen gleiche Oxidationsraten gefunden.

In einer Studie von Demmelmair, in der die Oxidationsraten von [U-^{13}C]-markierter LA bei stillenden Frauen untersucht wurde, zeigte sich, dass die Dauer der Stillperiode keinen signifikanten Einfluss auf die Oxidation von LA hat (Demmelmair

98). Die kumulative Wiederfindung von $^{13}CO_2$ innerhalb von 108 Stunden betrug zwischen 17 und 24%, wobei in den ersten 48 Stunden bereits etwa 15% detektiert wurden (Demmelmair 98, Fidler 99). Den gleichen 48 Stunden-Wert ergab die Messung der Oxidationsrate eines ^{13}C-haltigen, DHA-reichen Öls bei stillenden Frauen (Fidler 99). Im Gegensatz hierzu wurden in unserer Studie bereits nach zwölf Stunden 18% des Tracers in Form von $^{13}CO_2$ wiedergefunden; 108 Stunden nach Tracergabe betrug die kumulative Wiederfindung sogar 38%. Diese höheren Oxidationsraten der ALA im Vergleich zu LA wurden bereits in anderen Studien beschrieben (DeLany 00, Leyton 87).

Der in unserer Studie für den Zeitpunkt von 108 Stunden angegebene Wert der kumulativen Wiederfindung ist – im Gegensatz zu dem zwölf Stunden-Wert – mit Vorsicht zu interpretieren. In den ersten zwölf Stunden wurden stündlich Atemproben gewonnen, während die Intervalle im darauffolgenden Zeitraum zwischen sechs und zwölf Stunden betrugen. Durch die Vergrößerung der Intervalldauer werden jedoch ebenso die Fehler, die beispielsweise durch unvermeidliche Ungenauigkeiten bei der Messung entstehen, immer größer. Aus diesem Grund stellt der zwölf Stunden-Wert die exaktere Größe dar und ist für den Vergleich mit anderen Studien besser geeignet.

Maximale Oxidationswerte der mit der Nahrung zugeführten ALA wurden bei unseren Probandinnen zwischen zwei und sechs Stunden (Median: drei Stunden) nach Tracergabe gemessen. Neben interindividuellen Unterschieden in der Kapazität der Fettsäure-Oxidation und Geschwindigkeit der Enzymsysteme spielen hierbei sicherlich auch Faktoren wie Zeitpunkt der Magenentleerung nach Tracergabe sowie Art und Ausmaß der körperlichen Betätigung eine Rolle. Mit Ausnahme der von uns durchgeführten Standardisierung des Frühstücks wurden diese Aspekte nicht beeinflusst.

4.5 Muttermilch

4.5.1 Transfer der [U-^{13}C]-markierten ALA in die Muttermilch.

Durch den Einsatz stabiler Isotope wurde es erstmals möglich, die Stoffwechselwege einzelner Fettsäuren bei stillenden Frauen zu verfolgen und den Anteil der direkt der Nahrung entstammenden Fettsäuren in der Muttermilch zu quantifizieren. Die erste Studie hierzu wurde 1987 von Hachey veröffentlicht, der drei stillenden Frauen Deuterium-markierte Palmitin-, Linol- und Ölsäure verabreichte (Hachey 87). In den folgenden Jahren wurden weitere Studien zur Messung des Fettsäuretransfers in die Muttermilch mit sensitiveren Detektionsmethoden durchgeführt (Demmelmair 98, Del Prado 01, Fidler 00). Unter Verwendung von uniform ^{13}C-markierter Linolsäure untersuchten Demmelmair sowie Del Prado den Transfer und die Konversion der Linolsäure zu ihren langkettigen mehrfach ungesättigten Derivaten in der Muttermilch (Demmelmair 98, Del Prado 01). In einer weiteren Studie beschrieb Fidler die Aufnahme der alimentär zugeführten [U-^{13}C]-markierten Fettsäuren DHA sowie Palmitin-, Myristin- und Ölsäure in die Muttermilch (Fidler 00).

Hachey schätzte, dass etwa 10 bis 12% der von ihm verwendeten Fettsäuren, Palmitin-, Öl- und Linolsäure, innerhalb von 72 Stunden in die Muttermilch gelangen (Hachey 87). Fast identische Werte fand Demmelmair, der sechs stillenden Frauen 1mg [U-^{13}C]-markierte Linolsäure pro Kilogramm Körpergewicht verabreichte und 12,5% des Tracers innerhalb von 108 Stunden in der Muttermilch wiederfand (Demmelmair 98). Jedoch sind die beiden Studien trotz ihrer erstaunlich ähnlichen Ergebnisse nicht ohne weiteres miteinander vergleichbar. So verwendete Hachey Deuterium-markierte Fettsäuren, die weniger hoch angereichert waren als die bei Demmelmair und auch in unserer Studie zum Einsatz kommenden [U-^{13}C]-markierten Fettsäuren. Auch die von Demmelmair verwendete Methodik zur

Detektion des Tracers (IRMS) war wesentlich sensitiver als die von Hachey eingesetzte organische Massenspektrometrie, was zur Folge hatte, dass die eingesetzte Tracermenge von mehreren Gramm auf etwa 70mg reduziert werden konnte. Die sensitiven Messgeräte ermöglichen es weiterhin, auch die in nur äußerst geringen Mengen enthaltenen langkettigen metabolischen Produkte des Tracers in der Muttermilch nachzuweisen. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von ^{13}C anstelle von ^{2}H liegt schließlich darin, dass hierdurch auch die Oxidation des markierten Substrates zu $^{13}CO_2$ gemessen werden kann.

Die von Demmelmair bei deutschen Müttern gemessene Transferrate der LA in die Muttermilch von 12,5% ist vergleichbar den von Del Prado bei mexikanischen Frauen, die sich traditionell fettarm ernähren (Fettanteil der Nahrung < 17% der zugeführten Energie), gemessenen Werten von 16% (Demmelmair 98, Del Prado 01). Jedoch scheint die Transferrate von LA höher zu liegen als die von uns gemessene Rate der ALA mit 7,3%. Dies wäre jedoch dadurch erklärbar, dass das Verhältnis von LA zu ALA in der Nahrung mit 6:1 wesentlich niedriger liegt als in der Muttermilch mit 12:1. Da also LA in der Milch im Verhältnis zu ALA wesentlich höher angereichert ist als in der Nahrung, ist es durchaus nachvollziehbar, dass auch prozentual mehr LA aus der Nahrung in die Muttermilch sezerniert wird.

