

**Einfluß von Ernährung und Umweltfaktoren
auf oxidative DNA-Schäden**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades

„DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN“

am Fachbereich Chemie und Pharmazie

der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von

Marie Isabel Homburg

geb. in Hoya / Weser

Mainz 2001

Tag der mündlichen Prüfung: 14.02.2002

Was wir wissen, ist ein Tropfen.

Was wir nicht wissen, ist ein Ozean.

Isaac Newton

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 1997 bis Juni 2001 am Institut für Pharmazie des Fachbereiches Chemie und Pharmazie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter Leitung von Prof. Dr. B. Epe angefertigt. Die Arbeiten wurden im Rahmen des EU-geförderten Projektes „Impact of ultraviolet radiation on health; nutrition for systemic protection“ (ENV4-CT97-0537) durchgeführt.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. B. Epe für die Überlassung des interessanten Themas, seine wissenschaftliche Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit, seine zahlreichen Anregungen, die stete Diskussionsbereitschaft und Hilfe.

Allen Partnern des EU-Projektes danke ich für die gute Kooperation und die zahlreichen, fruchtbaren Diskussionen. Mein besonderer Dank geht an die Gruppe um Dr. Lesley Rhodes (Universität Liverpool, Großbritannien) für die zur Verfügungstellung der Lymphozyten aus der EPA-Studie und an Dr. Ralf Moison (Gorlaeus Institut, Leiden, Niederlande) für die wissenschaftliche Unterstützung bei den Gehaltsbestimmungen von EPA und von Vitamin C mit GC bzw. HPLC und für viele wissenschaftliche Diskussionen.

Frau Dr. Inge Eckert danke ich für die unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung der vielen Toxizitäts- und Mikrokernratenbestimmungen.

Im Rahmen der Alkoholikerstudie in der Klinik für Psychiatrie und Psychosomatik der Universität Mainz möchte ich Prof. Dr. C. Hiemke für die freundliche Aufnahme in seinem Labor und Dr. A. Szegedi, Dr. H. Himmerich und Christina Hahn für die erfolgreiche Koordinierung und Durchführung der Studie danken.

Herrn Dipl. Chem. Thomas Colnot danke ich für die unermüdliche Beschaffung von Literatur, für die fachlichen Diskussionen und für sein immer offenes Ohr bei allen Sorgen, Problemen und Nöten.

Der Werkstatt und der Materialverwaltung des Institutes für Pharmazie danke ich für die immer freundliche und zuverlässige Hilfe bei technischen Problemen. Auch den freiwilligen Spendern der primären Lymphozyten in allen durchgeführten Untersuchungen gilt mein Dank.

Ich danke allen meinen Kolleginnen und Kollegen im AK Epe, insbesondere Dr. Inge Eckert, Claudia Flohr, Tina Heine, Simone Hoffmann, Dr. Hanns-Christian Mahler, Dr. Michael Pflaum, Nicole Phoa, Marcel Osterod, Dorothea Scherer, Ina Schulz und Lydia Weidenfeller.

1	<i>Einführung</i>	3
1.1	Reaktive Sauerstoffspezies	7
1.2	Die Bildung von ROS	8
1.3	Oxidative DNA-Modifikationen	11
1.4	Biologische Konsequenzen oxidativer DNA-Schäden	14
1.5	Antioxidantien in der Ernährung und Gesundheitszustand	17
1.5.1	Antioxidantien	19
1.5.2	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren - Eicosapentaensäure	27
1.6	Alkohol	30
1.6.1	Ethanol als Fremdstoff im Organismus	30
1.6.2	Alkoholismus und dessen Folgen	33
1.7	Zielsetzung	35
2	<i>Material und Methoden</i>	37
2.1	Material	37
2.1.1	Geräte	37
2.1.2	Verbrauchsmaterial	38
2.1.3	Chemikalien	38
2.1.4	Enzyme	39
2.1.5	Zellen	40
2.1.6	Medien, Lösungen, Puffer	40
2.2	Methoden	42
2.2.1	Zellkultur	42
2.2.2	Studiendesign der Probandenstudie mit EPA	44
2.2.3	Probandenstudie bzgl. chronischen Alkoholmißbrauchs	44
2.2.4	Bestimmung des Vitamin C-Gehaltes im Zellysat und im Blut	47
2.2.5	Bestimmung der EPA-Aufnahme in AS52	48
2.2.6	Alkalische Elution	49
2.2.7	Toxizitätstest	54
2.2.8	Mikrokerntest	54
3	<i>Ergebnisse</i>	56
3.1	Einfluß von Vitamin C in AS52	56
3.1.1	Beeinflussung der DNA-Modifikationen durch Vitamin C <i>in vitro</i>	57
3.1.2	Beeinflussung der Mikrokernrate in AS52-Zellen durch Vitamin C	60
3.1.3	Einfluß von Vitamin C auf die Zytotoxizität in AS52-Zellen	65
3.2	Einfluß von Vitamin C auf Lymphozyten <i>in vivo</i>	69
3.2.1	Beeinflussung der oxidativen DNA-Modifikationen in Lymphozyten durch orale Vitamin C-Gabe	70
3.2.2	Inter- und intraindividuelle Schwankungen der Modifikationen	72
3.2.3	Einfluß von Katalasezusatz bei der Blutabnahme auf die Bildung von Modifikationen	72
3.2.4	Einfluß der Kryokonservierung auf die Bildung von Modifikationen	74
3.3	Einfluß von Vitamin C auf Lymphozyten <i>in vitro</i>	76

3.4	Einfluß von MMPDCD in AS52	77
3.4.1	Beeinflussung von DNA-Modifikationen durch MMPDCD.....	77
3.4.2	Einfluß von MMPDCD auf die Mikrokernrate	80
3.4.3	Einfluß von MMPDCD auf die Zytotoxizität in AS52-Zellen	83
3.5	Einfluß von EPA in AS52	85
3.5.1	Resorption von EPA	85
3.5.2	Einfluß von EPA auf oxidative DNA-Modifikationen.....	87
3.5.3	Beeinflussung der Mikrokernrate durch EPA	90
3.5.4	Einfluß von EPA auf die Zytotoxizität.....	92
3.6	Einfluß von EPA in humanen Lymphozyten	94
3.6.1	Einfluß von EPA auf die DNA-Modifikationen.....	94
3.6.2	Vergleich Verum – Placebo – Gruppen.....	96
3.7	Einfluß von Ethanol auf AS52	96
3.8	Einfluß von chronischer Ethanolaufnahme auf humane Lymphozyten und Blutparameter	97
3.8.1	Erhebung des Alkoholkonsums vor Probennahme.....	98
3.8.2	Einfluß von Ethanol und von Ethanolentzug auf die DNA-Modifikationen in humanen Lymphozyten	100
3.8.3	Vergleich der Blutparameter zwischen Kontroll- und Alkoholikergruppe	106
3.8.4	Korrelationen der Blutparameter nach Pearson.....	110
3.8.5	Einfluß der Lagerzeit auf den DNA-Schaden.....	118
4	Diskussion	120
4.1	Wirkung von Vitamin C auf den oxidative DNA-Schaden in Zellkultur und <i>in vivo</i>	120
4.2	Einfluß von MMPDCD auf den oxidativen DNA-Schaden	126
4.3	EPA als untypisches Antioxidans	128
4.4	Effekte durch Ethanol	133
5	Zusammenfassung	137
6	Abkürzungen	140
7	Literatur	142

1 Einführung

Nach der Veröffentlichung des Statistischen Bundesamtes von 1999 liegen Krebs-erkrankungen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen auf Platz zwei der Todesursachen in Deutschland. 27,6 % der Sterbefälle bei Männern (22,5 % bei Frauen) lassen sich auf maligne Neubildungen zurückführen (Tab.1.1). Hierbei überwiegen bei Männern Erkrankungen der Luftröhre, Bronchien und der Lunge und bei Frauen das Mammakarzinom. Vermutlich werden Krebserkrankungen bald Herz-Kreislauf-Erkrankungen als häufigste Todesursache verdrängen, da sie im Gegensatz zu diesen meist schlecht heilbar bzw. therapierbar sind (Dekant *et al.*, 1994).

	Männer	Frauen
Insgesamt	390700	455600
Herz-Kreislauf-Erkrankungen	166400	238500
Krebs	108000	102400
Herzinfarkt	42500	34400
Atemwegserkrankungen	26600	24700
Nicht natürliche Ursachen	21500	12400
Erkrankungen der Verdauungsorgane	20300	19700
sonstige	5400	23500

Tab.1.1 Statistik der Todesursachen 1999 (Statistisches Bundesamt, 2000)

Die Ursachen für Krebserkrankungen werden bereits seit längerer Zeit untersucht. Vermutlich spielt die genetische Prädisposition der Betroffenen eine eher geringe Rolle. Dagegen sind äußere Ursachen wie synthetische Chemikalien und natürliche Stoffe aus der Nahrung, Viren und Strahlung von sehr viel größerer Bedeutung. Man spricht chemischen Verbindungen einen quantitativen Beitrag von etwa 90 % an Krebserkrankungen zu. Untersuchungen zur chemischen Kanzerogenese begannen bereits mit Beobachtungen von Menschen vor vielen Jahren. So beobachtete John Hill 1761 das Auftreten von Nasenkrebs bei Tabakschnupfern, Percival Pott 1775 den Hodenkrebs bei Schornsteinfegern und Ayrton um 1820 den Hautkrebs nach einer Arsentherapie.

Tumorzellen unterscheiden sich von körpereigenen, normalen Zellen durch ihr autonomes, unkontrolliertes Wachstum und durch eine veränderte Morphologie, was auf Veränderungen des Erbgutes zurückzuführen ist. Sie entstehen ursprünglich aus einer

einigen Zelle und sind somit monoklonal. Sie wachsen ohne Einordnung in die Organfunktion, d.h. infiltrierend und unter Zerstörung des umliegenden Gewebes. Eine weitere Eigenschaft von entarteten Zellen ist die Fähigkeit, über Blut- und Lymphbahnen ihren Entstehungsort zu verlassen, in entferntem Gewebe Metastasen zu bilden und sich so im gesamten Organismus auszubreiten. Im Zellverband des Organismus unterliegt eine Zelle nicht einem Selektionsdruck wie Einzeller (Hefen und Bakterien) und teilt sich nicht so oft, wie es die Nährstoff- und Platzsituation der Umgebung zuließe. Sie unterliegt Regelkreisen, die im jugendlichen Organismus für ein koordiniertes und gleichmäßiges Wachstum und beim adulten für eine konstante Organgröße und für eine Aufrechterhaltung der notwendigen Funktionen sorgen.

Epidemiologische Beobachtungen am Menschen und entsprechende Tierversuche zeigten, daß es für die meisten Krebsarten eine Latenzzeit zwischen dem genotoxischen Ereignis und der Ausprägung der Krebserkrankung gibt. Nach derzeitiger Vorstellung läuft der Vorgang der Tumorentstehung über eine Reihe von unabhängigen Zwischenstufen ab. Primär muß die für die Erbinformation und eine geregelte Zellteilung verantwortliche DNA im Zellkern durch chemische, physikalische oder virale Einflüsse modifiziert werden. Diese molekulare Veränderung der DNA (DNA-Schaden) kann in der Regel durch DNA-Reparaturmechanismen wieder korrigiert werden, wenn die genotoxische Schädigung in einer ruhenden Zelle erfolgt. Trifft die Noxe auf Zellen in der Teilungsphase, so kann oft keine Reparatur mehr stattfinden und sich der Schaden als Mutation manifestieren. Mutationen in bestimmten Genen stellen den Initiationsschritt der Kanzerogenese dar. Bei einer Mitosesteigerung, z.B. bei chronischen Entzündungen, intensiver UV-Bestrahlung der Haut etc. ist die Gefahr einer Initiation durch Kanzerogene folglich besonders groß. Die für diese erste Phase der Tumorentstehung verantwortlichen Substanzen (Mutagene) können bereits in kleinsten Mengen das Genom einer Zelle so verändern, daß sich aus ihr eine Tumorzelle entwickeln kann. Initiierte Zellen werden zunächst mit verschiedenen Kontrollmechanismen am Wachstum gehindert. Die Wachstumskontrolle erfolgt von den umliegenden, nicht initiierten Zellen über interzelluläre Verbindungen (gap junctions). Erst wenn diese Kontrollmechanismen durch sogenannte Promotoren ausgeschaltet werden, beginnt das entartete Wachstum der initiierten Zelle.

Folglich besitzen Promotoren selbst keine genotoxischen Eigenschaften, sind jedoch in der Lage, initiierte Zellen zum Wachstum und damit zur Tumorbildung zu

stimulieren. Sie stellen einen mehr oder weniger selektiven Wachstumsstimulus für initiierte Zellen dar und ermöglichen ihre klonale Expansion. Am Ende der Promotionsphase steht die präneoplastische Zelle. Der letzte Schritt in Richtung Tumorentstehung ist die Progression. Hierdurch wird die präaligne Zelle in eine invasiv wachsende Tumorzelle umgewandelt. Die Zelle verliert dabei ihre Fähigkeit zur Differenzierung, so daß letztlich Tumorzellen unter Umständen völlig andere Eigenschaften als die Ausgangszelle besitzen. Je entdifferenzierter eine Tumorzelle ist, umso schneller wächst sie (Abb. 1.1).

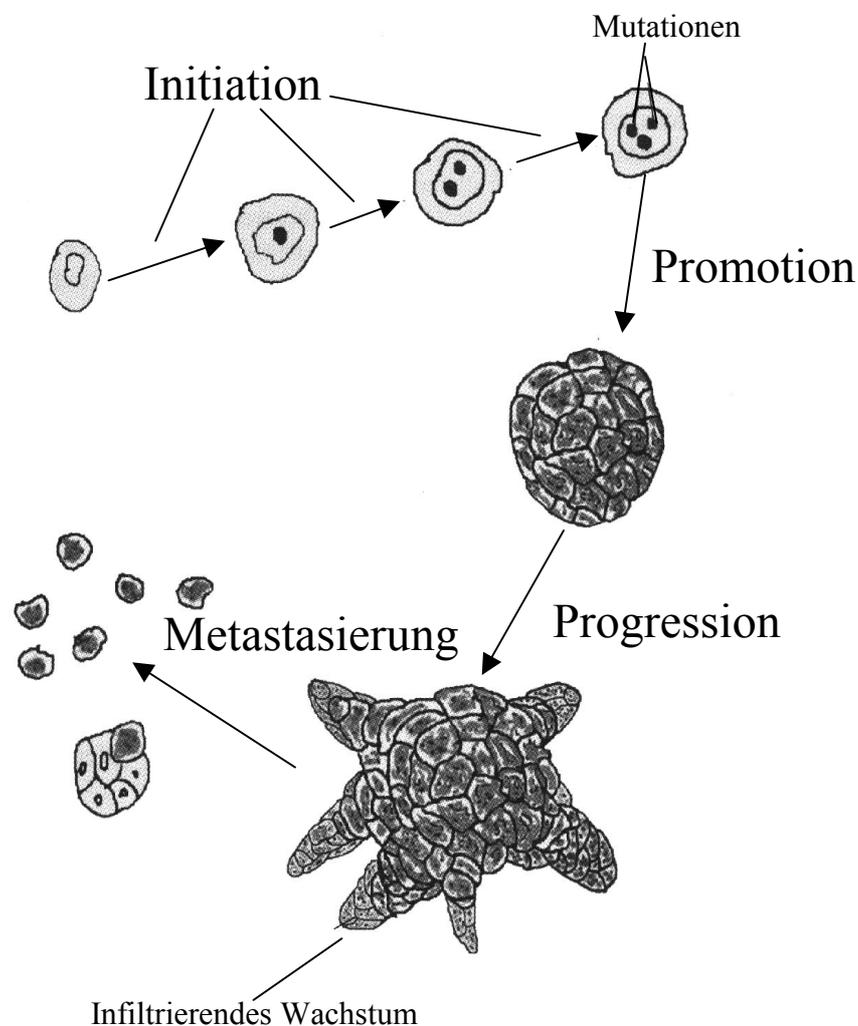


Abb. 1.1 Schritte der Kanzerogenese (nach Dekant *et al.*, 1994)

Für die initiale DNA-Schädigung sind sowohl endogene als auch exogene Faktoren von Bedeutung. Eine besonders wichtige Rolle hierbei spielen reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species = ROS), die endogen in der Atmungskette oder bei der Lipidperoxidation und exogen durch Chemikalien oder Strahlung entstehen. Eine DNA-Schädigung tritt in jeder Zelle häufig auf und ist noch reversibel, da zelleigene Reparaturmechanismen greifen (Sato *et al.*, 1994; Lindahl *et al.*, 1999), bevor sich der Schaden als Mutation manifestiert. In jeder Zelle besteht ein aktives Gleichgewicht zwischen Bildung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden, das in Abbildung 1.2 dargestellt ist und das zu sogenannten Untergrundspiegeln oxidativer DNA-Modifikationen in allen Zellen führt.

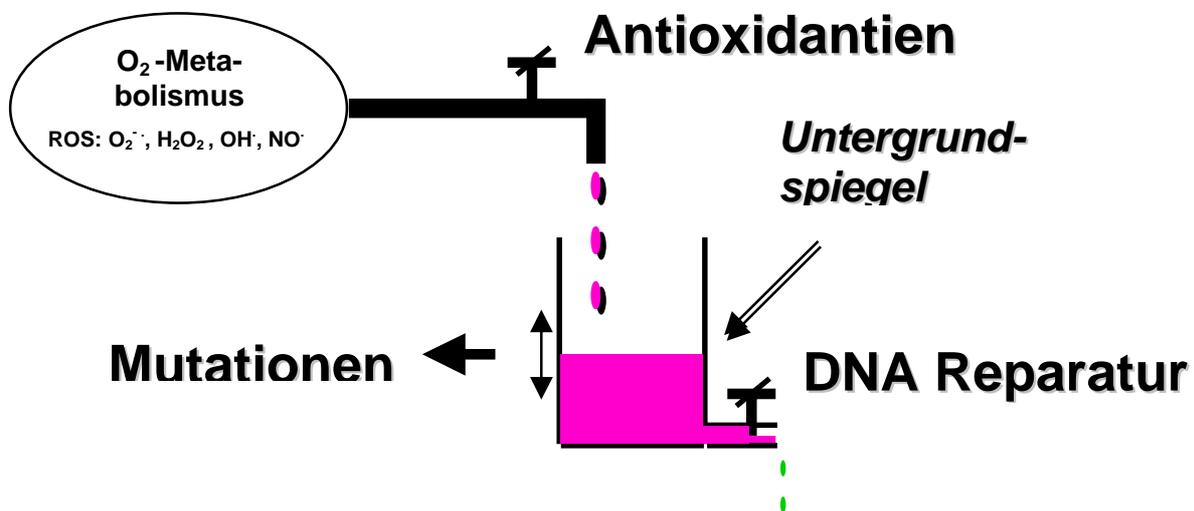


Abb. 1.2 Gleichgewicht zum Untergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden

Die Entstehung bösartiger Tumoren ist von den drei Faktoren Alter, Disposition und Exposition abhängig. Je älter, je stärker disponiert und je häufiger und länger exponiert das Individuum ist, desto häufiger treten maligne Tumore auf. Die Disposition ist in erster Linie erblich bedingt. Es gibt Familien mit einer über dem allgemeinen Durchschnitt liegenden Häufigkeit bestimmter Organtumoren. Die hierfür verantwortlichen spezifischen Mutationen im Genom („Onkogene“, „Tumorsuppressorgene“ etc.) sind nur teilweise identifiziert. Zu malignen Tumoren disponieren aber auch bestimmte Erkrankungen wie Gallensteine für das Gallenblasenkarzinom, Colitis ulcerosa für das Kolonkarzinom oder Fisteln für den Hautkrebs. Die Exposition umfaßt alle Umweltfaktoren, die Einfluß auf die

Tumorentstehung nehmen. Ein wesentlicher Faktor ist die Ernährungsweise (siehe Kapitel 1.5), auf die man etwa ein Drittel aller Krebserkrankungen in den westlichen Ländern zurückführt.

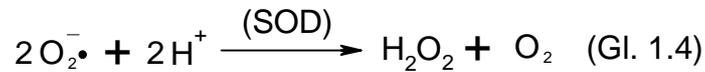
1.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Für die aerobe Zelle ist die Sauerstoffaktivierung zur Energiegewinnung unerlässlich. Bei der Ein-Elektronen-Reduktion (Gl.1.1) von molekularem Sauerstoff zu Wasser entstehen verschiedene, sehr reaktive Sauerstoffverbindungen (Tab.1.2), die an der Krebsentstehung, Alterung und an Entzündungsvorgängen beteiligt sind. Obwohl diese reaktiven Sauerstoffspezies meist nur eine kurze Halbwertszeit besitzen, können sie mit der DNA, Proteinen und Lipiden (z.B. ungesättigten Fettsäuren) reagieren. Dies führt zu Strangbrüchen und oxidativen Schäden an der DNA und zu Quervernetzungen zwischen Proteinen bzw. zwischen Protein und DNA. Lipide werden zu Peroxiden oxidiert, die wiederum eine radikalische Kettenreaktion eingehen und zu weiterem oxidativen Schaden führen können.

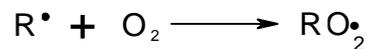
Formel	Bezeichnung
HO•	Hydroxyl-Radikal
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
HO ₂ •	Perhydroxyl-Radikal
O ₂ ⁻ •	Superoxid-Radikalanion
RO•	Alkoxy-Radikal (R=Alkylrest)
ROO•	Hydroperoxy-Radikal (R=Alkylrest)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOCl	Hypochlorige Säure
NO•	Stickstoffmonoxid

Tab.1.2 Reaktive Sauerstoffspezies mit abnehmender Reaktivität (nach Markant *et al.*, 1995)

Außerdem bilden sich unter sauren Bedingungen Perhydroxylradikale ($\text{HO}_2\cdot$) aus anionischen Superoxidradikalen.



Hydroxylradikale sind sehr viel reaktiver als Singulett-Sauerstoff und als Superoxid. Sie können mit organischen Verbindungen wie z.B. DNA, Proteinen und Lipiden (Halliwell *et al.*, 1985; Southorn *et al.*, 1988) reagieren und durch Wasserstoffabstraktion aus Wasserstoff-Kohlenstoff-Bindungen eine radikalische Kettenreaktion einleiten (Gl. 1.5). Ein Kettenabbruch der Radikalbildung ist durch Reaktion zweier Radikale zu einer stabilen Verbindung möglich.



Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) gehört ebenfalls zu den endogen gebildeten ROS (Epe, 1991). Er entsteht unter dem Einfluß von Licht auf endogene Photosensibilisatoren [z.B. Flavinen (Joshi, 1985) und Porphyrinen (Lambert *et al.*, 1986)] oder lichtunabhängig bei der Reaktion von Oxidasen wie Peroxidasen, Lipoxygenase oder dem Cytochromkomplex (Kanofsky, 1989). Singulett-Sauerstoff besitzt eine längere Halbwertszeit als das Hydroxylradikal und kann vor seiner Abreaktion auch in andere Zellkompartimente diffundieren (Diffusionsweg: 1-2 μm). Gelangt er in den Zellkern, kann er mit der DNA unter Bildung von 8-Hydroxyguanin (8-oxoG) reagieren (Epe, 1991).

1. Zelluläre Atmung
 - Mitochondrialer Elektronentransport
 - Hexosemonophosphat shunt
2. Biosynthese und Abbau im normalen intermediären Metabolismus
 - Arachidonsäuremetabolismus
 - β -Oxidation von Fettsäuren
 - Oxidation von Aminosäuren
 - Eisenmetabolismus
 - Biosynthese von Ascorbinsäure (nicht im Menschen)
 - Oxidation von Polyaminen
 - Biosynthese von Steroiden
 - Oxidation von Purinen
3. Biotransformation von Fremdstoffen
 - Mikrosomaler Elektronentransport (Cytochrom P450)
 - andere Oxidasen
 - Peroxidative Oxidation (Myeloperoxidasen, Prostaglandin-Synthetase)
4. Aktivierung von phagozytotischen Zellen durch natürliche Stimuli
 - Periphere Leukozyten
 - Makrophagen aus Geweben
 - Kupfferzellen
 - Clarazellen

Tab. 1.3 Vorgänge, bei denen ROS gebildet werden, nach Frenkel, 1992

Von Außen kann man die Bildung von ROS (vor allem $^1\text{O}_2$ und $\text{O}_2^{\cdot-}$) durch die Zufuhr von Photosensibilisatoren erreichen. Ein Beispiel hierfür ist die stark gelb fluoreszierende Verbindung [R]-1[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl)carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol (Abb. 1.3), welche Ro 19-8022 genannt wird. Sie wurde von der Firma Hoffman-La Roche ursprünglich als Tranquillans entwickelt, erwies sich aber im Ames-Test in Kombination mit sichtbarem Licht als mutagen. Zellfreie Untersuchungen an Bakteriophagen-DNA (PM2-Assay) zeigten, daß Ro 19-8022 Singulett-Sauerstoff freisetzt, was im Schadensprofil durch den hohen Anteil an Formamidopyrimidin-Glykosylase (Fpg)-sensitiven Modifikationen am Gesamtschaden deutlich wird (Epe *et al.*, 1994; Wengler *et al.*, 1995). In Säugerzellen erzeugt dieser Photosensibilisator mit Licht ein sehr ähnliches Schadensbild, welches sich auf Singulett-Sauerstoff zurückführen läßt (Wengler *et al.*, 1995).

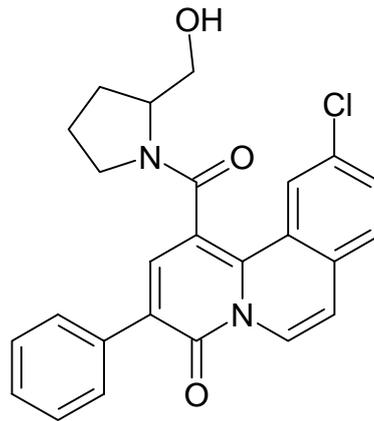


Abb. 1.3 Strukturformel von Ro 19-8022

Andere Beispiele für die Bildung von ROS sind SIN-1, ein Metabolit von Molsidomin (Duchstein *et al.*, 1995), Kaliumbromat, welches vermutlich über die Bildung von Bromradikalen Einfluß auf die ROS-Bildung nimmt, und Riboflavin, das wahrscheinlich sowohl Superoxidation als auch Singulett-Sauerstoff freisetzen kann (Korycka-Dahl *et al.*, 1980; Joshi, 1985). Eine vermehrte Auftreten von ROS in Zellen wird als oxidativer Stress bezeichnet, auf den sie mit adäquaten Maßnahmen reagieren müssen.

1.3 Oxidative DNA-Modifikationen

Ein oxidativer Schaden an DNA-Basen, am Zucker-Phosphat-Gerüst oder an Proteinen entsteht endogen in allen Zelltypen auch unter physiologischen Bedingungen und ist eine natürliche Herausforderung an die Genomintegrität. Zwar sind die genauen Schädigungsmechanismen noch nicht bekannt, es ist aber sicher, daß ROS eine sehr wichtige Rolle spielen (Epe *et al.*, 1988). Die Oxidation der DNA kann theoretisch durch verschiedene Mechanismen gefördert werden: vermehrte Bildung von ROS, verminderte antioxidative Abwehr oder Hemmung der Reparatur von oxidativen Schäden (Douki *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2000). Besonders wichtig sind hier Enzyme (z.B. Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase) und Antioxidantien (z.B. Glutathion, Ascorbinsäure), die ROS abfangen, und die spezifische

Reparatur, die modifizierte Basen aus der DNA entfernt. Da diese Abwehrmechanismen nicht perfekt funktionieren, findet sich in jeder Zelle ein gewisser Hintergrund an DNA-Schäden, der sich durch das Gleichgewicht von Bildung und Entfernung von Modifikationen ausdrückt (s. Abb 1.2).

Es gibt eine große Vielzahl von oxidativen DNA-Modifikationen (Abb. 1.4). Zellfrei wurden bisher über 100 verschiedene Modifikationen nachgewiesen (von Sonntag, 1987; Halliwell *et al.*, 1992), von denen sich viele im Säugerzellmodell als prämutagen gezeigt haben (Moriya, 1993). Es gibt verschiedene Oxidationsprodukte von allen DNA-Basen (von Sonntag, 1987; Ballmaier *et al.*, 1995; Cadet *et al.*, 1997). Da Guanin das niedrigste Oxidationspotential aller DNA-Basen besitzt und sich somit am leichtesten oxidieren läßt, kommt die Modifikation 8-oxoG am häufigsten vor (Halliwell *et al.*, 1991) und kann deshalb als Marker für die Erkennung von oxidativem Stress in der Zelle genutzt werden (Kasai *et al.*, 1993). Die Formamidopyrimidine (Fapy-Modifikationen) entstehen aus oxidierten Pyrimidin-Basen durch Öffnung des Imidazolringes.

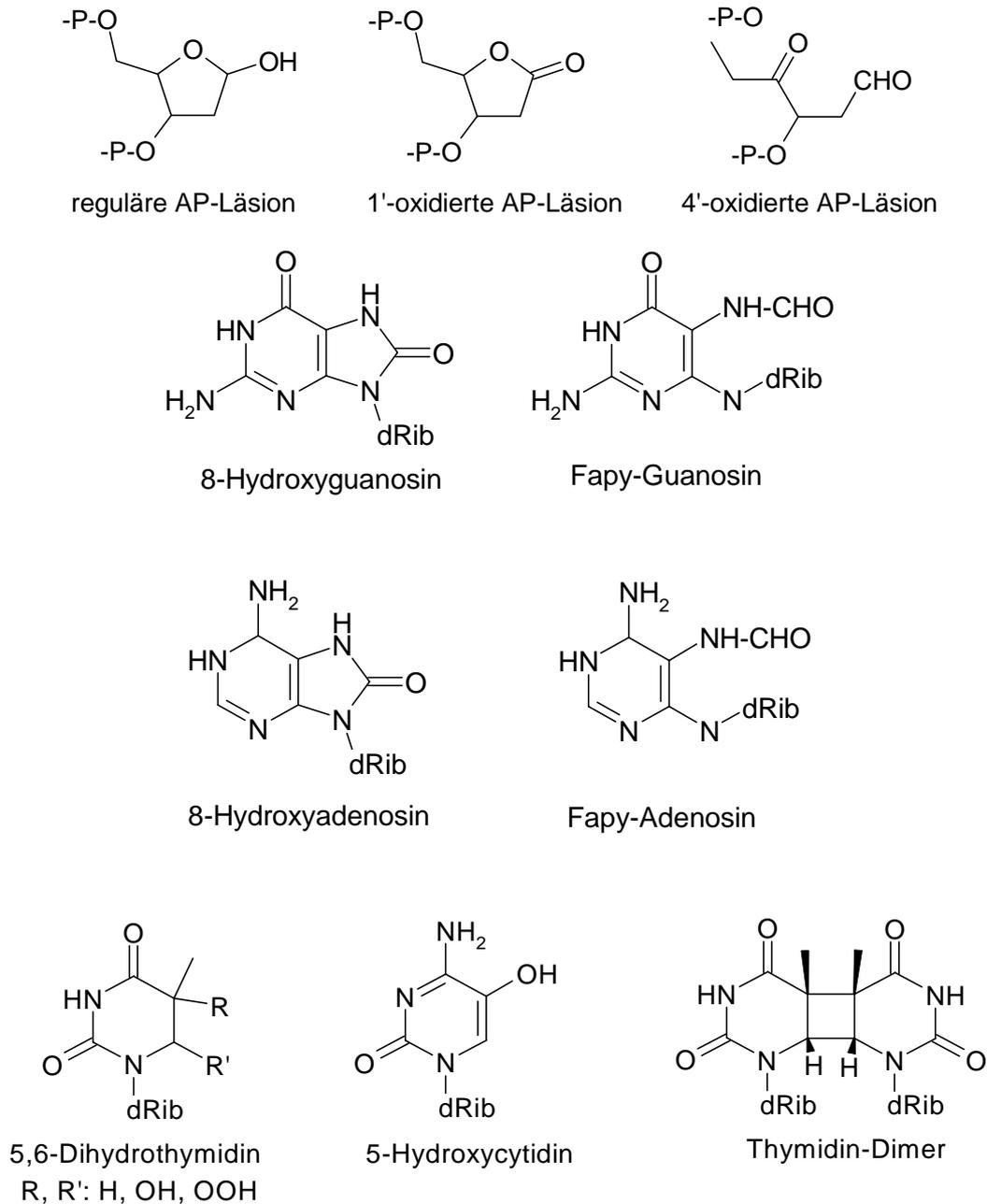


Abb.1.4 Struktur verschiedener DNA-Modifikationen

Neben veränderten Basen gibt es auch andere von ROS erzeugte Schäden: Basenfreie Stellen (AP-Läsionen: apurinische oder apyrimidinische Stellen), die bei der Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung zwischen Base und Desoxyribose gebildet werden und die auch in oxidiert Form auftreten (OhUigin *et al.*, 1987; Piette *et al.*,

1981), und desweiteren Einzel- bzw. Doppelstrangbrüche (Sies, 1986; Epe *et al.*, 1988), welche durch Hydrolyse der Phosphat-Desoxyribose-Verknüpfung entstehen. Strangbrüche und DNA-Quervernetzungen können auch nach Bestrahlung von Zellen mit sichtbarem Licht oder langwelligem UV-Licht auftreten (Cadet *et al.*, 1992; Peak *et al.*, 1991; Rosenstein *et al.*, 1991; Pflaum *et al.*, 1994). Quervernetzungen können innerhalb der DNA oder zwischen DNA und Proteinen entstehen. Wird mit UV-Licht bestrahlt, entsteht aus zwei Molekülen Thymin unter Bildung eines Cyclobutanringes ein Thymidindimer (Abb.1.4). In Gegenwart von Sauerstoff kann die Pyrimidinbase Thymin auch mit der Aminosäure Tyrosin reagieren (Nackerdien *et al.*, 1991; Stadtman, *et al.*, 1992). Andere Beispiele für Protein-DNA-Quervernetzungen (Abb. 1.5) sind Thymin-Lysin- und Cytosin-Tyrosin-Verknüpfungen (Gajewski *et al.*, 1988).

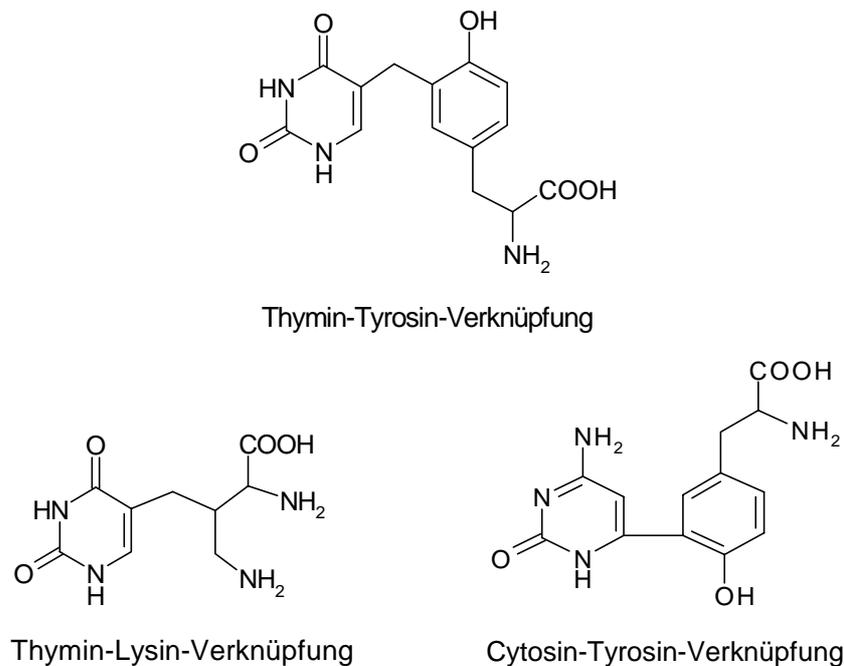


Abb.1.5 Beispiele für DNA-Protein-Quervernetzungen

1.4 Biologische Konsequenzen oxidativer DNA-Schäden

Allgemein bedeuten nicht reparierte oxidative Schäden für eine Zelle den Zelltod oder die Gefahr der Mutation und damit der malignen Entartung. Es muß sich aber nicht immer um ein initiales Ereignis der Kanzerogenese (Olinsk *et al.*, 1998) handeln, denn oxidative DNA-Schäden können auch promovierende Wirkung haben (Cerutti, 1985;

Frenkel, 1992). Für einen Organismus können DNA-Schäden möglicherweise den Beginn von Degenerationsprozessen wie z.B. Alterung, Arthritis oder Arteriosklerose oder von Krebserkrankungen darstellen. Daneben sind aber auch die Verkürzung der Telomerlängen (Ames, 1989) und oxidierte Proteine (Koshiishi *et al.*, 1997) für das zelluläre Altern von Bedeutung. Außerdem wurde der Einfluß der Lipidoxidation auf die Arteriosklerose (White *et al.*, 1988) und auf Herzerkrankungen (Collins *et al.*, 1998) nachgewiesen. Ein anderer Aspekt ist die medizinische Nutzung von oxidativen Schäden. Eine typische Anwendung ist die spezifische Schadensinduktion in der photodynamischen Therapie und der Tumorbehandlung.

Durch die veränderte Struktur der modifizierten Base kann es bei der Replikation zu Basenfehlpaarungen kommen, welche erkannt und beseitigt werden können (Mismatch-Reparatur). Ist die Zelle nicht in der Lage, einen Schaden fehlerfrei zu reparieren, manifestiert sich dieser nach der nächsten Replikation mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit als Mutation. Diese kann dann eine Entartung der Zelle im Sinne des Mehrstufenkonzepts der Kanzerogenese bedeuten (siehe Kapitel 1). Eine andere Reaktionsmöglichkeit auf DNA-Schäden ist der Zellzyklusstop oder die Blockade von Transkription bzw. Replikation, um das Zeitfenster für die Reparatur zu vergrößern. Bei einer massiven Anhäufung von Schäden, die von den Reparaturmechanismen nicht mehr ausreichend prozessiert werden können, wird ebenfalls die Transkription bzw. die Replikation blockiert und später auch der programmierte Zelltod, die Apoptose, eingeleitet.

Die verschiedenen oxidativen DNA-Schäden zeigen unterschiedliche, teilweise typische Folgen. 8-oxoG bildet sehr häufig Fehlpaarungen mit Adenin. Erfolgt keine Reparatur der Fehlpaarung, führt sie zu einer GC:TA-Transversion in der DNA. Dieses prämutagene Potential von 8-oxoG wurde sowohl in Bakterien (Wood *et al.*, 1990; Moriya *et al.*, 1991) als auch in Säugerzellen (Klein *et al.*, 1992; Moriya, 1993) gefunden. Dagegen geht oxidiertes Adenin (8-Hydroxyadenin = 8-oxoA) kaum Fehlpaarungen ein und zeigt sich in einem Vektorsystem um etwa eine Zehnerpotenz weniger mutagen (Prigent *et al.*, 1992; Shibutani, 1993). Fapy-Modifikationen besitzen kein mutagenes Potential, sondern sind durch die Blockade der DNA-Synthese charakterisiert (Tudek *et al.*, 1992). Für 5,6-Dihydropyrimidine wurden in verschiedenen Organismen spezifische Reparaturenzyme gefunden (Boiteux, 1993;

Demple *et al.*, 1994), und bei 5-Hydroxycytosin wurden GC:TA-Transitionen beobachtet (Purmal *et al.*, 1994).

Für die Beseitigung von Schäden besitzt die Zelle Reparaturmechanismen, die Modifikationen entfernen. Einzelstrangbrüche in der DNA werden schnell und effizient repariert (Churchill *et al.*, 1991). Trotzdem kann hier ein prämutagenes Potential nicht ausgeschlossen werden. Doppelstrangbrüche sind für die Zelle stark toxisch und mutagen. Sie können größere Deletionen und auch Chromosomenaberrationen hervorrufen. Liegt eine basenfreie Stelle (AP-Läsion) vor, wird die Replikation meistens blockiert. In Säugerzellversuchen mit einem Shuttle-Vektor, der eine AP-Stelle besitzt, wurde gezeigt, daß gegenüber von basenfreien Stellen bevorzugt Guanin eingebaut wird (Neto *et al.*, 1992; Klinedinst *et al.*, 1992). Durch diesen Basenaustausch ist auch hier ein mutagenes Potential gegeben. Darüberhinaus können sich AP-Stellen spontan oder enzymatisch in Einzelstrangbrüche umwandeln und dann Deletionen verursachen. Liegt eine modifizierte Base vor, kann dieser Schaden direkt revertiert werden. Dies erfolgt durch die bei manchen Säugern vorkommende Photolyase, die die für UV-Strahlung typischen Pyrimidindimere unter Nutzung der Lichtenergie wieder in zwei Pyrimidinnukleotide überführt. Ein anderes Beispiel ist die O⁶-Methylguanin-DNA-methyltransferase (MGMT), die spezifisch Alkylgruppen von O⁶-Methyl-, O⁶-Ethyl- und O⁶-Butylguanin auf sich selbst überträgt und dabei ihre Aktivität verliert. Weitere Reparaturmechanismen sind die Basen-Exzisions-Reparatur (BER) und die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER). Bei der NER werden DNA-Modifikationen wie Pyrimidindimere, DNA-Quervernetzungen und andere großvolumige Modifikationen, die sogenannten „bulky adducts“, repariert. Die beteiligten Reparaturenzyme wandern als Komplex an der DNA entlang, erkennen Modifikationen und schneiden an beiden Seiten davon ein Oligonukleotid aus. Mit einer Polymerase und einer Ligase wird die doppelsträngige DNA wiederhergestellt. Fällt beim Menschen dieser Reparaturkomplex aus, kommt es zur Erbkrankheit Xeroderma pigmentosum.

Bei der Basenexzisionsreparatur wird von einer spezifischen Glykosylase ein Schaden erkannt und die glykosidische Bindung hydrolysiert. Typische Substrate sind endogen vorkommende Läsionen wie AP-Läsionen, oxidative Basenmodifikationen und kleinere Alkylierungen wie Ethenoaddukte. Anschließend wird an der basenfreien Stelle von einer AP-Endonuklease ein Strangbruch erzeugt und die DNA-Polymerase füllt die Lücke auf, bevor sie von der Ligase wieder geschlossen wird. Die bekannten DNA-

Glykosylasen besitzen meistens neben der Glykosylase- auch eine AP-Endonukleaseaktivität und werden als Reparaturoendonukleasen bezeichnet. Bei ihnen sind die Eigenschaften der Erkennung und der anschließenden Elimination der modifizierten Base unter Entstehung eines Einzelstrangbruches in einem Enzym vereinigt (Wallace, 1988). Beispiele hierfür sind die aus *Escherichia coli* stammende Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase (Fpg) und sein Funktionshomologes, das OGG1 (8-oxoG-Glykosylase), aus Hefe, Mensch und Maus (van der Kemp *et al.*, 1996; Radicella *et al.*, 1997). Das Erkennungsspektrum des Fpg-Enzyms reicht von 8-oxoG bis zu Adenin- und Guaninderivaten mit geöffnetem Imidazolring (Fapy) (Boiteux *et al.*, 1992). Liegt 8-oxoG mit Cytosin gepaart vor, kann es von Fpg oder dem OGG1 erkannt und herausgeschnitten werden.

1.5 Antioxidantien in der Ernährung und Gesundheitszustand

Es ist bereits lange bekannt, daß die Art der Ernährung einen Einfluß auf den Gesundheitszustand des Menschen hat. Erste Beobachtungen und wissenschaftliche Ansätze waren Erkrankungen wie Skorbut, Beriberi, Pellagra und Rachitis, die durch den Mangel spezifischer Nahrungsfaktoren (Vitamin C, Vitamin B₁, Niacin/Tryptophan, Vitamin D) entstehen und die durch Umstellung der Ernährung verbessert werden können. Der Verzehr von mehrfach ungesättigten Fettsäuren z.B. aus Fischöl hat eine Schutzwirkung. Die Nahrung der Inuit ist besonders reich an diesen Stoffen und es wurde eine sehr seltenes Auftreten von koronaren Herzerkrankungen in dieser Bevölkerungsgruppe beobachtet (Feskens *et al.*, 1993; Innis *et al.*, 1988; Dyerberg *et al.*, 1979).