In unserer Studie wurde die Fettsäurezusammensetzung des Fettgewebes unserer Teilnehmerinnen nicht bestimmt, jedoch konnten bereits mehrere Autoren zeigen, dass das Fettsäuremuster des Körperfetts von langfristigen Ernährungsgewohnheiten abhängig ist (Baylin 02, Sanders 78, Kohlmeier 95, Tjonneland 93). Insbesondere EFA, die nicht endogen aus Kohlenhydraten synthetisiert werden können, stellen Indikatoren für die Fettsäure-Zufuhr des Menschen dar. Besonders hohe Konzentrationen an ALA und LA weist das Körperfett von vegetarischen und veganischen Frauen auf, die diese beiden

Fettsäuren aufgrund ihrer Ernährungsweise in großen Mengen zu sich nehmen (Sanders 78). Baylin konnte nachweisen, dass die Fischzufuhr signifikant mit den n-3 Fettsäuren des Fettgewebes korrelierte (Baylin 02). Jedoch ist der Anteil der ALA im Fettgewebe sowie in der Muttermilch stets niedriger als in der Nahrung (Baylin 02, Martin 93). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass der Einbau von ALA in Triglyzeride der Fettspeicher sowie ihre Sekretion in die Muttermilch in einem wesentlich geringeren Ausmaß ablaufen als dies für LA der Fall ist. Ein wichtiger Faktor hierfür könnten die im Verhältnis zu LA höheren Oxidationsraten der ALA sein (De Lany 00, Demmelmair 98).

In unserer Studie zeigte sich jedoch eine negative Korrelation zwischen der Oxidation von ALA durch die stillende Frau und dem Fettgehalt ihrer Milch. In einer Studie an Ratten beschrieb Leyton eine inverse Beziehung zwischen der Oxidation diverser ungesättigter Fettsäuren und ihrem Einbau in Phosphoglyceride und weitere Fettspeicher der Ratte (Leyton 87). Wenn wir annehmen, dass die Oxidationsrate der ALA der gesamten Fettsäure-Oxidation proportional ist, so könnte dies implizieren, dass eine erhöhte Fettsäure-Oxidation mit einer reduzierten Bereitstellung von Fett für die Brustdrüse zur Synthese der Milch assoziiert ist.

Ein bedeutender Unterschied zwischen den beiden C18 Fettsäuren ALA und LA in der Muttermilch liegt in ihrem der Nahrung entstammenden prozentualen Anteil. Während Demmelmair berechnete, dass etwa 30% der LA in der Muttermilch direkt von der Nahrung in die Milch transferiert wird, zeigte sich in unserer Studie, dass 65% der ALA in der Milch der Nahrung entstammt. Die Ernährung der stillenden Mutter scheint folglich – im Gegensatz zu anderen Fettsäuren – für den ALA-Gehalt der Muttermilch eine bedeutende Rolle zu spielen. Francois untersuchte die Auswirkungen einer einmaligen hochdosierten Gabe einer Fettsäure auf die Fettsäurekonzentration der Muttermilch (Francois 98). Hierbei erhöhte sich der Anteil

der LA in der Milch nach Gabe von 30 Gramm LA um 80%, während nach Verabreichung von nur 3,3 Gramm ALA ihr prozentualer Gehalt in der Milch um 120% stieg (Francois 98).

Durch die entscheidende Abhängigkeit von der Ernährung lässt sich auch die, im Unterschied zu vielen anderen Fettsäuren, relativ große Schwankungsbreite des prozentualen ALA-Anteils in der Milch erklären (Koletzko 88). Der überwiegende Beitrag der Nahrung der Frau zur Determinierung der ALA-Konzentration der Muttermilch könnte auch der Grund für extrem niedrige ALA-Gehalte in der Milch mangelernährter Frauen in Nigeria sein, deren Milch jedoch LA-Gehalte im unteren Normbereich aufweist (Koletzko 91, Glew 95).

Auch Martin, der die Abhängigkeit essentieller Fettsäuren in der Muttermilch von den Fettspeichern der Frau untersuchte, hielt eine entscheidende Beteiligung der Körperspeicher für die Determinierung des ALA-Gehaltes der Milch für unwahrscheinlich (Martin 91+93). In seinen Studien, in denen er die Fettsäurezusammensetzung des Fettgewebes stillender Frauen mit dem Fettsäuremuster ihrer Muttermilch verglich, zeigte sich, dass der prozentuale Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Milch und Fettgewebe ähnliche Werte einnahm und die Konzentration von LA in den untersuchten Substraten signifikant korrelierten (Martin 91+93). Im Gegensatz dazu konnte er keine Korrelation für ALA finden. Weiterhin war der ALA-Anteil der Milch – im Unterschied zu LA – höher als im Fettgewebe und Plasma. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Körperfettspeicher der Frau einen erwarteten qualitativen Effekt auf die interindividuelle Variabilität des LA-Gehaltes der Milch haben, das Fettgewebe jedoch keinen entscheidenden Einfluss auf die ALA-Konzentration in der Milch hat. Der Autor vermutete eine selektive Bevorzugung der Brustdrüse bei der Aufnahme

von ALA gegenüber LA, da sowohl im Plasma wie auch im Fettgewebe niedrigere ALA-Konzentrationen als in der Milch gemessen wurden (Martin 91+93, Mellies 79). In einer Studie an Ratten zeigte sich, dass die in der Laktationsperiode befindlichen Tiere wesentlich niedrigere n-3 Konzentrationen im Serum aufwiesen als ihre Artgenossen (Guesnet 88). Dagegen blieb die n-6 Konzentration im Serum beinahe konstant, was ebenso für eine erleichterte Aufnahme der n-3 Fettsäuren durch die Brustdrüse spricht.

Zwischen der oralen Aufnahme einer Fettsäure und der korrespondierenden maximalen Chylomikronämie liegen etwa drei bis fünf Stunden (Francois 98). Vermunt konnte vier bzw. sechs Stunden nach Verabreichung ^{13}C-markierter ALA an gesunde Probanden maximale ^{13}C-Anreicherungen der ALA im Plasma finden (Vermunt 00). Da das Gewebe der Brustdrüse in hohen Konzentrationen das rasch arbeitende Enzym Lipoproteinlipase enthält, liegt die Vermutung nahe, dass sich die alimentär zugeführte ALA bald nach Auftreten der Chylomikronämie auch in der Milch wiederfindet. So konnten wir bereits sechs und neun Stunden nach Gabe des Tracers hohe ^{13}C-Anreicherungen der ALA in der Muttermilch messen; der Maximalwert fand sich zwölf Stunden nach Verabreichung des Tracers. Unsere Ergebnisse sind mit den Werten von Francois vergleichbar, die zehn bzw. 14 Stunden nach Gabe eines Bolus ALA maximale ALA-Konzentrationen in der Muttermilch fand (Francois 98). Auch die korrespondierende n-6 Fettsäure LA zeigte in der Studie von Demmelmair zwölf Stunden nach Gabe von ^{13}C-markierter LA maximale Werte in der Milch (Demmelmair 98). Somit erscheint der Transfer der beiden C18 Fettsäuren ALA und LA in die Milch einer ähnlichen Kinetik zu folgen.

4.5.2 Konversion der ALA zu langkettigen hochungesättigten Fettsäuren

Ein wichtiges Ziel unserer Studie stellte die Untersuchung der Konversion der ALA zu ihren langkettigen hochungesättigten Derivaten EPA, DPA und DHA dar, sowie deren prozentualer Beitrag zu den Lipiden der Milch.

In der bereits zitierten Studie von Vermunt wurden nach Verabreichung von ^{13}C18:3n-3 im Plasma maximale Werte für ^{13}C-markierte EPA 24 Stunden nach Tracergabe gemessen, für DPA und DHA 36 Stunden nach Tracergabe. Hierzu ist jedoch zu bemerken, dass zwischen 24 und 336 Stunden nach Studienbeginn lediglich eine Messung der ^{13}C-Anreicherung im Plasma – zum Zeitpunkt von 36 Stunden – durchgeführt wurde, so dass die maximale Anreicherung von DPA im Zeitraum zwischen 24 und 36 Stunden vermutet werden kann. Beachtenswert ist die Nahrungsabhängigkeit der Metabolisierung von ALA, da in der Studie gezeigt werden konnte, dass eine ALA-reiche Ernährung (8,3 Gramm ALA pro Tag) im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer wesentlich niedrigeren Konversion von ^{13}C-markierter ALA zu ihren langkettigen Derivaten führt (Vermunt 00).

In unserer Studie lagen die maximalen Anreicherungen der ^{13}C-markierten Fettsäuren EPA, DPA und DHA, die der Konversion aus ^{13}C18:3n-3 entstammten, bei 36 Stunden. Weiterhin zeigten die Auftragung der Anreicherungen gegen die Zeit einen fast identischen Anstieg für EPA und DPA, was ein Hinweis für schnelle Elongation ist. Außerdem ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass die LC-PUFA Synthese nicht durch die Kettenelongation der Fettsäuren limitiert wird (Sprecher 96). Am Studienende, zum Zeitpunkt von 108 Stunden nach Tracergabe, konnten für alle drei Fettsäuren noch Anreicherungen in der Milch detektiert werden. Dies spricht dafür, dass der Prozess der Konversion der ALA langsam abläuft und auch bei Studienende noch nicht abgeschlossen war und ein verlängerter

Beobachtungszeitraum die Werte möglicherweise verändert hätte. Weiterhin suggerieren die Ergebnisse, dass ein Teil der mit der Nahrung zugeführten ALA die Brustdrüse nicht sofort nach der intestinalen Resorption erreicht, sondern temporär in maternalen Körperpools gespeichert wird, um schließlich wieder – in Form von ALA oder ihrer Derivate – dem Kreislauf zugeführt zu werden.

Dies könnte ebenso ein Grund dafür sein, dass wir nur minimale Mengen der ^{13}C-markierten ALA in Form von EPA und DPA (jeweils 0,10% der Tracerdosis) bzw. DHA (0,013% der Tracerdosis) in der Milch fanden. In einer Isotopenstudie mit unserer Studie vergleichbaren Ernährungsbedingungen berechnete Pawlosky, dass nur etwa 0,2% der ALA im Plasma zu EPA metabolisiert wird, während EPA wiederum effizient zu DPA und DHA konvertiert wurde (Pawlosky 01). In weiteren Studien an gesunden Erwachsenen verlief die Detektion der DHA-Synthese nahe der Nachweisgrenze (Burdge 02). Diese Ergebnisse stimmen auch mit unseren Beobachtungen überein, da wir nur etwa 0,25% des Tracers in Form von n-3 LC-PUFA in der Milch wiederfanden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die direkte Konversion der mit der Nahrung zugeführten ALA zu ihren langkettigen Metaboliten quantitativ von äußerst untergeordneter Bedeutung ist.

Aus den gefundenen Anreicherungen der LC-PUFA Derivate der ALA konnten wir berechnen, dass 10,9% der EPA und 1,1% der DHA in der Milch der direkten Konversion der alimentär aufgenommenen ALA entstammt. Diese Ergebnisse sind den von Demmelmair *et al* in seiner bereits zitierten Studie zur Konversion der LA erstaunlich ähnlich. Die Autoren konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass 11,0% der DGLA und 1,2% der AA in der Muttermilch ihren Ursprung in der Konversion der mit der Nahrung zugeführten LA haben (Demmelmair 98). In beiden Studien konnte der Ursprung der n-3 bzw. n-6 LC-PUFA folglich nicht endgültig geklärt werden, jedoch scheinen die in der Milch enthaltenen Fettsäuren DHA und

AA nicht direkt von der täglichen Zufuhr der essentiellen Fettsäuren abhängig zu sein. Fidler *et al* zeigten in ihrer Studie zum Transfer der DHA in die Muttermilch, dass etwa 30% der in der Milch enthaltenen DHA direkt aus der Nahrung stammt (Fidler 00). Dieser Wert wurde auch durch die 14-tägige Supplementation von DHA (200mg/die) nicht verändert.

Selbst bei Frauen, deren Nahrung traditionell nur wenig AA enthält, spielt die Konversion von LA zu AA für den AA-Gehalt der Muttermilch nur eine untergeordnete Rolle (Del Prado 01). Jedoch muss die von uns und anderen (Demmelmair 98, Del Prado 01) gemessene niedrige Transformation der mit der Nahrung zugeführten C18 Fettsäuren nicht unbedingt die tatsächliche LCPUFA-Produktion des Körpers widerspiegeln. So könnten die in der Leber entstehenden Fettsäuren DHA und AA in einem bereits vorbestehenden DHA- bzw. AA-Pool unbekannter Größe verdünnt werden, oder der Tracer wurde bereits in Pools von EPA oder DPA bzw. DGLA verdünnt. Hierfür spricht auch die von Francois gemachte Beobachtung, dass nach einmaliger Verabreichung eines EPA- und DHA-haltigen Öls an stillende Frauen diese Fettsäuren in der Muttermilch erst nach 24 Stunden maximale Werte erreichten, während praktisch alle weiteren untersuchten Fettsäuren – u.a. ALA und LA – ihre maximale Anreicherung bereits zehn bis zwölf Stunden nach der oralen Aufnahme zeigten (Francois 98). Diese Beobachtung suggeriert, dass EPA und DHA in größeren Pools als beispielsweise ALA zwischengespeichert und verdünnt werden oder dass die Freisetzung dieser Fettsäuren aus dem Speicher einer verzögerten Kinetik folgt.