Bereits der römische Arzt Claudius Galenus (129-199 nach Christus) war davon überzeugt, daß die Ernährung für die Entstehung bösartiger Tumoren mitverantwortlich sei. Erste systematische, epidemiologische Untersuchungen hierzu stammen aus der Mitte des vorigen Jahrhunderts von dem englischen Arzt Alfred Haviland. Er fand vermehrt Krebserkrankungen in sumpfigen Flußniederungen und glaubte, daß das Wasser hierfür mitverantwortlich sei. Auch in Deutschland wurde schon Anfang dieses Jahrhunderts darauf hingewiesen, daß der Wohlstand und die hiermit verbundene Art, sich hochkalorisch zu ernähren, mitverantwortlich für die Krebshäufigkeit sei. Damalige Beobachtungen sprachen dafür, daß die reiche Klasse häufiger an Krebs starb und daß hoher Fleischverzehr die Tumorentstehung begünstigte. Dagegen entwickelten

Mitglieder von Mönchsorden, die sich eine sehr „strenge Kost“ und „große Kasteiungen“ auferlegten, fast keine bösartigen Tumoren. In neuerer Zeit wurden eine Vielzahl epidemiologischer, klinischer und experimenteller Untersuchungen zur Fragestellung der protektiven und kanzerogenen Effekte der Ernährung durchgeführt. Es besteht derzeit kein Zweifel mehr daran, daß die Ernährung für den Prozeß der Tumorentstehung große Bedeutung hat. So nimmt die Häufigkeit des kolorektalen Karzinoms – dies gilt in gewissem Umfange auch für das Mammakarzinom, Prostatakarzinom und einige andere Tumoren - dann zu, wenn die traditionelle Ernährung (meist fettarm und reich an pflanzlichen Lebensmitteln) durch eine in westlichen Industrieländern übliche Kost ersetzt wird. Beispiele hierfür sind in den USA lebende Japaner und Afrikaner, die nach der Einwanderung und Übernahme US-amerikanischer Lebens- und Ernährungsgewohnheiten bereits in der zweiten Generation das gleiche Tumorrisiko aufweisen wie US-Amerikaner (Marchand, 1999; Kamineni, *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1996).

Die Interpretation von Humanstudien über den Zusammenhang zwischen Nahrung und Krebsentstehung ist sehr schwierig, da viele Faktoren Einfluß nehmen, die mit der Ernährung nicht oder nur teilweise assoziiert sind. Dazu kommt außerdem, daß die Exposition mit diesen Faktoren individuell sehr unterschiedlich sein kann in Bezug auf Menge und Häufigkeit und daß ihnen eventuell nicht die notwendige Bedeutung zugemessen wird. Bei unserer extrem komplex zusammengesetzten Ernährung muß auch berücksichtigt werden, daß es Komponenten gibt, die sowohl die Entstehung bestimmter Organtumoren begünstigen als auch vor ihrer Entstehung schützen können. Zu den ersteren zählen neben mit der Ernährung oft assoziierten Umwelteinflüssen wie Rauchen auch Nahrungsbestandteile wie Schwermetalle und Nitrosamine. Darüberhinaus schwanken zwischen den Individuen die Stoffwechsellage und andere Prozesse wie die Reparatur von DNA-Schäden aufgrund von Ernährungsunterschieden.

In den folgenden Kapiteln werden die Aspekte von Antioxidantien, Fettsäuren und Alkohol als Bestandteile der Nahrung genauer erläutert.

1.5.1 Antioxidantien

Antioxidantien zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, andere Stoffe zu reduzieren und dabei selbst oxidiert zu werden. Sie wirken als Fänger von Radikalen und sind somit von besonderer Bedeutung bei der Verhinderung von oxidativem Streß (Bendich *et al.*, 1986; Frei *et al.*, 1989) und bei der Erhaltung eines niedrigen zellulären Untergrundes an oxidativen Modifikationen (siehe Abb. 1.2). Allerdings sind für viele Antioxidantien auch Mechanismen bekannt, die prooxidative Effekte vermitteln (Podmore *et al.*, 1998; Halliwell *et al.*, 1990) und somit die Bildung von ROS fördern. Die verschiedenen Wirkungen von oxidativen bzw. antioxidativen Substanzen sind in Abb. 1.6 zusammengefaßt (Halliwell, 2000). Antioxidantien können (1) die Zellproliferation hemmen durch Verhinderung von vorübergehenden Oxidationen, die die Proteinphosphorylierung und Transkriptionsfaktoren stimulieren. Durch Abfangen von reaktiven Spezies (2) schützen sie vor oxidativen Schäden und blockieren die Freisetzung von Metallionen, die diese Schädigung katalysieren. Außerdem können Antioxidantien die Adaption auf oxidativen Schaden durch verminderte Transkriptionsfaktoraktivierung verhindern (3) und die oxidative Schädigung beschleunigen (4), indem sie Metallionen reduzieren, die dadurch zu besseren Promotoren einer Schädigung werden. Schließlich hemmen sie die durch freie Radikale induzierte Apoptose (5), was entweder die Zelle rettet oder zu ihrer Entartung führt. Anstelle von Apoptose kann auch Nekrose erfolgen und der Schaden wird an die Umgebung der Zelle weitergegeben.

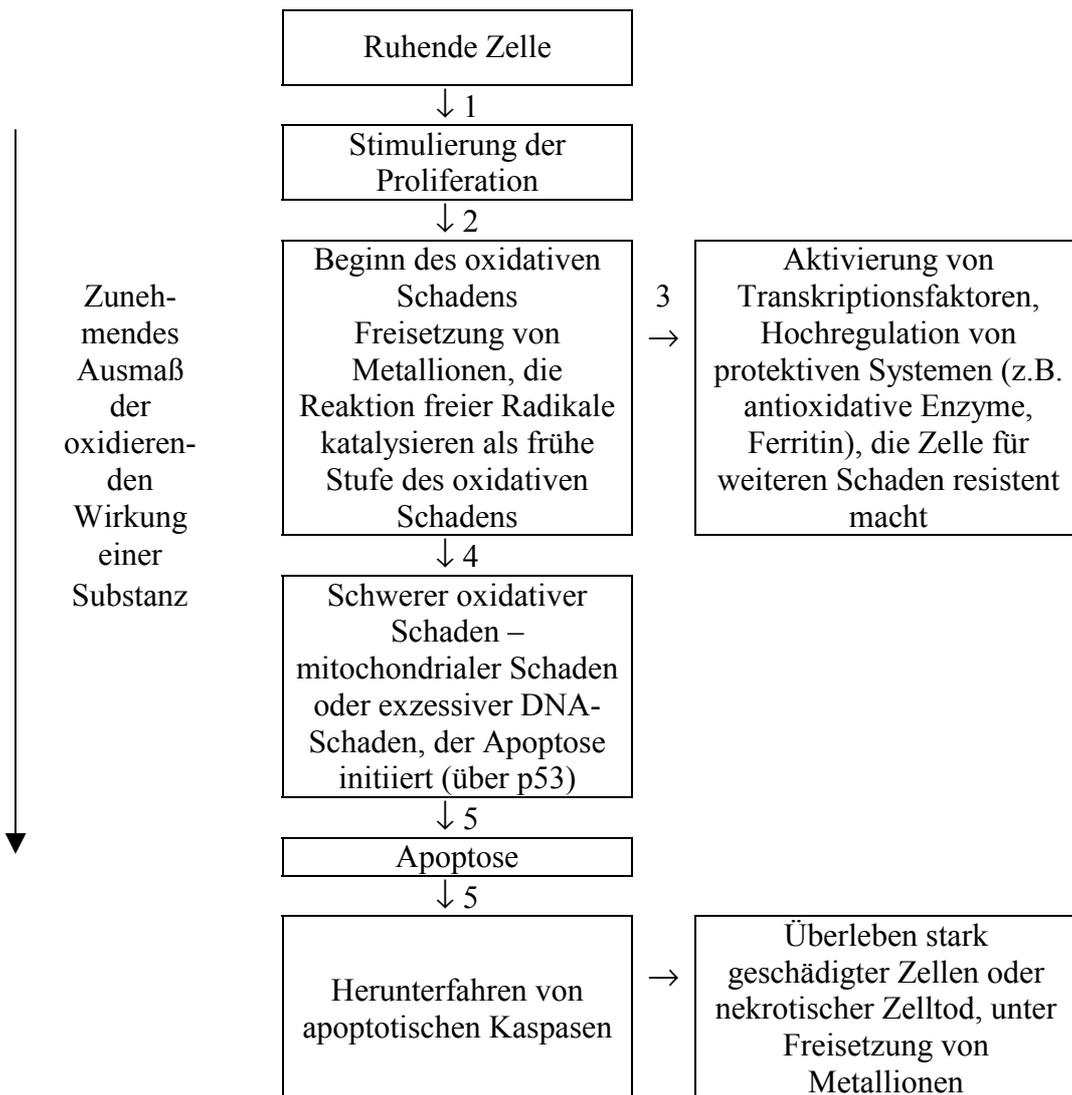


Abbildung 1.6 Wirkungen von oxidativen bzw. antioxidativen Substanzen (nach Halliwell, 2000).

1.5.1.1 Ascorbinsäure - Vitamin C

Der Name Vitamin ist ursprünglich aus „vitalem Amin“ entstanden, da man annahm, daß es sich bei diesen Stoffen um lebenswichtige Amine handelt. Obwohl spätere Strukturaufklärungen gezeigt haben, daß es sich bei Stoffen dieser Gruppe nicht immer um Amine handelt, hat sich der eingeführte Name erhalten. Mit Vitamin werden essentielle, organische Substanzen bezeichnet, die auch als Provitamine zugeführt werden können und die nur in geringen Mengen im Organismus benötigt werden. Man teilt die Vitamine in fettlösliche (Vitamine A, E, D, K) und in wasserlösliche (Thiamin,

Riboflavin, Nicotinsäure, Folsäure, Pantothensäure, Biotin, Pyridoxin, Vitamin B₁₂, Ascorbinsäure) ein. Im Gegensatz zu den fettlöslichen Vitaminen kommen bei wasserlöslichen keine Hypervitaminosen vor. Allerdings sind bei beiden Gruppen Mangelerscheinungen, also Hypovitaminosen, bekannt (siehe Kapitel 1.5) (Kasper, 1996).

Im folgenden sollen die Eigenschaften von Ascorbinsäure (3-Oxo-L-gulonsäure- γ -lacton; 2,3-Didehydro-L-threo-hexano-1,4-lacton; Vitamin C; Abb.1.7) näher erläutert werden.

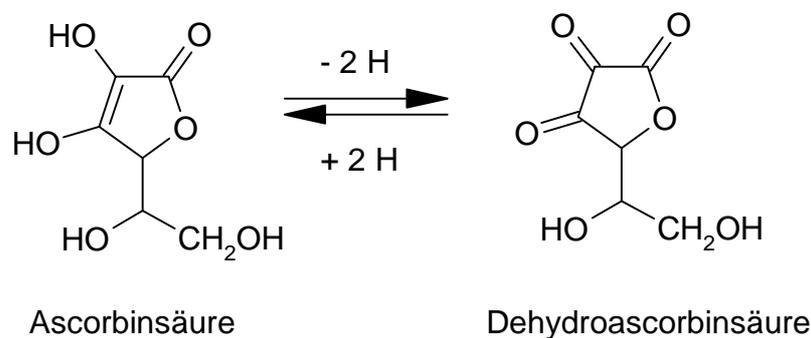
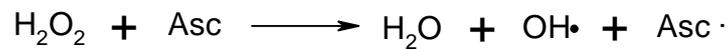
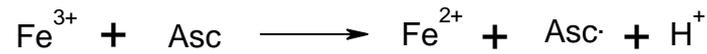


Abb. 1.7 Ascorbinsäure und sein Oxidationprodukt

Ascorbinsäure wird leicht oxidiert, besonders in Anwesenheit von Eisen- oder Kupferkationen (Gl. 1.6) (Englard *et al.*, 1986; Bram *et al.*, 1980). Außerdem kann sie freie Radikale abfangen und so oxidative Schäden verhindern (Bendich *et al.*, 1986; Frei *et al.*, 1989). Da in der Zelle häufig H₂O₂ anwesend ist, kommt es aber auch zur Fentonreaktion und zur Bildung von Hydroxylradikalen (siehe Kapitel 1.1 und 1.2), wenn nicht Metallchelatoren oder Katalase die Reaktionen verhindern. Ascorbatradikale können auch zu Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure disproportionieren (Brigelius-Flohé *et al.*, 1996). Allerdings sind auch andere Reaktionen der Radikale möglich. Die Kombination von Ascorbinsäure und Fe²⁺ wird *in vitro* eingesetzt, um eine Lipidperoxidation zu induzieren (Aust *et al.*, 1985). Im Organismus wird Ascorbinsäure enzymatisch von Reduktasen unter Verbrauch von Glutathion (GSH) recycelt.



Gl. 1.6 Reaktionen von Ascorbinsäure (Asc = Ascorbinsäure; DHA = Dehydroascorbinsäure; GSSG = oxidiertes Dimer aus 2 GSH).

Vitamin C ist für die Mehrzahl der Säuger nicht essentiell, wohl aber für den Menschen, Affen, Meerschweinchen, Indische Fledermaus und für Vögel der Gattung Passeriformes. Eine Folge von Ascorbinsäuremangel ist Skorbut. Die vermutlich erste Beschreibung dieser Erkrankung stammt aus dem Papyrus Elbers der Ägypter aus dem Jahre 1550 vor Christus. Der britische Arzt James Lind führte bereits 1747 eine erste Studie zur Skorbutbehandlung und fand den protektiven und heilenden Effekt von Zitrusfrüchte gegenüber einer Kontrollgruppe. Trotzdem wurde Zitronensaft für Seeleute in der British Navy erst ca. 50 Jahre später zum Standard (Pauling, 1970). Bereits 10 mg pro Tag reichen aus, um Skorbut zu verhindern (Bartley *et al.*, 1953), wobei die optimale Dosis weiter unbekannt ist. Da sich Ascorbinsäure in einer einmonatigen Studie mit Gaben von 40 g täglich als völlig untoxisch erwies (Stone, 1967) und keine Todes- oder Krankheitsfälle auf eine Überdosis zurückzuführen waren, empfahl Linus Pauling mit 250 mg bis 10 g pro Tag sehr viel höhere Dosen als das US-amerikanische Food and Nutrition Board of the National Research Council (NRC) mit 55 bis 60 mg pro Tag.

Isoliert wurde Ascorbinsäure zuerst 1927 von Albert Szent-Györgyi aus Budapest, der die Ursache für die Braunverfleckung von Obst suchte (Pauling, 1970; Moss, 1987). Er fand die Substanz nicht nur in Früchten und Paprika sondern auch in adrenergen Drüsen bei Tieren und nannte sie Hexuronsäure, bevor sie später wegen der Anti-Skorbuteigenschaften Ascorbinsäure genannt wurde, wobei nur die L-Ascorbinsäure wirksam ist. Tab. 1.4 zeigt die Vitamin C-Konzentrationen in verschiedenen menschlichen Geweben.

Gewebe	Vitamin C ($\mu\text{mol}/100\text{ g Gewebe}$)
Hypophyse	227-284
Nebenniere	170-227
Linse (Auge)	142-176
Leukozyten	115-300
Gehirn	74-85
Leber	57-91
Niere	20-60
Lunge	40
Skelettmuskel	17
Schilddrüse	11
Plasma	1,7-8,5
Speichel	0,01-0,5

Tab. 1.4 Gehalt an Vitamin C in verschiedenen humanen Geweben ($M_R = 176,1\text{ g/mol}$)

Die Resorption von Ascorbinsäure aus dem Magen-Darm-Trakt sinkt mit steigender Dosis. Ab einer Plasmakonzentration von $60\ \mu\text{mol/l}$ oder einer Dosis von 100 mg/d (= 70 % Sättigung des Plasma und 100 % der weißen Blutzellen) wird Vitamin C über den Harn ausgeschieden. Die Resorption von Eisen aus dem Gastrointestinaltrakt wird durch gleichzeitige Anwesenheit von Ascorbinsäure gefördert, wobei prooxidatives Eisenascorbat entstehen kann (Padayatty *et al.*, 2001). Der Transport von Vitamin C in die Zelle erfolgt über Natrium-abhängige SVCT1 und/oder SVCT2-Transporter. Dehydroascorbinsäure wird von Glucosetransportern GLUT1 und GLUT3 transportiert (in insulin-sensitiven Geweben auch von GLUT4).

Früchte und Gemüse besitzen einen hohen Gehalt an Ascorbinsäure (Tab. 1.5), welcher aber durch Erhitzen besonders in Anwesenheit von Metallionen (Cu, Fe) stark gesenkt wird. Der Restgehalt liegt nach dem Kochen bei ca. 50 %.

	Vitamin C Konzentration (mg/100 g)		Vitamin C Konzentration (mg/100 g)
Apfelsine	50	Blumenkohl	69
Ebereschenfrucht	98	Brennessel	200
Erdbeere	62	Broccoli	115
Grapefruit	44	Fenchel	93
Hagebutten	1250	Gartenkresse	59
Schwarze Johannisbeeren	189	Grünkohl	105
Kiwi	71	Kohlrabi	63
Papaya	80	Meerrettich	114
Sanddornbeeren	450	Paprika	140
Zitrone	53	Rosenkohl	112
Corn flakes	75	Rotkohl	50
Kleieflocken	75	Wirsing	50

Tab 1.5 Wichtige Vitamin C –Quellen (Anon., 1997)

Der Anti-Skorbuteffekt von Ascorbinsäure wird auf ihre Bedeutung in der Kollagensynthese zurückgeführt. So hat sie über die Regulation der Genexpression (z.B. Typ I und X der Kollagengene) Einfluß auf die Wundheilung, die Bildung von Knorpeln, Knochen, Zähnen, Zahnfleisch, Muskeln und die Haut (Anon., 1996). Auch auf anderen Ebenen ist Ascorbinsäure an der Funktionsfähigkeit von Körpersystemen zur beteiligt. Ein möglicher Schutz vor Erkältungserkrankungen läßt sich auf die gesteigerte Aktivität von Leukozyten unter dem Einfluß von Ascorbinsäure erklären (Anon., 1996). Dieser protektive Effekt wurde auch im Tierversuch gefunden (Dugal, 1961). Hierfür ist ihre Rolle als Cofaktor von Hydroxylasen in der Biosynthese von Kollagen, Steroiden, Carnitin, Norepinephrin, Tyrosinmetabolismus und bei der Amidierung von Peptidhormonen verantwortlich (Padayatty *et al.*, 2001). Aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften kann Ascorbinsäure auch alle mit oxidativen Streß verbundenen Erkrankungen beeinflussen (siehe Kapitel 1.5.1) und so z.B. auch am Recycling anderer antioxidativer Mikronährstoffe wie Vitamin E beteiligt sein.

Im Plasma werden durch Vitamin C 24 % der freien Radikale neutralisiert, was nur noch von der Aktivität von Harnstoff und SH-Gruppen bestimmter Proteine übertroffen wird (Wayner *et al.*, 1987). Wie aus Tabelle 1.4 deutlich wird, treten hohe Ascorbinsäure-Konzentrationen besonders in den Geweben mit einer hohen ROS-

Bildung auf. So werden in Leukozyten die reaktiven Spezies abgefangen, die bei der Phagozytose entstehen (Anderson *et al.*, 1987), und im Gehirn könnte es die Oxidation von Lipiden und Dopamin verhindern und dadurch vor neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinsons schützen (Fahn *et al.*, 1992). Die durch Photolyse im Auge entstandenen Radikale könnten ebenfalls durch das Antioxidans abgefangen werden, wobei aber noch andere Vorgänge für einen Schutz vor der Kataraktbildung notwendig sein dürften (Varma, 1987). Auch im Cytosol der Zelle wird ein Schutz vor oxidativen Schäden diskutiert, der auch die DNA im Zellkern betrifft und so eine Bedeutung für die Kanzerogenese hat. Es wurde beobachtet, daß sowohl der DNA-Schaden von Magen-Darm-Mukosa nach oraler Gabe von Vitamin C sinkt (Dyke *et al.*, 1994) als auch der chromosomale Schaden in Lymphozyten, der *in vitro* mit Bleomycin induziert wurde (Pohl *et al.*, 1989). Der Schutz vor Herzerkrankungen läßt sich auf eine verminderte Peroxidation von Plasmalipiden und Low Density Lipoproteinen (LDL) sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zurückführen (Frei *et al.*, 1989; Jialal *et al.*, 1990). Bei *in vitro* Versuchen zur antioxidativen Protektion vor LDL-Peroxidation (Frei *et al.*, 1989) ergab sich folgende Reihenfolge der Aktivität:

Vitamin C = Proteinthiole > Bilirubin > Harnstoff (Urate) > α -Tocopherol

Das ist insofern erstaunlich, da α -Tocopherol seinen höchsten Gehalt in Lipidphasen hat und Vitamin C als wasserlösliche Substanz dort nicht zu erwarten ist. Daher wird hier ein indirekter, antioxidativer Effekt von Ascorbinsäure postuliert. So kann sie an der Regenerierung von verbrauchtem α -Tocopherol neben körpereigenen, lipidlöslichen Reduktionsmitteln wie Ubichinon oder Glutathion eine Rolle spielen (Bowry *et al.*, 1992), oder auch GSH aus GSSG, dem Dimer aus zwei oxidierten Molekülen GSH, reduzieren und damit die protektive Aktivität von GSH erhöhen (Martensson *et al.*, 1991, Martensson *et al.*, 1992; Jain *et al.*, 1992). Für den letzteren Mechanismus, die Erhaltung des primären, endogenen Antioxidans, sprechen die beobachtete Senkung des Quotienten aus GSH und GSSG bei verminderter Vitamin C – Zufuhr (Henning *et al.*, 1991) und die 50 %ige Erhöhung des GSH-Gehaltes in roten Blutzellen nach Supplementation (Johnston *et al.*, 1993). In Bezug auf die Immunkompetenz des Organismus wurde eine Steigerung der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten, Lymphozytenproliferation und der Killerzellaktivität (Siegel, 1993; Vojdani *et al.*, 1993) beobachtet.

1.5.1.2 Carbazol-Derivate

Verschiedene Carbazol-Derivate wurden aus Species von *Streptomyces* isoliert, von denen die ortho-Benzochinonsysteme wegen ihres antioxidativen Potentials von besonderem Interesse sind; auch im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Anwendung bei ROS-bedingten Erkrankungen. 2-Methyl-1-(4-methylphenyl)-4,9-dihydro-3H-3,4-carbazoldion (MMPDCD) ist ein Carbazochinocin mit einem Methylphenyl-Rest am C₁-Atom (Abb.1.8 A). Die Synthese erfolgte nach einer neu entwickelten Methode von Alparslan Aygün aus dem Arbeitskreis von Prof. Ulf Pindur in Mainz (Aygün *et al.*, 2000). MMPDCD ist ein tiefviolettes Pulver, das schlecht in Wasser aber gut in DMSO und Ethanol löslich ist.

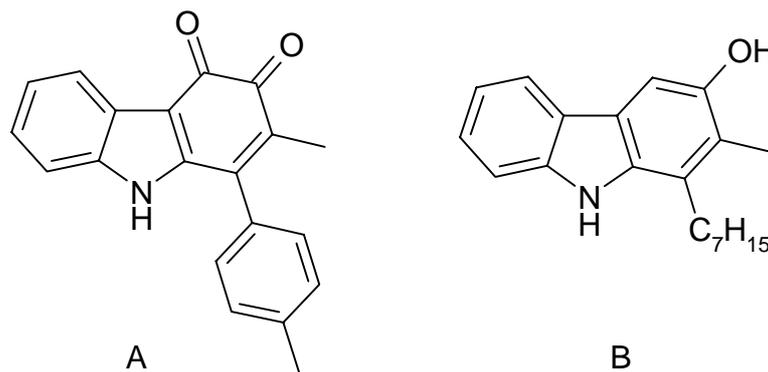


Abb. 1.8 Strukturformeln von MMPDCD (A) und Carazostatin (B).

Nach bisher noch unveröffentlichten Daten hat MMPDCD *in vitro* hemmende Wirkung auf die Cyclooxygenase und auf die Tyrosinkinase (A. Aygün, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus wurde beobachtet, daß es *in vitro*, gelöst in DMSO und in Anwesenheit von GSH, zum farblosen Dihydroxyderivat reduziert wird, welches dann wie ein Carazostatin (Abb. 1.8 B) als Radikalfänger fungieren kann (siehe Kapitel 4.2). Ob die Reduktion von MMPDCD durch das Lösungsmittel oder durch GSH erfolgt, ist dabei nicht klar.

1.5.2 Mehrfach ungesättigte Fettsäuren - Eicosapentaensäure

Zu den für den Körper wichtigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren zählen vor allem Carbonsäuren mit einer Kettenlänge von 18 Kohlenstoffatomen und mehr. Sie werden je nach der Position ihrer ersten Doppelbindung vom Methylende aus gesehen in ω 3- und ω 6-Fettsäuren eingeteilt. Da der menschliche Organismus Doppelbindungen nur am ω 9-Kohlenstoff oder zwischen einer bereits vorhandene Doppelbindung und dem Carboxylende einfügen kann, gelten diese Fettsäuregruppen als essentiell. Dazu zählen die Linolsäure (C18:2 ω 6), welche durch Kettenverlängerung in Di-homo- γ -linolensäure (C20:3 ω 6) oder in Arachidonsäure (C20:4 ω 6) umgewandelt werden kann, die ω 3-Fettsäure α -Linolensäure (18:3 ω 3) und die nur in geringem Ausmaß selbstsynthetisierte Eicosapentaensäure (C20:5 ω 3; EPA) (Abb. 1.9) (Kasper, 1996).

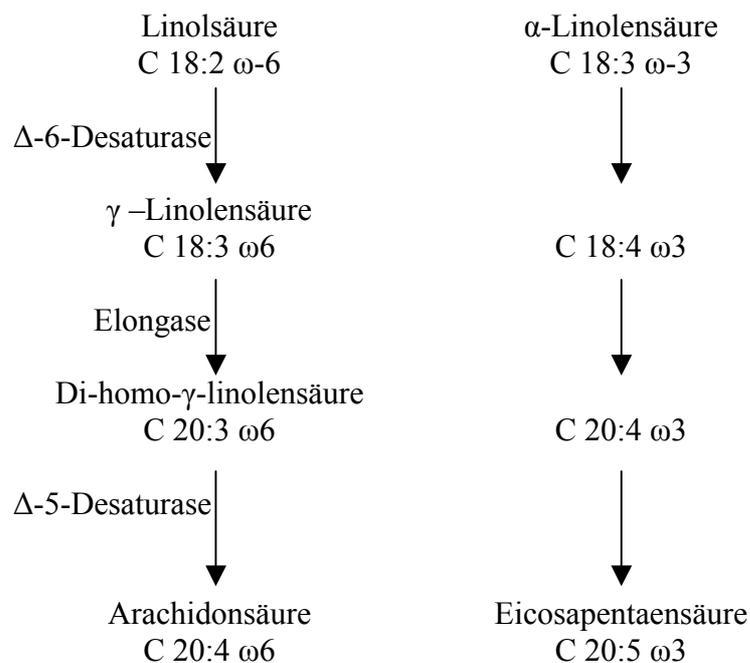


Abb. 1.9 Mehrfach ungesättigte Fettsäuren der ω 6- und ω 3-Reihe und ihre Umwandlung in Substrate der Eicosanoidsynthese.

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren haben eine sehr geringe biologische Aktivität. Allerdings ist ihr Metabolismus von Bedeutung, bei dem die sogenannten Eicosanoide entstehen. Die Verstoffwechslung erfolgt über den Cyclooxygenase- und den Lipoxygenase-Weg. Die Di-homo- γ -linolensäure ist nur Substrat für die

Cyclooxygenase. Hierbei entstehen Prostaglandine (PG) der Serie 1, also TXA₁, PGD₁, PGE₁ und PGI₁. Arachidonsäure und EPA werden dagegen von beiden Enzymen umgesetzt. Aus Arachidonsäure entstehen einmal mittels Lipoxygenase die Leukotriene (LT) LTB₄, LTC₄, LTD₄ und LTE₄ und über die Cyclooxygenase die Prostaglandine und Thromboxan (TX) der Serie 2 (TXA₂, PGE₂) und PGI₁. Aus EPA werden über die jeweiligen Enzyme die Serie 3 (TXA₃, PGE₃, PGI₃) und Leukotriene (LTB₅, LTC₅, LTD₅, LTE₄) als Eicosanoide synthetisiert (Oliw., 1983; Hammerstrom *et al.*, 1980; Leitch, 1984; Prescott *et al.*, 1985). Die Umsetzung von EPA durch die Cyclooxygenase erfolgt langsamer als die der anderen beiden Fettsäuren (Culp *et al.*, 1979), und die 5-Lipoxygenase bevorzugt EPA als Substrat gegenüber Arachidonsäure (Ochi *et al.*, 1983).

Die verschiedenen Eicosanoide unterscheiden sich in den biologischen Aktivitäten, die vor allem im vaskulären System liegen. Thromboxan A₂ induziert die Aggregation von Blutplättchen und ist Vasokonstriktor (Hamberg *et al.*, 1975; Hamberg *et al.*, 1976; Svensson *et al.*, 1977). Prostaglandine besitzen dem entgegengesetzte Effekte; sie wirken antiaggregatorisch und vasodilatierend (Moncada *et al.*, 1976; Johnson *et al.*, 1976; Kadowitz *et al.*, 1978). Außerdem sind PGE₂, PGF_{2α} und PGD₂ beteiligt an Entzündungsreaktionen, Fertilität, Kanzerogenese, Neurotransmission, Nierenfunktion und gastrointestinalen Funktionen (Vapaatalo *et al.*, 1978; Wolfe, 1982; Gerber *et al.*, 1982). Leukotriene sind potente Mediatoren bei Entzündungsreaktionen (Samuelsson, 1983) und die cysteinhaltigen Verbindungen wirken bronchokonstruktiv (Weiss *et al.*, 1982). Allerdings gibt es auch hier unterschiedliche Eigenschaften. So hat LTB₅ nur 1/30 der Chemotaxisaktivität von LTB₄ (Goldman *et al.*, 1983; Leitch, 1984). Lipoxine, die bei der Umsetzung von Di-homo- γ -linolensäure entstehen, stimulieren und modulieren die enzymatische Aktivität von Proteinkinase C *in vitro*, hemmen die natürliche Killerzellaktivität und verursachen lysosomale Degranulierung und H₂O₂-Bildung in Neutrophilen (Serhan *et al.*, 1984; Serhan *et al.*, 1985).

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren kommen in vielen Lebensmitteln vor (Tab. 1.6), wobei besonders Seefisch sehr reich an EPA und Docosahexaensäure ist.

	Gehalt mehrfach ungesättigter Fettsäuren (g/100 g)
Schlagsahne (30 % Fett)	1,0
Hühnerei	1,5
Butter	3,0
Butterschmalz	3,7
Baumwollsamöl	49,5
Leinöl	68,1
Maiskeimöl	53,2
Sojaöl	61,9
Distelöl	74,9
Olivenöl	8,9
Sonnenblumenöl	63,2
Walnuß	40,9
Makrele	2,6
Hering	2,6
Sardine	1,6
Thunfisch	4,6
Aal	3,2
Lachs	2,6
Amaranth	4,1
Sojabohnen	10,7
Avocado	2,0

Tab. 1.6 Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren einiger Lebensmittel (aus GU Nährwert Kalorien Tabelle)

Eine Fischdiät mit hohem Anteil an diesen Fettsäuren zeigt eine Protektion vor kardiovaskulären Erkrankungen (Dyerberg *et al.*, 1979). Diese Beobachtung läßt sich mit einer Konkurrenz dieser Säuren mit Arachidonsäure in Bezug auf die Fettsäure-Speicherung und die Bildung von unterschiedlichen Eicosanoiden erklären. Ohne besondere Diät entsteht aus Arachidonsäure (Abb. 1.10, A) das aggregationsfördernde TXA₂ und das antiaggregative PGI₂. Verstoffwechselt der Organismus vermehrt EPA (Abb.1.10, B), werden zwei aggregationshemmende Eicosanoide, TXA₃ und PGI₃, gebildet (Needleman *et al.*, 1979), woraus eine verringerte Aggregation und eine längere Blutungszeit resultieren (Siess *et al.*, 1980; Thorngren *et al.*, 1981). Darüberhinaus kann durch eine EPA-Diät ein modulierender Effekt auf Entzündungsreaktionen auftreten (Leitch, 1984; Terano *et al.*, 1986), da weniger Prostaglandine, v.a. PGE₂, und weniger LTB₄ und statt dessen das weniger aktive LTB₅ synthetisiert werden.

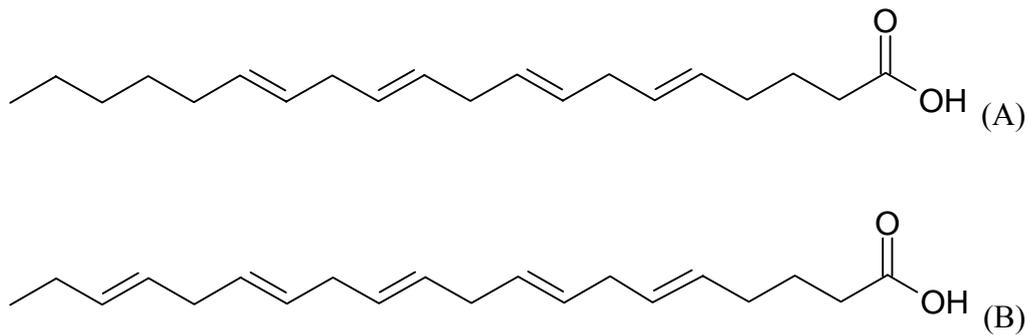


Abb. 1.10 Strukturformeln von (A) Arachidonsäure und (B) Eicosapentaensäure

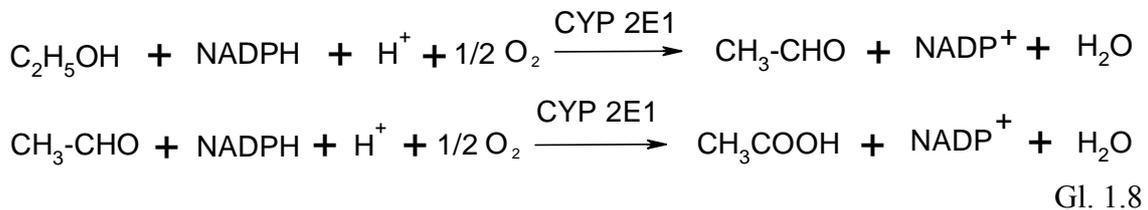
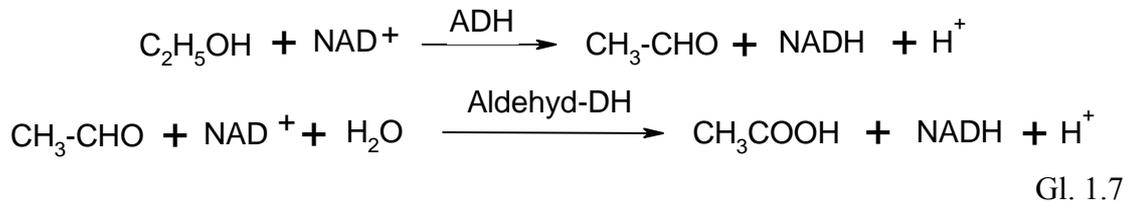
1.6 Alkohol

1.6.1 Ethanol als Fremdstoff im Organismus

Bei einer akuten Alkoholintoxikation kommt es zunächst zu einer Erregung und dann zu einer Sedierung, die bis zur Narkose und Atemlähmung führen kann. Starker Alkoholkonsum ruft Übelkeit, Erbrechen und eine verstärkte Diurese hervor und aufgrund einer Vasodilatation der peripheren Blutgefäße kommt es zum Wärmeverlust. Der chronische Alkoholkonsum kann sich durch Leberschaden (aufgrund eines NAD-Mangels; Fettleber, Hepatitis, Leberzirrhose), Ösophagus-Varizen, Gastritis, periphere Neuropathie, Kardiomyopathie, Demenz, Sucht, Blindheit (Amblyopie) oder Krebserkrankungen äußern.

Die Alkoholresorption aus dem Gastrointestinaltrakt erfolgt zu 20 % bereits im Magen, aber vor allem im Dünndarm. Alkohol erreicht etwa eine halbe Stunde nach der oraler Aufnahme die höchste Blutkonzentration, verteilt sich schnell über den gesamten Körper und passiert auch die Blut-Hirn-Schranke. Die Metabolisierung erfolgt fast ausschließlich über die Alkohol-Dehydrogenase (ADH) (Gl.1.7) und nur zu einem geringen Anteil über das mikrosomale Ethanol oxidierende System (MEOS), wobei es sich um das mit Ethanol induzierbare Cytochrom P450 2E1 handelt (Gl.1.8). Spuren werden glucuronidiert oder an Schwefelsäure gekoppelt über den Harn ausgeschieden. Beim ADH-Weg wird Ethanol unter Verbrauch von NAD^+ zunächst zu Acetaldehyd und anschließend unter weiterem NAD^+ -Verbrauch zur Essigsäure umgesetzt. Diese wird dann entweder in Acetyl-Coenzym A umgewandelt oder bei einem massiven

Auftreten über das Blut ausgeschieden, was dann zu einer metabolischen Azidose führt. Darüberhinaus führt ein hoher Umsatz von Ethanol zu einem NAD-Mangel in der Leber, was eine Schädigung des Organs verursacht. Dagegen ist die Metabolisierung über das CYP 2E1 NADPH-abhängig. Sie führt ebenfalls über Acetaldehyd als Zwischenstufe zur Essigsäure.



Im zentralen Nervensystem stört Ethanol verschiedene Neurotransmittersysteme (Cowen *et al.*, 1999). Er beeinflusst GABA-, NMDA- und Dopamin-Rezeptoren sowie spannungsabhängige Calcium-Kanäle. Ethanol erhöht ähnlich wie Benzodiazepine die Affinität von γ -Aminobuttersäure zum GABA-Rezeptor. Dies erhöht die Leitfähigkeit für Chlorid und senkt damit das Membranpotential, was eine verminderte Erregbarkeit der Zelle zur Folge hat. Am NMDA-Rezeptor agiert Ethanol als nicht-kompetitiver Antagonist und blockiert somit den Einstrom von Calcium- und Natriumionen. Um eine fortdauernde Hemmung zu kompensieren, wird die Anzahl der NMDA-Rezeptoren erhöht. Wird nun die Alkoholzufuhr beendet, fällt die hemmende Wirkung weg und eine starke Exzitation ist die Folge.

Welchen Einfluß Ethanol bei der Kanzerogenese hat, ist noch nicht vollständig geklärt. Einerseits entwickeln Mäuse, die lebenslang Alkohol konsumierten, nicht häufiger Tumore als die Kontrolltiere (Ketcham *et al.*, 1963), andererseits zeigen epidemiologische Studien eine starke Kokanzerogenität mit dem Rauchen (Tuyns *et al.*, 1978; Autrup *et al.*, 1992). Der reaktive Metabolit Acetaldehyd dagegen bindet schnell an zelluläre Proteine, möglicherweise auch an die DNA (Fang *et al.*, 1995), und ist für seine mutagenen und kanzerogenen Eigenschaften bekannt. So kann Acetaldehyd direkt mit der DNA reagieren (Fang *et al.*, 1997), ihre Methylierung behindern (Garro *et al.*, 1991), den GSH-Pool depletieren und Chromosomenaberrationen hervorrufen (Obe *et*

al., 1979). Außerdem kann er Austausche zwischen Schwesterchromatiden verursachen, was zur Manifestierung eines rezessiven, heterozygoten Schadens führt. Er kann die DNA-Reparatur hemmen [besonders über Inhibition der O⁶-Methylguanintransferase (Garro *et al.*, 1986)] und die Bildung der Protoonkogene c-jun und c-phos induzieren. Die Folge davon sind Entzündungsreaktionen, Zellzyklusveränderung, Entartung der Zelle, z.B. Metaplasie des Rachenepithels (Trachea) oder Apoptose (Garro *et al.*, 1986). Der Abbau von Ethanol mit der Alkoholdehydrogenase zu Acetaldehyd erfolgt im Organismus nicht nur in der Leber sondern auch in Zellen der gastrointestinalen Schleimhautoberfläche und durch Bakterien des Magendarmtraktes (Salmela *et al.*, 1994a; Salmela *et al.*, 1994b), was auch die in diesem Bereich beobachteten Schädigungen erklärt. Darüberhinaus verändert Alkohol die Membranpermeabilität (Thomas, 1995), so daß die Resorption von Fremdstoffen, also auch von Kanzerogenen, erleichtert wird. Bei der Metabolisierung von Alkohol wird direkt oder indirekt über oxidativen Stress die Aktivität von Enzymen induziert, besonders das CYP 2E1, und Fremdstoffe können vermehrt umgesetzt und so auch vergiftet werden. Dabei sind auch eine vermehrte Entstehung von ROS und eine Radikalbildung möglich (Albano *et al.*, 1999), wobei das aus Ethanol entstehende Radikal ($\cdot\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) nur wenig reaktiv ist (Seitz *et al.*, 1998; Abb. 1.11).

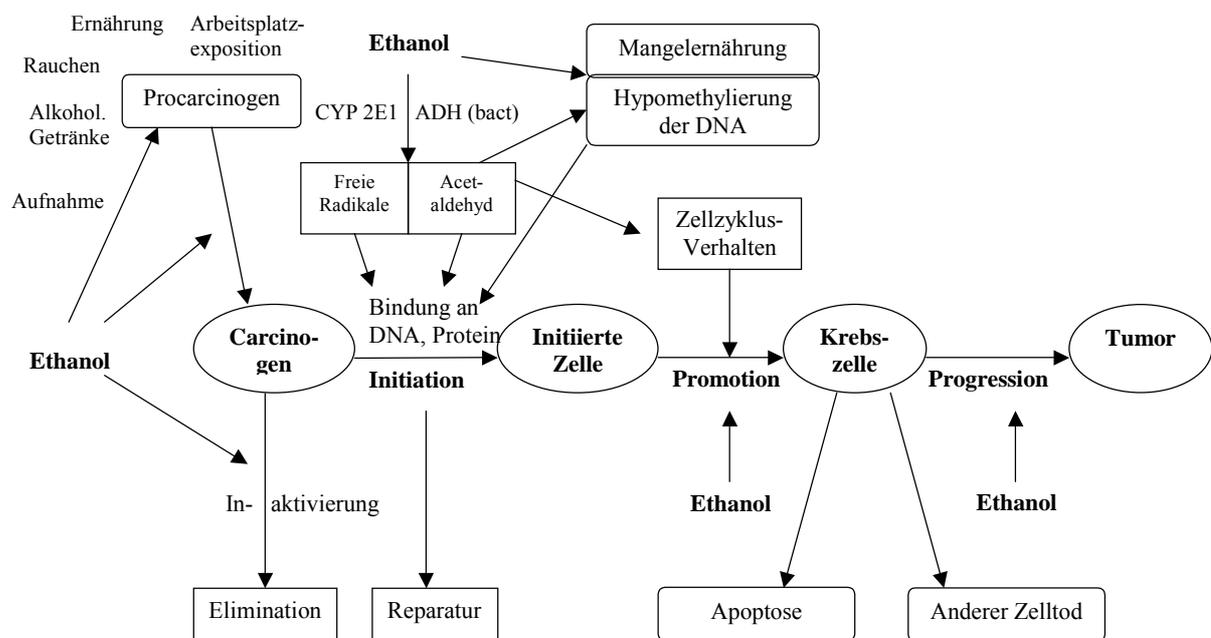


Abb. 1.11 Ethanoleffekte in der Kanzerogenese (Seitz *et al.*, 1998)

1.6.2 Alkoholismus und dessen Folgen

Alkohol stellt in Deutschland neben Tabak eines der wichtigsten Suchtprobleme dar: Gesteigerter und chronischer Alkoholkonsum kann zu einer Vielzahl von Gesundheitsstörungen und Krankheiten führen, wobei sich das Erkrankungsrisiko durch gleichzeitiges Rauchen noch erhöht (Tuyns *et al.*, 1978). Der Pro-Kopf-Verbrauch ist ein Maß für den Konsum reinen Alkohols. Er betrug 1994 in Deutschland 10,3 l reinen Alkohols in Form von Bier, Spirituosen, Wein und Schaumwein, womit Deutschland hinter Luxemburg, Frankreich und Portugal auf den vorderen Plätzen in Europa liegt (Abb. 1.12). Historisch gesehen ist der Alkoholkonsum im letzten Jahrhundert deutlich gestiegen. 1950 lag der Pro-Kopf-Verbrauch zum Vergleich noch bei 3 l reinem Alkohol.