Eine theoretisch denkbare Erklärung für die geringen Mengen an ^{13}C-markierter DHA in der Muttermilch könnte durch die Retrokonversion von DHA zu EPA und DPA verursacht sein. Brossard konnte jedoch nachweisen, dass dieser Stoffwechselweg

beim Menschen von untergeordneter Bedeutung ist und nur etwa 1,4% der mit der Nahrung zugeführten DHA zu EPA und DPA retrokonvertiert werden (Brossard 96). Weiterhin ist eine Synthese von LCPUFA aus C18 Fettsäuren, die aus Körperfettspeichern stammen wahrscheinlich, jedoch mit dem von uns verwendeten Studiendesign und der Methodik nicht messbar. Sanders konnte in seinen Studien zeigen, dass auch veganische Frauen, deren Nahrung praktisch keine DHA enthält, diese Fettsäure in ihrer Milch aufweisen (Sanders 78+92). Dass die alimentäre Zufuhr von LC-PUFA eine essentielle Rolle für die Konversion der Vorläuferfettsäuren spielt, konnte bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Δ5- und Δ6-Desaturase bis zum dreifachen ihres Ausgangswertes ansteigt, wenn man die Tiere mit EFA-freiem Futter ernährt, die Enzymaktivitäten bei Supplementation von n-3 und n-6 Fettsäuren jedoch wieder reduziert werden (Peluffo 76). Cho wies nach, dass die Gabe von Fischöl nach der Fütterung einer fettfreien Diät das Vorkommen der hepatischen Δ5-Desaturase um 60% reduzierte, das der Δ6-Desaturase sogar um 80% (Cho 99). Die Verabreichung von Ölsäure hatte dagegen keinen Effekt auf die Expression der Enzyme (Cho 99).

Del Prado *et al* konnten beobachten, dass mexikanische Mütter täglich etwa 70 mg AA mit der Nahrung zu sich nehmen, jedoch 90 mg AA mit ihrer Muttermilch sezernieren, wobei die Autoren berechnen konnten, dass 90% des AA-Gehaltes der Milch nicht der direkten intestinalen Absorption entstammen (Del Prado 01).

Ein weiterer Punkt, der die Bedeutung der endogenen Konversion der C18 Fettsäuren ALA und LA unterstreicht ist die Korrelation zwischen n-3 und n-6 LC-PUFA, die nicht nur in der Muttermilch, sondern ebenso im Körperfett nachzuweisen ist (Martin 91+93, Koletzko 88).

Neuere Studien haben ergeben, dass die Konversion von ALA zu DHA unabhängig von einer Δ4-Desaturase abläuft. Der limitierende Faktor beim Metabolismus der ALA zu ihren korrespondierenden LC-PUFA ist dabei die initiale Δ6-Desaturation, die ALA zu 18:4n-3 konvertiert (Cho 99, Sprecher 00). Unsere Ergebnisse bestätigen dies, da die Konversionsprodukte der ^{13}C-markierten ALA nur in äußerst geringen Mengen in der Muttermilch wiederzufinden waren, während die ^{13}C-markierten Fettsäuren EPA und DPA in beinahe identischem Umfang in die Milch sezerniert wurden und ihre Anreicherungen in der Milch einer ähnlichen Kinetik folgten. Weiterhin korrelierte die Wiederfindung der Derivate von ALA hoch signifikant, während die Anreicherung von ^{13}C-ALA nur eine relativ schwache Korrelation zu ^{13}C-DPA zeigte. Da die berechneten Wiederfindungsraten des Tracers von der Menge des sezernierten Milchvolumens sowie vom Fettgehalt der Milch abhängig sind, könnte auch dies der Grund für die Korrelationen der LC-PUFA untereinander sein. Jedoch korrelierten weder das Milchvolumen noch der Milchfettgehalt mit den Wiederfindungsraten der ^{13}C-markierten Fettsäuren.

4.5.3 Oxidation und n-3 Fettsäure-Transfer in die Muttermilch

Vermunt beobachtete in ihrer Studie eine inverse Korrelation zwischen der Oxidation von ALA und ihrer kalkulierten Konversion zu EPA und DPA (Vermunt 00). Im Gegensatz hierzu fanden wir in unseren Untersuchungen keine Beziehung zwischen der Oxidationsrate von ALA und ihrem Transfer in die Muttermilch bzw. ihrer Konversion zu endogen synthetisierten n-3 LC-PUFA. Dies lässt darauf schließen, dass der Transfer von n-3 Fettsäuren in die Muttermilch und die Oxidation unabhängig voneinander ablaufen und nicht um das Substrat ALA konkurrieren.

Denkbar ist ebenso, dass unter der gegebenen Ernährungssituation der Mütter ALA im Überschuss vorhanden war und somit keinen limitierenden Faktor darstellte.

5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die vorliegende Studie zeigt, dass der überwiegende Teil der alimentär zugeführten ALA oxidiert wird. Bei allen Probanden wurde wesentlich mehr Tracer als CO_2 ausgeatmet als in Form von n-3 Fettsäuren in die Muttermilch transportiert. Der Vergleich mit Untersuchungen an nicht-stillenden Probanden lässt vermuten, dass die Laktation hierbei keinen Einfluss auf die Menge und den zeitlichen Verlauf der Oxidation hat.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass ein hoher Prozentsatz der ALA in der Muttermilch direkt der mütterlichen Nahrung entstammt. Im Gegensatz zu anderen mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie beispielsweise DHA und LA, deren direkt aus der Nahrung in die Milch transferierter Anteil bei etwa 30% liegt, konnte in der vorliegenden Studie ein Anteil von 65% für ALA berechnet werden. Diese Beobachtungen unterstreichen die außerordentliche Bedeutung der mütterlichen Ernährung während der Stillzeit, insbesondere im Hinblick auf die n-3 Fettsäure ALA. Im Unterschied hierzu ist die unmittelbare Aufnahme von ALA als Präkursor für ihre langkettigen Metaboliten EPA, DPA und DHA nur von untergeordneter Bedeutung. Die hier für gefundenen Werte bestätigen die von Demmelmair für die n-6 Fettsäure LA postulierte Hypothese, dass nur ein marginaler Anteil der alimentär zugeführten LA direkt in Form seiner Konversionsprodukte γ-Linolensäure bzw. AA in die Muttermilch sezerniert wird.

Ein Grund für die minimale Metabolisierung der Präkursor-Fettsäure ALA könnte eine Inhibierung der für die LC-PUFA Synthese notwendigen Enzymsysteme durch die im Überfluss vorhandenen langkettigen Fettsäuren DHA und AA sein. Näheren Aufschluss über die komplexen Wechselwirkungen der LC-PUFA und ihrer

Intermediate könnten Studien mit mehrfachen aufeinanderfolgenden Tracergaben oder markierten Zwischensubstraten geben.

Im Hinblick auf die Produktinhibierung wären ebenso Untersuchungen bezüglich der Konversion von ALA an Müttern, die sich LCP-frei ernähren, interessant. Derartige Studien könnten auch die Frage klären, ob die Zufuhr von DHA tatsächlich die Metabolisierung von ALA in ihre korrespondierenden LCP hemmt.

6 Zusammenfassung

Für das gesunde Neugeborene gilt Stillen in den ersten vier bis sechs Lebensmonaten als die optimale Ernährungsform. Durch die Muttermilch erhält der Säugling die für die Entwicklung neurologischer und retinaler Funktionen bedeutenden LC-PUFA DHA und AA, sowie deren Präkursoren ALA und LA. Seit langem ist bekannt, dass die Ernährung der Mutter einen wichtigen Faktor für die Nährstoffzusammensetzung ihrer Muttermilch darstellt. Trotz der weitreichenden Bedeutung der Lipide in der Milch existieren derzeit nur wenige Studien über die Mechanismen des Fettsäuretransfers in der Stillzeit. Durch den Einsatz von stabilen Isotopen, die für Mutter und Kind als unbedenklich gelten, wurde es möglich, den Metabolismus von Fettsäuren während der Laktation *in vivo* zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Oxidation sowie den Transfer von alimentär zugeführter ALA in die Muttermilch von stillenden Frauen. Weiterhin wurde die endogene Konversion der ALA zu ihren langkettigen, hochungesättigten Derivaten EPA, DPA und DHA gemessen, sowie deren Beitrag zu den n-3 Fettsäuren in der Muttermilch.

In einer Münchener Frauenklinik wurden zehn Mütter mit ihren offenbar gesunden Säuglingen in die Studie eingeschlossen. In der fünften Laktationswoche wurden den Frauen 0,6mg [U-^{13}C]-markierte ALA pro Kilogramm Körpergewicht zu einem standardisierten Frühstück verabreicht.

Vor der Tracergabe sowie in den darauf folgenden fünf Tagen wurden von den Müttern Atem- und Milchproben gewonnen. Das sezernierte Milchvolumen wurde durch Wiegen der Babys jeweils vor und nach dem Stillen bestimmt. Die Fettsäurezusammensetzung der Muttermilch wurde mittels Gaschromatographie analysiert. Zur Erfassung der Nahrungszufuhr führten die Mütter ein siebentägiges

Ernährungsprotokoll. In den n-3 Fettsäuren der Muttermilch ALA, EPA, DPA und DHA sowie im CO_2 der Ausatemluft wurde mit Hilfe von GC-C-IRMS die ^{13}C-Anreicherung bestimmt. Der Transfer der genannten n-3 Fettsäuren in die Muttermilch, sowie der Beitrag der alimentär zugeführten ALA zu den n-3 Fettsäuren der Milch wurde aus den ermittelten Daten berechnet. Der Anteil der oxidierten ALA wurde mittels der $^{13}CO_2$-Wiederfindung in den Atemgasproben bestimmt.

Es lassen sich folgende Ergebnisse zusammenfassen:

1. Die Auswertung der Ernährungsprotokolle zeigte, dass täglich etwa 1,4 $\pm$ 0,1 g ALA mit der Nahrung zugeführt werden, während die tägliche Sekretion von ALA in die Muttermilch etwa 0,17 $\pm$ 0,02 g beträgt.
2. Während des Studienzeitraums wurden 37,5 $\pm$ 2,7% (MW $\pm$ SEM) der alimentär zugeführten ALA zu CO_2 konvertiert. In den ersten 24 Stunden nach der oralen Zufuhr wurde der größte Anteil des Tracers oxidiert.
3. 7,3 $\pm$ 1,1% der mit der Nahrung aufgenommenen ALA wurden direkt als ALA in die Muttermilch transferiert. Der entscheidende Anteil der alimentären ALA wird in den ersten 48 Stunden nach Nahrungsaufnahme in der Milch wiedergefunden. Maximale Anreicherungen wurden zwölf Stunden nach Tracergabe detektiert. Aus unseren Daten lässt sich berechnen, dass etwa 65% der ALA in der Milch direkt der Nahrung entstammt.
4. Nur 0,1% des Tracers wurden jeweils in Form von EPA und DPA in der Milch detektiert, weitere 0,01% als DHA. Die ^{13}C-Anreicherungen der EPA und DPA in der Milch zeigten eine ähnliche Kinetik, maximale Werte wurden jeweils 36 Stunden nach Tracergabe gefunden. Durch Extrapolation der Daten konnte ermittelt werden, dass 11% der EPA, 4% der DPA und 0,4% der DHA in der Milch direkt der Konversion der alimentär zugeführten ALA entstammt.

5. Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen der kumulativen Wiederfindung von ALA und DPA. Die kumulativen Wiederfindungen von EPA und DPA korrelierten hochsignifikant, was auf suffiziente Enzymsysteme schließen lässt.
6. Die Summe der n-3 und der n-6 PUFA in der Muttermilch korrelierte signifikant positiv, was auf interindividuelle Unterschiede in der Kapazität zur Sekretion der PUFA hinweist.

Wir schließen aus den Ergebnissen, dass ein großer Anteil der mit der Nahrung aufgenommenen ALA zu CO_2 konvertiert wird, wobei die Laktation keinen Einfluss auf die Oxidation hat.
Ein entscheidender Prozentsatz der ALA in der Milch entstammt direkt der mütterlichen Nahrung, weshalb die Ernährung der Mutter während der Stillzeit eine wichtige Rolle spielt. Die alimentäre ALA-Zufuhr ist für den Gehalt der Muttermilch an den n-3 LCP EPA, DPA und DHA dagegen von untergeordneter Bedeutung.
Ob die Aufnahme von DHA eine Inhibierung der Enzyme in der Synthese der LCP bewirkt ist eine interessante Fragestellung, die in weiteren Studien behandelt werden sollte.

7 Literaturverzeichnis

1. Agostoni C, Trojan S, Bellu R, Riva E, Giovannini M. Neurodevelopmental quotient of healthy term infants at 4 months and feeding practice: the role of long-chain polyunsaturated fatty acids. Pediatr Res 1995;38:262-6.

2. Baylin A, Kabagambe EK, Siles X, Campos H. Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. Am J Clin Nutr 2002;76:750-7.

3. Beckers EJ, Halliday D, Wagenmakers AJM. Glucose metabolism and radioactive labeling: what are the real dangers? Med Sci Spo Ex 1994;26:1316-1318.

4. Bitman J, Wood L, Hamosh M, Hamosh P, Metha NR. Comparison of the lipid composition of breast milk from mothers of term and preterm infants. Am J Clin Nutr 1983;38:300-12.

5. Bourre JM, Francois M, Youyou A, Dumont O, Piciotti M, Pascal G, Durand G. The effects of dietary α-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. J Nutr 1989;119:1880-92.

6. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH. Dermatologie und Venerologie 4. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg 1996. p. 945 f.