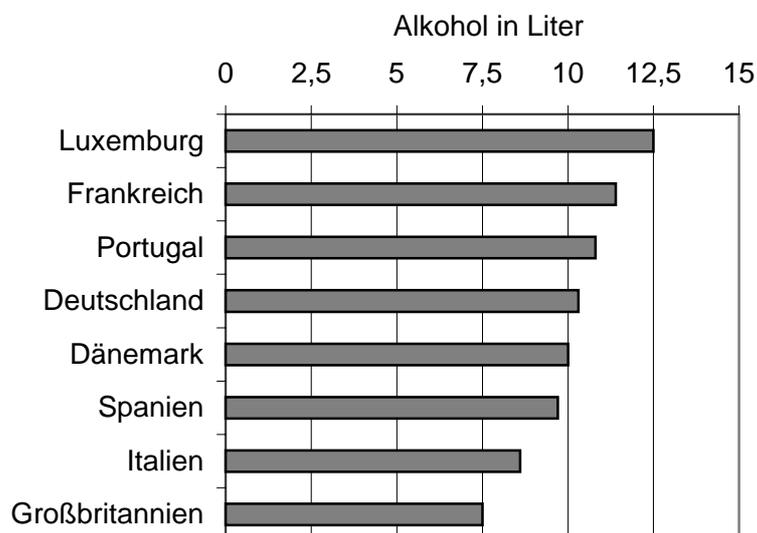


Abb. 1.12 Pro-Kopf-Verbrauch an reinem Alkohol 1994 (Statistisches Bundesamt, 1998).

Nach eigenen Angaben konsumieren 56 % der Bevölkerung regelmäßig Alkohol in geringen Mengen (1-20 g reinen Alkohol pro Tag) und 10 % in größeren Mengen (mehr als 40 g reinen Alkohol pro Tag). 22 % der Befragten geben an, überhaupt keinen Alkohol zu konsumieren. Eine gesundheitliche Gefährdung stellt ein chronischer Tagesverbrauch von mehr als 40 g reinem Alkohol für Männer bzw. mehr als 20 g für Frauen dar (das entspricht 0,4 bzw. 0,2 l Wein). 1995 wurde von 16,2 % der Männer und ca. 10 % der Frauen der jeweilige Grenzwert überschritten. Das entspricht

umgerechnet auf die Gesamtbevölkerung Deutschlands insgesamt ca. 10,6 Mio. Betroffene.

Die Folgen übermäßigen Alkoholkonsums sind vielfältig. Dazu gehören sowohl Schäden körperlicher, psychischer als auch sozialer Art. Es kann zu Befindlichkeitsstörungen, Konzentrationsproblemen, eingeschränkter Kontrollfähigkeit, auch Gewalttätigkeit und zum Verlust des sozialen Umfeldes (Familie, Arbeit und Wohnung) kommen. Alkoholabhängigkeit ist international als Krankheit anerkannt (Dilling *et al.*, 1991), die dann besteht, wenn während des letzten Jahres mindestens drei der folgenden Kriterien gegeben waren: Drang zum Alkoholkonsum; verminderte Fähigkeit, Beginn, Beendigung und Menge des Alkoholkonsums zu kontrollieren; Konsum mit dem Ziel, Entzugssymptome zu mildern; körperliches Entzugssyndrom (Unruhe, Zittern, Angst); Toleranzbildung, d.h. die Abhängigen vertragen zunehmend größere Alkoholmengen; eingeengtes Verhaltensmuster im Umgang mit Alkohol; fortschreitende Vernachlässigung anderer Interessen zugunsten des Alkoholkonsums; zunehmendes Trinken nach körperlichem Bedarf; anhaltender Alkoholkonsum trotz des Wissens um die schädlichen Folgen.

Man unterscheidet bei Alkohol-bedingten Erkrankungen einmal Krankheiten, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit direkt aus dem Alkoholkonsum folgen, und solche, zu deren Entstehung der Alkoholkonsum beiträgt. Zur ersten Gruppe gehören die sogenannten klassischen Alkoholkrankheiten wie Alkoholabhängigkeit, Alkoholpsychosen, alkoholische Fettleber, Hepatitis, Leberzirrhose und Polyneuropathie. Zur zweiten Gruppe zählen Krebserkrankungen der oberen Verdauungswege (Mundhöhle, Rachen, Speiseröhre), des Magens, der Bauchspeicheldrüse und der Leber, sowie Erkrankungen des Herzens (z.B. Herzmuskelschwäche) und des Kreislaufs (z.B. Bluthochdruck). Zu dieser Gruppe gehört auch die Alkoholembryopathie, von der jährlich etwa 2200 Kinder betroffen sind (Wiesner, 1995). Sie zeigt sich bei Säuglingen, deren Mütter während der Schwangerschaft Alkohol tranken und äußert sich durch geistige und körperliche Schäden wie Untergewicht, Wachstumsstörungen, geistiger Retardierung und Fehlbildungen innerer Organe, vor allem Herz und Nieren. Bis jetzt ist es noch nicht möglich, einen Grenzwert für die Menge Alkohol anzugeben, die mit Sicherheit nicht zu einer Embryopathie führt, da diese nicht nur nach übermäßigem Konsum sondern auch bereits bei geringeren Dosen Alkohol zu beobachten war. Chronischer Alkoholkonsum führt zu Mangelzuständen an Vitamin A, Folsäure,

Pyridoxalphosphat, Zink und Selen und zu stärkerer Infektanfälligkeit [Alkoholiker sind häufig mit Hepatitis B oder C infiziert (Anand *et al.*, 2000; Booth, 1998)]. Dies verursacht neben der direkten Ethanolwirkung eine Leberzirrhose, welche der Vorläufer von Leberkrebs (Hepato-cellular cancer, HCC) ist. Die Sterblichkeit an einer alkoholbedingten Leberzirrhose lag 1995 bei 10,6 Fällen pro 100 000 Einwohnern mit einem mittlerem Sterbealter von 55 Jahren. Die Wahrscheinlichkeit für einen frühen Tod liegt bei chronischem Alkoholmißbrauch etwa 10-fach über der Normalsterblichkeit bei Männern und bei Frauen etwa doppelt so hoch (Wiesner, 1995; Statistisches Bundesamt, 1998). Es gibt viele Hinweise auf Krebserkrankungen, die sich auf Alkoholkonsum zurückführen lassen. Die ersten Beobachtungen von Ösophaguskrebs bei Absinth-Trinkern Anfang des 20. Jahrhunderts werden von Lamu in Frankreich berichtet. In verschiedenen epidemiologischen Studien wurde der Zusammenhang zwischen chronischem Alkoholgenuß und Krebserkrankungen an Oropharynx, Larynx, Ösophagus und Leber gefunden (Seitz *et al.*, 1995). Außerdem zeigen starke Trinker von hochprozentigen Getränken ein 10- bis 12-fach höheres Risiko, an Mund-, Pharynx- und Larynxkrebs zu erkranken als Wein- und Biertrinker (Wynder *et al.*, 1973a; Wynder *et al.*, 1973b). Alkoholkonsum und Rauchen zeigen einen synergistischen Effekt und erhöhen das relative Krebsrisiko im oberen Verdauungstrakt erheblich (Tuyns *et al.*, 1978). Vermutlich könnte man 76 % aller Krebserkrankungen allein dadurch verhindern, daß nicht geraucht und kein Alkohol konsumiert wird (Seitz *et al.*, 1995; Statistisches Bundesamt, 1998).

1.7 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß von Ernährungsfaktoren auf DNA-Schädigungen *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Da viele Menschen Substanzen zusätzlich zur normalen Aufnahme über die Nahrung aus Gesundheitsgründen supplementieren, stellt sich die Frage nach deren Wirkweise, ihrer Schutzfunktion im Organismus und auch nach den Folgen, die eine Überversorgung verursachen könnte. Dazu sollten verschiedene Stoffe, Vitamin C, EPA, MMPDCD und Ethanol, auf eine mögliche Schutzwirkung zunächst im Säugerzellmodell untersucht werden. Bei MMPDCD handelt es sich, im Gegensatz zu den anderen Substanzen, nicht um einen Bestandteil der allgemeinen Ernährung sondern um eine Projektsubstanz mit

möglicherweise ähnlichen Eigenschaften wie natürliche Antioxidantien. Zunächst sollte die Wirkung dieser Stoffe *in vitro* auf den Untergrund von DNA-Schäden untersucht werden. Außerdem sollte ihr Einfluß auf die Höhe von Schadensspiegeln, die durch bereits bekannte, photosensibilisierende Schädigungsmechanismen induziert werden, bestimmt werden. Dazu sollte die modifizierte Form der Alkalischen Elution angewendet werden, mit der DNA-Strangbrüche und endonuklease-sensitive, hier Fpg-sensitive, DNA-Modifikationen erkannt werden. Darüberhinaus sollte die Mikrokernbildung, als Endpunkt für die chromosomale Integrität der zellulären DNA, und die Zytotoxizität und deren jeweiligen Beeinflußbarkeit unter den Versuchsbedingungen gemessen werden.

Neben der *in vitro*-Betrachtung sollte von Vitamin C, EPA und Alkohol auch der Effekt im humanen Organismus auf die Untergrundspiegel in peripheren Lymphozyten bestimmt werden. Dazu sollten verschiedene Studien durchgeführt werden. In Bezug auf Vitamin C sollte der kurzfristige Effekt einer einmaligen oralen Gabe von 1 g Ascorbinsäure auf die Schadenspiegel der Lymphozyten einiger freiwilliger Probanden bestimmt werden. Für eine Humanstudie zum EPA-Effekt, die im Rahmen einer europäischen Kooperation in der dermatologischen Abteilung der Universität Liverpool durchgeführt wurde, sollten die Spiegel an oxidativen DNA-Schäden in peripheren Lymphozyten gemessen werden. Die Probanden sollten dabei 4 g EPA oder Ölsäure täglich über drei Monate erhalten. Eine Studie mit alkoholabhängigen Patienten, die in der Klinik für Psychiatrie und Psychosomatik der Universität Mainz stationär zur Entgiftung aufgenommen sind, sollte die Wirkung von Ethanol auf die oxidativen DNA-Schäden in peripheren Lymphozyten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe erfassen.

Schließlich sollte anhand der *in vitro*- und *in vivo*-Ergebnisse eine Bewertung der Substanzen in Bezug auf protektive oder nozive Eigenschaften erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklaven	Biometra
Brutschrank	Heraeus B 5060 (Heraeus, Hanau)
Coulter Counter	Modell N Industry (Coulter Electronics, Luton, Großbritannien)
Fluoreszenz-Mikroskop	Filter 46 63 01-9901 (Zeiss, Oberkochen)
Fraktionssammler	Kontron FM 25 (Kontron AG, Zürich, Schweiz) RCT (Reichelt-Chemie-Technik,)
Gefrierbehälter	Flüssigstickstofftank TW 750RS (Taxlor Wharton, Theodore, AL, USA)
Gefrierschrank	-70°C Colora UF 85-300S (Colora, Lorch)
GC	CP Sil 88, 25 m x 0.25 mm (i.d.)
Halogenlampe	Osram SLG 1000-Studio (Osram, München)
HPLC	250 x 4.6 (i.d.) mm Hypersil BDS C18 Säule
Laminarairflow	HB 2448 (Heraeus, Hanau)
Mikroskop	(Zeiss, Jena)
Mehrkanalpumpe	Ismatec IPN 24 (Ismatec, Zürich, Schweiz)
pH-Meter	pH 526 (WTW, Weilheim)
Pipetten	Pipetman P 20, P 200, P 1000, P 5000 (Gilson, Frankreich)
UV/VIS-Photometer	LKB Biochrom Ultrospec 2 (Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden)
Schütteltisch	GFL No. 3015 (GFL, Burgwedel)
UV-Lampe 254 nm	Original Hanau, 15W
Zentrifugen	Hettich Mikro Rapid/K Hettich Universal/K2S (Hettich, Tuttlingen)
Zytozentrifuge	Cytospin 3 (Shandon, Astmoor, Großbritannien)

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Deckgläschen	(Knittel Gläser)
Filter	Poycarbonat-Membran, Porengröße 2µm, Durchmesser 25mm (Millipore, Holstein)
Filterhalter	Swinnex SC 2500 (Millipore, Holstein)
Filterpapier	(Schleicher&Schüll, Dassel)
Fluoreszenzküvetten	Hellma 105251-QS (Hellma GmbH, Mühlheim)
Kryoröhrchen	Nunc Kryo, 1,5 ml (A/S Nunc, Roskilde, Dänemark)
Objektträger	(Knittel Gläser)
Plastikröhrchen	15 und 50 ml (Greiner GmbH, Nürtingen)
Pipettenspitzen	(Gilson, Frankreich)
Pumpenschläuche	(Ismatec, Zürich, Schweiz)
Spritzen	20 ml Luerlock (Becton Dickinson &Co., Rutherford, USA)
Sterilfilter	Porengröße 0,22 µm (Schleicher & Schüll, Dassel)
Zellkulturflaschen	(Greiner GmbH, Nürtingen)
Zellkulturschalen	(Greiner GmbH, Nürtingen)

2.1.3 Chemikalien

L(+)-Ascorbinsäure	Sigma Chemie, Deisenhofen
Bisbenzimid Trihydrochlorid	Hoechst No. 33258, Sigma Chemie, Deisenhofen
Desferal	Sigma Chemie, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Eicosapentaensäure	Sigma Chemie, Deisenhofen
Ethanol, absolut	Baker, Deventer, Niederlande
Ethylendiaminsäure (EDTA)	Merck KG, Darmstadt
Ethylendiaminsäure, di-Natriumsalz(EDTA)	Merck KG, Darmstadt
Glycin	Merck KG, Darmstadt
Ham's F12-Medium	PAA, Cölbe
Heparin	Biochrom, Berlin
Histopaque-1077	Sigma Chemie, Deisenhofen
Kälberserum, fetales	Gibco, Eggenstein

Kalbsthymus-DNA	Serva, Heidelberg
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KG, Darmstadt
di-Kaliumhydrogenphosphat, Trihydrat	Merck KG, Darmstadt
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	Merck KG, Darmstadt
meta-Phosphorsäure	Sigma Chemie, Deisenhofen
MMPDCD	Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Chemie, Mainz
Natriumacetat, Trihydrat	Merck KG, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KG, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat, Monohydrat	Merck KG, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KG, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat, Dihydrat	Merck KG, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAA, Cölbe
Pufferlösungen pH 5, pH 7, pH 10	Merck KG, Darmstadt
Ro 19-8022	F. Hoffman-La Roche AG, Basel, Schweiz
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma Chemie, Deisenhofen
RPMI 1640	PAA, Cölbe
Salzsäure 25 %, 37 %	Merck KG, Darmstadt
Tetraethylammoniumhydroxid (TEAH)	Merck KG, Darmstadt
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA, Cölbe

2.1.4 Enzyme

Fpg-Protein	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase aus Escherichia coli; zur Verfügung gestellt von Serge Boiteux (Institute Gustave Roussy, Villejuif, Frankreich); Herstellung siehe Doktorarbeit von Olaf Will, 1999
Katalase	aus Rinderleber 78750 U/mg, 100 mg in 5 ml (Serva, Berlin)
Proteinase K	lyophilisiert, 27mAnson U/mg Protein (Roth, Karlsruhe)

2.1.5 Zellen

AS52	Ovarienzelllinie des Chinesischen Hamster, von W.J. Caspary, Laboratory of Environmental Carcinogenesis and Mutagenesis, North Carolina, USA
Menschliche Lymphozyten	verschiedene Spender

2.1.6 Medien, Lösungen, Puffer

2.1.6.1 Zellkultur

Kulturmedium für AS52	Ham's F 12 mit 5 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung
Kulturmedium für humane Lymphozyten	RPMI 1640 mit 5 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung
Einfriermedium für AS52	Kulturmedium für AS52 mit 10 % DMSO
Einfriermedium für humane Lymphozyten	reines FCS mit 10 % DMSO
PBSCMF (10 fach)	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 2 g KH ₂ PO ₄ mit H ₂ O _{dest} ad 1000 ml
PBSCMF (autoklaviert)	100 ml PBSCMF (10 fach) mit H ₂ O _{dest} ad 1000 ml
Trypsin/EDTA	0,5 g/l Trypsin 0,2 g/l EDTA in modifizierter Puck's Salzlsg.A
Ham's F12, RPMI 1640, FCS, Trypsin/EDTA, Penicillin/Streptomycin: PAA, Cölbe	

2.1.6.2 Aufarbeitung von Blutproben

Katalase aus Rinderleber	78750 U/mg, 100 mg in 5 ml, Serva, Berlin
Histopaque [®] -1077	Sigma Chemie, Deisenhofen
Biocoll [®] Separating Solution	Biochrom KG, Berlin
Sarstett S-Monovetten AH	Sarstett
Einfriermedium für humane Lymphozyten	siehe 2.1.6.1
Kulturmedium für humane Lymphozyten	siehe 2.1.6.1
PBSMCF (autoklaviert)	siehe 2.1.6.1

2.1.6.3 Alkalische Elution

BE ₁ -Puffer (autoklaviert)	20 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 1mM EDTA pH 7,5
Bisbenzimidstammlösung	0,15 mM in H ₂ O _{dest} aliquotiert und bei -20°C gelagert
DNA-Standard	50,0 mg/l Kalbsthymus-DNA in BE ₁ -Puffer
Elutionspuffer	20 mM H ₄ EDTA pH 12,1-12,2 der pH-Wert wird mit TEAH eingestellt
Enzymlösung Protein	BE ₁ -Puffer mit 0,5 mg BSA und Fpg-
Lysepuffer	100 mM Glycin pH 10,0 20 mM EDTA 2 % Natriumdodecylsulfat
Lysepuffer mit Proteinase K	0,4 mg Proteinase K /ml Lysepuffer
PBSCMF (autoklaviert)	siehe 2.1.6.1
Phosphatpuffer pH 6	0,1 M Natriumphosphat (autoklaviert) (Natriumdihydrogenphosphat 12,12 g/l, Dinatriumhydrogenphosphat 2,17 g/l)
Phosphatpuffer pH 7,2	0,1 M Natriumphosphat (autoklaviert) (Natriumdihydrogenphosphat 3,86 g/l, Dinatriumhydrogenphosphat 12,82 g/l)
Phosphatpuffer/Bisbenzimid	1 % (v/v) Bisbenzimidstammlösung in Phosphatpuffer pH 7,2

Waschpuffer	20 mM EDTA	pH 10,0
-------------	------------	---------

2.1.6.4 Toxizitätstest

Giemsa-Lösung

Methanol

Merck KG, Darmstadt

Natriumchlorid-Lösung

0,9 % in H₂O_{dest}

PBSCMF

siehe 2.1.6.1

2.1.6.5 Mikrokerntest

Farbstofflösung

Bisbenzimid in PBSCMF (5µg/ml)

Fixierlösung

EDL-2 (Linaris, Bettingen)

PBSCMF

siehe 2.1.6.1

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zelllinie AS52

AS52 Zellen stammen aus Ovarien des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) und wachsen adhärent. Die Zelllinie stammt von der CHO-K1-BH4-Zelllinie ab, in der die einzige Kopie des hemizygoten Säugergens HPRT (auf dem X-Chromosom lokalisiert) inaktiviert wurde. Durch Transformation mit dem Vektor PSV2-gpt wurde eine Kopie des zum HPRT-Gen funktionell analogen bakteriellen gpt-Gens eingeführt, welches für die Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (XPRT oder XGPRT) kodiert (Mulligan *et al.*, 1980). Die Zellen wurden mit Ham's F12 Medium supplementiert mit 5 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Ihre Verdopplungszeit beträgt etwa 18 h. Zur Passagierung der Zellen wird das Medium abpipettiert und mit PBSCMF gewaschen. Dann wird der Zellrasen mit Trypsin/EDTA-Lösung benetzt und ca. 1 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und resuspendiert. Dabei inaktiviert das serumhaltige Medium das Trypsin.

2.2.1.2 Blutabnahme

Die Blutabnahme bei Probanden erfolgte in heparinisierten Monovetten oder in Spritzen mit vorgelegter Heparin-Lösung (0,3 ml je 10 ml Vollblut) aus der Armvene. Bei der EPA- und bei der Alkohol-Studie wurde der Spritze bzw. Monovette außerdem Katalase (315 U/ml) zugesetzt, um Oxidationsreaktionen während der Aufarbeitung zu verhindern. Bei den Untersuchungen in Bezug auf Vitamin C wurde sowohl mit als auch ohne Katalasezusatz gearbeitet.

2.2.1.3 Isolierung humaner Lymphozyten

Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte über eine Dichtezentrifugation mit Histopaque®-1077 (für die Vitamin C- und EPA-Studie) oder Biocoll® (bei der Alkoholstudie). Für die Aufarbeitung mit Histopaque®-1077 werden in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen 10 ml der Trennlösung vorgelegt und auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wird vorsichtig mit dem gleichen Volumen Vollblut überschichtet und 30 min bei 400 x g zentrifugiert. Danach findet sich eine Schichtung in vier Zonen, wobei die oberste Schicht aus Blutplasma, die folgende aus mononukleären Zellen (Lymphozyten), die dritte aus Histopaque®-1077 und die letzte aus roten Blutkörperchen besteht. Das Plasma wird abgenommen und verworfen, die Lymphozyten in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit 10 ml PBSCMF gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 min bei 250 x g) wird der Überstand verworfen und der Bodensatz in 10 ml PBSCMF resuspendiert. Es wird erneut zentrifugiert (10 min bei 250 x g) und resuspendiert. Nach einer dritten Zentrifugation bei 250 x g wird der Bodensatz in dem entsprechenden Medium zur Weiterbehandlung der Zellen aufgenommen und resuspendiert (Sigma Chemical Company, 1994).

Bei der Aufarbeitung mit Biocoll® werden 15 ml Vollblut in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen vorgelegt, mit 15 ml PBSCMF verdünnt und mit 30 ml Trennmedium vorsichtig unterschichtet. Bei der Zentrifugation von 15 min bei 2500 U/min bildet sich die gleiche Schichtung aus wie oben beschrieben und die weitere Aufarbeitung ist ebenfalls entsprechend.

Die Lymphozyten wurden wie oben beschrieben isoliert und anschließend direkt in der Alkalischen Elution (siehe 2.2.8) vermessen oder nach der in 2.2.1.4 beschriebenen Methode eingefroren, bis die Probensammlung abgeschlossen war.

2.2.1.4 Kryokonservierung von Säugerzellen

Die Zellen wurden abzentrifugiert und mit vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert, so daß sich eine Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen ergab. Die Lösung wurde zügig in Kryoröhrchen aliquotiert (je 1,8 ml pro Röhrchen) und erst 1 ½ Stunden bei -20°C und anschließend über Nacht bei -70°C eingefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte in flüssigem Stickstoff. Die Lymphozytenproben wurden jedoch aus Platzgründen bei -70°C aufbewahrt.

Zum Auftauen der Zellen werden die Kryoröhrchen kurz in ein 37°C -Wasserbad gehalten und angetaut, dann in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Kulturmedium überführt und anschließend 10 min bei $140 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und kann dann in eine Zellkulturflasche zur Weiterkultur überführt werden.

2.2.2 Studiendesign der Probandenstudie mit EPA

Für die doppelt-blind durchgeführte Studie zur Wirkung von EPA wurden 14 freiwillige Probanden rekrutiert. Jedem wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen Blutproben entnommen, die Lymphozyten wie in 2.2.1.3 und 2.2.1.5 beschrieben isoliert und eingefroren. Die Probanden erhielten dann über drei Monate eine Supplementierung mit 4 g EPA (Verumgruppe) oder Ölsäure (Placebogruppe) täglich in Form von Kapseln. Nach Ablauf dieser Zeit wurden erneut an drei aufeinanderfolgenden Tagen Blutproben genommen, Lymphozyten isoliert und eingefroren. Teile aller genommenen Blutproben wurden zur Bestimmung des DNA-Schadens zur Verfügung gestellt. Darüberhinaus wurde bei den Probanden die minimale Erythem-bildende Lichtdosis (MED) sowohl vor als auch nach der Supplementierung bestimmt und auch Hautbiopsien in Bezug auf Lipidperoxidation, GSH-, Vitamin E-Gehalt und die Immunantwort untersucht.

2.2.3 Probandenstudie bzgl. chronischen Alkoholmißbrauchs

In Zusammenarbeit mit der Klinik für Psychiatrie und Psychosomatik der Universität Mainz wurden von Patienten, die zur Entgiftung nach chronischem Alkoholkonsum stationär aufgenommen wurden, 32 Freiwillige (Alter $44,7 \pm 8,7$ Jahre) in die Studie aufgenommen. Wie in Abb. 2.1 dargestellt ist, wurde ihnen bei stationärer Aufnahme Blutproben entnommen, zwei Tage nach der Aufnahme während der Entgiftungstherapie und nach Abschluß der Therapie am Entlassungstag (siehe 2.2.1.3).

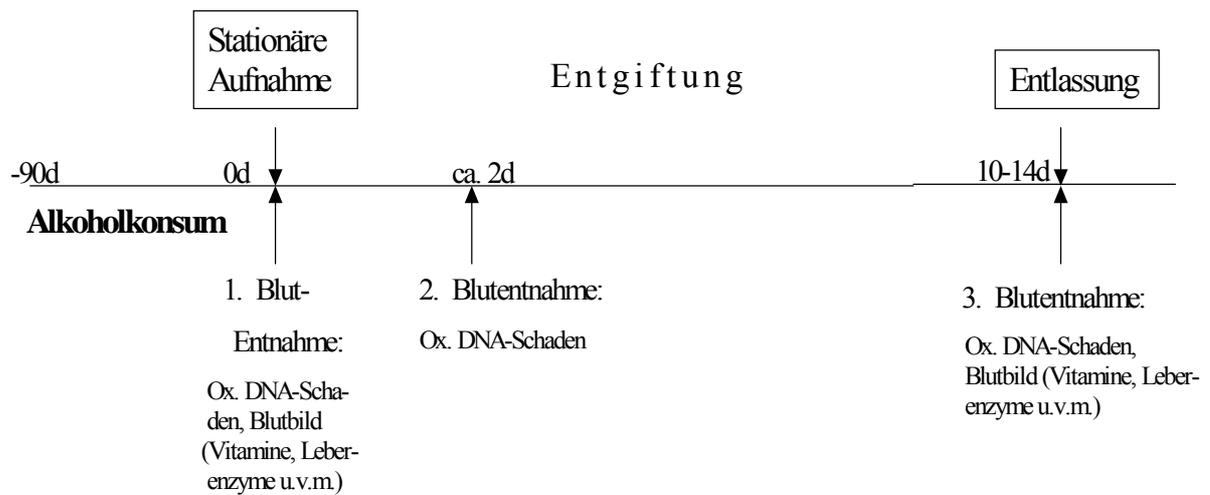


Abb.2.1 Design der Alkoholikerstudie

Bei allen Blutproben wurden wie in 2.2.1.3 beschrieben die Lymphozyten isoliert und eingefroren, um später den DNA-Schaden in den Zellen zu bestimmen. Außerdem wurde bei der ersten und dritten Entnahme ein klinisches Blutbild erstellt. Darüberhinaus wurden die Patienten mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens (Form 90) zu ihrem Alkoholkonsum der letzten 90 Tage vor der stationären Aufnahme befragt. Einer Kontrollgruppe von 28 Personen der gleichen Altersgruppe ($46,5 \pm 6,9$ Jahre) wurde ebenfalls Blut zur Lymphozytengewinnung und zur Erstellung des Blutbildes entnommen. Auch diese Personen wurden über ihren Konsum an Alkohol der zurückliegenden drei Monate mit Hilfe des Formblattes befragt.

Mit dem Formblatt Form 90 wurde der Alkoholkonsum der Probanden (= Alkoholiker und Kontrollen) für jeden Tag der letzten 90 Tage einzeln erfaßt. Aus diesen Daten lassen sich neben der Gesamttrinkmenge auch die Trinkmenge in jedem einzelnen Monat, die abstinenten Tage, die Trinktage und die schweren Trinktage mit einem Konsum über 80 g Alkohol pro Tag berechnen.

Die Bestimmung der Blutbilder erfolgte im Zentrallabor der Universitätsklinik Mainz nach den dortigen Standardmethoden. Dabei wurden die in Tabelle 2.1 aufgeführten Parameter erhoben.

Alkohol	mg/dl o. ‰	AP = alkalische Phosphatase	U/l
Vitamin A	ng/ml	GGT = γ -Glutamyl-Transferase	U/l
Vitamin E	μ g/ml	LDH = Lactat-Dehydrogenase	U/l
25-Hydroxy-Vitamin D	ng/ml	Natrium	mmol/l
1,25-Dihydroxy-Vitamin D	pg/ml	Kalium	mmol/l
Vitamin B ₁	ng/ml	Calcium	mmol/l
Vitamin B ₂	ng/ml	Magnesium	mmol/l
Vitamin B ₆	ng/ml	Chlorid	mmol/l
CDT = carbohydrate deficient transferrin	%	CreatinK = Creatin-Kinase	U/l
TG = Triglyceride	mg/dl	TnT = Troponin T	μ g/l
Cholesterin	mg/dl	Lipase	U/l
HDL = high density lipoprotein	mg/dl	Amylase	U/l
LDL = low density lipoprotein	mg/dl	Creatinin	mg/dl
Ri-Index = Quotient aus HDL und LDL		Harnstoff	mg/dl
Leukozyten	Anzahl/nl	Harnsäure	mg/dl
Erythrozyten	Anzahl/pl	Phosphat	mg/dl
Hb = Hämoglobin	g/dl	Gesamtbilirubin	mg/dl
HK = Hämatokrit	%	Gesamteiweiß	g/l
MCV = mean cell volume	fl	Glucose	mg/dl
MCH = mean corpuscular hemoglobin	pg	Lactat	mmol/l
MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration	g/dl	Quick = Prothrombinzeit	%
EVB = Erythrozytenverteilungsbreite	%	aktiviertes PTT = partielle Thromboplastinzeit	sec
Thromb = Thrombozyten	Anzahl/nl	TZ = Thrombinzeit	sec
MTV = mean thrombocyte volume	fl	Fibrinogen	mg/dl
Neutrophile = neutrophile Granulozyten	%	C-reaktives Protein	mg/l
Lymphozyten	%	Fe = Eisen	(μ g/dl)
Monozyten	%	Ferritin	ng/ml
Eos. = eosinophile Granulozyten	%	Vitamin B ₁₂	pg/ml
Baso = basophile Granulozyten	%	Folsäure	ng/ml
GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase	U/l	TSH = Thyreoidea-stimulierendes Hormon	mU/l
GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase	U/l	freies T3 = Triiodthyronin	pg/ml
GLDH = Glutamat-Dehydrogenase	U/l	freies T4 = Thyroxin	ng/dl

Tab. 2.1 Erfasste Blutparameter in der Alkoholikerstudie

Die statistische Analyse erfolgte ebenfalls in der Klinik für Psychiatrie und Psychosomatik mit Hilfe des Programmes SPSS 10.0, wobei Korrelationen nach Pearson berechnet wurden. Zum Vergleich der beiden Probandengruppen wurde Student's T-Test angewendet.

2.2.4 Bestimmung des Vitamin C-Gehaltes im Zellysat und im Blut

2.2.4.1 Aufarbeitung der AS52-Zellen - Zellysat

Der vorbehandelte Zellrasen wird dreimal mit je 10 ml PBSCMF gewaschen, abtrypsiniert und die Zellen in Medium resuspendiert (siehe 2.2.1.1) und mit dem Coulter Counter gezählt. Anschließend wird durch Zentrifugation ein Zellpellet aus vier Millionen Zellen hergestellt und der Überstand quantitativ abpipettiert. Zur Zellyse werden 150 µl einer Lösung aus 5 % meta-Phosphorsäure und 1 mM Desferal zugegeben und stark gemischt. Anschließend wird die Probe bei -70°C eingefroren und ist so maximal sechs Wochen haltbar.

2.2.4.2 Aufarbeitung der AS52-Zellen – Kernisolierung

2 bis 4 Millionen vorbehandelte und abtrypsinierte Zellen werden mit $400 \times g$ 5 min zentrifugiert und in 5 ml NaCl-Lösung (0,9 % in Wasser) resuspendiert. Dieser Waschschrift wird einmal wiederholt und das Zellpellet in 1 ml Puffer A (10 mM Tris, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA; eingestellt auf pH 7,5) resuspendiert. Anschließend werden 30 µl NP40 (Nonidet P40 10% in Wasser) zugesetzt und stark gemischt, so daß die Zellen lysieren. Dann wird bei $1000 \times g$ für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zum Kernpellet werden 100 bis 200 µl NaCl-Lösung (0,9 % in Wasser) zugesetzt und vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wird anschließend bei -70°C eingefroren.

2.2.4.3 Bestimmung des Vitamin C-Gehaltes in Blutproben

Die Bestimmung des Vitamin C-Gehaltes erfolgt im Blutserum. Dazu wird 1 ml heparinisiertes Vollblut 5 min stark zentrifugiert, so daß sich die Blutkörperchen absetzen und das Serum den Überstand bildet. Anschließend werden gleiche Teile von Serum und einer Lösung aus 10 % meta-Phosphorsäure und 2 mM Desferal stark

gemischt und bei -70°C eingefroren. Die Lagerung der Proben sollte auch hier sechs Wochen nicht überschreiten.

2.2.4.4 Messung von Vitamin C durch HPLC

Alle Proben werden innerhalb von vier Wochen nach der Gewinnung zweimal gemessen, um den Ascorbinsäure- und den Dehydroascorbinsäuregehalt (DHA) zu bestimmen. Einmal wird der Gesamt-Vitamin C-Gehalt nach Vorinkubation mit Ascorbatoxidase und Umsetzung der DHA mit 4,5-Dimethyl-*ortho*-phenylendiamin (DOP) zu einem fluoreszierenden Produkt gemessen. Bei der zweiten Analyse ohne Ascorbatoxidase wird nur bereits vorhandene DHA mit DOP umgesetzt und bestimmt. Die HPLC-Messung erfolgt mit einer 250 x 4.6 (i.d.) mm Hypersil BDS C18 Säule und einem Gradienten von Acetonitril mit 80 mM Natriumacetatpuffer (pH 6,7) mit einer Geschwindigkeit von 0,8 ml/min. Detektiert wird fluorimetrisch bei einer Wellenlänge von 360 bzw. 455 nm für Exzitation bzw. Emission. Die Ascorbinsäurespiegel errechnen sich aus der Differenz von Gesamt-Vitamin C- und DHA-Konzentration (Speek *et al.*, 1984; Lopez-Anaya *et al.*, 1987).

2.2.5 Bestimmung der EPA-Aufnahme in AS52

2.2.5.1 Aufarbeitung der Zellen

Der vorbehandelte Zellrasen wird dreimal mit je 10 ml PBSCMF gewaschen, abtrypsiniert und die Zellen in Medium resuspendiert (siehe 2.2.1.1) und mit dem Coulter Counter gezählt. Anschließend wird durch Zentrifugation ein Zellpellet aus vier Millionen Zellen hergestellt und der Überstand quantitativ abpipettiert. Zur Zellyse werden 120 μl reines Wasser zugegeben und stark gemischt. Anschließend wird die Probe bei -70°C eingefroren und ist lange haltbar, da EPA bei -70°C stabil ist.

2.2.5.2 Messung von Fettsäuren durch GC/FID

Die Methode zur Bestimmung von Fettsäuren ist eine spezifische Ein-Schritt-Methylierungsreaktion, bei der die Fettsäuren hydrolysiert, methyliert und extrahiert werden. Dafür wird in einem 10 ml-Glasröhrchen zu 100 μl Zellysat 15 μg Nonadecansäure als interner Standard und 2 ml eines Methanol-Benzen-Gemisches [4:1 (v/v)] gegeben. Dann werden 200 μl Acetylchlorid langsam unter Mischen zugefügt. Anschließend wird das Glasröhrchen dicht verschlossen und bei 100°C 1 h inkubiert.

Ist die Mischung abgekühlt, wird mit 5 ml 6 % (w/v) Kaliumcarbonat-Lösung versetzt und 5 min stark gemischt. Nach Zentrifugation von 10 min bei 1000 x g wird der Benzenüberstand abgenommen und zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in 50 µl Hexan aufgenommen und enthält die Fettsäuremethylester (einschließlich EPA). Diese werden dann mittels Gaschromatographie mit Stickstoff über eine Silicatsäule (25 m x 0.25 mm (i.d.) CP Sil 88) getrennt und per Flammenionisation detektiert. Der Fettsäuregehalt wird in mol % bezogen auf die gesamte Fettsäuremenge angegeben. (Onkenhout *et al.*, 1995).

2.2.6 Alkalische Elution

2.2.6.1 Prinzip der Methode

Die Alkalische Elution ist eine *in vitro*-Methode zur Quantifizierung von Einzelstrangbrüchen, DNA-DNA- und DNA-Protein-Quervernetzungen in zellulärer DNA von Säugerzellen (Kohn *et al.*, 1976). Die Nachweisgrenze der Methode liegt bei etwa 0,5 Läsionen pro 10^7 Basenpaaren. Die Versuchsanordnung besteht aus einem Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von 2 µm und einem Durchmesser von 25 mm, der sich in einem Filterhalter befindet. An diesen sind nach oben ein 25 ml-Vorratsgefäß, über das alle Lösungen aufgebracht werden, und nach unten ein Dialyseschlauch angeschlossen, der über eine Peristaltikpumpe mit einem Fraktionssammler verbunden ist.

Für die Bestimmung werden vorbehandelte Zellen als Suspension auf den Filter aufgebracht und mit einem Detergens lysiert, wobei der größte Teil des zellulären Proteins und der RNA vom Filter gespült werden. Die DNA bleibt als Doppelstrang zurück. Anschließend wird mit Proteinase K behandelt, um an die DNA-gebundenes Protein abzubauen. Nun wird ein alkalischer Puffer (Elutionspuffer pH 12,1) über 12 h sechsfach fraktioniert durch den Filter gepumpt. Im alkalischen Milieu dissoziiert der DNA-Doppelstrang in seine Einzelstränge, die abhängig von ihrer Länge vom Filter gespült werden. Kürzere Stränge passieren einfacher als längere die Filterporen und eluieren somit schneller. Das bedeutet auch, daß die DNA geschädigter Zellen, also mit mehr Einzelstrangbrüchen, schneller durch den Filter tritt und die DNA von ungeschädigten Zellen auf dem Filter verbleibt. Die Bestimmung des DNA-Gehaltes in den aufgefangenen Fraktionen und auf dem Filter erfolgt nach deren Neutralisation und

Anfärbung mit Bisbenzimid fluorimetrisch. Daraus wird die Elutionsrate der DNA errechnet, welche proportional zur Anzahl der Einzelstrangbrüche und alkalilabilen Läsionen ist. Die Methode wird mit γ -Strahlung als Standard kalibriert, wobei 6 Gy eine Läsion pro 10^6 Basenpaare hervorrufen (Kohn *et al.*, 1976).

Eine Modifizierung der beschriebenen Methode erfolgt durch den Einsatz von Reparaturenukleasen. Diese werden nach der Proteinase K-Hydrolyse auf den Filter aufgetragen und erkennen dort spezifisch DNA-Modifikationen, welche dann als zusätzliche Einzelstrangbrüche sichtbar werden.

2.2.6.2 Vorbehandlung der Zellen für die alkalische Elution

Zur Bestimmung des DNA-Schadens in AS52 werden Zellen im vorkonfluenten Stadium verwendet, die nach ihrer Schädigung und direkt vor der Alkalischen Elution in Suspension gebracht und mit dem Coulter Counter gezählt wurden. Um eine Reparatur der induzierten DNA-Modifikationen zu verhindern, werden die Zellen bei 0 °C auf Eis aufbewahrt.

Wird der DNA-Schaden in Lymphozyten bestimmt, werden diese entweder direkt nach ihrer Isolierung (siehe 2.2.1.3) oder nach dem Auftauen in reichlich Medium gezählt und bis zum Auftragen ebenfalls kühl gelagert.

2.2.6.3 Präinkubation mit Vitamin C

Zur Vorbehandlung mit Vitamin C wird der Zellrasen gewaschen und 10 ml frisches Medium zugegeben. Anschließend werden aus der 5 mM oder 100 mM Vitamin C-Stammlösung entsprechende Volumina für Endkonzentrationen von 0 bis 1 mM zugesetzt und 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wird zweimal mit PBSCMF gewaschen und eine Schädigung durchgeführt oder die Zellen zur DNA-Schadensbestimmung abgelöst.

2.2.6.4 Präinkubation mit EPA

Zunächst wird die EPA-Stammlösung (200 mM) im Verhältnis 1:133 mit BSA-Lösung (10 %, m/v) gemischt und bei 37 °C für 15 min inkubiert, so daß EPA an BSA binden und leichter in die Zelle aufgenommen werden kann (Trigatti *et al.*, 1995). Der Zellrasen wird gewaschen und 10 ml frisches Medium werden zugegeben. Anschließend werden aus dem EPA/BSA-Ansatz 333 μ l zugesetzt (Endkonzentration EPA 50 μ M) und 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wird zweimal

mit PBSCMF gewaschen und eine Schädigung durchgeführt, oder die Zellen werden zur DNA-Schadensbestimmung abgelöst.

2.2.6.5 Präinkubation mit MMPDCD

Für die Behandlung mit MMPDCD wurden Stammlösungen der Konzentrationen 3, 10, 30 und 100 μM hergestellt. Der gewaschene und mit 10 ml frischem Medium versetzte Zellrasen wird mit 10 μl (bzw. 30 und 100 μl bei den höchsten Konzentrationen) der jeweiligen Stammlösungen versetzt, so daß sich Endkonzentrationen von 0, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 nM an MMPDCD ergeben. Die Präinkubation erfolgt bei 37 °C und 5 % CO₂ für 1 h. Anschließend wird zweimal mit PBSCMF gewaschen und eine Schädigung durchgeführt oder die Zellen zur DNA-Schadensbestimmung abgelöst.

2.2.6.6 Präinkubation mit Ethanol

Zur Vorbehandlung mit Vitamin C wird der Zellrasen gewaschen und 10 ml frisches Medium zugegeben. Anschließend werden entsprechenden Volumina Ethanol p.a. zugegeben, so daß Endkonzentrationen von 0 bis 10 % (v/v) erreicht werden, und 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dann wird zweimal mit PBSCMF gewaschen und die Zellen zur DNA-Schadensbestimmung abgelöst.

2.2.6.7 Bestrahlung mit sichtbarem Licht

Zur Bestrahlung mit sichtbarem Licht werden die präinkubierten Zellen mit 10 ml PBSCMF versetzt und in Flaschen auf Eis geschüttelt und mit einer 1000 W-Lampe im Abstand von 33 cm 20 min bestrahlt. Das entspricht einer Dosis von 450 kJ/m². Anschließend wird mit PBSCMF gewaschen und die Zellen abgelöst, resuspendiert, gezählt und bis zum Auftragen kühl aufbewahrt.

2.2.6.8 Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Anwesenheit des Photosensibilisators Ro 19-8022

Direkt vor dem Gebrauch wird die benötigte Menge PBSCMF mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022 (Endkonzentration 50 μM) vorgemischt. Zur Bestrahlung werden die präinkubierten Zellen mit 10 ml dieser Lösung versetzt, in Flaschen auf Eis geschüttelt und mit einer 1000 W-Lampe im Abstand von 38 cm 10 min bestrahlt. Das entspricht einer Dosis von 166 kJ/m². Anschließend wird zweimal

mit PBSCMF gewaschen und die Zellen abgelöst, resuspendiert, gezählt und bis zum Auftragen kühl aufbewahrt.

2.2.6.9 Bestrahlung mit UVB

Zur Bestrahlung mit UVB werden die präinkubierten Zellen mit 10 ml PBSCMF versetzt und in Flaschen auf Eis mit einer UVB-Lampe im Abstand von 50 cm 14 min bestrahlt. Das entspricht einer Dosis von $1,1 \text{ kJ/m}^2$. Anschließend wird mit PBSCMF gewaschen und die Zellen abgelöst, resuspendiert, gezählt und bis zum Auftragen kühl aufbewahrt.