7. Brossard N, Croset M, Pachiaudi C, Riou JP, Tayot JL, Lagarde M. Retroconversion and metabolism of [^{13}C]22:6n-3 in humans and rats after intake of a single dose of [^{13}C]22:6n-3-triacylglycerols. Am J Clin Nutr 1996;64:577-86.

8. Brühl L. Fettextraktion. In: Charakterisierung maßgeblicher Triglyzeride in Muttermilch und Rohstoffen für Säuglingsnahrung. Dissertation. Münster, Universität Münster 1994:S.104.

9. Burdge GC, Wooton SA. Conversion of α-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic, and docosahexaenoic acid in young women. Br J Nutr 2002;88:411-20.

10. Burr GC, Burr MM. On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition. J Biol Chem 1930;86:587-621.

11. Carlson SE, Rhodes PG, Ferguson MG. Docosahexaenoic acid status of preterm infants at birth and following feeding with human milk or formula. Am J Clin Nutr 1986;44:798-804.

12. Carlson SE, Neuringer M. Polyunsaturated fatty acid status and neurodevelopment: a summary and critical analysis of the literature. Lipids 1999;34:171-8.

13. Cenedella RJ, Allen A. Differences between the metabolism of linoleic and palmitic acid: utilization for cholesterol synthesis and oxidation to respiratory CO_2. Lipids 1969;4:155-8.

14. Cho HP, Nakamura M, Clarke SD. Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Δ-6 desaturase. J Biol Chem 1999;274:471-77.

15. Cho HP, Nakamura M, Clarke SD. Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human Δ-5 desaturase. J Biol Chem 1999;274:37335-9.

16. Chulei R, Xiaofang L, Hongsheng M, Yiulan M, Guizheng L, Gianhoug D, DeFrancesco CA, Connor WE. Milk composition in women from five different regions of China: The great diversity of milk fatty acids. J Nutr 1995;125:2993-8.

17. Clandinin MT, Chappell JE, Leong S. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implication for fatty acid requirements. Early Human Development 1980;4:121-30.

18. Clandinin MT, Khetarpal S, Kielo ES, French MA, Tokarska B, Goh YK. Chain shortening of palmitic acid in human subjects. Am J Clin Nutr 1988;48:587-91.

19. Crawford MA, Costeloe K, Ghebremeskel K, Phylactos A, Skirvin L, Stacey F. Are deficits of arachidonic and docosahexaenoic acid responsible for the neural and vascular complications of preterm babies? Am J Clin Nutr 1997;66:S1032-41.

20. DeLany JP, Windhauser MM, Champagne CM, Bray GA. Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. Am J Clin Nutr 2000;72:905-11.

21. Del Prado M, Villalpando S, Elizondo A, Rodriguez M, Demmelmair H, Koletzko B. Contribution of dietary and newly formed arachidonic acid to human milk lipids in women eating a low-fat diet. Am J Clin Nutr 2001;74:242-7.

22. Demmelmair H, von Schenck U, Behrendt E, Sauerwald T, Koletzko B. Estimation of arachidonic acid synthesis in full term neonates using natural variation of ^{13}C content. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1995;21:31-6.

23. Demmelmair H, Sauerwald T, Koletzko B, Richter T. New insights into lipid and fatty acid metaolism via stable isotopes. Eur J Pediatr 1997;S156:S70-4.

24. Demmelmair H, Baumheuer M, Koletzko B, Dokoupil K, Kratl G. Metabolism of U^{13}C-labeled linoleic acid in lactating women. J Lipid Res 1998;39:1389-1396.

25. Farquharson J, Cockburn F, Patrick AW, Jamieson E, Logan RW. Infant cerebral cortex phospholipid fatty-acid composition and diet. Lancet 1993;40:810-3.

26. Fidler N, Sauerwald T, Demmelmair H, Pohl A, Koletzko B. Oxidation of an oil rich in docosahexaenoic acid compared to linoleic acid in lactating women. Ann Nutr Metab1999;43:339-345.

27. Fidler N, Sauerwald T, Pohl A, Demmelmair H, Koletzko B. Docosahexaenoic acid transfer into human milk after dietary supplementation: a randomized clinical trial. J Lipid Res 2000;41:1376-83.

28. Francois CA, Connor SL, Wander RC, Connor WE. Acute effects of dietary fatty acids on the fatty acids of human milk. Am J Clin Nutr 1998;67:301-8.

29. Fu Z, Sinclair AJ. Novel pathway of metabolism of alpha-linolenic acid in the guinea pig. Pediatr Res 2000;47:414-7.

30. Genzel-Boroviczeny O, Wahle J, Koletzko B. Fatty acid composition of human milk during the 1st month after term and preterm delivery. Eur J Pediatr 1997;156:142-7.

31. Ghebremeskel K Leighfield M, Leaf A, Costeloe K, Crawford MA. Fatty acid composition of plasma and red cell phospholipids of preterm babies fed on breast milk and formulae. Eur J Pediatr 1995;154:46-52.

32. Gibson RA, Kneebone GM. Effect of sampling on fatty acid composition of human colostrum. J Nutr 1980;110:1671-5.

33. Glew RH, Omene JA, Vignetti S, D`Amico M, Evans RW. Fatty acid composition of breast milk lipids of Nigerian women. Nutr Res 1995;15:477-89.

34. Guesnet P, Pascal G, Durand G. Effects of dietary alpha-linolenic acid deficiency during pregnancy and lactation on lipid fatty acid composition of liver and serum in the rat. Reprod Nutr Dev 1988;28:275-92.

35. Hachey DL, Thomas MR, Emken EA, Garza C, Brown-Booth L, Adlof RO, Klein PD. Human lactation: maternal transfer of dietary triglycerides labeled with stable isotopes. J Lipid Res 1987;28:1185-92.

36. Harzer G, Haug M, Dieterich I, Gentner PR. Changing patterns of human milk lipids in the course of lactation and during the day. Am J Clin Nutr 1983;37:612-21.

37. Haycock GB, Schwartz GJ, Wisotsky DH. Geometric method for measuring body surface area: a height-weight formula validated in infants, children, and adults. J Pediatr 1978;93(1):62-6.

38. Heseker H, Adolf T, Eberhardt W, Hartmann S, Herwig A, Kübler W, Matiaske B, Moch KJ, Nitsche A, Schneider R, Zipp A. Lebensmittel- und Nährstoffaufnahme Erwachsener in der Bundesrepublik Deutschland. In: Kübler W, Anders HJ, Heeschen W, Kohlmeier M. Verbundstudie Ernährungserhebung Risikofaktoren Analytik. Giessen, Wissenschaftlicher Fachverlag Dr. Fleck. 1996.

39. Insull W, Hirsch J, James T, Ahrens EH. The fatty acids of human milk. II. Alterations produced by manipulation of caloric balance and exchange of dietary fats. J Clin Invest 1959;38:443-50.

40. Jensen CL, Prager TC, Fraley JK, Chen H, Anderson RE, Heird WC. Effect of dietary linoleic/alpha-linolenic acid ratio on growth and visual function of term infants. J Pediatr 1997;131:200-9.

41. Jensen RG. Lipids in human milk. Lipids 1999;34:1243-1271.

42. Jones AE, Stolinski M, Smith RD, Murphy JL, Wootton SA. Effect of fatty acid chain length and saturation on the gastrointestinal handling and metabolic disposal of dietary fatty acids in women. Br J Nutr 1999;81:37-43.

43. Kohlmeier L. Future of dietary exposure assessment. Am J Clin Nutr 1995;61(Suppl.):S702-9.

44. Koletzko B, Mrotzek M, Bremer HJ. Fatty acid composition of mature human milk in Germany. Am J Clin Nutr 1988;47:954-9.

45. Koletzko B, Mrotzek M, Bremer HJ. Fatty acid composition of mature human milk in Nigeria. Eur J Nutr 1991;30:289-97.

46. Koletzko B, Thiel I, Abiodun PO. The fatty acid composition of human milk in Europe and Africa. J Pediatr 1992;120:S62-70.

47. Koletzko B, Sauerwald T, Demmelmair H. Safety of stable isotope use. Eur J Pediatr 1997;156:S12-7.

48. Koletzko B, Rodriguez-Palermo M. Polyunsaturated fatty acids in human milk and their role in early infant development. J Mammary Gland Biol Neoplasia 1999;4:269-84.

49. Koletzko B, Agostoni C, Carlson SE, Clandinin T, Hornstra G, Neuringer M, Uauy R, Yamashiro Y, Willatts P. Long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) and perinatal development. Acta Paediatr 2001;90:460-4.

50. Lamptey MS, Walker BL. A possible essential role for dietary linolenic acid in the development of the young rat. J Nutr 1976;106:86-93.

51. Larque E, Demmelmair H, Koletzko B. Perinatal supply and metabolism of long-chain polyunsaturated fatty acids: importance for the early development of the nervous system. Ann N Y Acad Sci 2002;967:299-310.

52. Lauritzen L, Jorgensen M, Hansen HS, Michaelsen KF. Fluctuations in human milk long-chain PUFA levels in relation to dietary fish intake. Lipids 2002;37:237-44.

53. Leyton J, Dury PJ, Crawford MA. Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in the rat. Br J Nutr 1987;57:383-93.

54. Leyton J, Drury PJ, Crawford MA. In vivo incorporation of labeled fatty acids in rat liver lipids after oral administration. Lipids 1987;22:553-8.

55. Lynn WS, Brown R. Oxidation and activation of unsaturated fatty acids. Arch Biochem Biophys 1959;81:353-62.

56. Makrides M, Simmer K, Neumann M, Gibson R. Changes in the polyunsaturated fatty acids of breast milk from mothers of full-term infants over 30 wk of lactation. Am J Clin Nutr 1995;61:1231-3.

57. Makrides M, Gibson RA. Long-chain polyunsaturated fatty acid requirements during pregnancy and lactation. Am J Clin Nutr 2000;71S:307S-11S.

58. Martin JC, Niyongabo T, Moreau L, Antoine JM, Lanson M, Berger C, Lamisse F, Bougnoux P, Couet C. Essential fatty acid composition of human colostrum triglycerides : its relationship with adipose tissue composition. Am J Clin Nutr 1991;54:829-35.

59. Martin JC, Bougnoux P, Fignon A, Theret V, Antoine JM, Lamisse F, Couet C. Dependence of human milk essential fatty acids on adipose stores during lactation. Am J Clin Nutr 1993;58:653-9.

60. Matissek R, Schnepel FM, Steiner G. Extraktion nach Ammoniakaufschluss-Methode nach Röse-Gottlieb. In: Lebensmittelanalytik (Hrsg.:Matissek R, Schnepel FM, Steiner G.). Berlin 1989, Springer-Verlag, S. 38-40.

61. Mead JF, Slaton WF, Decker AB. Metabolism of the essential fatty acids. II. The metabolism of stearate, oleate, and linoleate by fat-deficient and normal mice. J Biol Chem 1956;218:401-7.

62. Mellies MJ, Ishikawa TT, Gartside PS. Effects of varying maternal dietary fatty acids in lactating women and their infants. Am J Clin Nutr 1979;32:299-303.

63. Metges CC, Wolfram G. Different $^{13}CO_2$ recovery of orally administered [1-^{13}C]- and [8-^{13}C] triolein in postprandial humans: an effect of phosphoenolpyruvate-carboxykinase (EC 4.1.1.32) in peripheral tissues? Clin Nutr 1993;12:337-43.

64. Mohammed BS, Sankarappa S, Geiger M, Sprecher H. Reevaluation of the pathway for the metabolism of 7,10,13,16-docosaetraenoic acid to 4,7,10,13,16-docosapentaenoic acid in rat liver. Arch Biochem Biophys 1995;317:179-84.

65. Moore SA, Hurt E, Yoder E, Sprecher H, Spector AA. Docosahexaenoic acid synthesis in human skin fibroblasts involves peroxisomal retroconversion of tetracosahexaenoic acid. J Lipid Res 1995;36:2433-2443.

66. Neuringer M. Infant vision and retinal function in studies of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids: methods, results, and implications. Am J Clin Nutr 2000;71:S256-67.

67. Pawlosky RJ, Hibbeln JR, Novotny JA, Salem N. Physiological compartmental analysis of α-linolenic acid metabolism in adult humans. J Lipid Res 2001;42:1265-70.

68. Peluffo RO, Nervi AM, Brenner RR. Linoleic acid desaturation activity of liver microsomes of essential fatty acid deficient and sufficient rats. Biochim Biophys Acta 1976;441:25-31.

69. Pita ML, Morales J, Sanchez-Pozo A, Martinez-Valverde JA, Gil A. Influence of the mother´s weight and socioeconomic status on the fatty acid composition of human milk. Ann Nutr Metab 1985;29:366-73.

70. Pouteau E, Maugère P, Darmaun D, Marchini JS, Piloquet H, Dumon H, Nguyen P, Krempf M. Role of glucose and glutamine synthesis in the differential recovery of $^{13}CO_2$ from infused [2-^{13}C] versus [1-^{13}C] acetate. Metabolism 1998;47:549-54.

71. Qureshi IA, Xi XR, Limbu YR, Bin HY, Chen MY. Hyperlipidaemia during normal pregnancy, parturition, and lactation. Ann Aca Med Singapore 1999;28:217-21.