2.2.6.10 Praktische Durchführung der Alkalischen Elution

Die Polycarbonatfilterblättchen werden mit destilliertem Wasser befeuchtet, in Filterhalter eingebaut und blasenfrei mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gefüllt. Die Filterhalter werden an das Vorratsgefäß und über die Schläuche an die Mehrkanalpumpe angeschlossen. Anschließend wird zweimal mit 2 ml PBSCMF gespült und im temperierbaren Wasserbad auf $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Bei dieser Temperatur werden pro Filter eine Million der vorbehandelten Zellen bzw. der Kontrollen aufgetragen, mit maximaler Pumpgeschwindigkeit auf den Filter gesaugt und anschließend zweimal mit 3 ml kaltem PBSCMF gewaschen. Die anschließende Zellyse erfolgt bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Dazu werden 2 ml Lysepuffer mit maximaler Geschwindigkeit durch den Filter gepumpt und danach je 5 ml einer vorgemischten Lösung aus Lysepuffer und Proteinase K ($0,2 \text{ mg/ml}$) aufgetragen und innerhalb von 90 min durch den Filter gepumpt. Rest des Puffers werden entfernt und sieben mal mit je 5 ml BE_1 -Puffer gewaschen. Die Enzyminkubation erfolgt anschließend bei einer Temperatur von $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Dazu werden 2 ml BE_1 -Puffer auf die Filter für die Strangbruchbestimmung und 2 ml einer frisch hergestellten Fpg-Enzymlösung aus BE_1 -Puffer mit $1,0 \text{ mg}$ Fpg-Protein und $0,5 \text{ mg}$ BSA pro ml Puffer auf die Filter mit Enzymmessung aufgetragen. Die Hälfte der Lösungen wird mit maximaler Geschwindigkeit durchgespült und der Rest langsam innerhalb von 60 min. Anschließend wird das Wasserbad auf $25 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert und die Filter zweimal mit 5 ml BE_1 -Puffer und danach mit 4 ml Waschpuffer gewaschen. Für die Elution der DNA werden 25 ml Elutionspuffer (pH 12,1) in das Vorratsgefäß gegeben und mit einer Geschwindigkeit von $2,15 \text{ ml/h}$ gepumpt. Alle zwei Stunden

erfolgt ein Fraktionswechsel, wobei die sechste Fraktion und der restliche Elutionspuffer zur Erfassung der auf dem Filter verbliebenen DNA genutzt wird. Dazu werden die Filterhalter einschließlich des Polycarbonatfilters mit dem Restpuffer der sechsten Fraktion in einem Deckelgefäß vereinigt und 2 h bei 60 °C im Wasserbad geschüttelt, um die restliche DNA in Lösung zu bringen. Zur fluorimetrischen Bestimmung der DNA in den Fraktionen wird jede Fraktion (auch die der geschüttelten sechsten Fraktion) zu gleichen Teilen mit Phosphatpuffer pH 6 vermischt. Nach 15 min wird noch einmal mit dem gleichen Volumen diesmal Phosphatpuffer pH 7,2 mit Bisbenzimid gemischt und unter Lichtausschluß weitere 15 min aufbewahrt. Anschließend erfolgt die fluorimetrische Vermessung der Emission (bei 450 nm) des Bisbenzimid-DNA-Komplexes, der bei 360 nm angeregt wird. Dabei dient eine Mischung aus gleichen Teilen Elutionspuffer, Phosphatpuffer pH 6 und Phosphatpuffer pH 7,2 (mit Bisbenzimid) als Blindwert. Die Summe der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Fraktionen einer Spur ist linear zum Gesamt-DNA-Gehalt der Probe. Man errechnet nun den prozentualen Anteil der jeweiligen DNA-Menge, der zu den erfassten Zeitpunkten noch auf dem Filter vorlag. Trägt man diesen DNA-Gehalt logarithmisch gegen die Zeit auf, erhält man eine Gerade, deren Steigung direkt proportional zur Anzahl der Einzelstrangbrüche in der DNA ist. Die absolute Strangbruchzahl pro 10^6 Basenpaaren kann aus der Geradensteigung und dem Faktor $F=-2,24$ direkt errechnet werden. Dieser Faktor ergibt sich aus der Kalibrierung der Alkalischen Elution mit γ -Strahlung (Pflaum, 1996; Epe *et al.*, 1993). Die Anzahl der Fpg-sensitiven Modifikationen errechnet sich anschließend aus der Differenz der Spur mit Enzym und einer, in der ausschließlich bereits vorhandene Einzelstrangbrüche gemessen wurden. Sie werden dann ebenfalls als Modifikationen/ 10^6 Basenpaare (bp) angegeben.

Desweiteren wird eine Bestimmung des absoluten DNA-Gehaltes durchgeführt. Dazu wird ein Ansatz mit 20 μ l eines Kalbsthymus-DNA-Standards (Konzentration von 0,2 mg/ml) in Elutionpuffer hergestellt, dessen Volumen dem der Fraktionen entspricht. Dieser wird dann wie oben beschrieben mit Phosphatpuffer pH 6 und Phosphatpuffer pH 7,2 (mit Bisbenzimid) versetzt und auch analog gemessen. Der DNA-Gehalt in jeder Spur errechnet sich aus der Summe des relativen DNA-Gehaltes aller Fraktionen multipliziert mit der DNA-Menge des Standards und dividiert durch die gemessene Fluoreszenz des Standards.

2.2.7 Toxizitätstest

Zur Bestimmung der Toxizität wird die Eigenschaft der AS52 zur Bildung von Kolonien, die Cloning efficiency, genutzt. Dazu werden Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, vorbehandelt und geschädigt wie in 2.2.6 beschrieben. Die Zellen werden abgelöst und zu je 200 Zellen in fünf 60 mm-Gewebekulturschalen mit je 5 ml Routinemedium ausgesät. Die Platten werden acht Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Anfärbung der Kolonien werden die Platten mit 0,9 % Natriumchlorid-Lösung gespült und die Kolonien mit Methanol 15 min fixiert. Nun wird mit Giemsa-Lösung für 15 min gefärbt und danach nicht gebundener Farbstoff vorsichtig mit Wasser abgespült. Nach dem Trocknen werden die Kolonien jeder Platte ausgezählt und der durchschnittliche Wert jedes Ansatzes ermittelt. Die Zahl des Kontrollansatzes, also die maximale Überlebensrate, wird als 100 %-Wert gesehen und die anderen Ansätze dazu ins Verhältnis gesetzt.

2.2.8 Mikrokerntest

Prinzip der Methode

Mikrokerne stellen von einer doppelten Kernmembran umgebenes Chromatin im Zytoplasma der Zelle dar, das sich vom Hauptkern abgesondert hat. Es sind also kleinere Kerne (max. 1/3 des Hauptkerndurchmessers), die sich außerhalb, aber in enger Nachbarschaft zum Hauptkern, von dem sie abstammen, befinden. Die Ultrastruktur der Mikrokerne entspricht der eines normalen Kerns; sie besitzen Kernporen, Kernhülle, Hetero- und Euchromatin. Zur Entstehung von Mikrokerneln trägt der Verlust von Chromatinmaterial aus dem Hauptkern während der Mitose bei. Dabei können durch Schäden verschiedener Art ganze Chromosomen oder aber Chromosomenfragmente bei der Polwanderung verloren gehen (Heddle *et al.*, 1991; Kirsch-Volders *et al.*, 1997). Mikrokerne kommen in gesunden Zellen sehr selten vor, ihr Vorkommen kann durch Mutagene aber drastisch erhöht werden. Eine Sichtbarmachung von Zellkernen und Mikrokerneln ist durch Anfärbung des Chromatins mit Bisbenzimid möglich.

Mikrokernelinduktion in AS52

Die wie unter 2.2.6 vorbehandelten Zellen werden nach der Schädigung gewaschen und mit frischem Medium für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Danach werden die Zellen abgelöst, zu einer Zelldichte von etwa 1 Million pro ml resuspendiert und

wenige Tropfen davon mit Hilfe einer Zytocentrifuge (1000 U/min für 4 min) auf drei Objektträger je Ansatz aufgetragen. Anschließend werden die Zellen mit Methanol bei -20°C für mindestens eine Stunde fixiert. Die Anfärbung der DNA erfolgt erst kurz vor der mikroskopischen Auswertung. Dazu werden die Objektträger für eine Minute in Bisbenzimid-Lösung gestellt, anschließend vorsichtig mit PBSCMF gewaschen und mit einigen Tropfen EDL-2 eingedeckt. Danach erfolgt die Auswertung im Fluoreszenzmikroskop mit einem Anregungsfilter von 356 nm. Pro Objektträger werden 2000 Zellen mit den dazugehörigen Mikrokernen ausgezählt, also DNA-haltige Strukturen, deren Größe kleiner als 25 % des Hauptkerns ist und die deutlich vom Zellkern getrennt sind, und der Mittelwert für jeden Ansatz errechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluß von Vitamin C in AS52

Um einen anti- oder pro-oxidativen Effekt von Vitamin C feststellen zu können, wurden zunächst kultivierte Säugerzellen (AS52-Zellen) untersucht. Es wurden Vitamin C-Konzentrationen von 0, 50 und 100 μM eingesetzt, da diese etwa der physiologischen Serumkonzentration im Menschen entsprechen und bei diesen Konzentration noch keine pro-oxidativen Effekte bezüglich der DNA-Modifikationen festgestellt worden sind.

Zunächst wurden zum Nachweis der Aufnahme von Vitamin C AS52-Zellen mit 0, 50 und 100 μM Vitamin C für 2 h und für 4 h vorinkubiert und anschließend der Gehalt an Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure (DHA) mit Hilfe der HPLC bestimmt. Abbildung 3.1 zeigt, daß nicht vorbehandelte Zellen fast kein Vitamin C enthielten und daß der Gehalt durch die Vorinkubation konzentrationsabhängig nach zwei Stunden auf ein Vielfaches angestiegen war. Nach vierstündiger Inkubation zeigten sich ähnliche Konzentrationen in den Zellen wie nach 2 h.

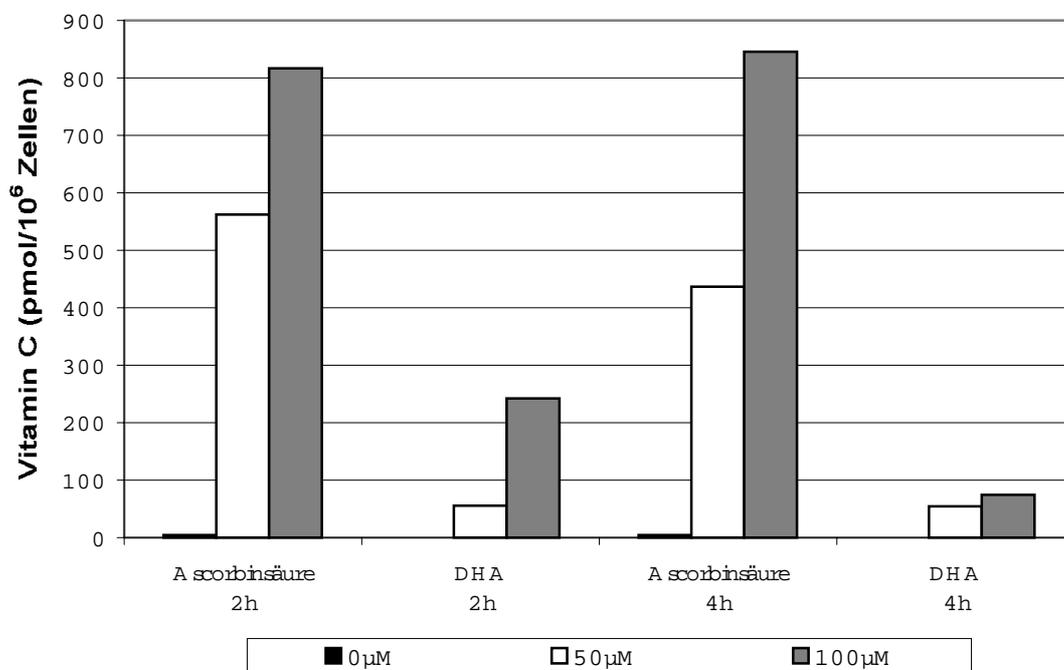


Abb.3.1 Gehalt an Ascorbinsäure und DHA im Zellysat von AS52 nach zwei- und vierstündiger Präinkubation mit 0, 50 und 100 μM Vitamin C (Messung mit HPLC).

3.1.1 Beeinflussung der DNA-Modifikationen durch Vitamin C *in vitro*

Zunächst wurde die Wirkung einer zweistündige Vorbehandlung von AS52-Zellen mit Vitamin C auf die Bildung von Einzelstrangbrüchen (ssb) und Fpg-sensitiven Läsionen untersucht. Hierbei zeigte sich im Konzentrationsbereich von 0 bis 1 mM kein Einfluß von Vitamin C auf den Untergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen (Abb. 3.2).

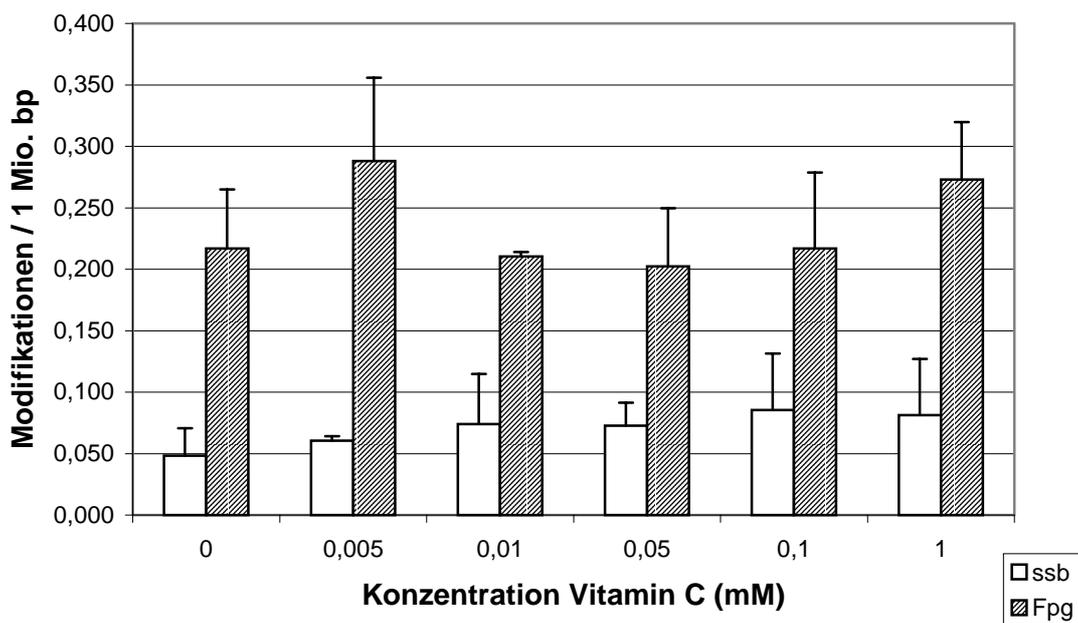


Abb. 3.2 Untergrundspiegel von Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Läsionen in AS52 nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen Vitamin C für 2 h, n = 3 für 0,005/0,01/1 mM, n = 5 für 0,05 mM und n = 13 für 0/0,1 mM Vitamin C.

Anschließend wurde untersucht, ob eine Präinkubation mit Vitamin C einen Einfluß auf die Suszeptibilität gegenüber einer zusätzlichen oxidativen DNA-Schädigung hat. Diese wurde durch verschiedene Bestrahlungsbehandlungen und einer damit einhergehenden Bildung von ROS induziert. Wie Abbildung 3.3 zeigt, waren beide Konzentrationen Vitamin C in der Lage, die durch sichtbares Licht induzierten Läsionen signifikant zu vermindern und so einen protektiven Effekt auszuüben.

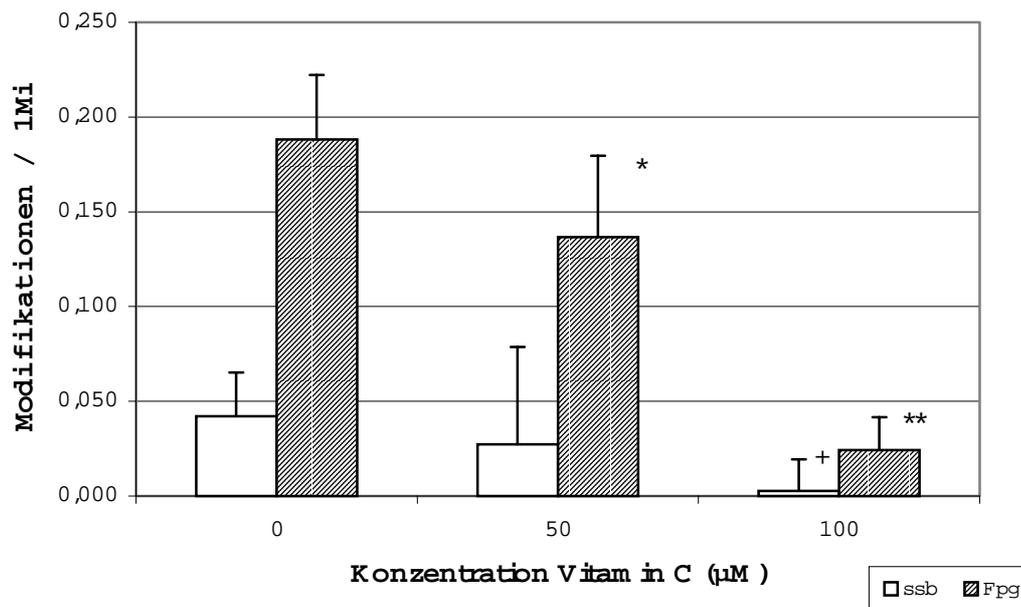


Abb. 3.3 Anzahl der induzierten Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitiven Läsionen in AS52 nach Präinkubation mit Vitamin C (0, 50, 100 µM) für 2 h und Schädigung mit sichtbarem Licht (1000 W, 33 cm, 20 min; 450 kJ/m²), n = 5, * p<5 %, + p<1 %, ** p<0,5 %. Die Zahl der Modifikationen in unbestrahlten Zellen (Untergrundspiegel, vgl. Abb. 3.2) wurden jeweils abgezogen.

Eine weitere Schädigung ist die Behandlung mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022, der in Gegenwart von Licht oxidative Schäden verursacht und dabei selbst in den eingesetzten Konzentrationen nicht zytotoxisch ist. Wie aus Abbildung 3.4 deutlich wird, ist Vitamin C in einer Konzentration von 50 µM nicht in der Lage, den durch den Photosensibilisator induzierten Schaden zu verhindern. Dies bedeutet, daß bei dieser Schädigung entweder ein grundsätzlich anderer Mechanismus als bei der mit sichtbarem Licht vorliegt (Abb. 3.3) oder daß möglicherweise die reaktiven Spezies im Falle von Ro 19-8022 räumlich so nah an der DNA gebildet werden, daß Vitamin C keinen protektiven Effekt ausüben kann.

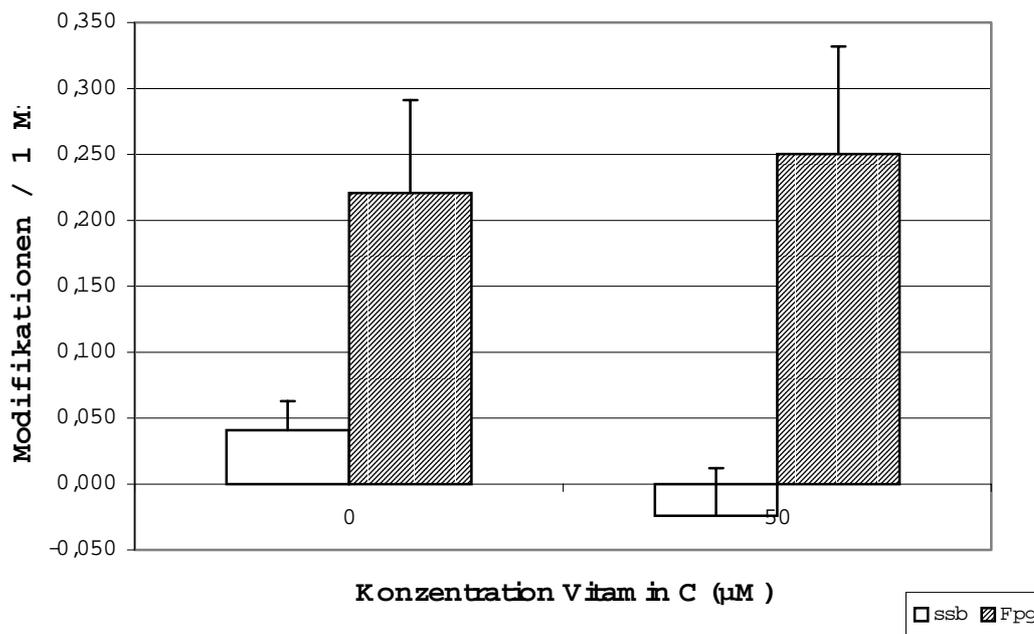


Abb. 3.4 Induzierte Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitiven Läsionen in AS52 nach Präinkubation mit Vitamin C (0, 50 µM) für 2 h und Schädigung mit 50 nM Ro 19-8022 und sichtbarem Licht (1000 W, 38 cm, 10 min; 166 kJ/m²), n = 4. Die Zahl der Modifikationen in unbestrahlten Zellen (Untergrundspiegel, vgl. Abb. 3.2) wurden jeweils abgezogen.

Als drittes DNA-schädigendes Agens wurde UVB-Strahlung verwendet und auch hier der Einfluß einer Vitamin C-Vorbehandlung untersucht. Dabei zeigte sich (Abb. 3.5) in Bezug auf die Fpg-sensitiven Läsionen ein leichte Tendenz der Schadenssenkung, während die Anzahl der Einzelstrangbrüche durch die Anwesenheit von Vitamin C eher anstieg.

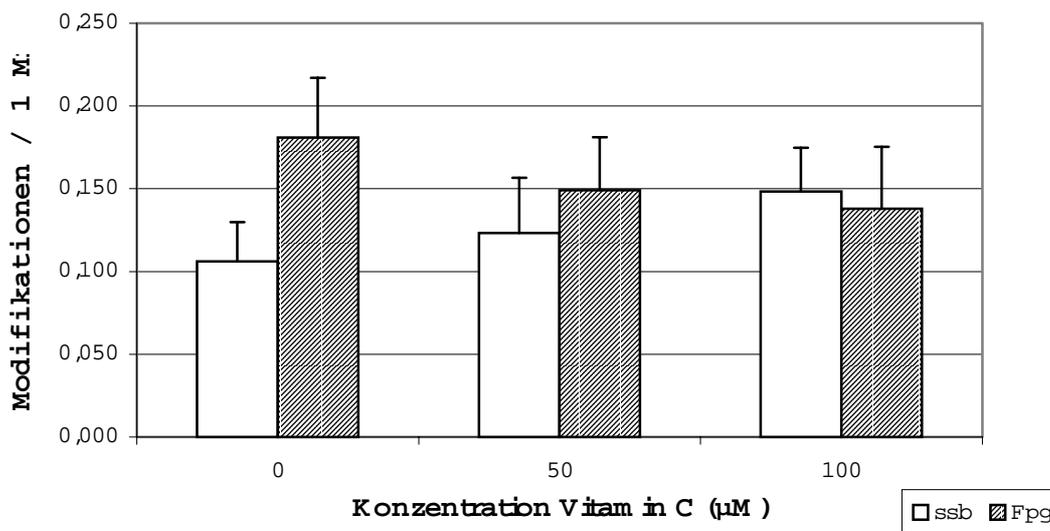


Abb. 3.5 Induktion von Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Läsionen in AS52 nach Präinkubation mit Vitamin C (0, 50, 100 µM) für 2 h und Schädigung mit UVB (50 cm, 14 min; 1,1 kJ/m²), n = 5. Die Zahl der Modifikationen in unbestrahlten Zellen (Untergrundspiegel, vgl. Abb. 3.2) wurden jeweils abgezogen.

Vitamin C führte also zu einer signifikanten Senkung der durch sichtbares Licht induzierten DNA-Schäden, während ein durch Ro 19-8022 oder UVB verursachter Schaden und auch der Schaden durch endogen gebildete ROS nicht beeinflusst wurde. Somit beruht die Induktion von oxidativen DNA-Schäden mit sichtbarem Licht auf einem Mechanismus, in den Vitamin C eingreifen konnte, während dies bei anderen Schädigungen, auch einer endogenen, nicht möglich war.

3.1.2 Beeinflussung der Mikrokernrate in AS52-Zellen durch Vitamin C

Als weiterer gentoxischer Endpunkt wurde unter den gleichen Schädigungsbedingungen wie in Kapitel 3.1.2 die Bildung von Mikrokernen in AS52-Zellen (s. Kapitel 2.2.8) und auch hier der Einfluß einer Vorbehandlung mit Vitamin C untersucht.

Zunächst wurden unbestrahlte Zellen bezüglich ihres Verhaltens gegenüber der Vorbehandlung mit Vitamin C betrachtet. Wie aus Abbildung 3.6 deutlich wird, liegen auch in völlig unbehandelten AS52-Zellen Mikrokern vor, deren Zahl durch eine Präinkubation mit Vitamin C, bei 100 µM signifikant, erhöht wird. Dies zeigte, daß Ascorbinsäure in Konzentrationen, bei denen keine Erhöhung der DNA-Modifikationen

erkennbar war, bereits zu einer signifikanten Erhöhung der spontanen Mikrokernrate führte und dieser Assay vermutlich sehr empfindlich für genotoxische Schädigungen ist.

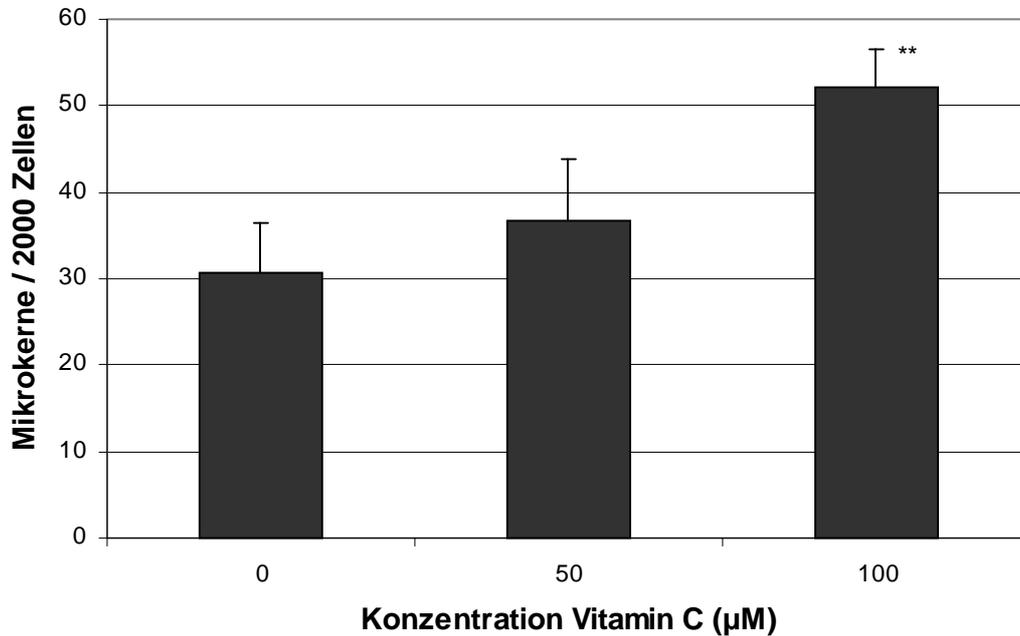


Abb. 3.6 Einfluß von Präinkubation mit Vitamin C (2 h; 0, 50, 100 µM) auf die Bildung von Mikrokernen in AS52, n = 9, ** p<0,5 %.

Anschließend wurde der Einfluß von sichtbarem Licht auf die Mikrokernrate in AS52 untersucht. In Abbildung 3.7 ist die dosisabhängige Bildung von Mikrokernen durch sichtbares Licht dargestellt. Bei einer Bestrahlungsdauer von 20 min (450 kJ/m^2) war eine signifikante Erhöhung der Mikrokernrate erkennbar, welche etwa der Erhöhung durch 100 µM Vitamin C allein entsprach. Dies zeigte, daß auch sichtbares Licht genotoxisch ist. Alle nachfolgenden Schädigungen mit sichtbarem Licht zur Untersuchung der Mikrokernrate wurden bei dieser Lichtdosis erhoben.

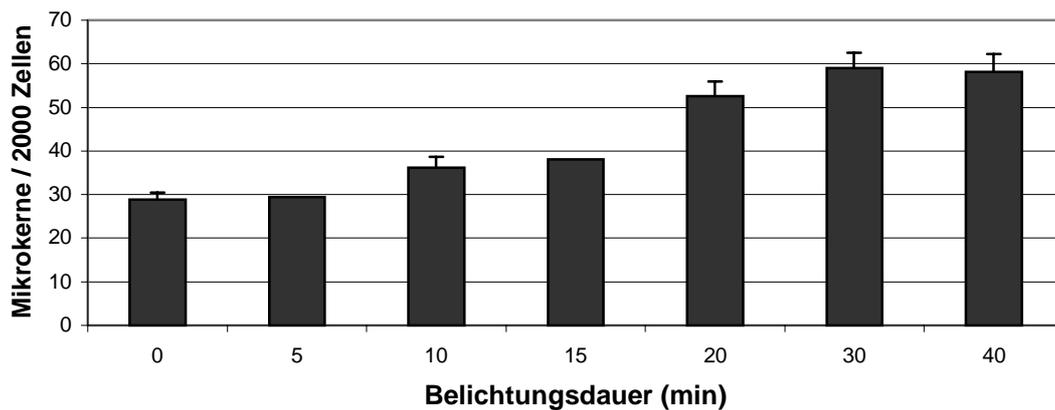


Abb. 3.7 Induktion von Mikrokernen in AS52 mit sichtbarem Licht in Abhängigkeit von der Belichtungszeit, $n = 1-4$.

Betrachtet man nun den Einfluß der Präinkubation mit Vitamin C auf die Bildung von Mikrokernen durch 450 kJ/m^2 sichtbares Licht (Abb. 3.8), so sind $50 \text{ }\mu\text{M}$ Vitamin C nicht in der Lage, die lichtinduzierte Mikrokernbildung zu verhindern. Bei einer Präinkubation mit $100 \text{ }\mu\text{M}$ Vitamin C ist die Mikrokernrate gegenüber dem Wert im Dunkeln unverändert. Das heißt, daß eine zusätzliche Mikrokernbildung durch Ascorbinsäure verhindert wurde.

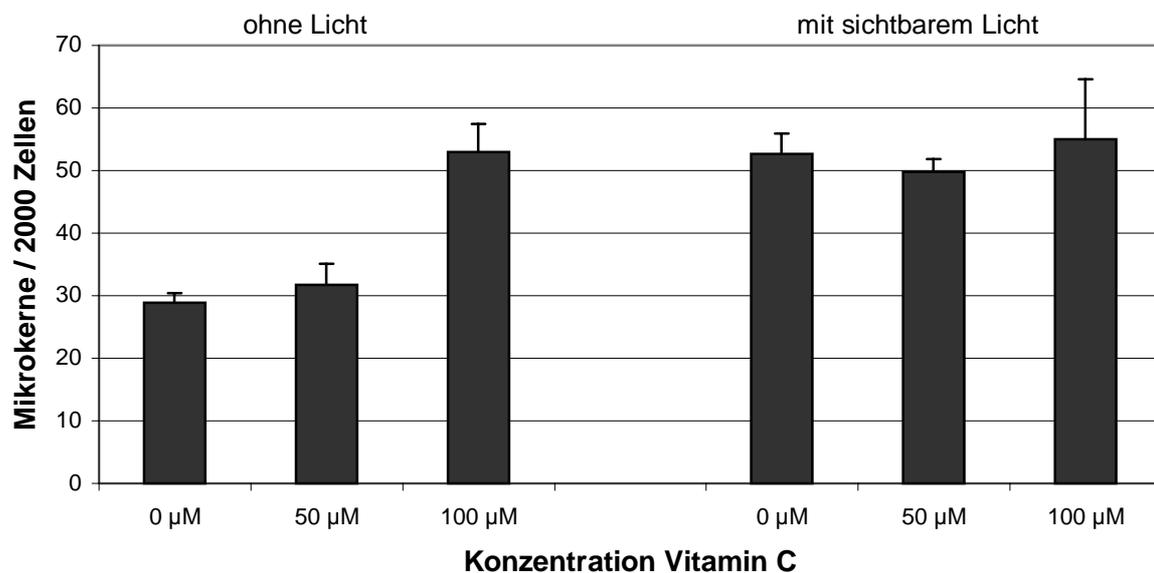


Abb.3.8 Einfluß von Präinkubation mit Vitamin C (2 h; 0, 50, 100 μM) auf die Induktion von Mikrokernen in AS52 durch sichtbares Licht (1000 W, 33 cm, 20 min, 450 kJ/m^2), $n = 3$.

Ebenso wie sichtbares Licht allein erhöhte eine Behandlung mit 50 nM Ro 19-8022 und Licht signifikant die Mikrokernrate in AS52-Zellen. Eine Vorbehandlung mit 50 μM Vitamin C bewirkte eine signifikante Senkung der Rate, während bei einer Konzentration von 100 μM keine Veränderung zu den durch Ro 19-8022 selbst induzierten Schaden auftrat. Dabei ist wieder zu berücksichtigen, daß bei dieser Vitamin C-Konzentration bereits ein sehr hoher Untergrund an Mikrokernen vorliegt (Abb. 3.9) und Vitamin C somit eine zusätzliche Mikrokernbildung durch Ro 19-8022 verhinderte.

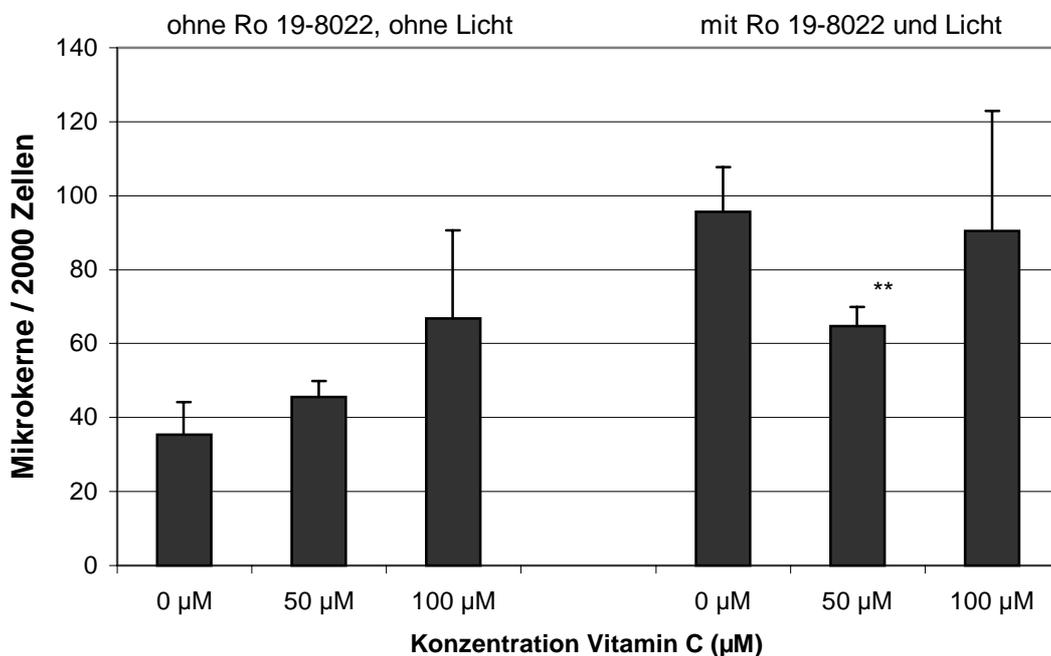


Abb. 3.9 Einfluß von Präinkubation mit Vitamin C (2 h, 0, 50, 100 μM) auf die Induktion von Mikrokernen in AS52 durch 50 nM Ro 19-8022 und sichtbares Licht (1000 W, 38 cm, 10 min, 166 kJ/m^2), $n = 3$, ** $p < 0,5 \%$.

Besonders interessant war die Mikrokernbildung durch UVB, da sich bei dieser Schädigung bereits bei der Untersuchung der DNA-Schäden eine starke Erhöhung der Einzelstrangbrüche, welche für die Bildung von Mikrokernen verantwortlich gemacht wird, in AS52-Zellen zeigte (Abb. 3.5). Wie die Belichtungsreihe aus Abbildung 3.10 zeigt, war die Mikrokernrate durch UVB-Strahlung ebenfalls dosisabhängig und erreichte ihr Maximum bei einer Bestrahlungsdauer von 14 min. Bereits ab einer Belichtungszeit von 7 min lag die Mikrokernrate deutlich über dem Untergrund. Trotz

der hohen Anzahl an Einzelstrangbrüchen war die Mikrokernbildung aber nicht höher als bei anderen Schädigungen, was daraufhin deutet, daß es den vermuteten, direkten Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern nicht gibt.

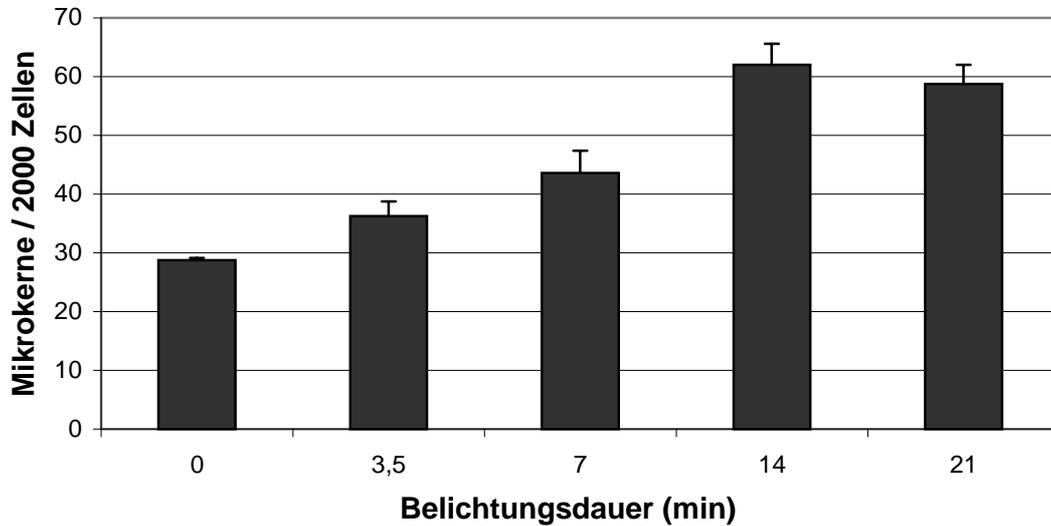


Abb. 3.10 Dosisabhängigkeit der Induktion von Mikrokernen in AS52 durch UVB (Abstand 50 cm, Dosen: 0, 275, 550, 1100, 1650 J/m²), n = 4 (bei 275 J/m²: n = 2).

Anschließend wurde die Beeinflußbarkeit der UVB-vermittelten (Dosis 1,1 kJ/m²) Mikrokernrate durch Vitamin C-Präinkubation bestimmt. Sowohl 50 als auch 100 µM Vitamin C zeigten eine signifikante Hemmung der Schadensinduktion, wobei die Rate bei 100 µM auf das Untergrundniveau zurückging (Abb. 3.11), was sich ebenfalls nicht in der Anzahl der gemessenen Einzelstrangbrüche widerspiegelte (Abb. 3.5).

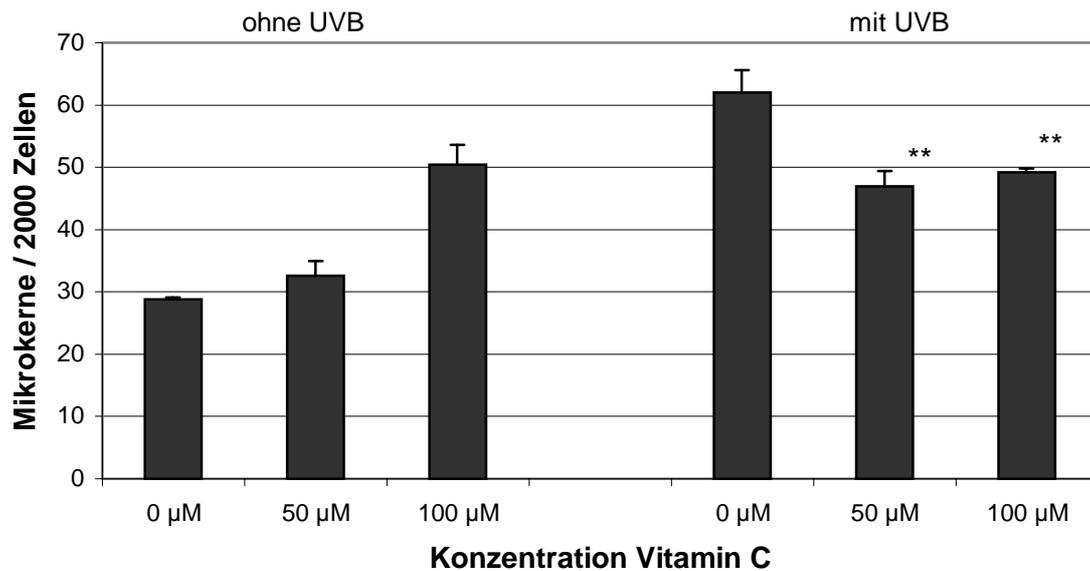


Abb. 3.11 Einfluß von Präinkubation mit Vitamin C (2 h, 0, 50, 100 µM) auf die Induktion von Mikrokernen in AS52 durch UVB (50 cm, 14 min, 1,1 kJ/m²), n = 3, ** p<0,5 %.

3.1.3 Einfluß von Vitamin C auf die Zytotoxizität in AS52-Zellen

Durch Messung der „Cloning efficiency“ (Kapitel 2.2.7) wurde die Toxizität der in Kapitel 3.1.1 und 3.1.2 angewendeten Schädigungen bestimmt, um den Vitalitätszustand der Zellen während der Behandlung zu erfassen und um mögliche protektive Effekte der Vitamin C-Vorbehandlung gegenüber toxischen Folgen der Schädigungen zu erkennen.

Wie in Abbildung 3.12 zu erkennen ist, hatte die Behandlung mit 50 und 100 µM Vitamin C keinerlei Einfluß auf die Lebensfähigkeit der AS52-Zellen und war unter diesem Aspekt unschädlich.

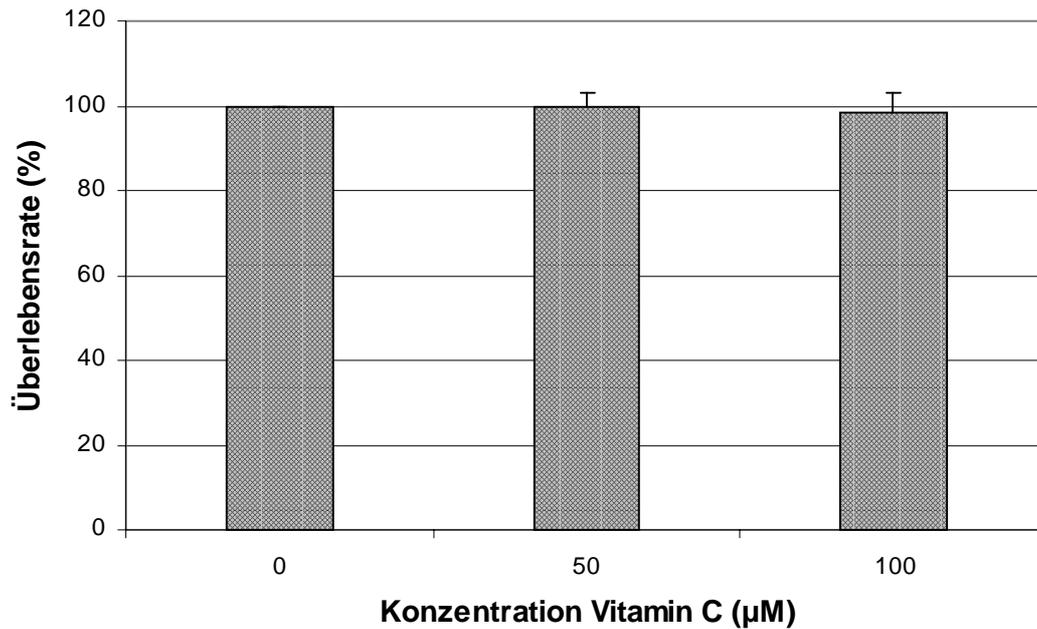


Abb. 3.12 Einfluß von Vitamin C auf die Überlebensrate von AS52, n = 10

Die Belichtung mit sichtbarem Licht zeigte über den gesamten Dosisbereich ebenfalls keine Beeinträchtigung der Überlebensrate (Abb. 3.13). Selbst bei einer Lichtdosis von 900 kJ/m^2 , also einer doppelt so hohen Dosis wie sie für die Induktion von DNA-Schäden und Mikrokernen eingesetzt wurde, war keine Toxizität erkennbar. Die Untersuchung des Einflusses von Vitamin C auf die Toxizität von sichtbarem Licht erübrigte sich daher.