72. Rating D, Langhans CD. Breath tests: concepts, applications and limitations. Eur J Pediatr 1997;S156:S18-23.

73. Rebuffé-Scrive M, Enk L, Crona N, Lönnroth P, Abrahamsson L, Smith U, Björntorp P. Fat cell metabolism in different regions in women. Effect of menstrual cycle, pregnancy, and lactation. J Clin Invest 1985;75:1973-6.

74. Rodriguez-Palmero M, Koletzko B, Kunz C, Jensen R. Nutritional and biochemical properties of human milk, Part II. Lipids, micronutrients, and bioactive factors. Clin Perinatol 1999;26:335-9.

75. Salem N, Wegher B, Mena P, Uauy R. Arachidonic and docosahexaenoic acid are biosynthesized from their 18-carbon precursors in human infants. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:49-54.

76. Salem N Jr, Litman B, Kim HY, Gawrisch K. Mechanisms of action of DHA in the nervous system. Lipids 2001;36:945-59.

77. Sanders TAB, Ellis FR, Dickerson JWT. Studies of vegans: the fatty acid composition of plasma choline phosphoglycerides, erythrocytes, adipose tissue, and breast milk, and some indicators of susceptibility to ischemic heart disease in vegans and onmivore controls. Am J Clin Nutr 1978;31:805-13.

78. Sanders TAB, Reddy S. The influence of a vegetarian diet on the fatty acid composition of human milk and the essential fatty acid status of the infant. J Pediatr 1992;120:S71-7.

79. Sanders TAB. Essential fatty acid requirements of vegetarians in pregnancy, lactation, and infancy. Am J Clin Nutr 1999;70:S555-9.

80. SanGiovanni JP, Parra-Cabrera S, Colditz GA, Berkey CS, Dwyer JT. Meta-analysis of dietary essential fatty acids and long-chain polyunsaturated fatty acids as they relate to visual resolution acuity in healthy preterm infants. Pediatrics 2000;105:1292-8.

81. Sauerwald T, Demmelmair H, Koletzko B. Zur Unbedenklichkeit von stabilen Isotopen in der pädiatrischen Forschung und Diagnostik. Monatsschr Kinderheilkd 1996;114:636-42.

82. Sauerwald TU, Hachey DL, Jensen CL, Chen H, Anderson RE, Heird WC. Intermediates in endogenous synthesis of C22:6n-3 and C20:4n-6 by term and preterm infants. Pediatr Res 1997;41:183-7.

83. Sauerwald TU, Demmelmair H, Koletzko B. Polyunsaturated fatty acid supply with human milk. Lipids 2001;36:991-6.

84. Schrauwen P, van Aggel-Leijssen PC, van Marken Lichtenbelt WD, van Baak MA, Gijsen AP, Wagenmakers AJM. Validation of the [1,2-^{13}C]acetate recovery factor for correction of [U-^{13}C]palmitate oxidation rates in humans. J Physiol 1998;513:215-23.

85. Sheaff Greiner RC, Zhang Q, Goodman KJ, Giussani DA, Nathanielsz PW, Brenna JT. Linoleate, alpha-linolenate, and docosahexaenoate recycling into saturated and monounsaturated fatty acids is a major pathway in pregnant or lactating adults and fetal or infant rhesis monkeys. J Lipid Res 1996;37:2675-86.

86. Sidossis LS, Coggan AR, Gastaldelli A, Wolfe RR. Pathway of free fatty acid oxidation in human subjects. Implications for tracer studies. J Clin Invest 1995;95:278-84.

87. Sidossis LS, Coggan AR, Gastaldelli A, Wolfe RR. A new correction factor for use in tracer estimations of plasma fatty acid oxidation. Am J Physiol 1995; 269:E649-56.

88. Sinclair AJ, Long chain polyunsaturated fatty acids in the mammalian brain. Proc Nutr Soc 1975;34:287-91.

89. Sinclair AJ, Attar-Bashi NM, Li D. What is the role of α-linolenic acid for mammals? Lipids 2002;37:1113-23.

90. Spear ML, Hamosh M, Bitman J, Spear ML, Larry Wood D. Milk and blood fatty acid composition during two lactations in the same woman. Am J Clin Nutr 1992;56:65-70.

91. Sprecher H. New advances in fatty-acid biosynthesis. Nutrition 1996;12:S5-7.

92. Sprecher H. An update on the pathways of polyunsaturated fatty acid metabolism. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 1999;2:135-8.

93. Sprecher H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. Biochim Biophys Acta 2000;1486:219-31.

94. Sun GY, Sun AY. Synaptosomal plasma membranes: acyl group composition of phosphoglycerides and (Na^+ + K^+)-ATPase activity during essential fatty acid deficiency. J Neurochem 1974;22:15-8.

95. Tjonneland A, Overvad K, Thorling E, Ewertz M. Adipose tissue fatty acids as biomarkers of dietary exposure in Danish men and women. Am J Clin Nutr 1993;57:629-33.

96. Toorop AI, Romsos DR, Leville GA. The metabolic fate of dietary 1-[^{14}C]linoleate and 1-[^{14}C]palmitate in meal-fed rats. Proc Soc Exp Biol Med 1979;160:312-6.

97. Vermunt SHF, Mensink RP, Simonis MMG, Hornstra G. Effects of dietary α-linolenic acid on the conversion and oxidation of ^{13}C-α-linolenic acid. Lipids 2000;35:137-42.

98. Voss A, Reinhart M, Sankarappa S, Sprecher H. The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. J Biol Chem 1991;266:19995-20000.

99. Wolfe RR, Jahoor F. Recovery of labeled CO_2 during the infusion of C-1 vs C-2-labeled acetate: implications for tracer studies of substrate oxidation. Am J Clin Nutr 1990;51:248-52.

100. Wolfe RR (Hrsg.). Radioactive and stable isotope tracers in biomedicine. Principles and practice of kinetic analysis, Wiley-Liss Inc., New York 1992.

Curriculum vitae

Angelika Kuhn
Gabelsbergerstr. 46
80333 München

Telefon: 089-89340265

Geburtsdatum:	05.03.1977
Geburtsort:	München
Familienstand:	ledig
Schulbildung:	1987-1996 Besuch des Karolinen-Gymnasiums in Rosenheim - Abitur 06/1996
Akademische Ausbildung:	Wintersemester 1996/97 bis Wintersemester 2002/03 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München 09/1998 - Physikum 09/1999 - I. Staatsexamen 04/2002 - II. Staatsexamen 06/2003 - III. Staatsexamen
Facharztausbildung:	09/ 2003 – 09/2004 AiP in der IV. Medizinischen Abteilung (Rheumatologie) im Krankenhaus München-Bogenhausen Seit 10/2004 Assistenzärztin in der II. Medizinischen Abteilung (Gastroenterologie und Onkologie) im Krankenhaus München-Bogenhausen

München, 08.03.05