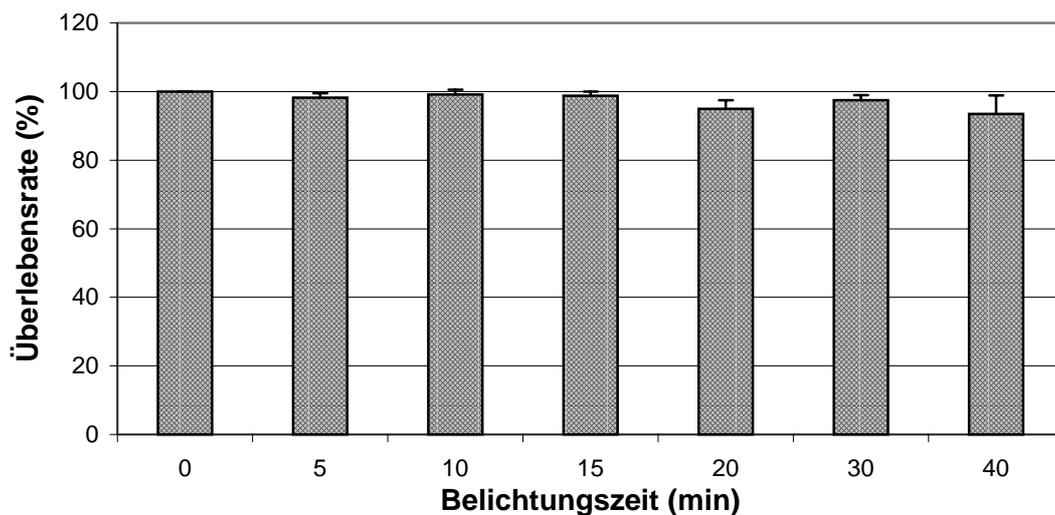


Abb. 3.13 Dosisabhängigkeit der Toxizität von sichtbarem Licht in AS52 (Dosen von 0, 112.5, 225, 337.5, 450, 675, 900 kJ/m^2 entsprechend 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 min Belichtung), n = 2-4.

Der Photosensibilisator Ro 19-8022 war im Dunkeln (Abb. 3.14) und in der unter 3.1.1 und 3.1.2 eingesetzten Konzentration von 50 nM nicht zytotoxisch (Daten nicht gezeigt). Ab einer Konzentration von 300 nM und Licht zeigte er einen deutlich senkenden Einfluß auf die Überlebensrate. Deshalb wurde diese Konzentration (300 nM) eingesetzt, um den Einfluß von Vitamin C auf die Toxizität des Photosensibilisators Ro 19-8022 zu untersuchen.

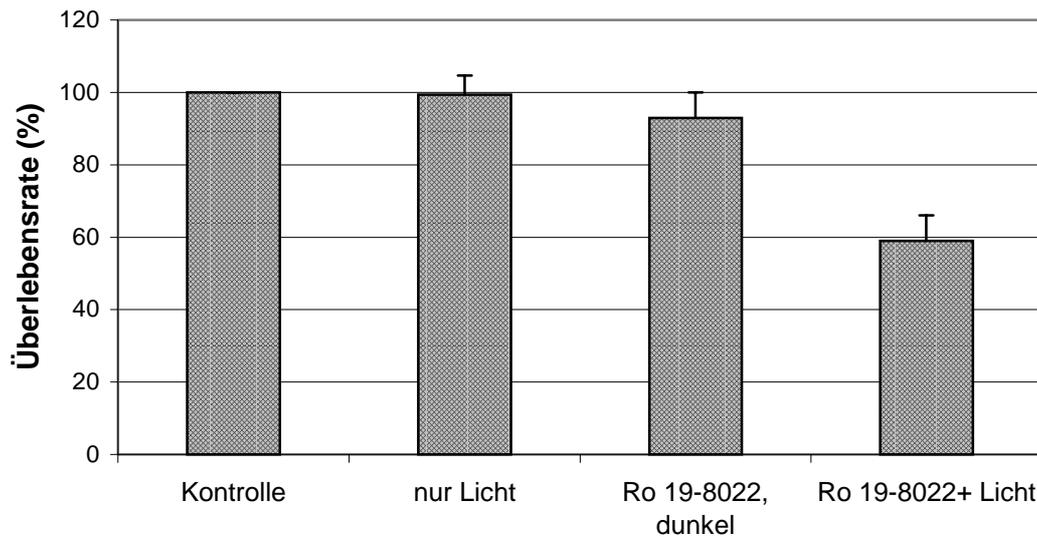


Abb. 3.14 Einfluß der Behandlung mit 300 nM Ro 19-8022 auf die Überlebensrate in AS52, n = 4-7

Das Ergebnis (Abb. 3.15) zeigte, daß eine Präinkubation sowohl mit 50 μ M als auch mit 100 μ M Vitamin C die Überlebensrate signifikant erhöhte und somit protektiv wirkte.

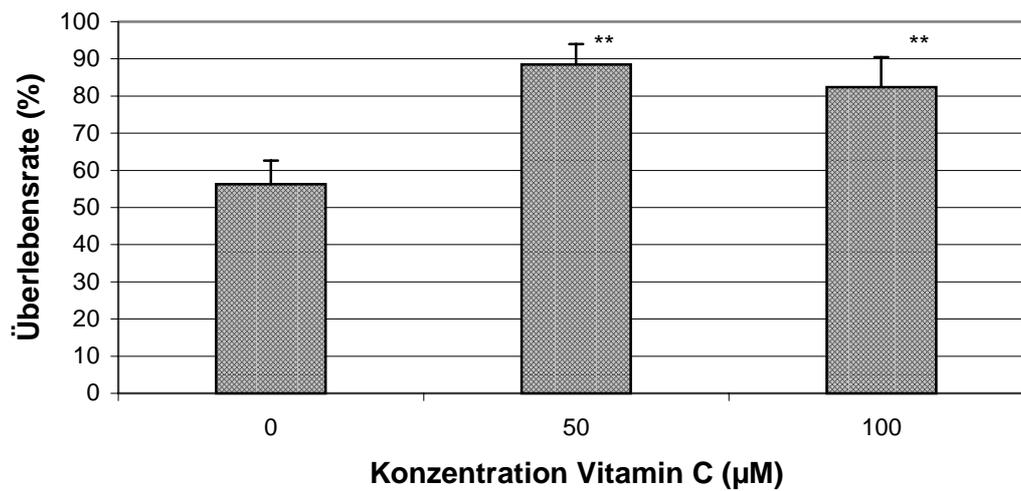


Abb. 3.15 Einfluß von Vitamin C auf die Überlebensrate von AS52 nach Schädigung mit 300 nM Ro 19-8022 (1000 W, 38 cm, 10 min), n = 5, ** p<0,5 %.

Die Schädigung mit UVB war für AS52-Zellen sehr toxisch. Wie Abbildung 3.16 zeigt, senkten bereits Dosen von 550 J/m² die Überlebensrate um über 40 %. Bei noch höheren Dosen, also auch bei den in Kapitel 3.1.1 und 3.1.2 angewendeten Schädigungsbedingungen, sank die Überlebensrate sogar auf unter 20 %.

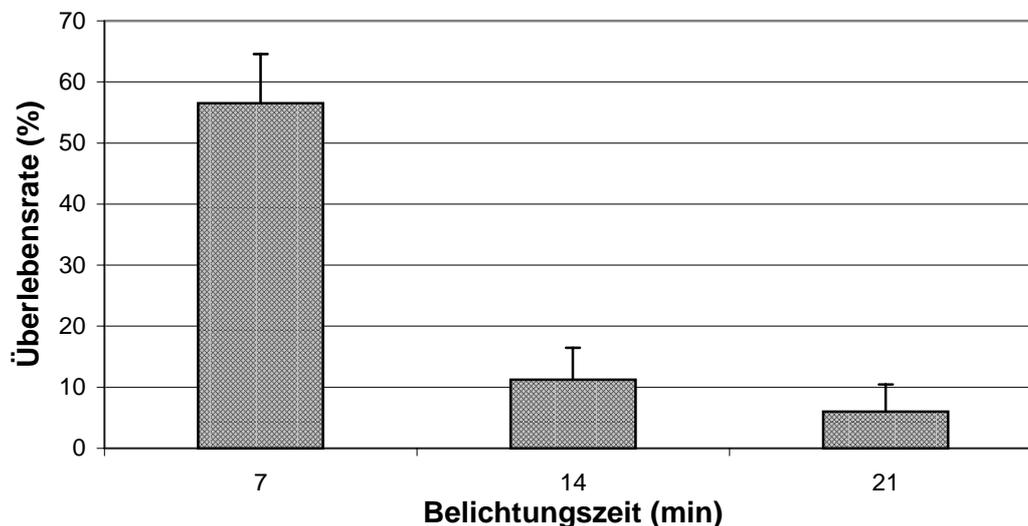


Abb. 3.16 Dosisabhängigkeit der Toxizität von UVB in AS52 (Dosen von 0,55/1,1/1,65 kJ/m² entsprechend 7, 14, 21 min Belichtungszeit); n = 8.

Eine Präinkubation mit 50 µM Vitamin C zeigte bei einer Belichtungszeit von 7 min noch einen protektiven Effekt, der bei einer Konzentration von 100 µM nicht

mehr ganz so deutlich sichtbar war. Bei längeren Bestrahlungszeiten sank die Überlebensrate so stark, daß nur noch ein leicht protektiver Effekt durch 100 μM Vitamin C und einer Dosis von 1,1 kJ/m^2 feststellbar war (Abb. 3.17).

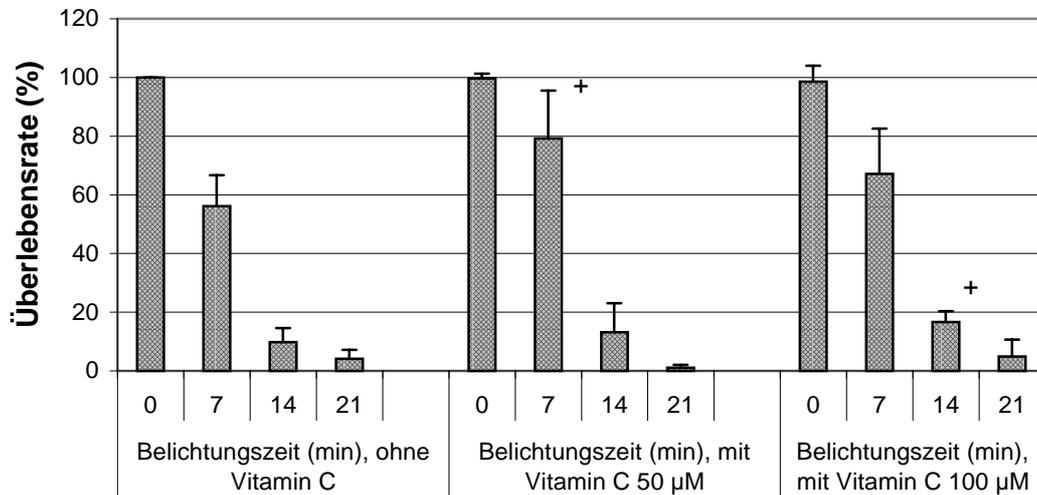


Abb. 3.17 Einfluß von Vitamin C (50 oder 100 μM) auf die Überlebensrate nach unterschiedlichen Dosen (0,55/1,1/1,65 kJ/m^2 ; entsprechend 7/14/21 min Bestrahlungszeit) UVB-Schädigung, n = 5, + p < 2,5 %.

3.2 Einfluß von Vitamin C auf Lymphozyten *in vivo*

Um den Einfluß von Ascorbinsäure auch im Organismus zu untersuchen, wurde an freiwilligen, gesunden Probanden eine Studie durchgeführt und dafür der akute Effekt von 1 g Vitamin C auf den DNA-Schaden in peripheren Lymphozyten erhoben. Dazu wurde an verschiedenen Tagen insgesamt acht verschiedenen Personen mehrfach Blut abgenommen und die Untergrundspiegel oxidativer DNA-Schaden in den Lymphozyten bestimmt. Anschließend wurde 1 g Vitamin C oral aufgenommen und zwei Stunden später erneut Blutproben genommen und analog untersucht. Es wurde der DNA-Schaden sowohl in frisch isolierten als auch in kryokonservierten Zellen untersucht. Außerdem wurde ein Teil der Blutproben mit Katalase versetzt und mit nicht Katalase-behandelten Proben verglichen.

In einem Teil der Blutproben wurde im direkt nach der Blutentnahme gewonnenem Serum mittels HPLC der Vitamin C-Gehalt (s. Kapitel 2.2.4.4) bestimmt. Abbildung 3.18 zeigt den deutlichen Anstieg der Serumspiegel 2 h nach der oralen Einnahme von 1 g Vitamin C.

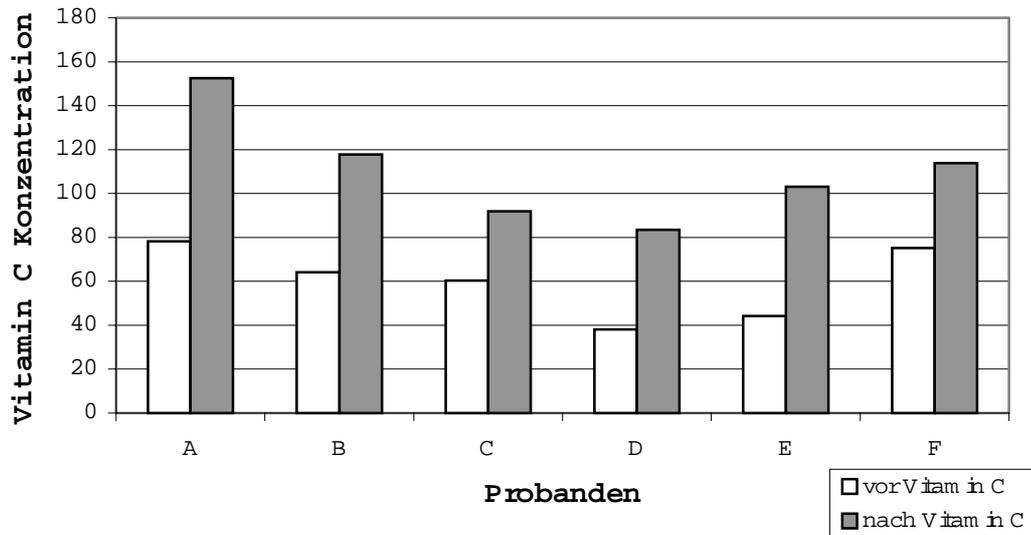


Abb. 3.18 HPLC-Messung der Vitamin C-Konzentrationen im Serum vor und nach Aufnahme von 1 g Vitamin C am Beispiel von sechs Blutproben bei verschiedenen Probanden.

3.2.1 Beeinflussung der oxidativen DNA-Modifikationen in Lymphozyten durch orale Vitamin C-Gabe

In Abbildung 3.19 sind die DNA-Modifikationen vor und nach oraler Gabe von Vitamin C gegenübergestellt. Dabei handelte es sich um Proben, die mit Katalasezusatz und direkt nach der Isolierung vermessen wurden. Es zeigte sich eine leichte, nicht signifikante Senkung der Fpg-sensitiven Läsionen, während der Spiegel der Einzelstrangbrüche (ssb) nicht beeinflusst wurden.

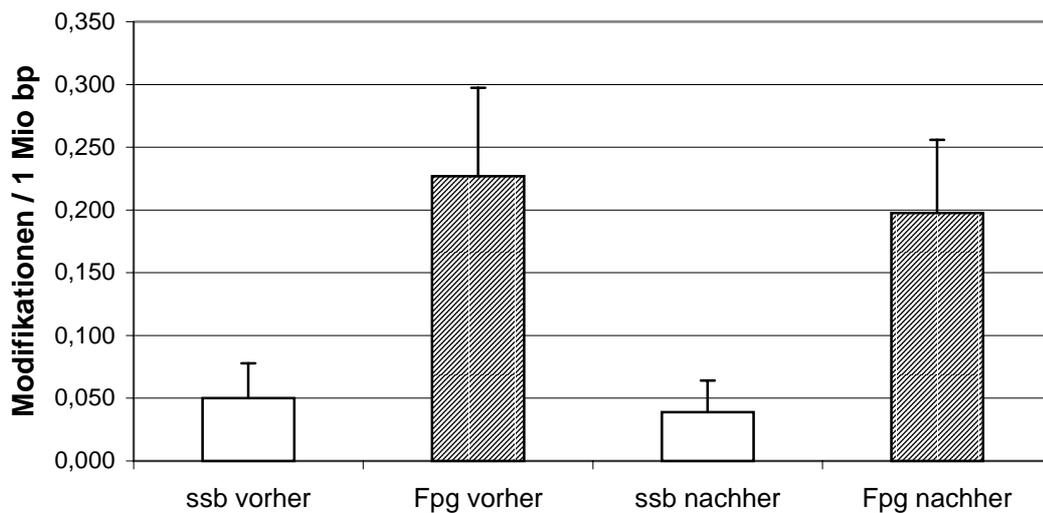


Abb. 3.19 Untergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden frisch isolierter, humaner Lymphozyten mit Katalasezusatz; jeweils vor und nach Supplementation mit Vitamin C, n = 21.

Wie bereits beschrieben wurde ein Teil der Proben auch tiefgefroren und erst später auf den DNA-Schaden hin analysiert. Abbildung 3.20 zeigt nun die Gegenüberstellung dieser Proben vor und nach Vitamin C-Aufnahme. Es fanden sich hier ähnliche Spiegel an Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Läsionen wie bei den direkt vermessenen Proben und auch eine leichte Abnahme der Fpg-sensitiven Modifikationen bei der zweiten Probennahme war erkennbar.

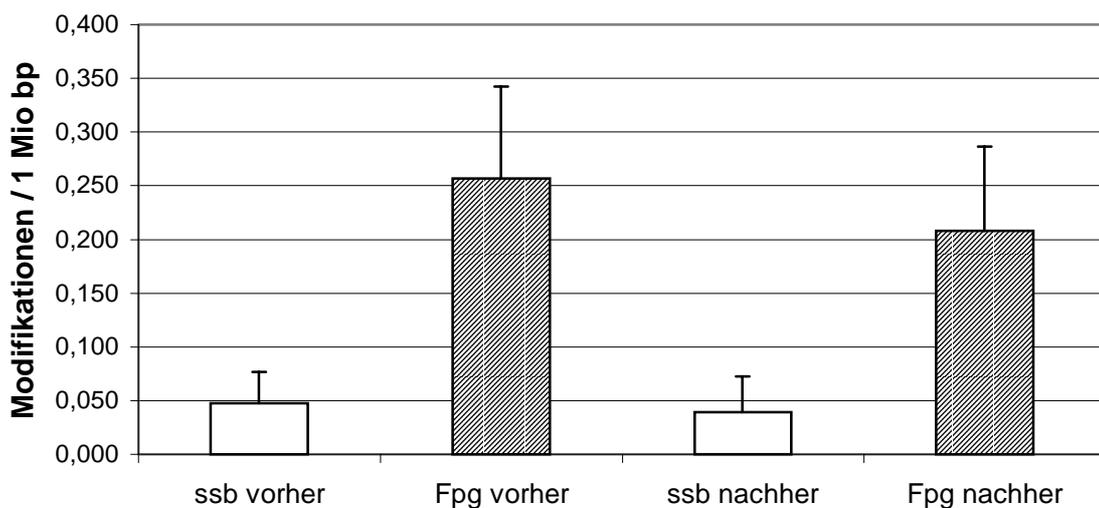


Abb. 3.20 Einfluß von Vitamin C auf die DNA-Modifikationen in humanen Lymphozyten mit Katalasezusatz, tiefgefrorene Proben; n = 13.

3.2.2 Inter- und intraindividuelle Schwankungen der Modifikationen

Vergleicht man nun die Meßwerte einzelner Personen, so fällt auf, daß die Grundspiegel an Fpg-sensitiven Modifikationen sowohl zwischen den Individuen als auch in einem Individuum abhängig vom Tag der Probennahme sehr schwanken können (Abb. 3.21). Dabei fiel besonders die Blutabnahme vom 10.12.1998 auf, bei der sich auffällig hohe Werte für Fpg-sensitive Läsionen fanden. Da dieser Effekt bei allen Probanden zu beobachten war, kann ein experimenteller Fehler vermutet werden.

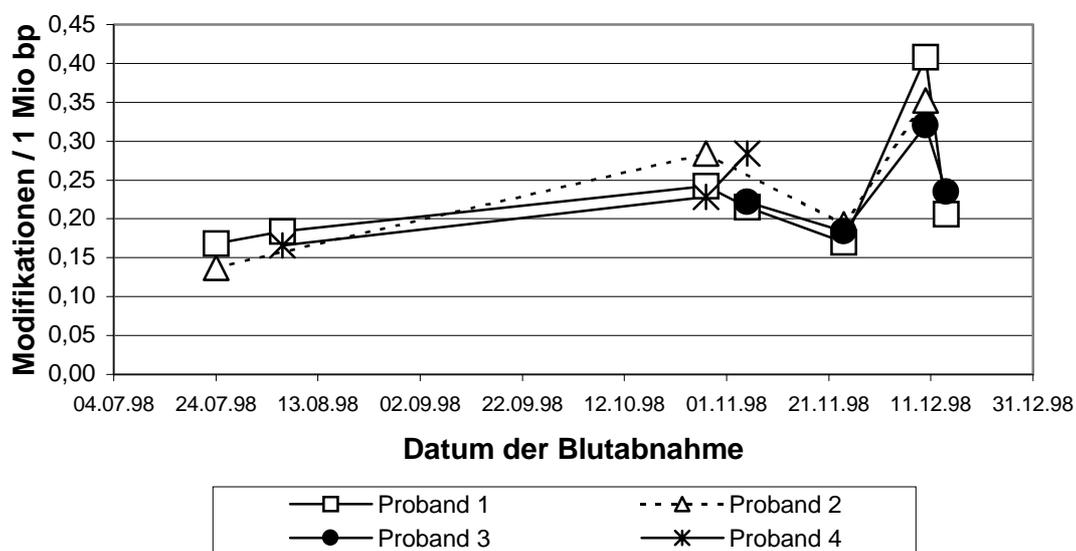


Abb. 3.21 Inter- und intraindividuelle Schwankungen der Fpg-sensitiven Modifikationen bei vier Probanden, Proben ohne Vitaminvorbehandlung.

3.2.3 Einfluß von Katalasezusatz bei der Blutabnahme auf die Bildung von Modifikationen

Da das Enzym Katalase Reaktionen verhindern kann, bei denen reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden (siehe Kapitel 1.2 und 1.5.1.1; und hier besonders die Autoxidation von Ascorbinsäure), wurden einige Blutproben mit Katalase versetzt und mit katalasefreien verglichen. Durch einen Katalasezusatz sollten also Reaktionen ausgeschlossen werden, die möglicherweise als *ex vivo*-Schädigung während der Blutaufarbeitung stattfinden könnten. Aus Abbildung 3.22 ist ersichtlich, daß mit Katalase (315 U/ml) versetzte Proben einen niedrigeren Spiegel an Fpg-sensitiven Modifikationen aufwiesen. Der Unterschied wurde vor allem bei den Proben vor der

Vitamin C-Einnahme deutlich. In Bezug auf die Einzelstrangbrüche war kein Effekt durch Katalase feststellbar. Dies zeigte, daß ein Katalasezusatz zwar offensichtlich nicht immer notwendig war, aber doch einen schützenden Effekt vor einer *ex-vivo*-Schädigung haben konnte. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde bei allen nachfolgenden Experimenten und bei den Studien zu EPA und Ethanol den Blutproben routinemäßig Katalase zugesetzt.

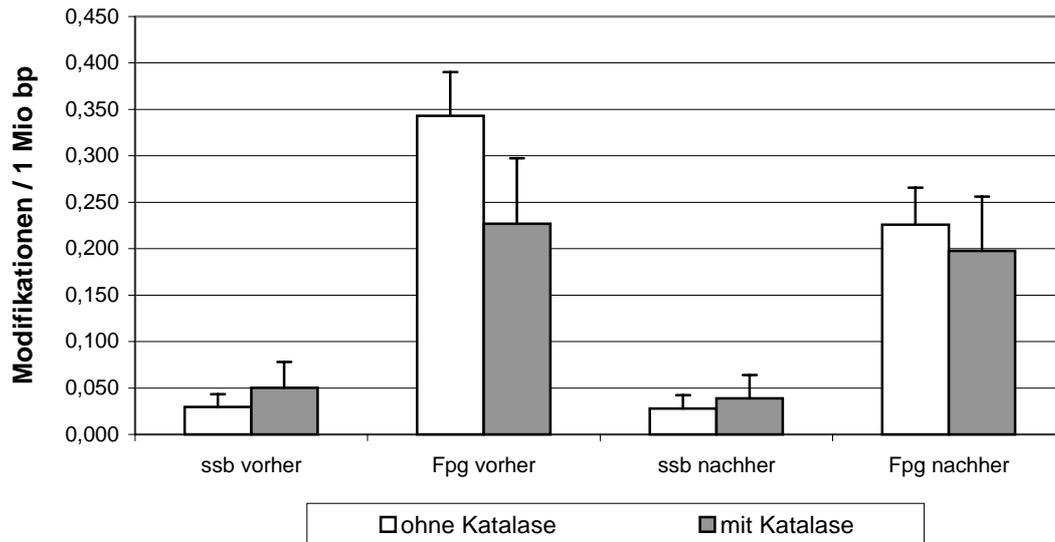


Abb. 3.22 Vergleich von frischen, humanen Lymphozyten vor und nach Einnahme von 1 g Vitamin C, mit und ohne Katalasezusatz; ohne Katalase: n = 9, mit Katalase: n = 21.

Die Untersuchung der tiefgefrorenen Lymphozyten unter dem Aspekt des Katalasezusatzes (Abb. 3.23) zeigte keinen Unterschied zwischen vorbehandelten und nicht vorbehandelten Proben. Allerdings war die Probenzahl ohne Katalasezusatz sehr gering und es könnte sich auch um ein zufälliges Ergebnis handeln.

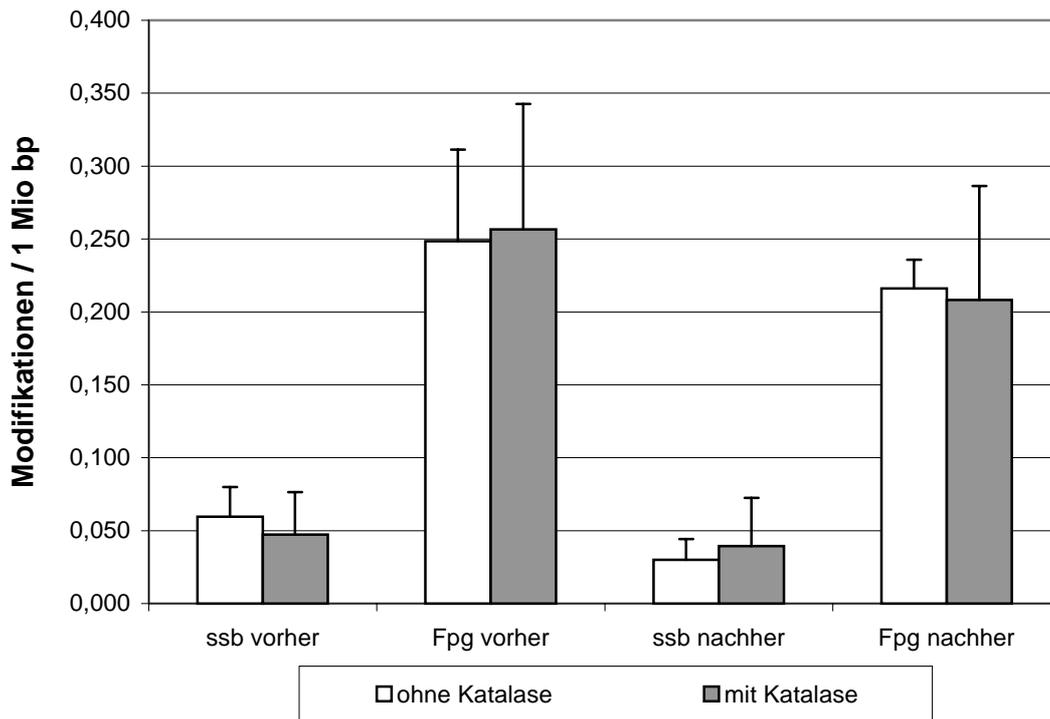


Abb. 3.23 Vergleich tiefgefroreener, humaner Lymphozyten mit und ohne Katalasezusatz; ohne Katalase: n = 2, mit Katalase: n = 13.

3.2.4 Einfluß der Kryokonservierung auf die Bildung von Modifikationen

Um für die nachfolgenden Studien sicherzustellen, ob die von Patienten und Probanden gewonnenen Lymphozyten in tiefgefrorenem Zustand ohne Erhöhung des DNA-Schadens gelagert werden können, wurden Vergleichsmessungen der beiden Probenbehandlungen durchgeführt. Aus Abbildung 3.24 wird deutlich, daß sich weder die Einzelstrangbrüche noch die Fpg-sensitiven Modifikationen durch den Einfriervorgang weder vor noch nach der oralen Vitamin C-Aufnahme verändern.

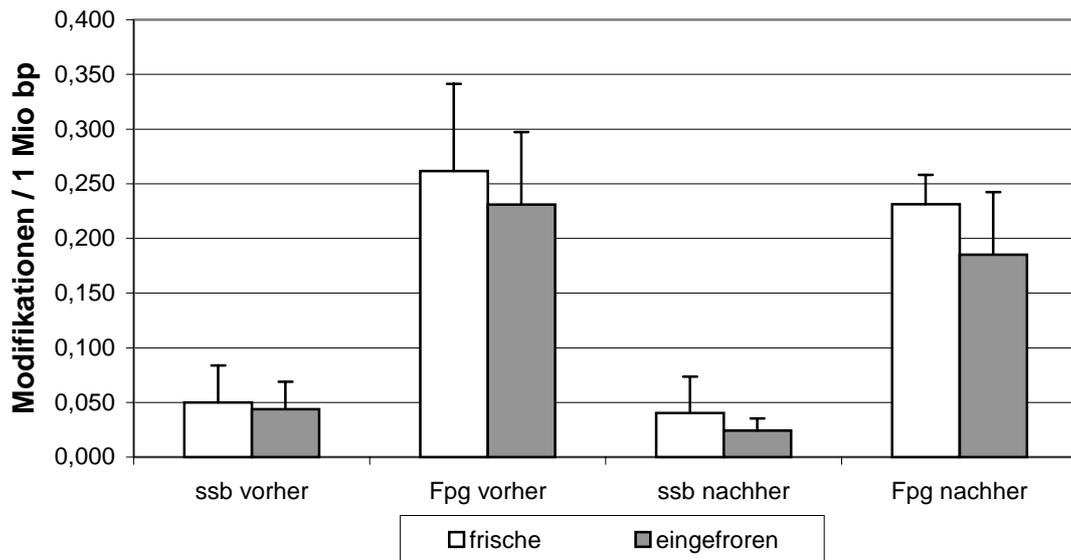


Abb. 3.24 Einfluß von Kryokonservierung auf den DNA-Schaden. Vergleich frische und tiefgefrorene humane Lymphozyten, vor und nach Vitamin C-Gabe, n = 12.

Wird in allen Untersuchungen zur oralen Vitamin C-Aufnahme der Ausgangswert, also die Messung vor Aufnahme von Vitamin C, gleich 100 % und die Bestimmung 2 h nach der Aufnahme dazu ins Verhältnis gesetzt, so ergab sich insgesamt eine nicht signifikante Senkung der Fpg-sensitiven Modifikationen auf 80 % des Ausgangswertes. Dies traf sowohl für die direkt analysierten als auch für die gefroren gelagerten Proben zu (Abb. 3.25). Die absoluten Werte gehen aus den Abbildung 3.24 hervor.

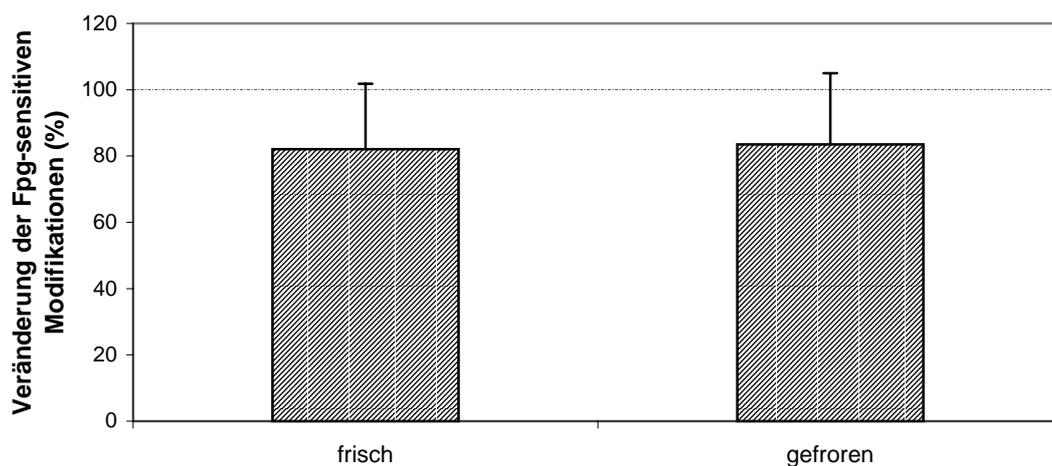


Abb. 3.25 Veränderung der Fpg-sensitiven Modifikationen nach Vitamin C-Aufnahme in Prozent, 100 % entspricht dem Wert vor Vitamin C-Einnahme, n = 30 (frisch) und n = 15 (gefroren).

3.3 Einfluß von Vitamin C auf Lymphozyten *in vitro*

Um den direkten Effekt von Vitamin C auf humane Lymphozyten unter Ausschluß von Einflüssen des Organismus zu untersuchen, wurden humane Lymphozyten mit verschiedenen Konzentrationen Vitamin C im Medium für 2 h *ex vivo* unter Zellkulturbedingungen kultiviert. Dabei stieg mit zunehmender Ascorbinsäurekonzentration die Anzahl der Einzelstrangbrüche stark an, während die Fpg-sensitive Läsionen unverändert blieben. Bei einer Konzentration von 1 mM traten ebenso viele Einzelstrangbrüche wie Fpg-sensitive Modifikationen auf (Abb. 3.26). Das zeigt, daß Vitamin C im Konzentrationsbereich bis 1 mM auch in Lymphozyten unter Zellkulturbedingungen keinen Einfluß auf den Untergrund der Fpg-sensitiven Schäden hatte, was bereits für AS52-Zellen gezeigt wurde (siehe Abb. 3.2). Allerdings zeigte sich im Gegensatz zu den AS52-Zellen in den Lymphozyten eine deutliche Erhöhung der Einzelstrangbrüche bereits bei Konzentrationen von 500 μM .

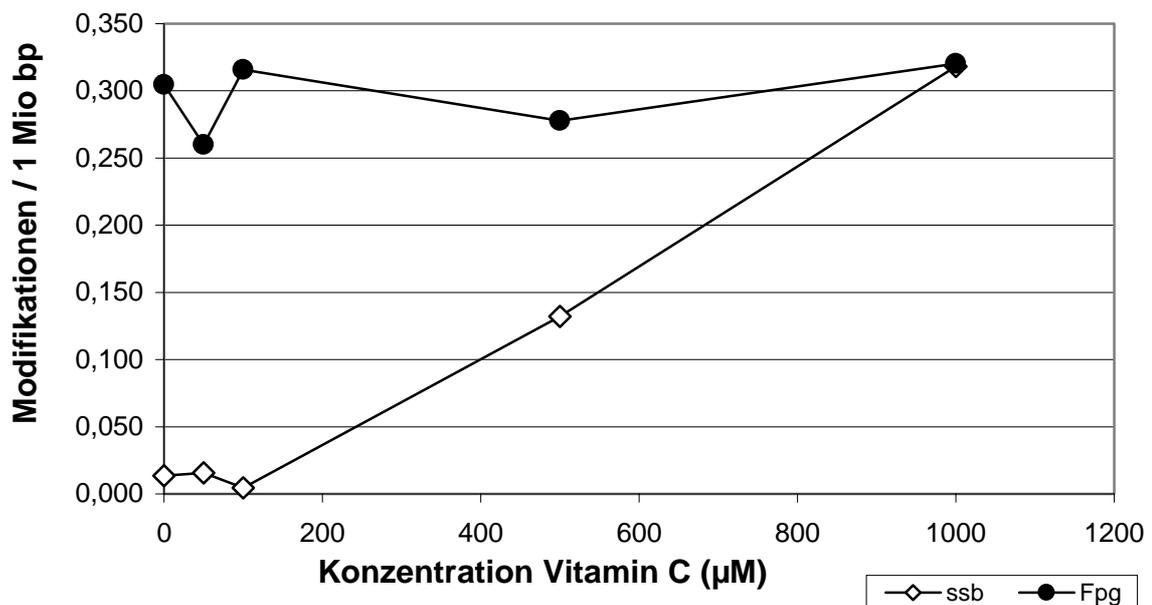


Abb. 3.26 Einfluß einer zweistündigen *in vitro*-Inkubation mit Vitamin C auf oxidative DNA-Modifikationen in humanen Lymphozyten, n = 1.

3.4 Einfluß von MMPDCD in AS52

Als weitere Substanz wurde nach Vitamin C das Carbazolderivat MMPDCD (siehe Kapitel 1.5.1.2) auf oxidative DNA-Schäden, Mikrokerninduktion und Toxizität in AS52 getestet. Die Verbindung wurde im Arbeitskreis von Prof. U. Pindur am Institut für Pharmazie der Universität Mainz synthetisiert und zeigte in Vorversuchen antioxidative Eigenschaften. Im folgenden sind der Einfluß von MMPDCD auf oxidative DNA-Schäden im Untergrund und nach Induktion mit sichtbarem Licht und mit dem Photosensibilisator Ro 198022 beschrieben.

3.4.1 Beeinflussung von DNA-Modifikationen durch MMPDCD

MMPDCD wurde in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 1000 nM zur Präinkubation in AS52-Zellen für eine Stunde eingesetzt und direkt anschließend der oxidative DNA-Schaden bestimmt. Dabei fanden sich im Untergrundspiegel ein leichter Rückgang der Fpg-sensitiven Modifikationen und ein leichter Anstieg der Einzelstrangbrüche mit zunehmender Konzentration an MMPDCD (Abb. 3.27). Somit konnte MMPDCD in Abhängigkeit von der Konzentration einen Teil des oxidativen Schadens, nämlich die Fpg-sensitiven Läsionen, verhindern, während ein anderer Teil, die Einzelstrangbrüche, anstiegen.

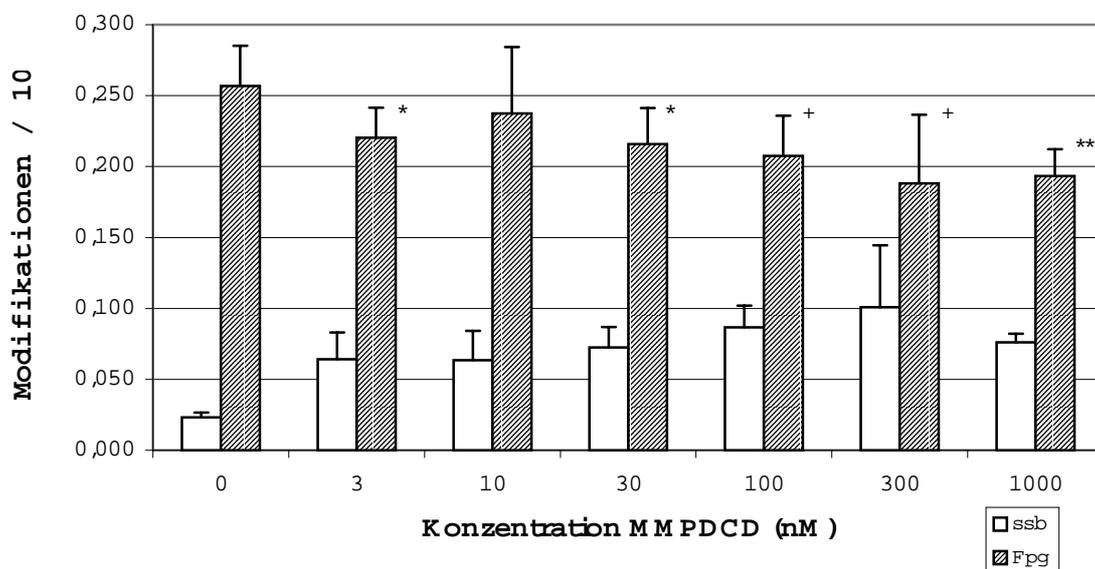


Abb. 3.27 Einfluß von MMPDCD auf den Untergrund an oxidativen DNA-Schäden in AS52. Präinkubation mit MMPDCD für 1 h; n = 3; * p<5 %, + p<2,5 %, ** p<0,5 %.

Anschließend wurde die Empfindlichkeit der mit MMPDCD vorinkubierten AS52-Zellen gegenüber sichtbarem Licht bestimmt, wobei die Substanz während der Schädigung nicht anwesend war. Als Bezugsgröße für den Untergrund wurde hier wie auch in allen folgenden Untersuchungen zu MMPDCD eine völlig unbehandelte Kontrolle verwendet. Wie aus Abb. 3.28 hervorgeht, beeinträchtigte die Präinkubation mit MMPDCD nicht die Spiegel der induzierten oxidativen Schäden mit Ausnahme von signifikant erhöhten Einzelstrangbrüchen bei Konzentration von 300 und 1000 nM und einer nicht signifikanten Senkung der Fpg-sensitiven Läsionen bei 100 nM.

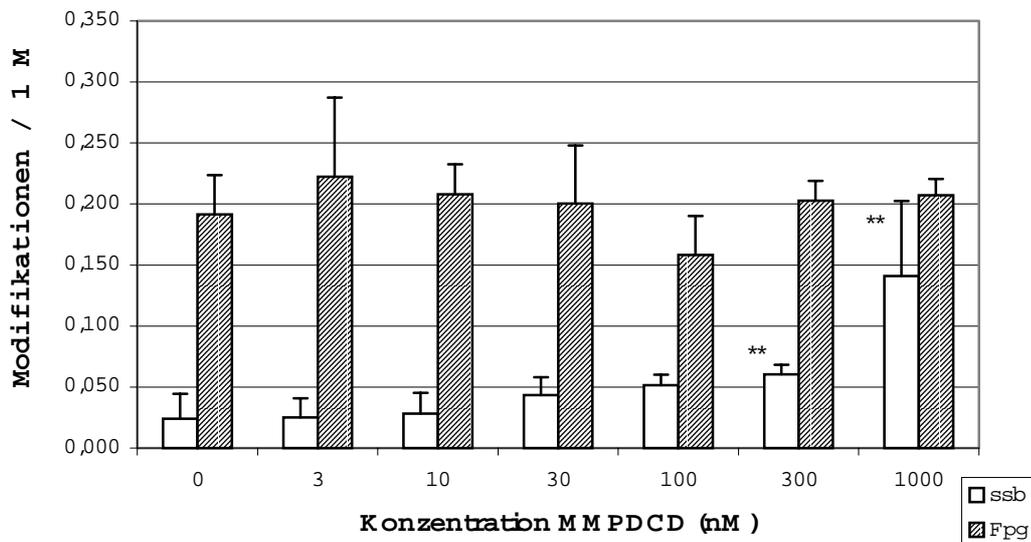


Abb. 3.28 Einfluß der Präinkubation mit MMPDCD in AS52 für 1 h auf die Schadensinduktion mit sichtbarem Licht (1000 W, 33 cm, 20 min). MMPDCD ist nicht anwesend während der Bestrahlung; der Untergrundspiegel von unbestrahlten und nicht präinkubierten Zellen wurde in allen Fällen abgezogen, n = 5; ** p < 0,05 %.

In Abbildung 3.29 sind die Ergebnisse der Suszeptibilitätsuntersuchung gegenüber sichtbarem Licht für den Fall gezeigt, daß MMPDCD während der Bestrahlung anwesend ist. MMPDCD konnte hier in Konzentrationen ab 100 nM die Bildung von Fpg-sensitiven Modifikationen verhindern. Allerdings nahm unter den gleichen Bedingungen auch die Anzahl der Einzelstrangbrüche zu.

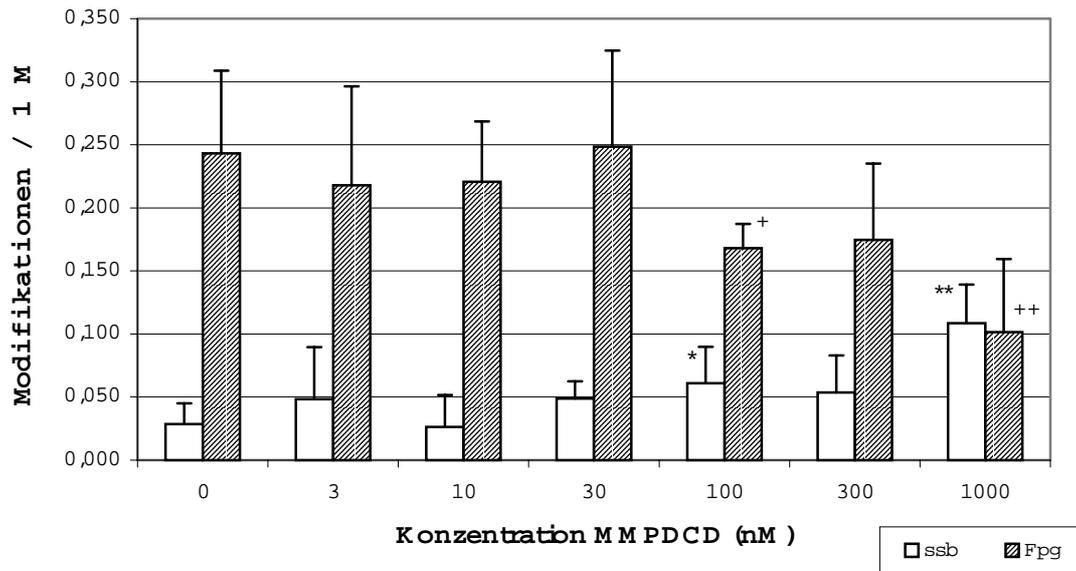


Abb. 3.29 Einfluß der Präinkubation mit MMPDCD in AS52 für 1 h auf die Schadensinduktion mit sichtbarem Licht (1000 W, 33 cm, 20 min; 450 kJ/m²). MMPDCD ist während der Bestrahlung anwesend; der Untergrundspiegel von unbestrahlten und nicht präinkubierten Zellen wurde in allen Fällen abgezogen, n = 5; * p<5 %, + p<2,5 %, ++ p<1 %, ** p<0,5 %.

Anschließend wurde der Einfluß von MMPDCD auf eine Schadensinduktion mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022 untersucht. Dabei konnte der oxidative Schaden in AS52 durch Präinkubation und gleichzeitige Anwesenheit der Substanz bei der Schädigung teilweise verhindert werden (Abb. 3.30). Bei allen Konzentrationen war der Fpg-sensitive Schaden erniedrigt, wobei sich bei 30 nM ein Minimum fand. Bei höheren Konzentrationen stieg die Zahl der Läsionen wieder an, blieb aber unter dem Niveau der unbehandelten Kontrolle.

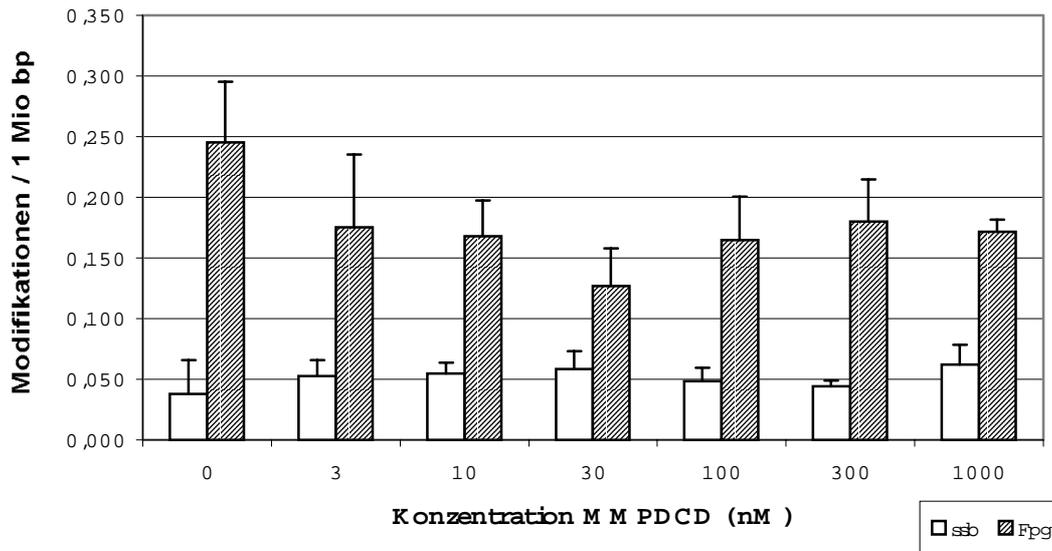


Abb.3.30 Induzierte Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitiven Läsionen in AS52 nach Präinkubation mit MMPDCD (0 bis 1000 nM) für 1 h und Schädigung mit 50 nM Ro 19-8022 und sichtbarem Licht (1000 W, 33 cm, 10 min) in Gegenwart von MMPDCD; der Untergrundspiegel von unbestrahlten und nicht präinkubierten Zellen wurde in allen Fällen abgezogen; n = 4.

3.4.2 Einfluß von MMPDCD auf die Mikrokernrate

Um einen weiteren genotoxischen Endpunkt zu untersuchen, wurde der Einfluß einer Vorbehandlung mit MMPDCD auf die Mikrokernrate von AS52-Zellen bestimmt. Dabei fiel in mit MMPDCD präinkubierten Zellen eine signifikante Zunahme der spontanen Mikrokernrate bei einer Konzentration von 30 nM und höher auf (Abb. 3.31). MMPDCD induzierte ähnlich wie Vitamin C dosisabhängig Mikrokerne und konnte so pro-oxidativ wirken.

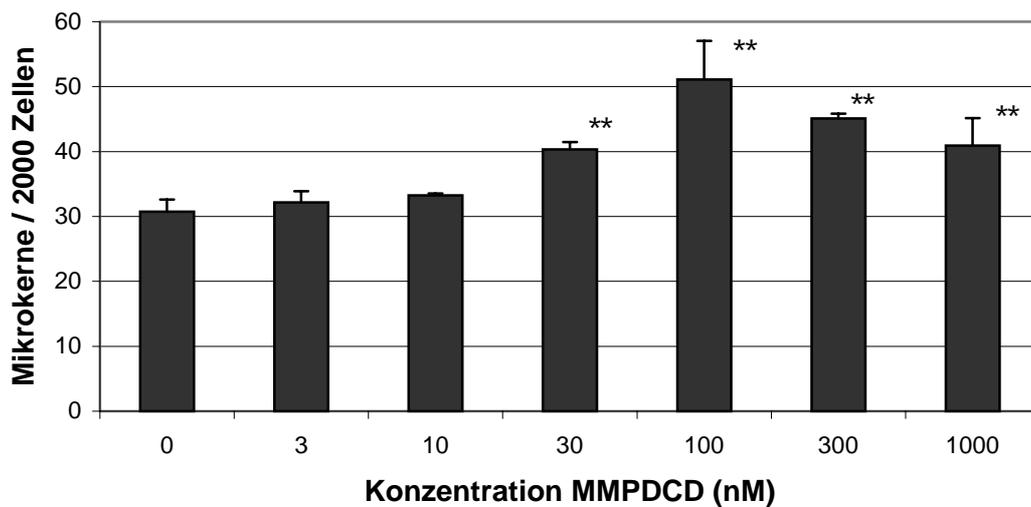


Abb. 3.31 Einfluß von MMPDCD-Präinkubation auf die spontane Bildung von Mikrokerneln in AS52, $n = 2-5$, ** $p < 0,05$ %.

Wurde die Mikrokernelnbildung in AS52 nach Schädigung mit sichtbarem Licht betrachtet, so zeigte sich nach Präinkubation mit MMPDCD eine signifikante, dosisabhängige Zunahme der Rate. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, daß die nicht präinkubierte, aber bestrahlte Probe (Konzentration 0 nM), die in anderen Versuchen (siehe Abb. 3.7 und 3.46; Kapitel 3.1.2 und 3.5.3) bei 53 Mikrokerneln / 2000 Zellen lag, keine Erhöhung der Mikrokernelnrate über dem Untergrund aufwies. Wenn man den induzierten Wert aus den anderen Untersuchungen zugrunde legt, zeigen die beiden höchsten Konzentrationen MMPDCD noch eine deutlich erhöhte Mikrokernelnrate und bei niedrigeren Konzentrationen (3 und 10 nM) wäre dann auch ein protektiver Effekt denkbar.

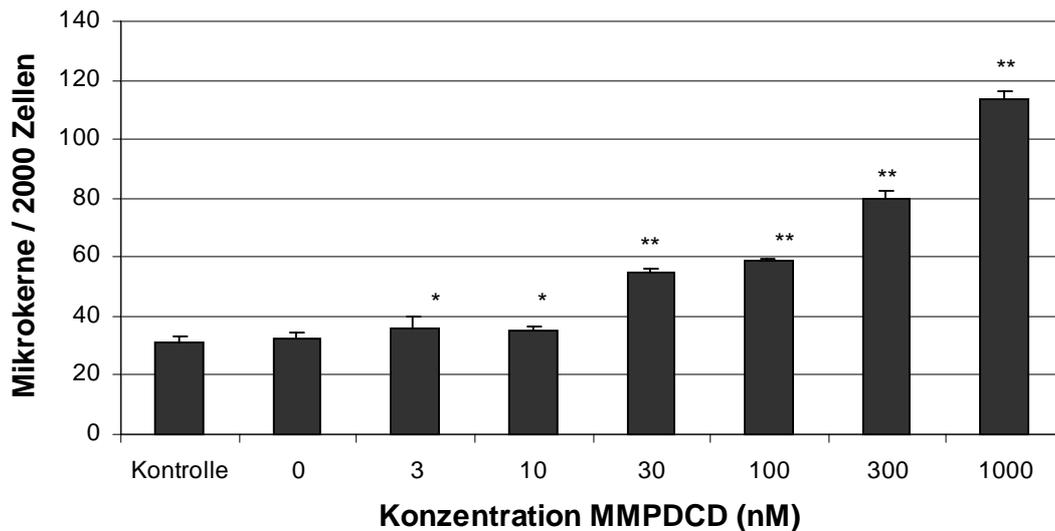


Abb. 3.32 Einfluß von MMPDCD-Präinkubation auf die Induktion von Mikrokerneln in AS52 mit sichtbarem Licht (1000 W, 33 cm, 20 min; 450 kJ/m²), MMPDCD ist nicht anwesend während der Bestrahlung; n = 2 (3, 10 nM), n = 3 (30, 100, 300, 1000 nM), n = 5 (Kontrolle, 0 nM); ** p<0,5 %, * p<5 %.

Die Beeinflussung der mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022 induzierten Mikrokerne erwies sich ebenfalls als konzentrationsabhängig. Bei Konzentrationen von 3 und 10 nM lag eine signifikant erniedrigte Mikrokernrate vor, während die nächsthöhere Konzentration von 30 nM bereits eine signifikante Erhöhung verursachte (Abb. 3.33).

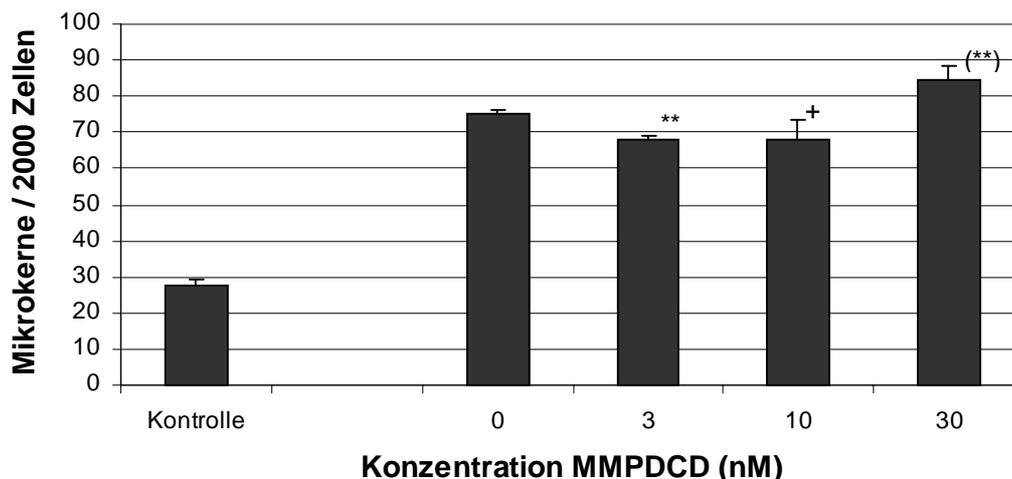


Abb. 3.33 Induktion von Mikrokerneln in AS52 nach Präinkubation mit MMPDCD und Schädigung mit Ro 19-8022 50 nM in Anwesenheit von MMPDCD, n = 4, * p<5 %, + p<2,5 %, ** p<0,5 %; (***) Erhöhung gegenüber des bei 0 induzierten Schadens.

3.4.3 Einfluß von MMPDCD auf die Zytotoxizität in AS52-Zellen

Um den Einfluß von MMPDCD auf die Überlebensrate von AS52-Zellen zu untersuchen, wurde die „cloning efficiency“ (siehe Kapitel 2.2.7) gemessen. Dabei hatte die Präinkubation mit MMPDCD keinen Einfluß (Abb. 3.34) und war somit nicht zytotoxisch.

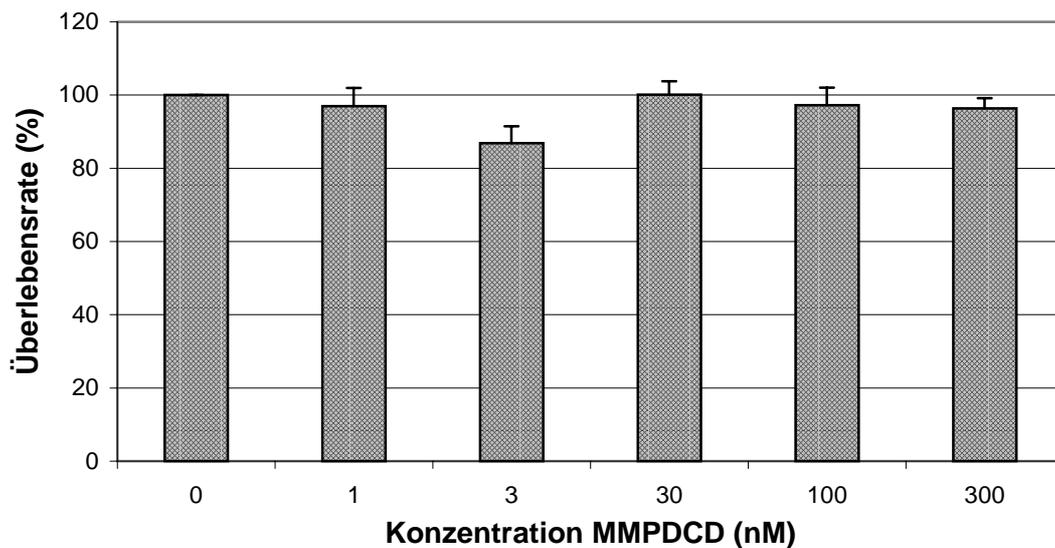


Abb. 3.34 Einfluß von MMPDCD auf die Überlebensrate von AS52, n = 2, 3

Auch die eigentlich untoxische Schädigung (siehe Abb. 3.7) mit sichtbarem Licht wurde nach einer Vorbehandlung mit MMPDCD untersucht. Bei Konzentrationen von 3, 30 und 300 nM sank die Überlebensrate der AS52-Zellen leicht (Abb. 3.35), was aber noch nicht als Zytotoxizität zu werten war.

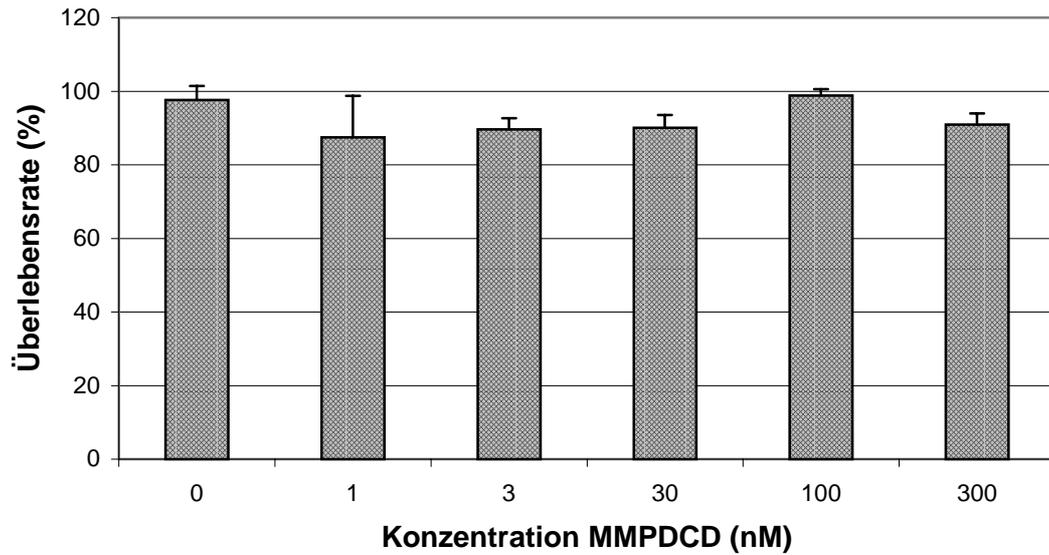


Abb. 3.35 Einfluß von MMPDCD auf die Überlebensrate von AS52 nach Schädigung mit sichtbarem Licht (1000 W, 33 cm, 10 min, 225 kJ/m²), n = 2-3

Bei einer Schädigung mit 50 nM Photosensibilisator Ro 19-8022, einer untoxischen Behandlung (vergleiche Kapitel 3.1.4), veränderte die Präinkubation mit MMPDCD nicht die Überlebensrate der AS52-Zellen (Abb. 3.36).

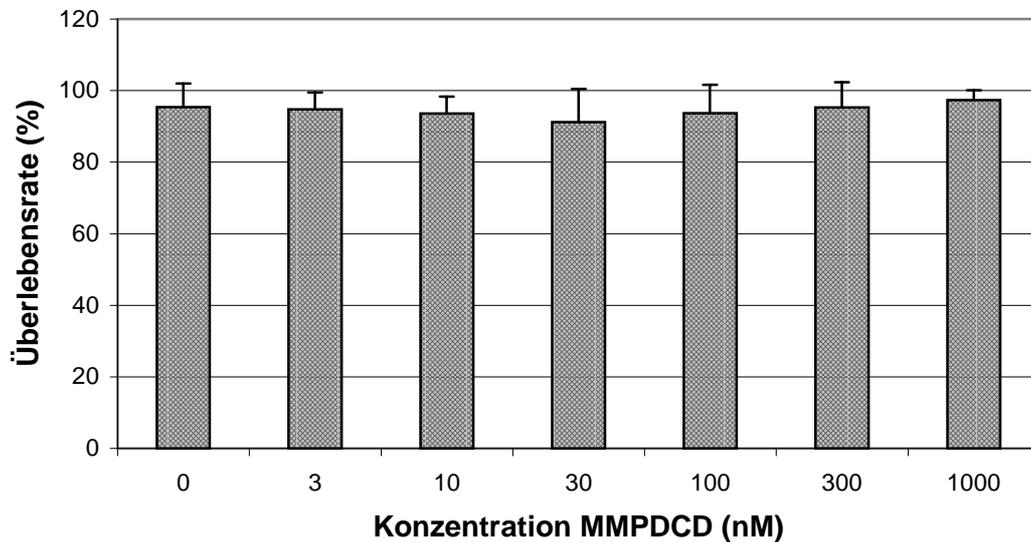


Abb. 3.36 Einfluß von MMPDCD auf die Überlebensrate nach Schädigung 50 nM Ro 19-8022 und sichtbarem Licht, n = 5.

3.5 Einfluß von EPA in AS52

Wie in der Einleitung (Kapitel 1.5.2) beschrieben, wird von einem protektiven Effekt eines hohen Konsums an Fischöl, und damit an mehrfach ungesättigten ω 3-Fettsäuren, auf das Herz-Kreislauf-System bereits seit langem berichtet (Jorgensen, K. *et al.*, 1986). Welchen Einfluß die ω 3-Fettsäuren EPA auf den DNA-Schaden in Zellen hat, wurde bisher noch nicht genauer untersucht. Deshalb wurde in den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen die Beeinflußbarkeit von basalen und induzierten Basenmodifikationen, von Mikrokernraten und von der Überlebensfähigkeit in AS52-Zellen durch 50 μ M EPA gemessen.

3.5.1 Resorption von EPA

Zunächst wurde der Gehalt an ω 3-Fettsäuren im Zellkern und im Zellysat von AS52-Zellen nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen EPA für 24 h mit Hilfe der GC/FID (siehe Kapitel 2.2.5) bestimmt. Dabei fiel auf, daß der Anteil an ω 3-Fettsäuren im Kern insgesamt anstieg und nicht nur der Gehalt an EPA sondern auch der an Docosahexaensäure (= C 22:6) zunahm. Der Anteil an den gesamten Fettsäuren in den Zellen verdoppelte sich der Gehalt an EPA durch eine Zugabe von 50 μ M und stieg absolut auf den fünffachen Wert an (Abb. 3.37 und Abb. 3.38). Die Zunahme an den Fettsäuren insgesamt bzw. an Docosahexaensäure könnte auf das zugesetzte BSA zurückzuführen sein (siehe Kapitel 2.2.6.4), welches nicht fettsäurefrei war und so Verunreinigungen bei der Präinkubation verursachen konnte.

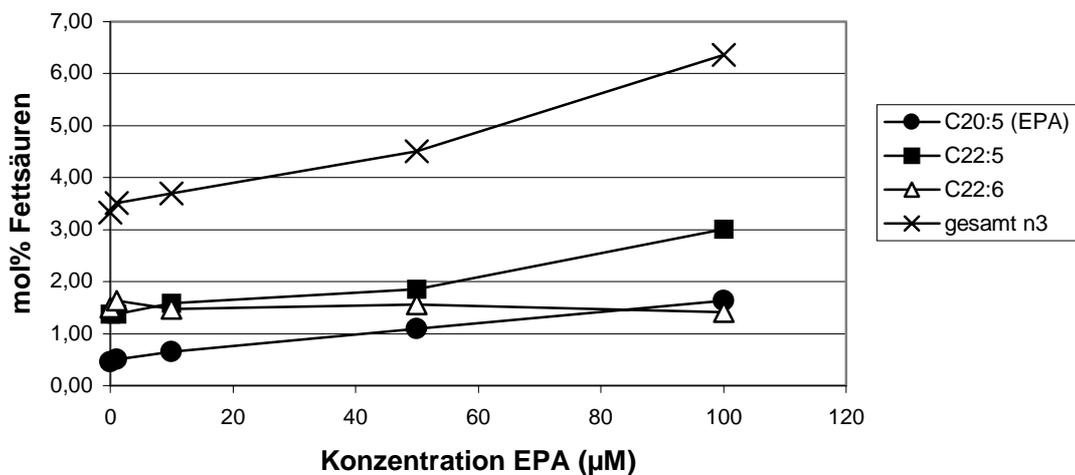


Abb. 3.37 Gehalt an ω 3-Fettsäuren im Zellkern von AS52 nach 24-stündiger Präinkubation mit EPA (Angabe in mol % der Gesamtfettsäuren).

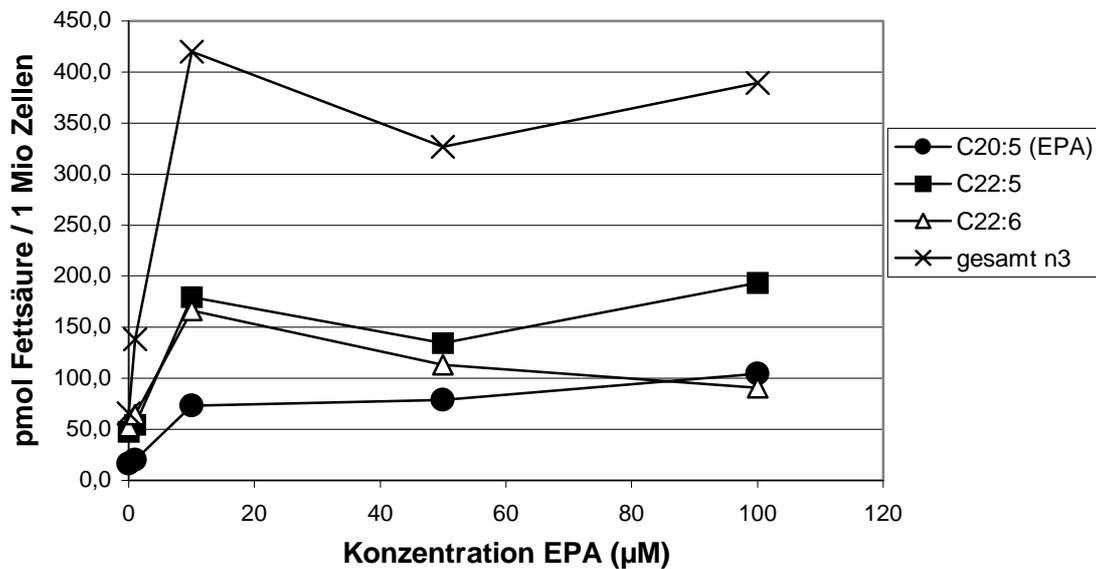


Abb. 3.38 Gehalt an ω 3-Fettsäuren im Zellkern von AS52 nach 24-stündiger Präinkubation mit EPA (Angabe in pmol/1 Mio Zellen).

Im Zellysat erhöhte sich ebenfalls der Gehalt an EPA nach einer Supplementation mit 50 μ M und zwar sowohl relativ als auch absolut auf das 2 $\frac{1}{2}$ -fache (Abb. 3.39 und Abb. 3.40). Damit war die Supplementation mit EPA möglich und eine Konzentration von 50 μ M konnte den Gehalt deutlich erhöhen.

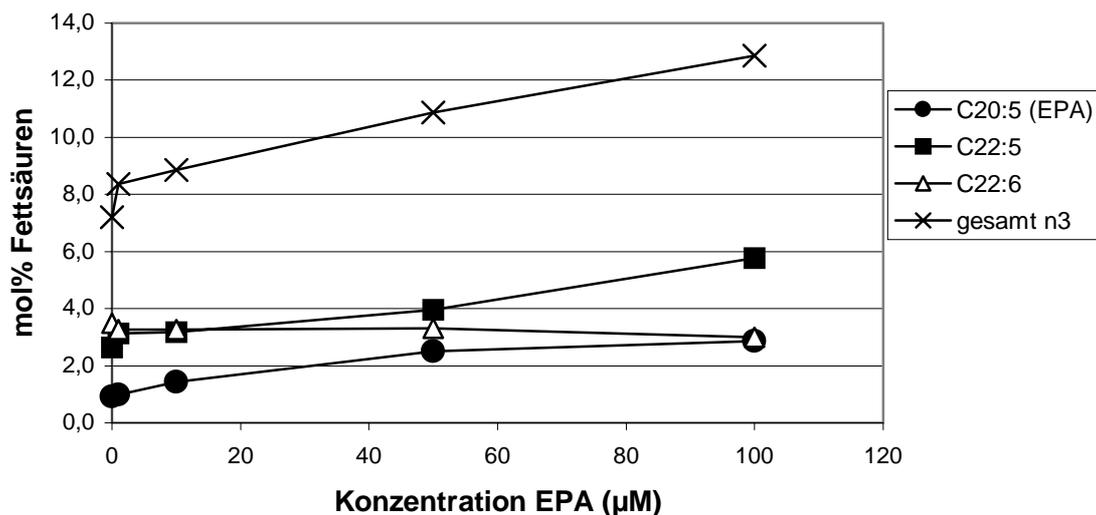


Abb. 3.39 Gehalt an ω 3-Fettsäuren im Zellysat von AS52 nach 24-stündiger Präinkubation mit EPA (Angabe in mol % der Gesamtfettsäuren).

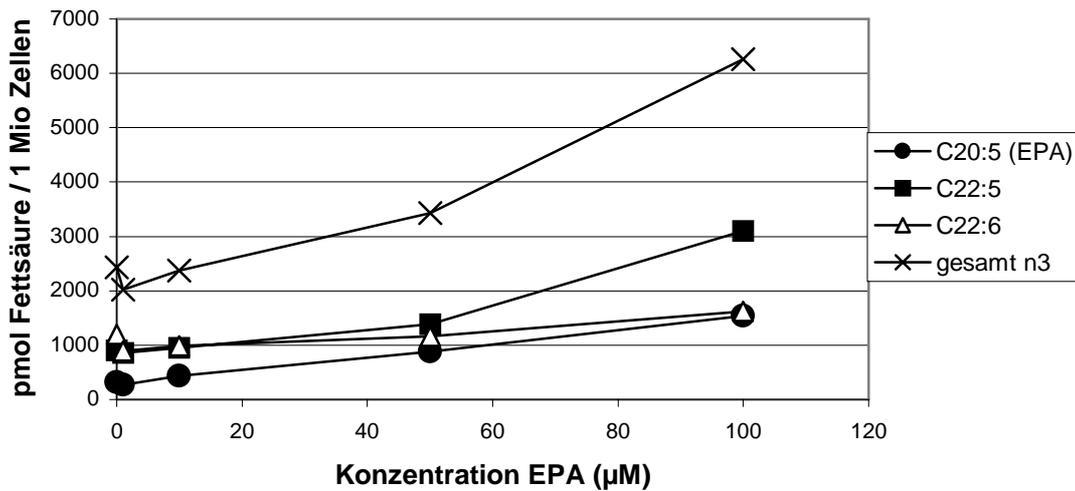


Abb. 3.40 Gehalt an ω 3-Fettsäuren im Zellysat von AS52 nach 24-stündiger Präinkubation mit EPA (Angabe in pmol/ 1 Mio Zellen).

3.5.2 Einfluß von EPA auf oxidative DNA-Modifikationen

Eine Präinkubation mit EPA in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 500 μ M hatte keinen Einfluß auf den Untergrund an oxidativen DNA-Schäden in AS52-Zellen (Abb. 3.41), wobei sich die Anzahl der Strangbrüche bei Konzentrationen zwischen 0,1 und 10 μ M transient leicht erhöhte. Die nachfolgenden Untersuchungen wurden jeweils in unbehandelten Zellen und in mit 50 μ M EPA vorbehandelten AS52 durchgeführt.

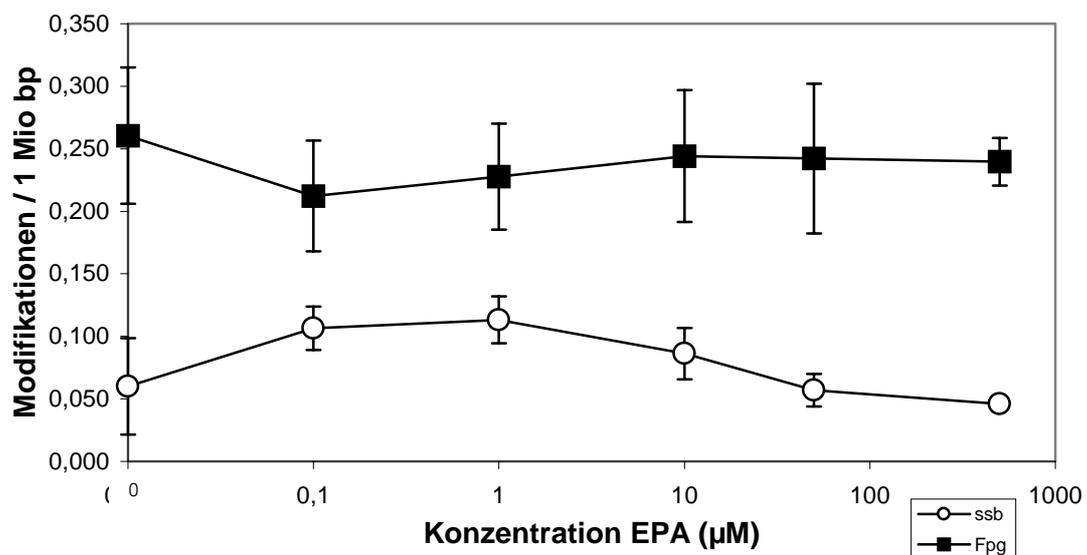


Abb. 3.41 Einfluß von EPA auf den Untergrund an DNA-Modifikationen in AS52; n = 2 für 500 μ M, n = 4 für 0,1/1/10 μ M, n = 10 für 50 μ M und n = 14 für 0 μ M EPA.

Bei den Schädigungen zur Induktion von oxidativen DNA-Schäden in AS52-Zellen wurde zunächst mit sichtbarem Licht bestrahlt. Es zeigte sich hier kein Einfluß auf die Suszeptibilität der Zellen durch eine Präinkubation mit 50 μM EPA (Abb. 3.42), da EPA die Schadensinduktion nicht veränderte.

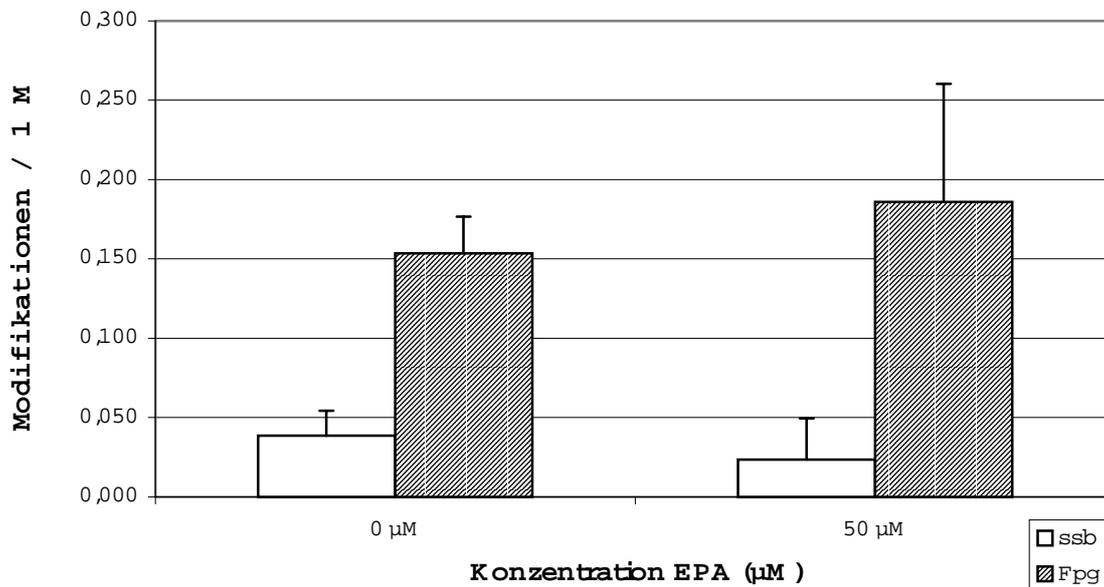


Abb. 3.42 Anzahl der induzierten Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitiven Läsionen in AS52 nach Präinkubation mit EPA (0, 50 μM) für 24 h und Schädigung mit sichtbarem Licht (1000 W, 33 cm, 20 min; 450 kJ/m^2), $n = 4$.

Auch die Induktion von oxidativen DNA-Schäden durch den Photosensibilisator Ro 19-8022 konnte durch eine Präinkubation mit 50 μM EPA nicht signifikant beeinflusst werden, obwohl die Zahl der Einzelstrangbrüche leicht zurückging (Abb. 3.43).

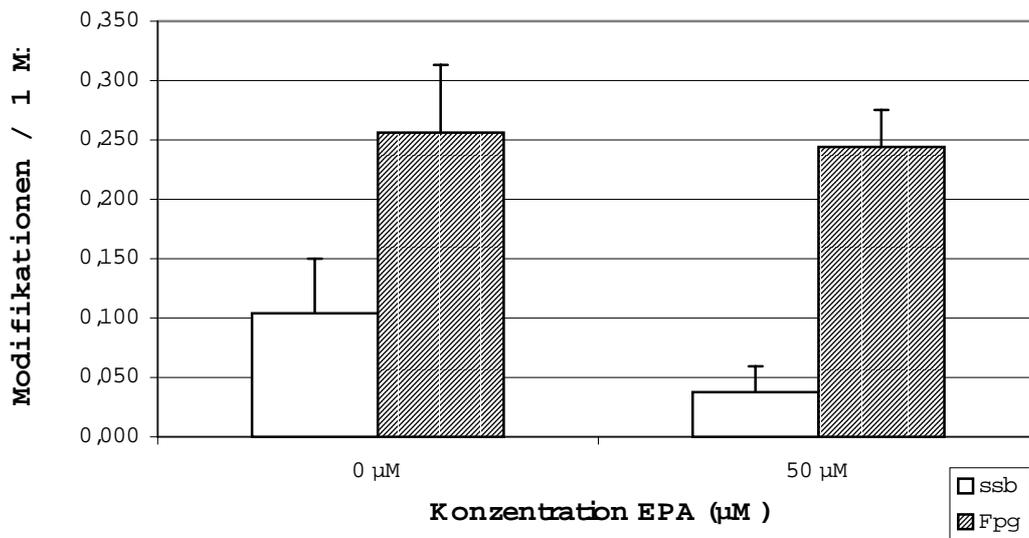


Abb. 3.43 Induzierte DNA-Modifikationen in AS52 nach Präinkubation mit EPA (0, 50 µM) für 24 h und Schädigung mit 50 nM Ro 19-8022 und sichtbarem Licht (1000 W, 38 cm, 10 min; 166 kJ/m²), n = 3.

Bei der dritten Schädigungsvariante, mit UVB, verhinderte die Vorbehandlung mit EPA ebenfalls nicht die Anzahl der induzierten oxidativen Modifikationen (Abb. 3.44). EPA war also nicht in der Lage, die Suszeptibilität von AS52-Zellen gegenüber einer der untersuchten, exogenen Oxidation zu beeinflussen.

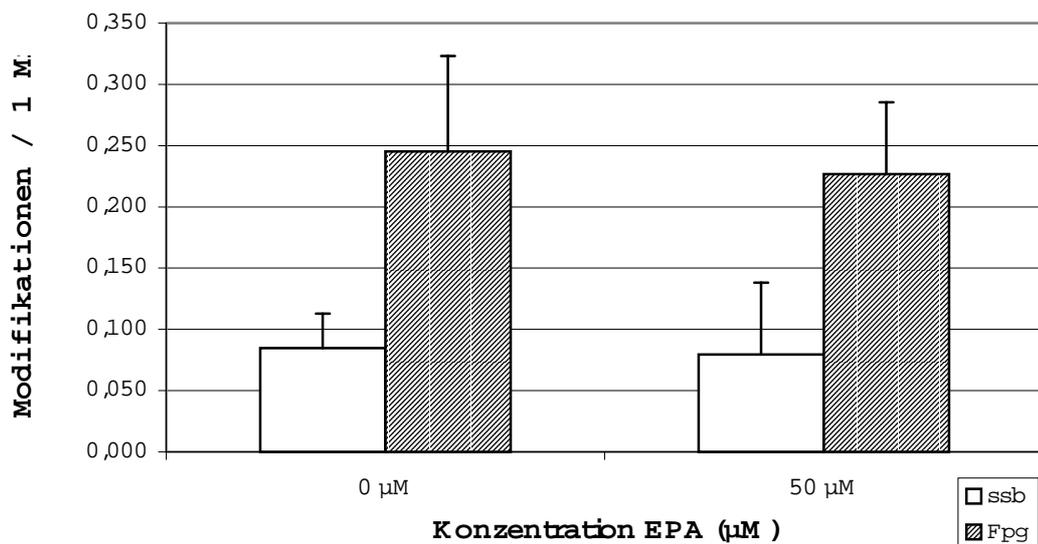


Abb. 3.44 Induktion von Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Läsionen in AS52 nach Präinkubation mit EPA (0, 50 µM) für 24 h und Schädigung mit UVB (50 cm, 14 min; 1,1 kJ/m²), n = 4.

3.5.3 Beeinflussung der Mikrokernrate durch EPA

Im Gegensatz zu Vitamin C und MMPDCD (siehe Kapitel 3.1.3 und 3.4.2) beeinflusste EPA in einer Konzentration von 50 μM den Untergrund der spontanen Mikrokernrate in AS52-Zellen nicht (Abb. 3.45).

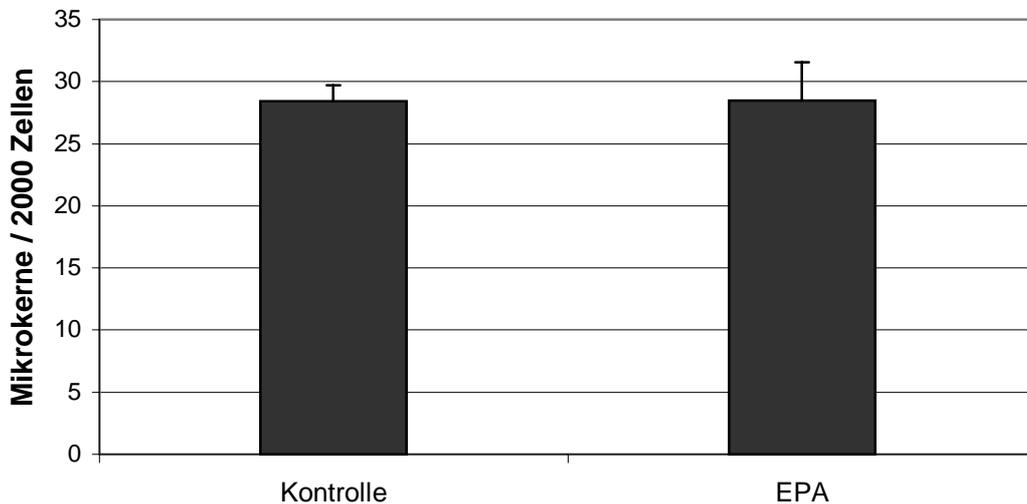


Abb. 3.45 Einfluß von 50 μM EPA auf die Spontanrate von Mikrokernen in AS52, n = 9.

Bei der Induktion von Mikrokernen durch sichtbares Licht war die Vorbehandlung mit 50 μM EPA in der Lage, die Suszeptibilität von AS52-Zellen zu verändern. Die Fettsäure senkte signifikant die Mikrokernrate um ca. 14 % (Abb. 3.46).

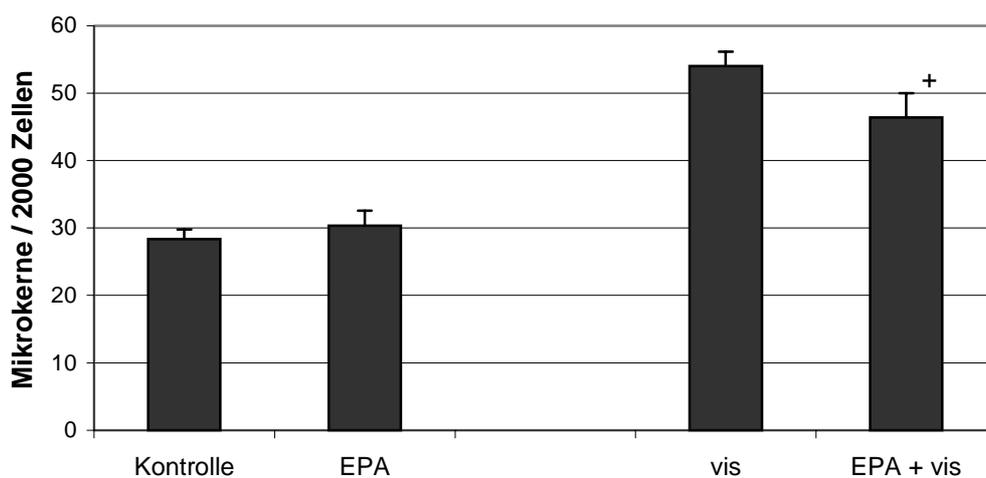


Abb. 3.46 Einfluß von 50 μM EPA auf die Induktion von Mikrokernen in AS52 mit sichtbarem Licht (1000 W, 33 cm, 20 min; 450 kJ/m^2) (vis = sichtbares Licht); n = 3; + p < 2,5 %.

Auch bei der Schädigung mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022 verhinderte die Präinkubation mit 50 μM EPA die Mikrokerninduktion signifikant (Abb. 3.47).

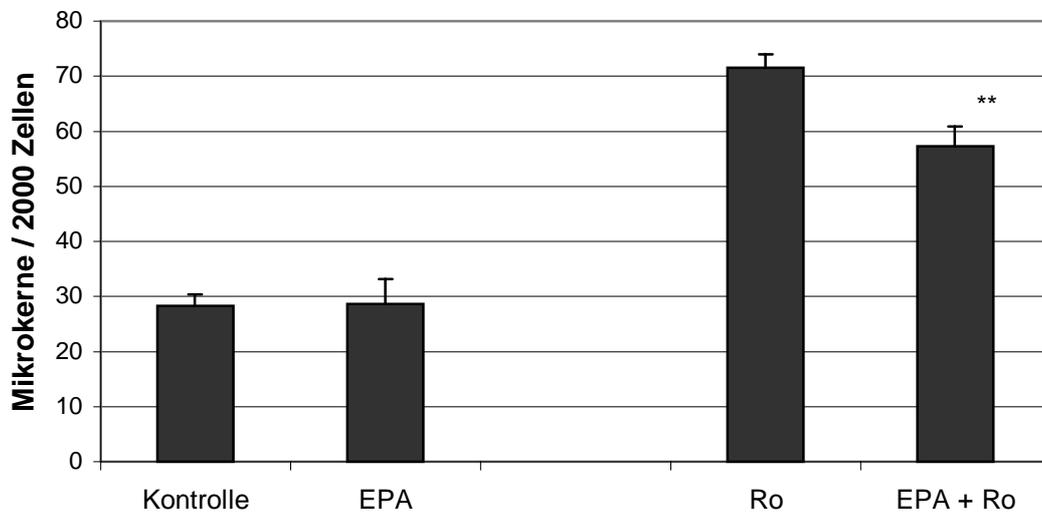


Abb. 3.47 Induktion Mikrokernen in AS52 mit 50 nM Ro 19-8022 (1000 W, 38 cm, 10 min; 166 kJ/m^2) nach EPA-Präinkubation (50 μM für 24 h), $n = 3$; ** $p < 0,5 \%$.

Bei der dritten Schädigungsart fand sich ebenfalls ein protektiver Effekt von EPA auf die Mikrokernrate in AS52 (Abb. 3.48). EPA erwies sich also bei der Induktion von Mikrokernen als effektiver Schutzfaktor, obwohl es die in der alkalischen Elution gemessenen oxidativen DNA-Schäden nicht beeinflusste (siehe Kapitel 3.5.2).

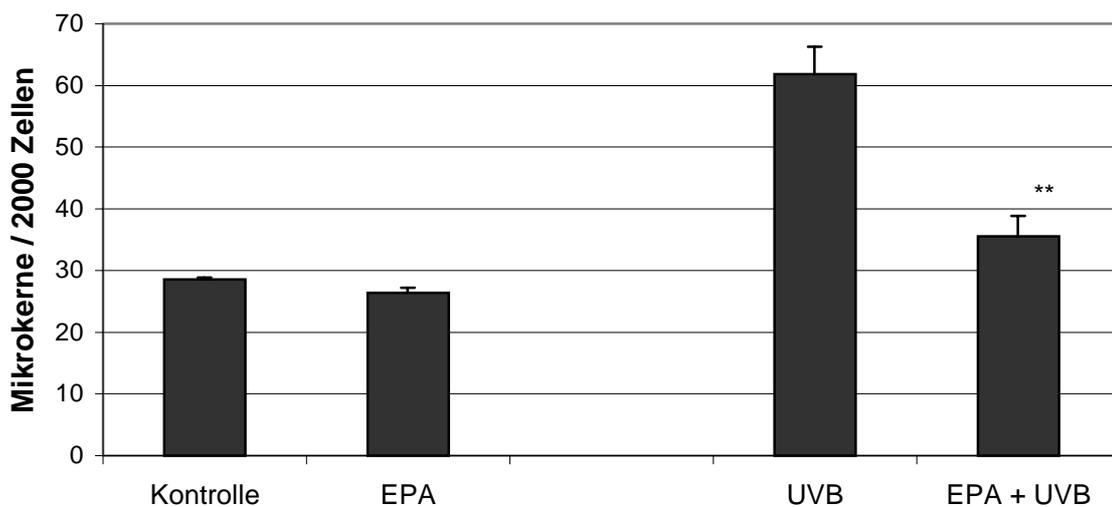


Abb. 3.48 Einfluß von 50 μM EPA auf die Induktion von Mikrokernen in AS52 durch UVB (50 cm, 14 min; $1,1 \text{ kJ/m}^2$), $n = 3$; ** $p < 0,5 \%$.

3.5.4 Einfluß von EPA auf die Zytotoxizität

Durch Messung der „Cloning efficiency“ (Kapitel 2.2.7) wurde die Toxizität der angewendeten Schädigungen bestimmt, um den Vitalitätszustand der Zellen nach der Behandlung zu erfassen und um mögliche protektive Effekte der EPA-Vorbehandlung gegenüber toxischen Folgen der Schädigungen zu erkennen.

Auf ungeschädigte AS52-Zellen hatte EPA in einer Konzentration von 50 μM keinen toxischen Einfluß (Abb. 3.49)

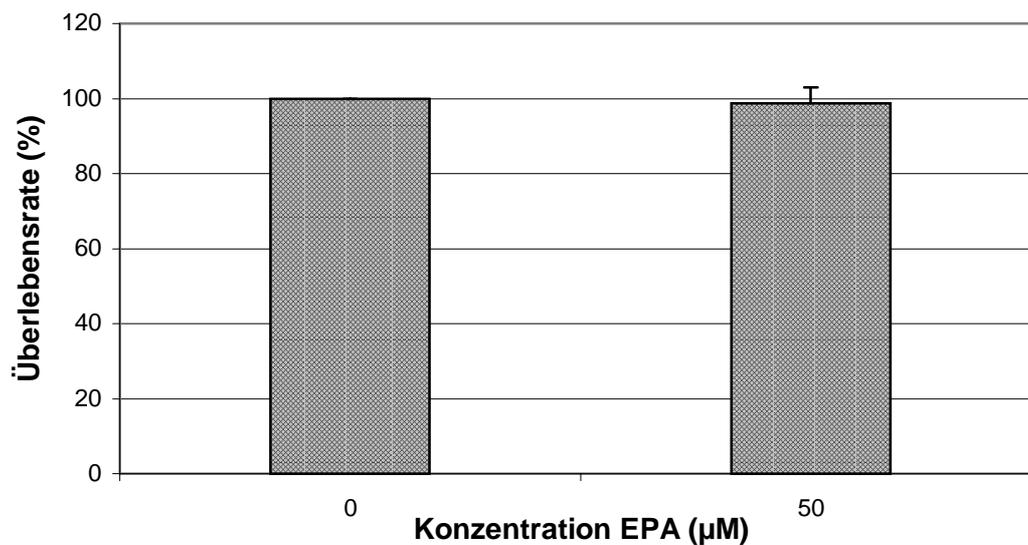


Abb. 3.49 Einfluß von 50 μM EPA auf die Überlebensrate von AS52-Zellen, n = 11.

Bei der Schädigung mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022 konnte EPA, im Gegensatz zu Vitamin C (siehe Kapitel 3.1.4), nicht die Toxizität der Behandlung vermindern (Abb. 3.50).

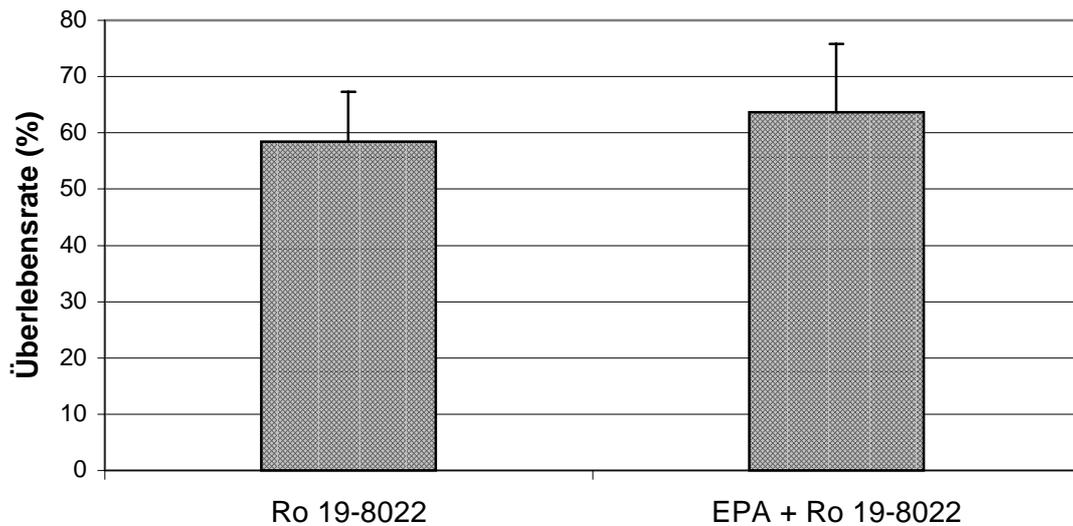


Abb. 3.50 Einfluß von 50 μM EPA auf die Überlebensrate von AS52-Zellen nach Schädigung mit Ro 19-8022 300 nM (1000 W, 38 cm, 10 min; 166 kJ/m^2), $n = 4$

Auch bei der Untersuchung der Toxizität durch UVB unterschied sich EPA von Vitamin C. Die Fettsäure konnte auch hier nicht vor der Toxizität der Behandlung schützen (Abb. 3.51).

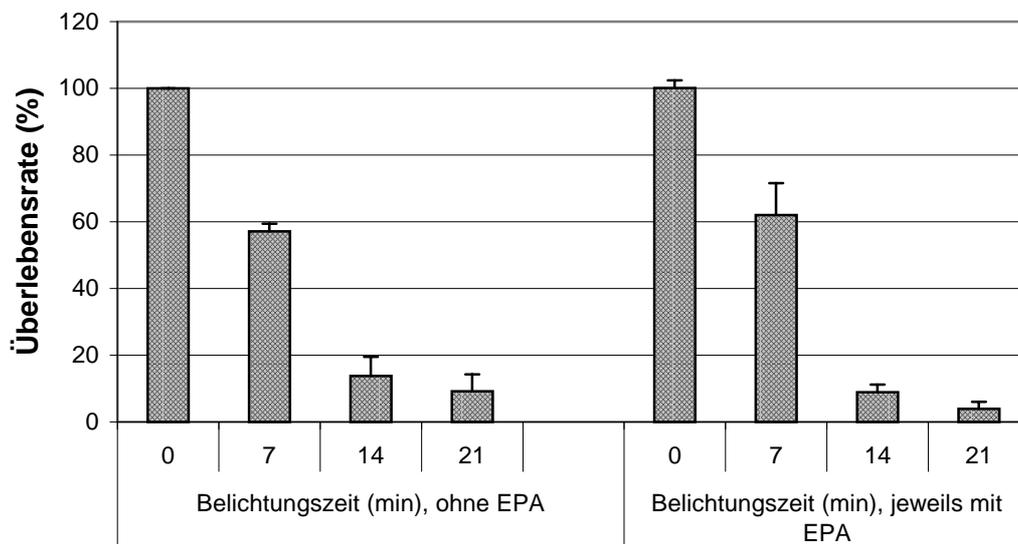


Abb. 3.51 Einfluß von 50 μM EPA auf die Überlebensrate nach Schädigung mit UVB (Dosen von 0,55/1,1/1,65 kJ/m^2 entsprechend 7/14/21 min Belichtungszeit), $n = 3$

3.6 Einfluß von EPA in humanen Lymphozyten

Durch Teilnahme an einem von der Europäischen Kommission geförderten Forschungsprojekt ergab sich die Möglichkeit, die protektive Wirkung von EPA gegenüber einer oxidativen DNA-Schädigung auch *in vivo* zu überprüfen. Ausgangspunkt des Projektes war der allgemein für ω 3-Fettsäuren beobachtete kardioprotektive Effekt und eine Erhöhung der MED durch EPA. Als Endpunkte der Untersuchung wurden die Aufnahme von EPA in die Haut, die minimale Erythem-bildende Dosis, die Immunantwort, die Lipidperoxidation, der GSH- und Vitamin E-Gehalt und in Lymphozyten der oxidative DNA-Schaden bestimmt (siehe Kapitel 2.2.2). Letztere Untersuchung war Teil der vorliegenden Arbeit.

Für die doppelt-blind durchgeführte Studie zur Wirkung von EPA wurden in der dermatologischen Abteilung des Royal Liverpool University Hospital 14 freiwillige Probanden rekrutiert. Jedem wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen Blutproben entnommen, die Lymphozyten wie in 2.2.1.3 und 2.2.1.5 beschrieben isoliert und eingefroren. Die Probanden erhielten dann über drei Monate eine Supplementierung mit 4 g EPA (Verumgruppe) oder Ölsäure (Placebogruppe) täglich in Form von Kapseln. Nach Ablauf dieser Zeit wurden erneut an drei aufeinanderfolgenden Tagen Blutproben genommen, Lymphozyten isoliert und eingefroren. Teile aller genommenen Blutproben wurden zur Bestimmung des DNA-Schadens zur Verfügung gestellt.

3.6.1 Einfluß von EPA auf die DNA-Modifikationen

In Abb. 3.52 sind die Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitiven Modifikationen der einzelnen Probanden der Placebogruppe als Mittelwerte aus den jeweils drei Blutabnahmen vor und nach der Supplementation dargestellt. Um Schwankungen zwischen den Messungen auszuschließen, wurde die drei Proben eines Probanden immer gleichzeitig in einem Versuch bestimmt. Der Proband DW bildet hier eine Ausnahme, da bei ihm die Zellen der drei Blutabnahmen wegen ihrer geringen Anzahl gepoolt wurden. Bei den sieben Individuen war kein Trend einer Veränderung durch die Supplementation mit Ölsäure erkennbar. Vielmehr fiel erneut auf, daß sich die Spiegel an Fpg-sensitiven Modifikationen zwischen den Individuen stark unterscheiden.

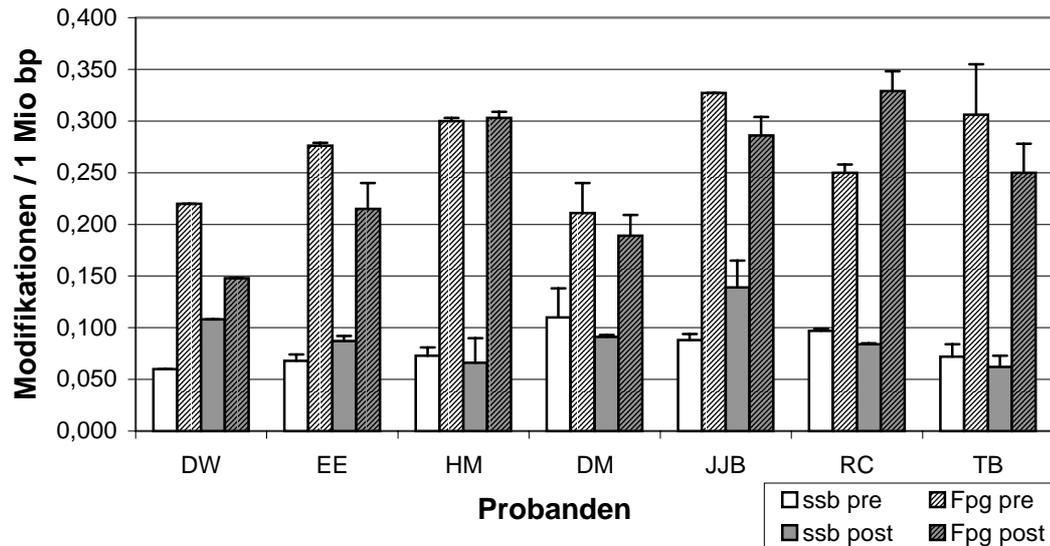


Abb. 3.52 Einfluß der Supplementierung mit Ölsäure (Placebogruppe) auf die DNA-Schäden in peripheren Lymphozyten, pre = vor und post = nach Supplementierung, n = 1, 3.

Für die Bestimmung des DNA-Schadens in der Verumgruppe wurde genauso vorgegangen wie bei der Placebogruppe. Auch hier konnte aus Mangel an Lymphozyten bei einem Kandidaten (JF) nur eine Bestimmung durchgeführt werden. Auch in dieser Gruppe schwankten die Fpg-sensitiven Modifikationen mit Werten zwischen 0,15 und 0,30 Modifikationen/1 Million Basenpaare sehr stark. Ein Trend zu einem protektiven oder noziven Effekt durch die Supplementation mit EPA fand sich nicht (Abb.3.53).

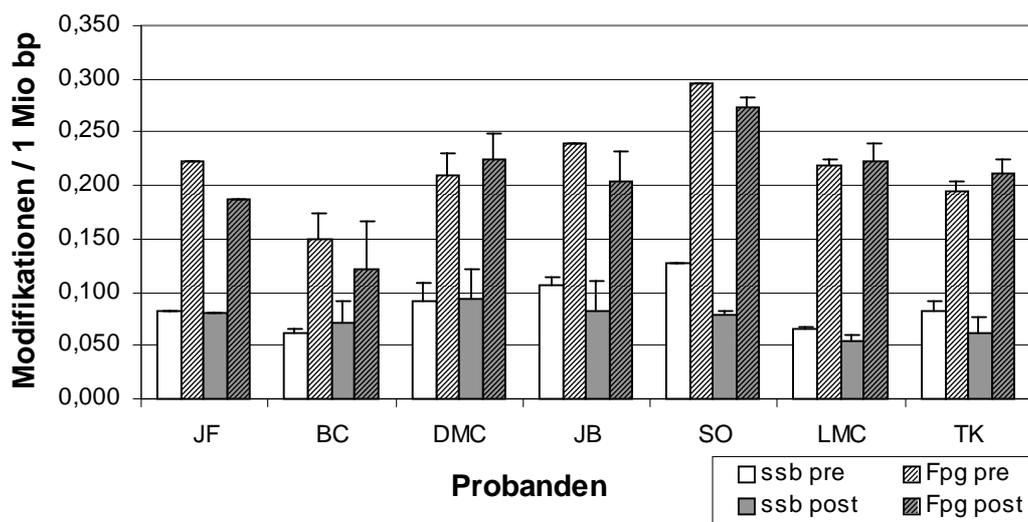


Abb. 3.53 Einfluß der Supplementierung mit EPA (Verumgruppe) auf den DNA-Schaden in peripheren Lymphozyten, pre = vor und post = nach Supplementierung n = 1, 3.

3.6.2 Vergleich Verum – Placebo – Gruppen

In Abb. 3.54 sind die Werte aus den beiden vorherigen Abbildungen als Veränderung zum jeweiligen Ausgangswert (100 %) prozentual dargestellt. Betrachtet man die Fpg-sensitiven Modifikationen, so sanken diese in beiden Gruppen leicht, aber nicht signifikant. In Bezug auf die Einzelstrangbrüche konnte man in der Placebogruppe eine leichte Erhöhung erkennen gegenüber einer leichten Verminderung in der Verumgruppe.

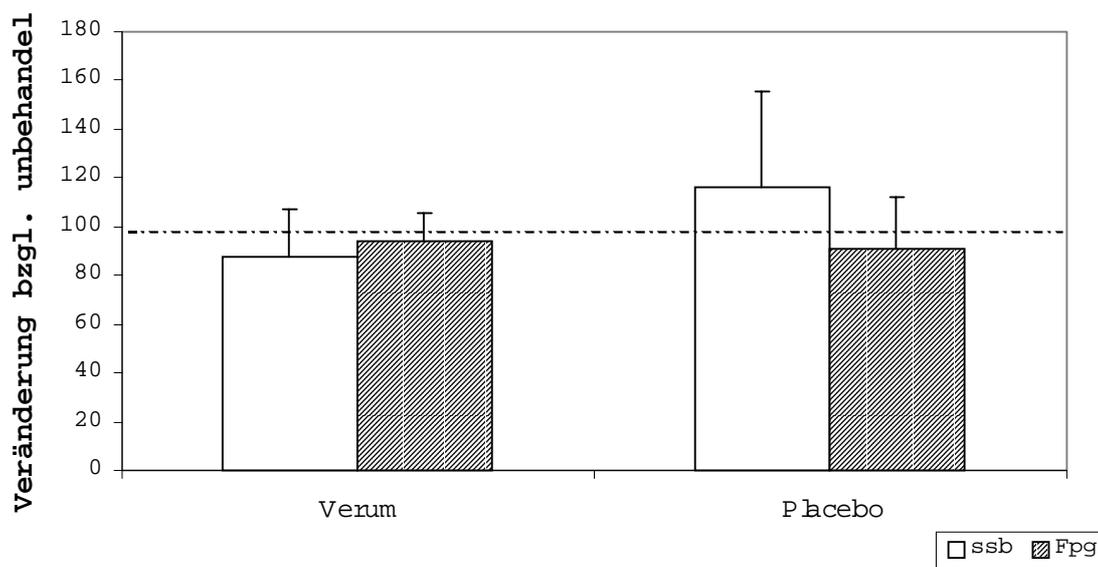


Abb. 3.54 Veränderung in Prozent zu den Werten vor der Supplementierung mit Ölsäure bzw. EPA. Die Werte der Probanden vor der Supplementierung entsprechen jeweils 100 %.

3.7 Einfluß von Ethanol auf AS52

Zur Erfassung des Effektes von Ethanol auf den oxidativen DNA-Schaden wurden zunächst kultivierte Zellen untersucht. Dazu wurden AS52-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Ethanol im Medium für 2 h präinkubiert und anschließend der oxidative DNA-Schaden bestimmt. Dabei konnten leicht erhöhte Spiegel der Einzelstrangbrüche und der Fpg-sensitiven Modifikationen beobachtet werden, wobei diese Veränderungen nicht signifikant waren (Abb. 3.55).

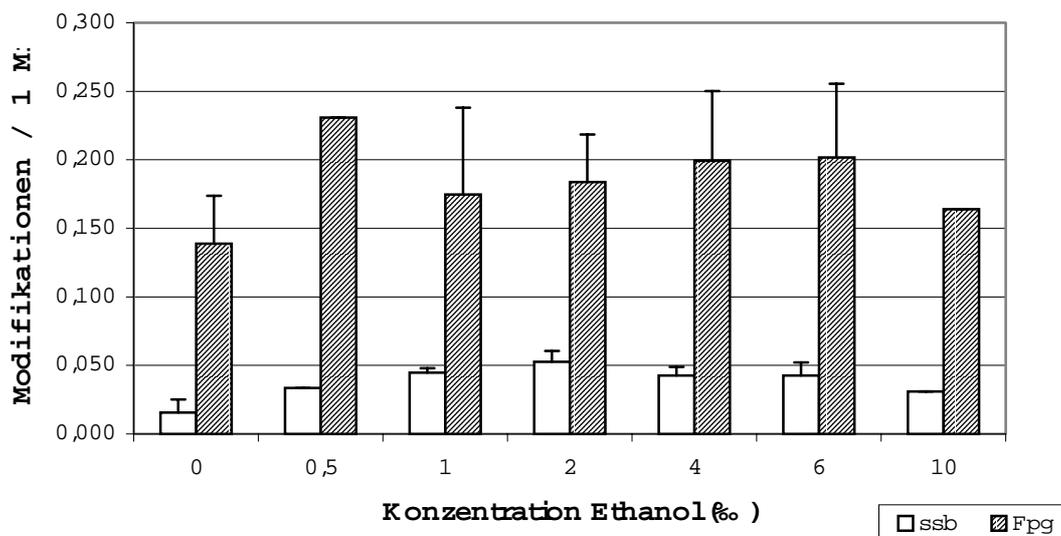


Abb. 3.55 Einfluß von Ethanol auf den DNA-Schaden in AS52, Inkubation für 2 h, n = 1-2

3.8 Einfluß von chronischer Ethanolaufnahme auf humane Lymphozyten und Blutparameter

In Zusammenarbeit mit der Klinik für Psychiatrie und Psychosomatik der Universität Mainz wurde eine Studie zum Einfluß chronischem Alkoholkonsums auf den oxidativen DNA-Schaden in menschlichen Lymphozyten durchgeführt. Dazu wurden 32 freiwillige Patienten, die zur Entgiftung nach chronischem Alkoholkonsum stationär aufgenommen wurden, im Alter von $44,7 \pm 8,7$ Jahre und 28 Kontrollpersonen der gleichen Altersgruppe Altersgruppe ($46,5 \pm 6,9$ Jahre) in die Studie aufgenommen. Wie in Abb. 2.1 dargestellt ist, wurde den Patienten bei stationärer Aufnahme (t_0), zwei Tage nach der Aufnahme während der Entgiftungstherapie (t_1) und nach Abschluß der Therapie am Entlassungstag (t_2) zur Lymphozytenisolierung Blutproben entnommen (siehe Kapitel 2.2.1.3). Den Kontrollpersonen wurde nur einmalig Blut entnommen (t_0). Die isolierten Zellen wurden eingefroren, um später ihren DNA-Schaden zu bestimmen. Außerdem wurde bei der ersten und dritten Entnahme ein klinisches Blutbild erstellt. Darüberhinaus wurden alle Probanden mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens (Form 90) zu ihrem Alkoholkonsum der letzten 90 Tage vor der stationären Aufnahme befragt.

3.8.1 Erhebung des Alkoholkonsums vor Probennahme

Zur Erfassung des gesamten Alkoholkonsums der letzten drei Monate vor stationärer Aufnahme bzw. vor Probennahme wurden die Probanden mit Hilfe eines Formblattes zu ihrem Trinkverhalten befragt. Die Aufaddierung für die einzelnen Patienten und Probanden ist in den Abbildungen 3.56 und 3.57 dargestellt. Der durchschnittliche Alkoholkonsum lag in der Kontrollgruppe bei 675 ± 552 g und in der Patientengruppe bei 11930 ± 10483 g Ethanol.

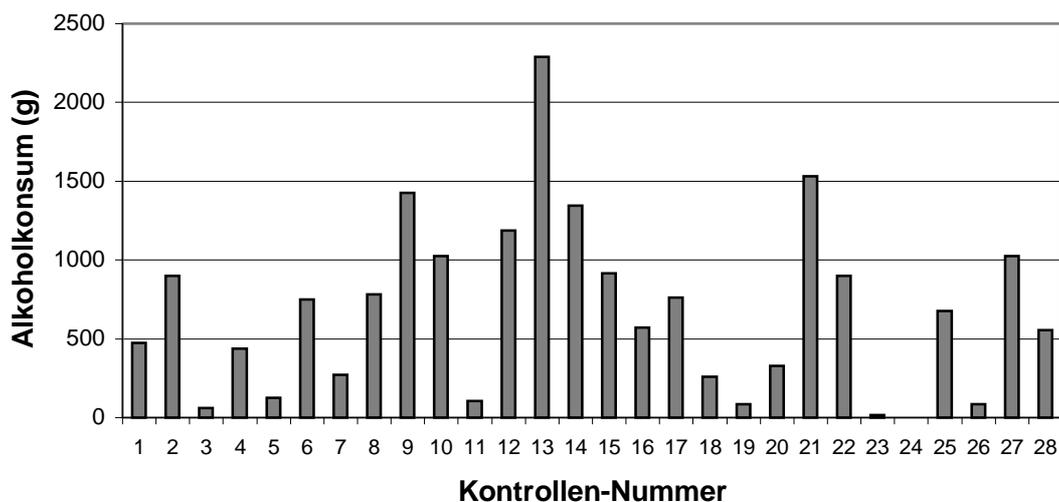


Abb. 3.56 Alkoholkonsum der Kontrollgruppe in den letzten 90 Tage vor Probennahme.

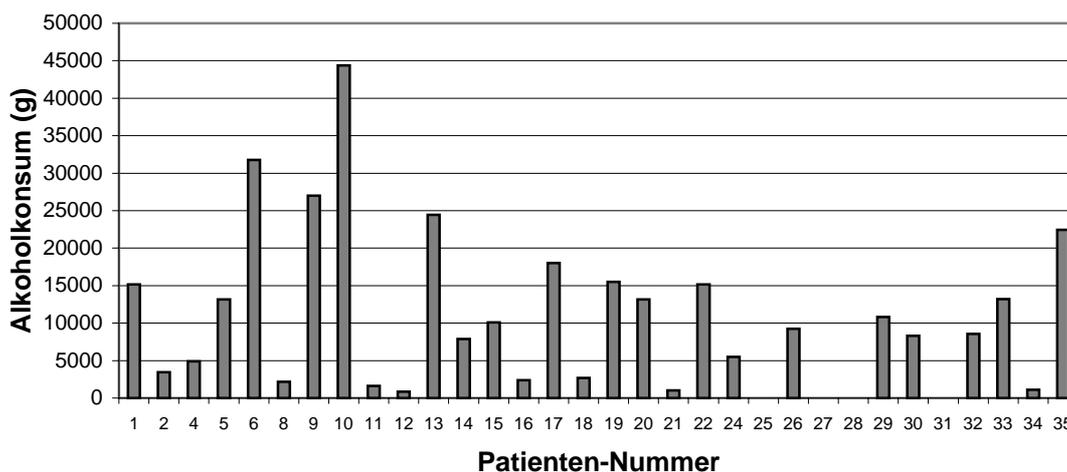


Abb. 3.57 Alkoholkonsum der letzten 90 Tage in der Alkoholikergruppe. Die Angaben zu den Patienten 25, 27, 28 und 31 fehlen.

Die Abbildungen 3.58 und 3.59 zeigen den Alkoholkonsum der Kontroll- und der Patientengruppe in den letzten 30 Tagen vor der Probennahme. Der durchschnittliche Alkoholkonsum lag bei 174 ± 160 bzw. 4740 ± 3388 g pro Proband. In diesem Zeitraum, der wegen der zu erwartenden, eher kurzfristigen Effekte auf die DNA besonders von Bedeutung ist, konsumierten die Alkoholiker somit etwa 27 mal mehr Ethanol als die Kontrollpersonen.

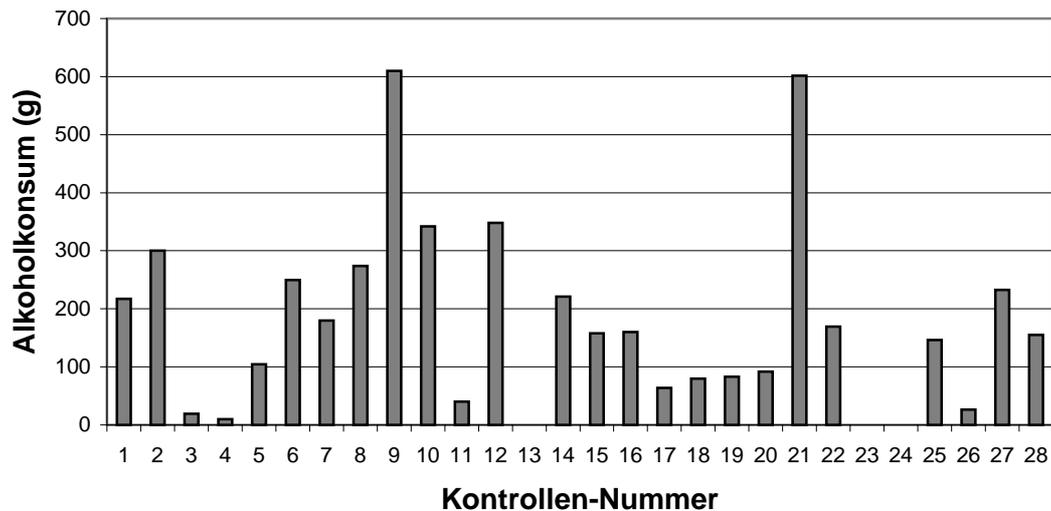


Abb. 3.58 Alkoholkonsum der Kontrollen in den letzten 30 Tage vor Probennahme.

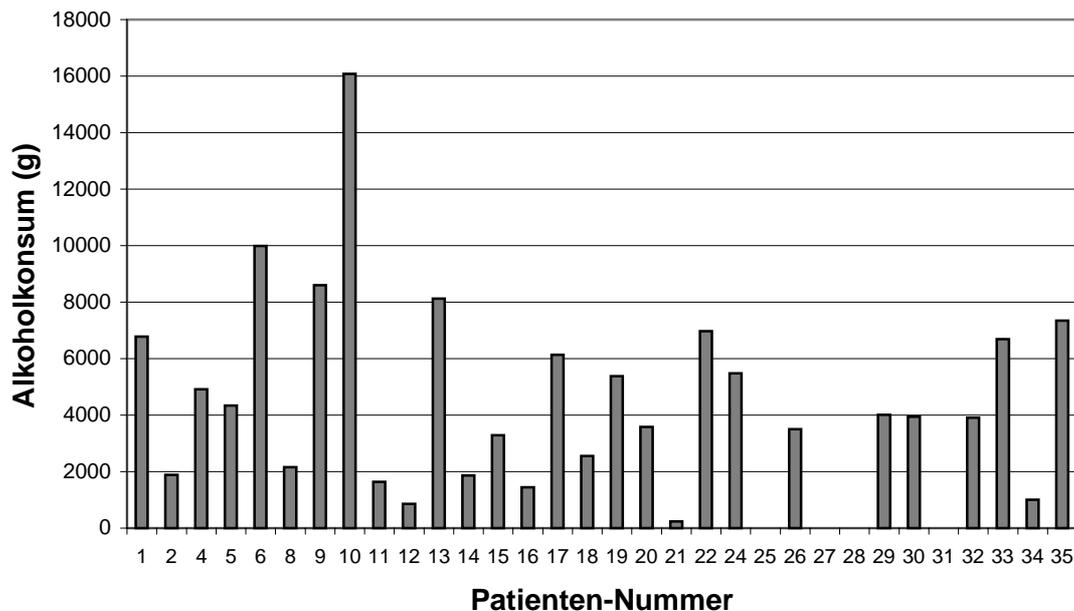


Abb. 3.59 Alkoholkonsum der Alkoholiker in den letzten 30 Tage vor der Probennahme. Die Angaben zu den Patienten 25, 27, 28 und 31 fehlen.

3.8.2 Einfluß von Ethanol und von Ethanolentzug auf die DNA-Modifikationen in humanen Lymphozyten

In den Abbildungen 3.60 und 3.61 sind die Untergrundspiegel an Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Modifikationen der Kontroll- und der Patientengruppe zum Zeitpunkt t_0 angegeben. Es handelt sich hier um den Mittelwert aus jeweils zwei unabhängigen Bestimmungen der gleichen Probe. Auffällig war hier wiederum die große interindividuelle Schwankung der DNA-Schäden zwischen den einzelnen Probanden, besonders in der Patientengruppe.

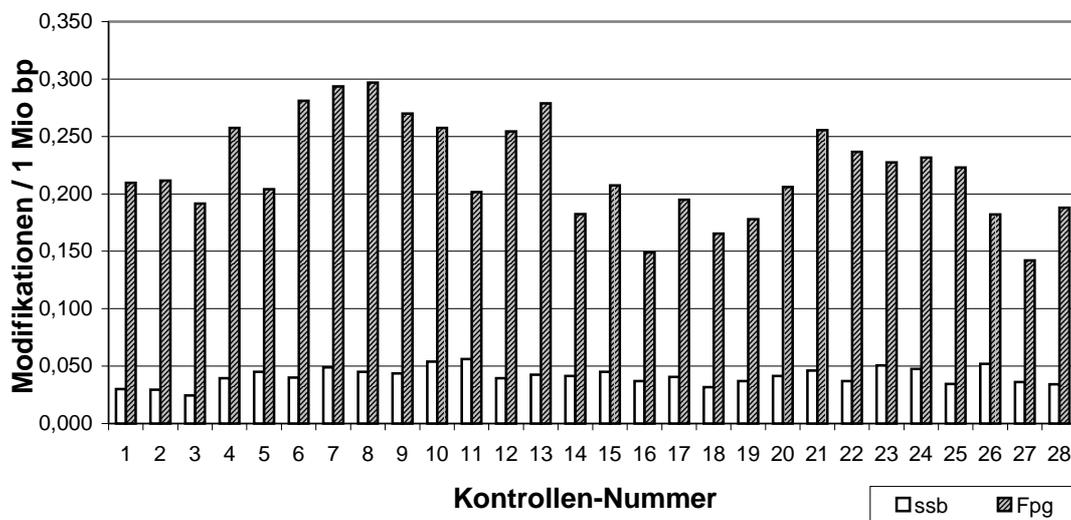


Abb. 3.60 Untergrund an oxidativen DNA-Modifikationen in der Kontrollgruppe, n = 2.

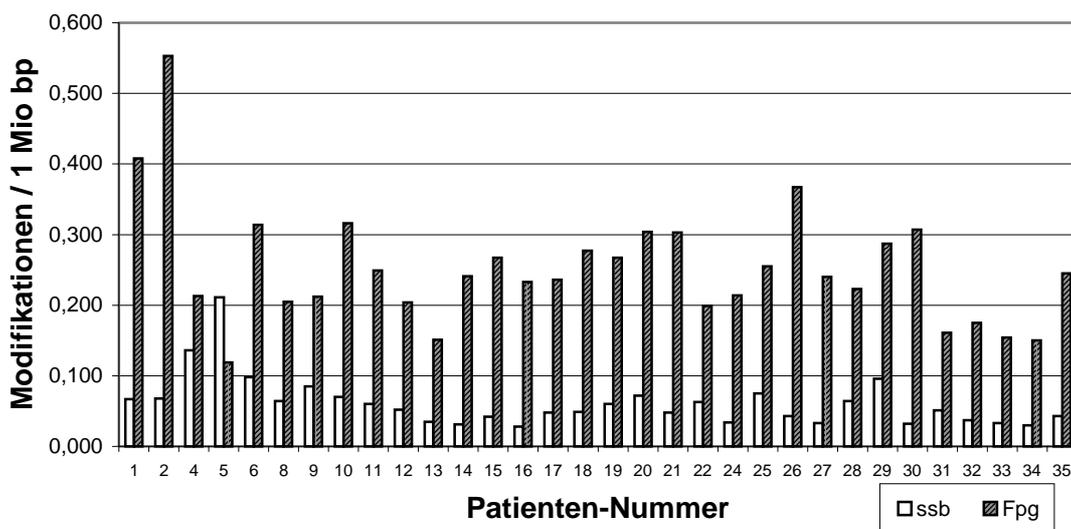


Abb. 3.61 Untergrund oxidativen DNA-Modifikationen in der Alkoholikergruppe, n = 2.

Mittelt man die Werte der jeweiligen Gruppe, so ergibt sich der in Abbildung 3.62 dargestellte Vergleich. Die Einzelstrangbrüche waren in der Kontrollgruppe etwas niedriger und die Fpg-sensitiven Läsionen signifikant (um 12,5 %) niedriger als in der Alkoholikergruppe.

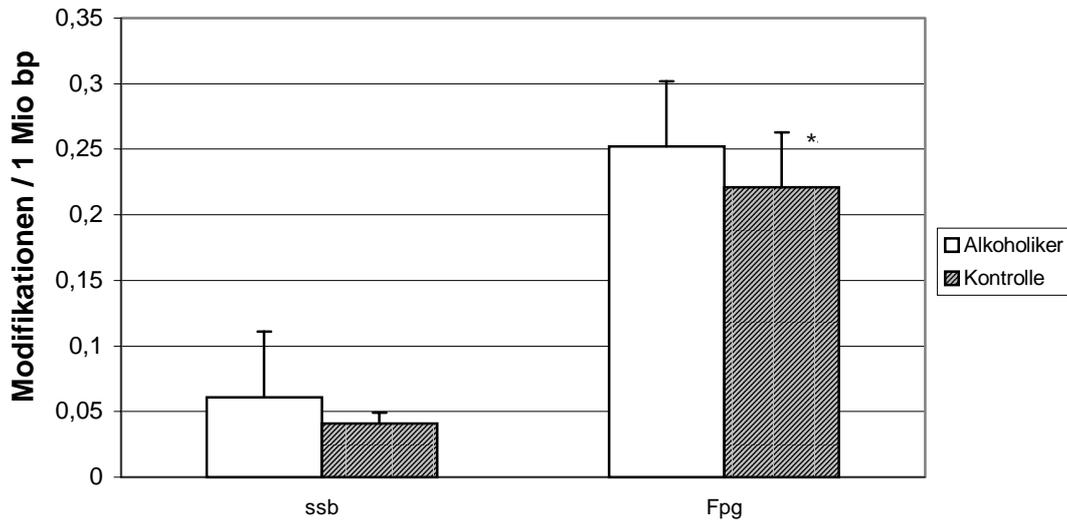


Abb. 3.62 Vergleich der oxidative DNA-Schäden in den Proben von Kontrollpersonen (n = 28) und Alkoholikern (n = 32), *: $p < 5\%$.

In Abbildung 3.63 sind die zum Zeitpunkt t_0 gemessenen Blutalkoholkonzentrationen der Alkoholiker und der Kontrollen gegen den Fpg-sensitiven Modifikationen dargestellt. Dabei zeigte sich innerhalb der Alkoholiker mit zunehmenden Alkoholgehalt ein sinkender oxidativer DNA-Schaden. Allerdings verschwand dieser Zusammenhang wieder, wenn man die Kontrollpersonen (mit einer angenommenen Blutalkoholkonzentration von 0 mg/dl) mit einbezog. Ein mit steigendem akuten Alkoholspiegel sinkender DNA-Schaden würde für einen antioxidativen Effekt von Ethanol besonders in Konzentrationen größer 260 mg / dl sprechen. Allerdings zeigte sowohl Abb. 3.62 als auch Abb. 3.63, daß Alkoholiker, vermutlich aufgrund ihres durch chronischen Mißbrauch induzierten Leberschadens, einen höheren DNA-Schaden haben als Kontrollpersonen.

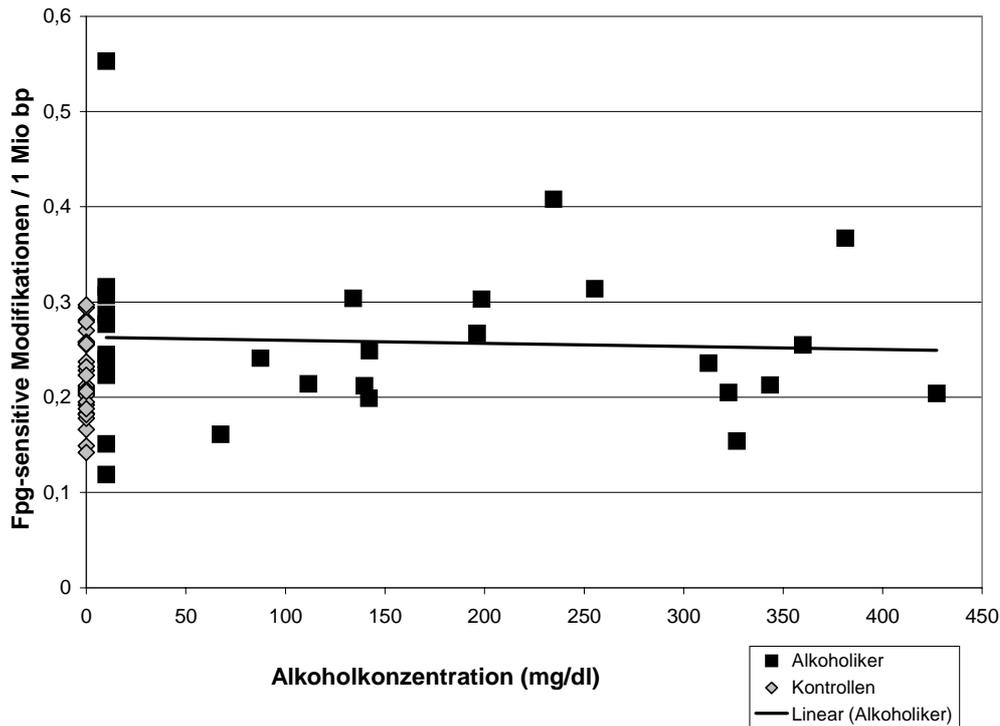


Abb.3.63 Korrelation der Alkoholkonzentration bei Aufnahme mit Fpg-sensitiven Modifikationen (lineare Regression nur durch die Punkte der Alkoholiker).

Wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben wurden von den Patienten im Verlauf der Entgiftung wiederholt Blutproben entnommen. Abbildung 3.64 zeigt die oxidative DNA-Schäden während dieses Zeitraumes. Sowohl die Einzelstrangbrüche (Daten nicht gezeigt) als auch die Fpg-sensitiven Läsionen der drei Meßpunkte unterschieden sich kaum. Der deutliche Unterschied zur Kontrollgruppe blieb aber bestehen, was für einen chronischen Schaden in der Alkoholikergruppe spricht. Betrachtet man die prozentuale Veränderung jeweils gegenüber dem Aufnahmezeitpunkt $t_0 = 100\%$ (Abb. 3.65), so zeigte sich zum Zeitpunkt t_1 eine signifikante Erhöhung der Einzelstrangbrüche auf 117,5 % und zum Zeitpunkt t_2 ein signifikanter Anstieg der Fpg-sensitiven Läsionen auf 109,5 % jeweils gegenüber t_0 . Darüberhinaus waren die Meßwerte für die drei Zeitpunkte bei beiden Parametern korreliert (Tab. 3.4).

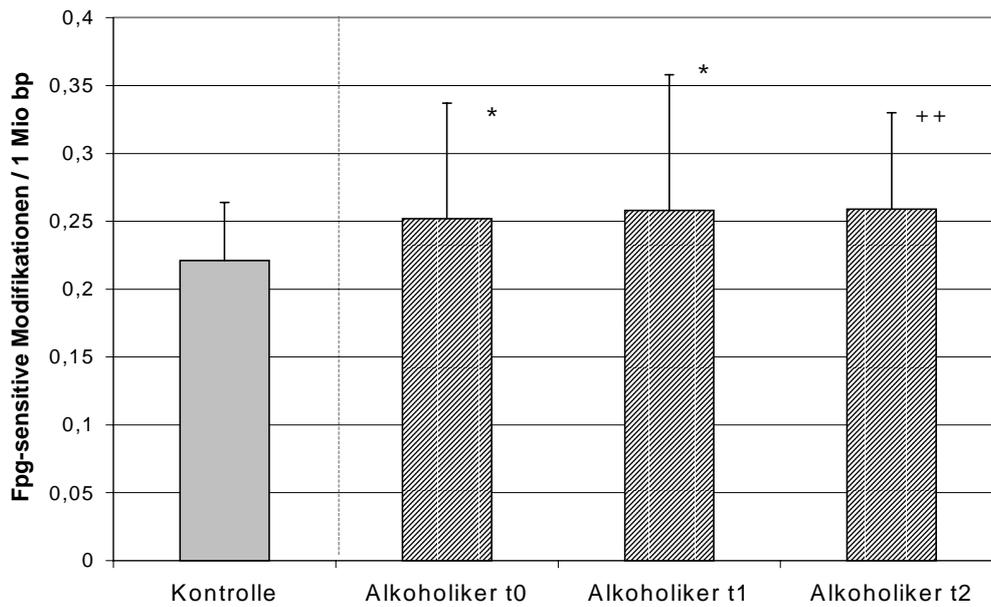


Abb. 3.64 Absolute Anzahl der Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen während der Entgiftung (n = 31) im Vergleich zu den Kontrollen (n = 28); t₀: Zeitpunkt der Aufnahme, t₁: während der Entgiftung, t₂: Zeitpunkt der Entlassung; *: p < 5%; ++: p < 1 %.

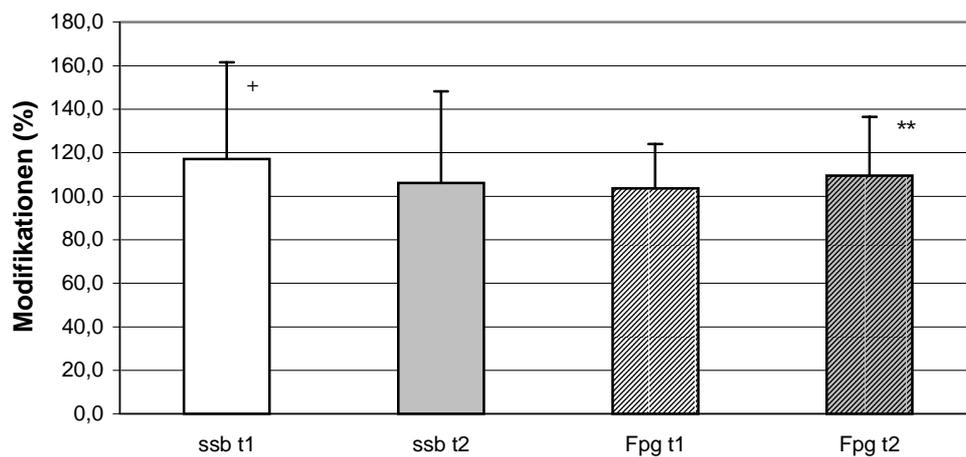


Abb. 3.65 Prozentuale Veränderung der Modifikationen während der Entgiftung. Mittelwerte gegenüber t₀ = 100 %, n = 31, +: p < 2,5 %, **: p < 0,5 % .

Der unabhängig aus Abb. 3.63 und Abb. 3.65 hervorgehende antioxidative Effekt wurde in Abb. 3.66 für die Entgiftungsphase noch einmal genau aufgeschlüsselt. Dafür wurden die Alkoholiker nach ihrem akuten Blutalkoholspiegel bei Aufnahme in drei Gruppen eingeteilt (Probanden ohne meßbaren Alkoholspiegel, Probanden mit einem Ethanolspiegel bis 260 mg / dl und Probanden mit einer Blutalkoholkonzentration über 260 mg / dl) und ihre individuelle Schadensveränderung bezüglich der Fpg-sensitiven Modifikationen während der Entgiftung dargestellt. Bei der Gruppe mit den höchsten Blutalkoholkonzentrationen und den niedrigsten Untergrundspiegeln bei Aufnahme erhöhte sich unter Alkoholentzug bei nahezu allen Probanden der oxidative DNA-Schaden (Teil E und F der Abb. 3.66). Somit scheint Ethanol in diesem Konzentrationsbereich antioxidative Eigenschaften zu besitzen, die aber vermutlich nicht langfristig durch eine Alkohol-bedingte Leberschädigung bestehen kann.

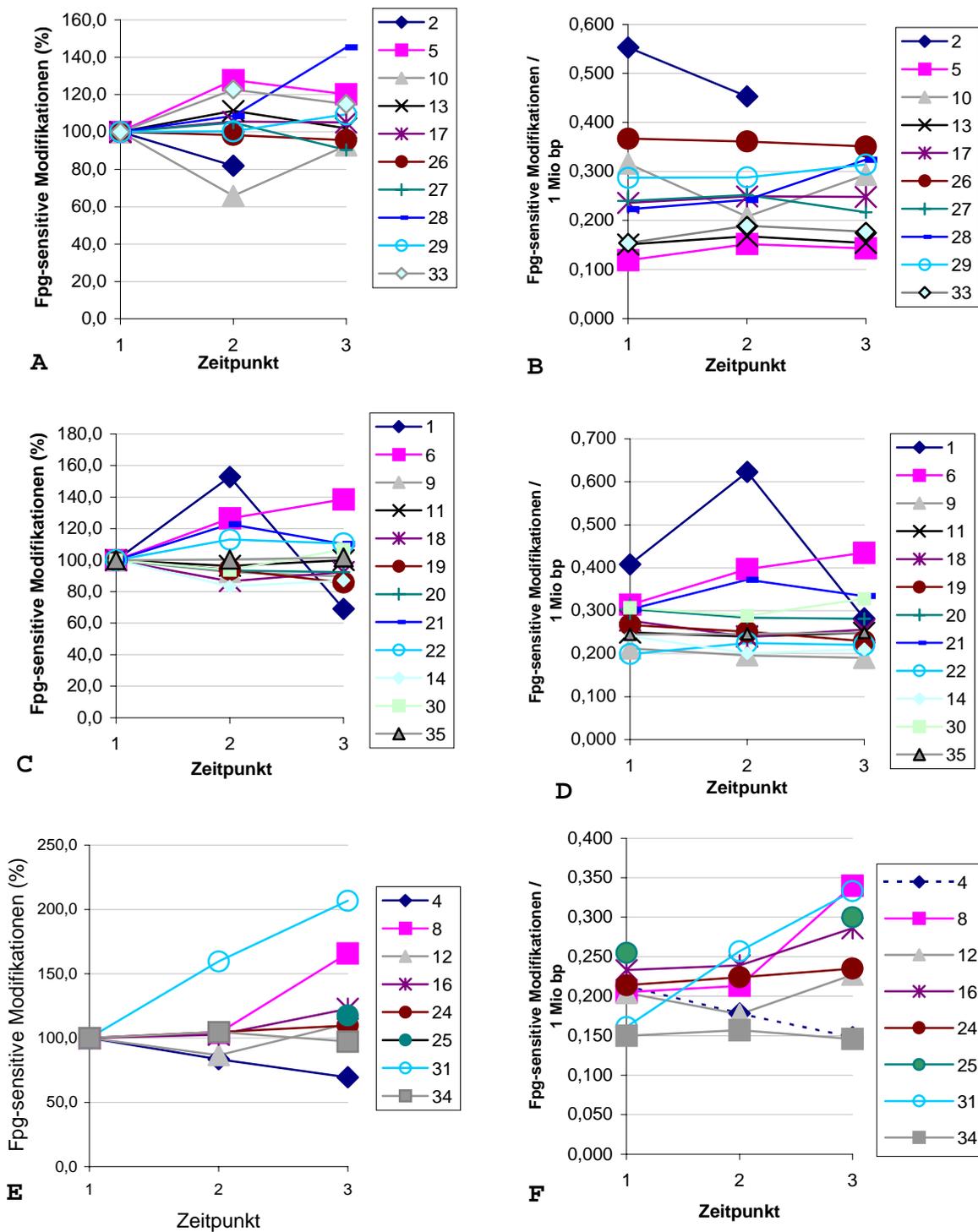


Abb. 3.66 Fpg-sensitive Modifikationen zu den drei Meßzeitpunkten (1: t_0 , 2: t_1 und 3: t_2) in der Alkoholikergruppe. A und B: Alkoholiker ohne meßbare Blutalkohol-konzentration, C und D: Alkoholiker mit einer Blutalkoholkonzentration von bis zu 260 mg / dl, E und F: Alkoholiker mit einer Blutalkoholkonzentration von über 260 mg / dl bei Einlieferung. A, C, E: relative Verängerung gegenüber t_0 ; B, D, F: Absolute Meßwerte.

3.8.3 Vergleich der sonstigen Blutparameter zwischen Kontroll- und Alkoholikergruppe

Tab. 3.1 zeigt als Übersicht die Mittelwerte aller Parameter, die in der Kontrollgruppe und in der Patientengruppe zum Zeitpunkt der Aufnahme (t_0) und der Entlassung (t_2) erfaßt wurden.

Parameter	Kontrollen	Alkoholiker t_0	Alkoholiker t_2
Alter (Jahre)	46,5 ± 6,9	44,7 ± 8,7	-
ssb	0,041 ± 0,008	0,061 ± 0,036	0,057 ± 0,024
Fpg	0,221 ± 0,043	0,252 ± 0,085	0,259 ± 0,071
Alkoholkonsum 90d (g)	674,7 ± 551,5	11930,1 ± 10483,0	-
Alkoholkonsum 30d (g)	174,4 ± 160,4	4739,7 ± 3388,0	-
Vitamin A (ng/ml)	850,0 ± 177,9	1022,4 ± 328,9	n.b.
Vitamin E (µg/ml)	12,7 ± 5,2	11,5 ± 4,6	n.b.
25-OH-Vitamin D (ng/ml)	12,6 ± 3,1	10,6 ± 7,8	n.b.
1,25-diOH-Vitamin D (pg/ml)	37,4 ± 10,3	35,2 ± 13,7	n.b.
Vitamin B1 (ng/ml)	73,8 ± 12,1	61,0 ± 18,4	n.b.
Vitamin B2 (ng/ml)	264 ± 34	235 ± 48	n.b.
Vitamin B6 (ng/ml)	44,3 ± 32,9	33,4 ± 22,6	n.b.
CDT (%)	3,48 ± 0,77	10,09 ± 5,35	n.b.
TG (mg/dl)	211,2 ± 155,2	165,1 ± 101,1	128,3 ± 36,0
Cholesterin (mg/dl)	210,6 ± 37,2	215,3 ± 64,7	174,0 ± 53,0
HDL (mg/dl)	51,2 ± 10,7	82,7 ± 26,1	55,5 ± 30,6
LDL (mg/dl)	125,7 ± 34,6	99,5 ± 59,2	92,8 ± 27,8
Ri-Index	2,54 ± 0,8	1,32 ± 0,83	2,1 ± 1,0
Leukozyten/nl	6,4 ± 1,5	8,6 ± 3,5	7,92 ± 2,5
Ery's /pl	5,1 ± 0,3	4,62 ± 0,48	4,34 ± 0,36
Hb (g/dl)	15,3 ± 1,2	15,0 ± 1,6	17,5 ± 18,1
HK (%)	44,2 ± 3,0	44,1 ± 4,6	41,8 ± 3,8
MCV (fl)	86,6 ± 3,1	95,5 ± 6,1	96,5 ± 6,5
MCH (pg)	29,9 ± 1,6	32,5 ± 2,3	32,7 ± 2,1
MCHC (g/dl)	34,5 ± 1,2	34,0 ± 0,9	33,9 ± 0,8
EVB (%)	13,0 ± 0,7	13,8 ± 1,7	13,6 ± 1,7
Thromb /nl	231,0 ± 49,7	219,5 ± 84,8	300,2 ± 144,0
MTV (fl)	8,9 ± 1,1	8,38 ± 0,92	8,6 ± 0,8
Neutrophile (%)	59,2 ± 8,2	66,3 ± 12,0	63,2 ± 9,2
Lymphozyten (%)	31,7 ± 6,8	25,5 ± 11,7	25,0 ± 7,1
Monozyten (%)	5,7 ± 1,0	5,6 ± 2,1	8,1 ± 3,1
Eosinophile (%)	2,9 ± 2,2	2,0 ± 1,7	2,8 ± 3,0
Basophile (%)	0,7 ± 0,4	0,7 ± 0,4	0,9 ± 0,7
GOT (U/l)	24,5 ± 8,1	78,2 ± 46,2	44,4 ± 31,6
GPT (U/l)	30,7 ± 12,3	55,9 ± 33,3	62,1 ± 63,3

GLDH (U/l)	4,9 ± 3,3	26,0 ± 27,5	17,1 ± 45,4
AP (U/l)	177,4 ± 49,4	234,5 ± 95,8	206,4 ± 71,8
GGT(U/l)	30,3 ± 20,7	248,4 ± 334,9	208,3 ± 184,3
LDH (U/l)	n.b.	445 ± 152	426,0 ± 14,0
Natrium (mmol/l)	139,9 ± 1,5	139,6 ± 4,2	141,2 ± 3,0
Kalium (mmol/l)	4,1 ± 0,3	4,1 ± 0,5	4,2 ± 0,4
Calcium (mmol/l)	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,43 ± 0,13
Magnesium (mmol/l)	0,83 ± 0,06	0,82 ± 0,07	0,86 ± 0,03
Chlorid (mmol/l)	100,6 ± 1,9	99,1 ± 4,6	102,5 ± 0,7
CreatinK (U/l)	123,0 ± 56,8	226,1 ± 215,7	100,4 ± 67,1
Lipase (U/l)	44,9 ± 16,5	44,6 ± 19,3	34,3 ± 6,1
Creatinin (mg/dl)	1,1 ± 0,2	0,89 ± 0,13	0,94 ± 0,13
Harnstoff (mg/dl)	14,3 ± 3,9	8,8 ± 3,3	9,3 ± 3,3
Harnsäure (mg/dl)	5,6 ± 1,5	6,0 ± 1,3	5,0 ± 1,1
Phosphat (mg/dl)	3,6 ± 0,7	3,6 ± 0,8	3,7 ± 0,6
Gesamtbilirubin (mg/dl)	0,7 ± 0,3	0,8 ± 0,6	0,5 ± 0,4
Gesamteiweiß (g/l)	72,9 ± 2,5	74,2 ± 6,5	72,1 ± 5,7
Glucose (mg/dl)	87,2 ± 14,3	99,5 ± 21,4	98,8 ± 23,2
Quickwert (%)	99,2 ± 8,7	100,4 ± 14,8	99,6 ± 16,2
aktiviertes PTT (sec)	30,6 ± 2,9	31,8 ± 5,3	34,9 ± 7,6
Thrombinzeit (sec)	16,9 ± 0,9	16,7 ± 1,4	15,6 ± 0,5
Fibrinogen (mg/dl)	258,3 ± 61,0	285,7 ± 92,0	413,1 ± 86,7
C-reaktives Protein (mg/l)	3,0 ± 2,4	5,5 ± 9,4	5,2 ± 5,7
Fe (µg/dl)	94,0 ± 23,2	151,1 ± 69,1	87,0 ± 37,4
Ferritin (ng/ml)	196,6 ± 192,5	473,0 ± 443,1	n.b.
Vitamin B12 (pg/ml)	437,2 ± 105,6	445,9 ± 159,5	n.b.

Tab. 3.1 Gemessene (Blut)Parameter der Kontrollen und der Patienten (n.b.: nicht bestimmt).

Vergleich man die in Tabelle 3.1 aufgeführten Mittelwerte zum Zeitpunkt t_0 mit Hilfe von Student's T-Tests, so ergaben sich für folgende Parameter signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Patientengruppe, die in den Abbildungen 3.67 bis 3.69 dargestellt sind:

- | | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| Fpg-sensitive Läsionen (p<5 %) | Vitamin A (p<0,5 %) |
| Vitamin E (p<0,5 %) | Folsäure (p<0,5 %) |
| Vitamin D (p<0,5 %) | Dihydroxy-Vitamin D (p<0,5 %) |
| Vitamin B ₁ (p<0,5 %) | Vitamin B ₂ (p<0,5 %) |
| Vitamin B ₆ (p<0,5 %) | GOT (p<0,5 %) |
| CDT (p<0,5 %) | HDL (p<0,5 %) |
| LDL (p<2,5 %) | RI-Index (p<0,5 %) |

Leukozyten (p<0,5 %)	Erythrozyten (p<0,5 %)
MCV (p<0,5 %)	MCH (p<0,5 %)
MCHC (p<5 %)	EVB (p<2,5 %)
MTV (p<2,5 %)	Neutrophile (p<0,5 %)
Lymphozyten (p<1 %)	Eosinophile (p<5 %)
GPT (p<0,5 %)	GLDH (p<0,5 %)
AP (p<0,5 %)	GGT (p<0,5 %)
Creatinin (p<0,5 %)	Harnstoff (p<0,5 %)
Eisen (p<2,5 %)	Ferritin (p<5 %)

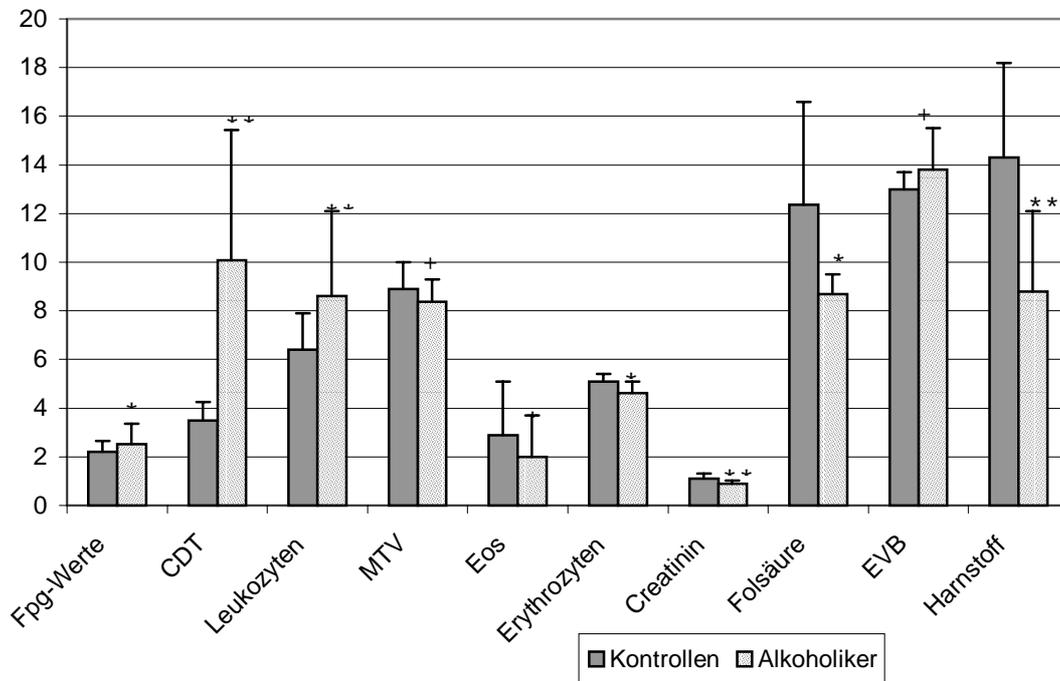


Abb. 3.67 Mittelwerte verschiedener, in den beiden Gruppen signifikant unterschiedlicher Parameter [Fpg-Werte: (Modifikationen/ 10^7 bp); CDT: (%); Leukozyten: (Anzahl/nl); MTV: (fl); Eosinophile: (%); Erythrozyten: (Anzahl/pl); Creatinin: (mg/dl); Folsäure: (ng/ml); EVB: (%); Harnstoff: (mg/dl)].

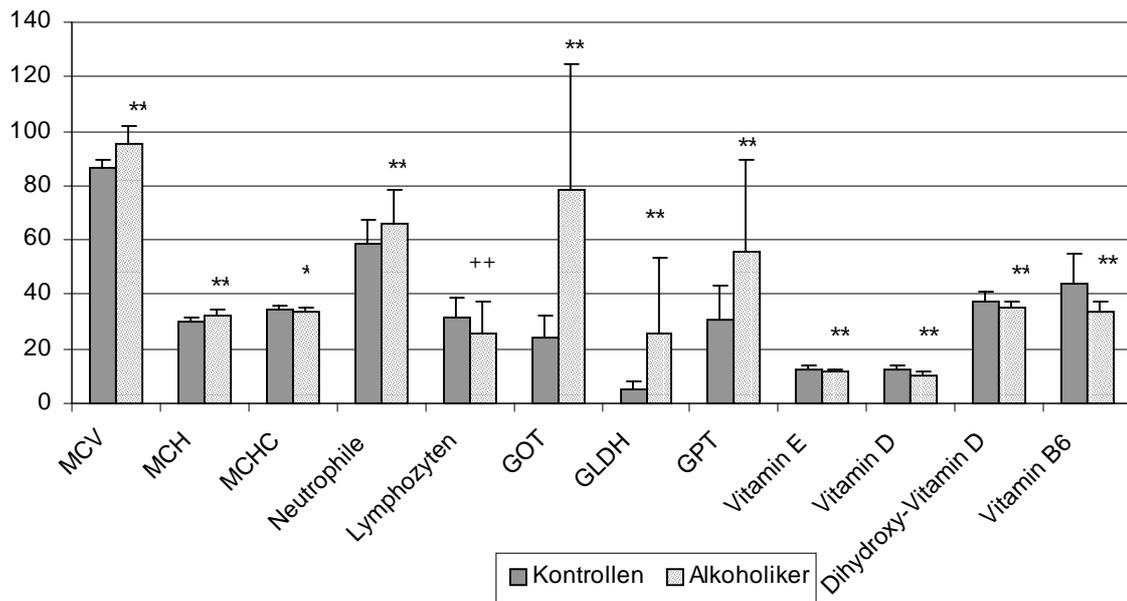


Abb. 3.68 Mittelwerte verschiedener, in den beiden Gruppen signifikant unterschiedlicher Parameter [MCV: (fl); MCH: (pl); MCHC: (g/dl); Neutrophile: (%); Lymphozyten: (%); GOT: (U/l); GLDH: (U/l); GPT: (U/l); Vitamin E: ($\mu\text{g/ml}$); Vitamin D: (ng/ml); Dihydroxy-Vitamin D: (pg/ml); Vitamin B₆: (ng/ml)].

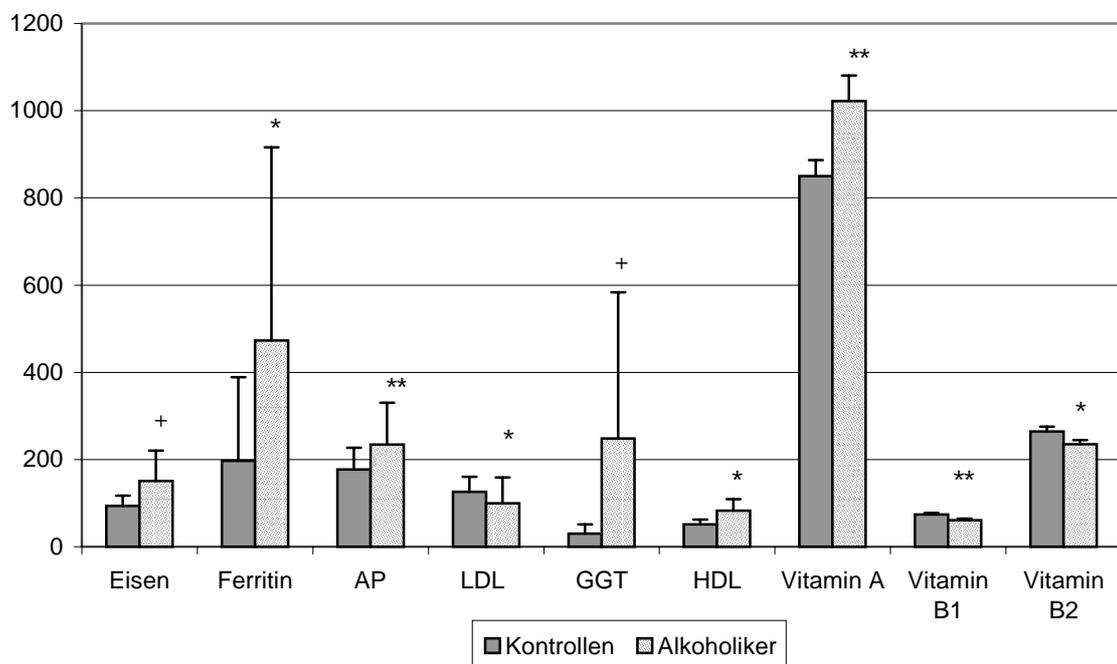


Abb. 3.69 Mittelwerte verschiedener, in den beiden Gruppen signifikant unterschiedlicher Parameter [Eisen: ($\mu\text{g/dl}$); Ferritin: (ng/ml); AP: (U/l); LDL: (mg/dl); GGT: (U/l); HDL: (mg/dl); Vitamin A: (ng/ml); Vitamin B₁: (ng/ml); Vitamin B₂: (ng/ml)].

3.8.4 Korrelationen der Blutparameter nach Pearson

Setzt man den Ethanolkonsum mit den DNA-Schäden zum Zeitpunkt der Aufnahme (t_0) in Beziehung, so ergeben sich für einen Zeitraum von 90 Tagen vor Probennahme die Abbildungen 3.70 und 3.72 und für den Zeitraum von 30 Tagen die Abbildungen 3.71 und 3.73. Nach Pearson korrelierte über alle Probanden die Anzahl der Einzelstrangbrüche mit dem Alkoholkonsum über 90 Tage (Korrelation: 0,345 / Signifikanz: 0,009 / n: 56) und über 30 Tage (0,359 / 0,007 / 56), während bei den Fpg-sensitiven Läsionen ein solcher Zusammenhang nicht erkennbar war. Dies ist zum Teil durch die akuten antioxidativen Effekte des Ethanols (Abb. 3.63) bedingt. Eine stärkere, aber immer noch nicht signifikante Korrelation ergibt sich für die Alkoholiker wenn die Fpg-sensitiven Modifikationen zum Zeitpunkt t_1 oder t_2 mit dem längerfristigen Alkoholkonsum in Beziehung gesetzt werden (Abb. 3.74 und 3.75).

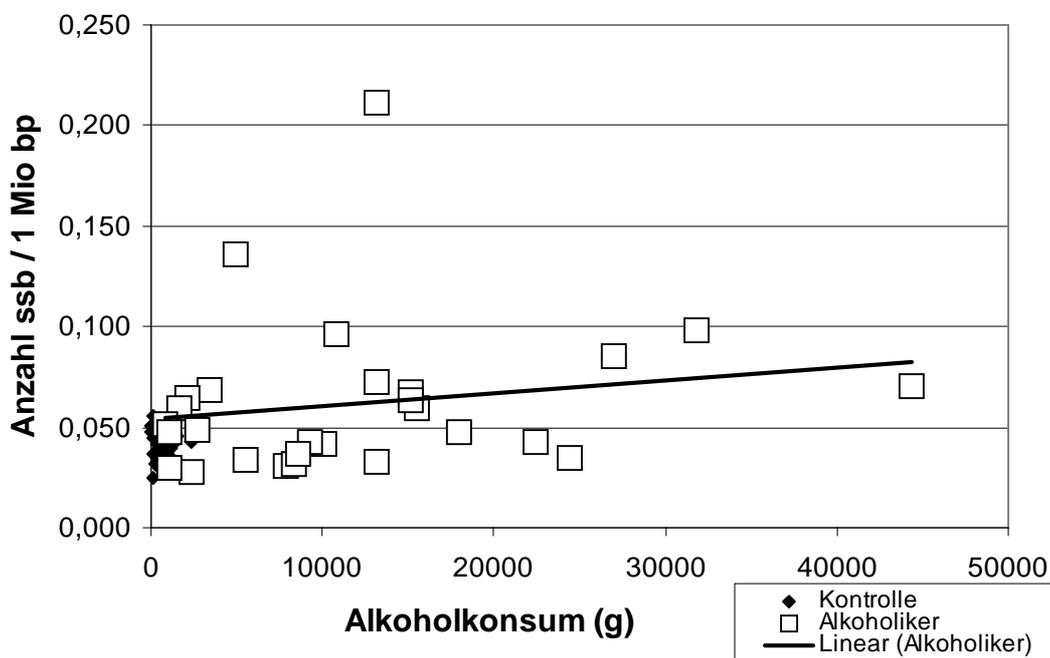


Abb. 3.70 Korrelation des Alkoholkonsums über 90 Tage vor Probenaufnahme mit der Anzahl der Einzelstrangbrüche in Alkoholikern und Kontrollpersonen zum Zeitpunkt der Aufnahme, n = 56.

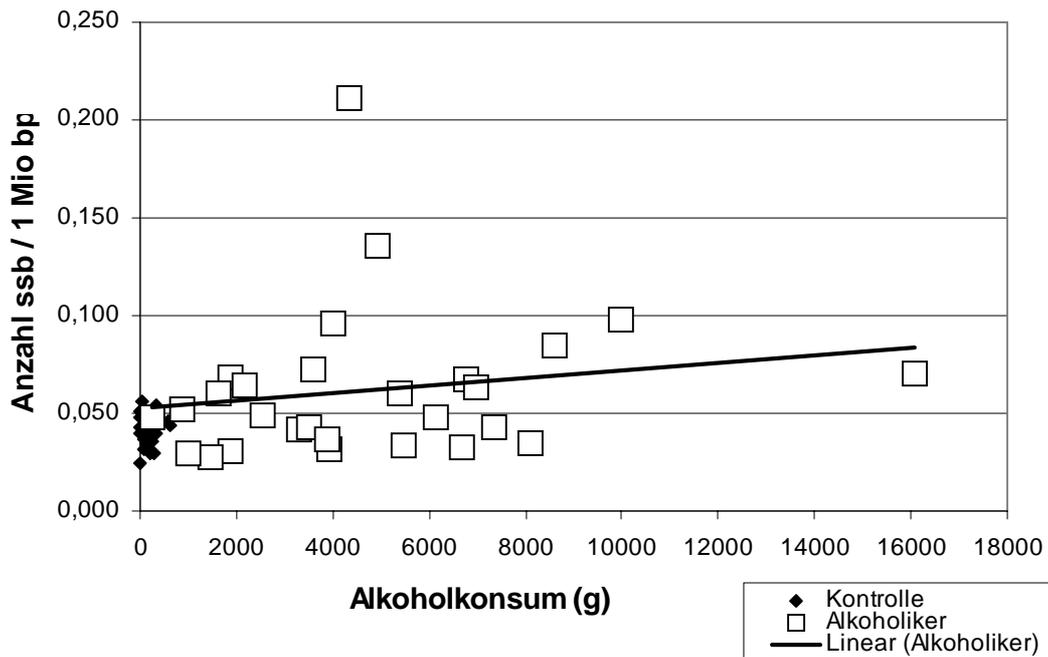


Abb. 3.71 Korrelation des Alkoholkonsums über 30 Tage vor Probennahme mit der Anzahl der Einzelstrangbrüche in Alkoholikern und Kontrollpersonen zum Zeitpunkt der Aufnahme, n = 56.

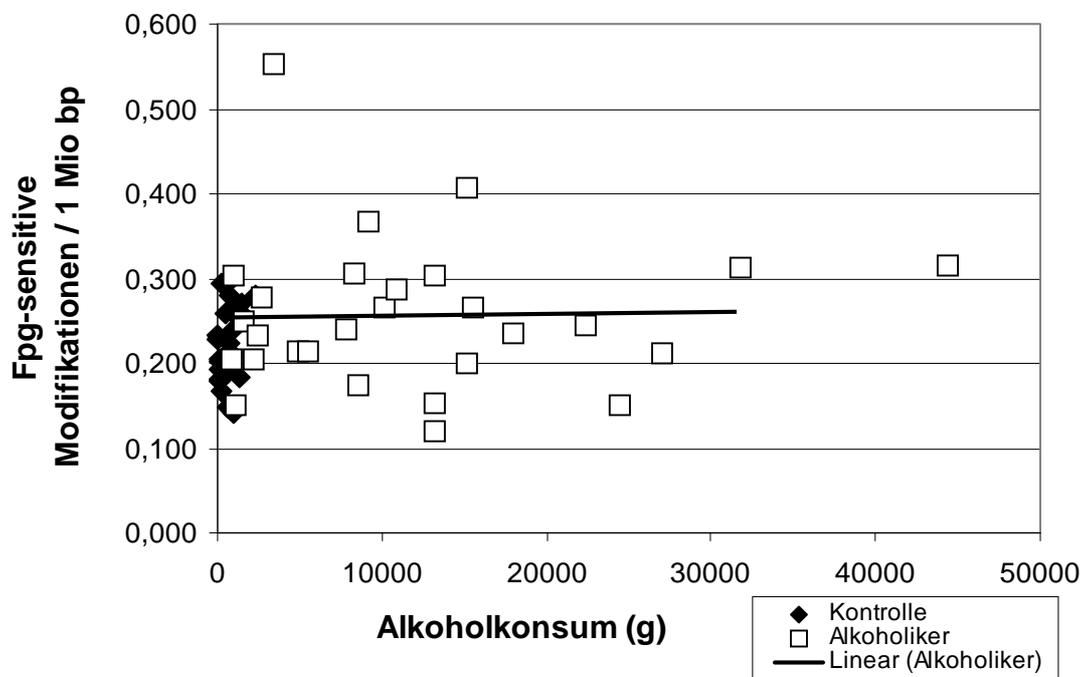


Abb. 3.72 Korrelation des Alkoholkonsums über 90 Tage vor Probennahme mit den Fpg-sensitive Modifikationen in Alkoholikern und Kontrollpersonen zum Zeitpunkt der Aufnahme, n = 56.

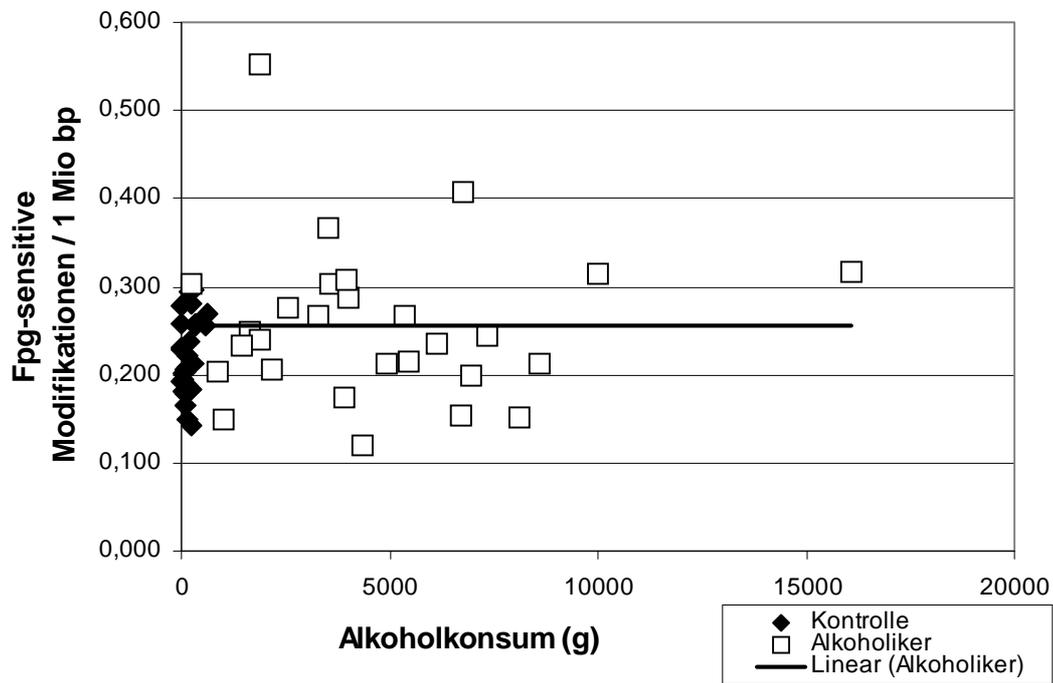


Abb. 3.73 Korrelation des Alkoholkonsums der letzten 30 Tage vor Probennahme mit den Fpg-sensitive Modifikationen in Alkoholikern und Kontrollpersonen zum Zeitpunkt der Aufnahme, $n = 56$.

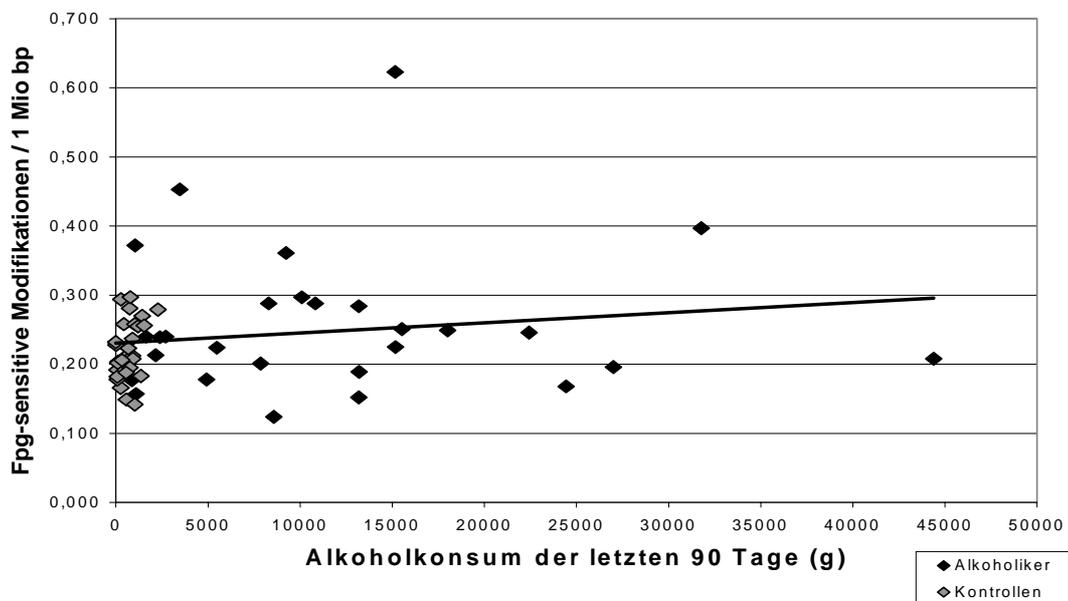


Abb. 3.74 Korrelation der Fpg-sensitiven Modifikationen mit dem Alkoholkonsum; Kontrollen Werte vom Zeitpunkt t_0 und für Alkoholiker zum Zeitpunkt t_1 , ($n = 28$).

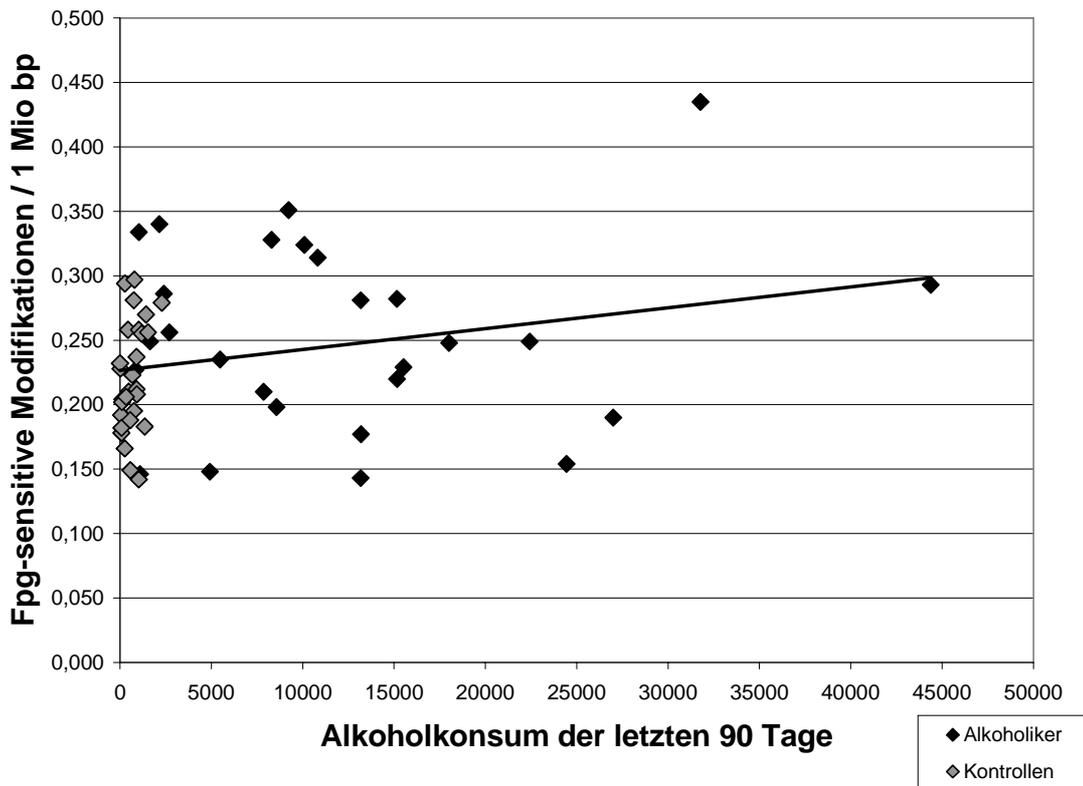


Abb. 3.75 Korrelation der Fpg-sensitiven Modifikationen mit dem Alkoholkonsum; Kontrollen Werte vom Zeitpunkt t_0 und für Alkoholiker zum Zeitpunkt t_2 , ($n = 28$).

Führt man mit den in Tabelle 3.1 aufgeführten Werten für jede Gruppe eine Korrelationsanalyse nach Pearson durch, so ergaben sich für die in der Studie erfassten Vitamine (A, E, D, B₁, B₂, B₆, B₁₂) keine signifikante Korrelationen mit der Anzahl der Einzelstrangbrüche oder mit der Anzahl der Fpg-sensitiven Modifikationen. Alle Korrelationen mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,050$, die sich innerhalb der Kontrollgruppe rein rechnerisch fanden, sind in Tabelle 3.2 dargestellt, die der Patientengruppe in Tabelle 3.3.

Parameter 1	Parameter 2	Korrelation	Signifikanz	Probenzahl n
Vitamin E	Vitamin B2	0,782	0,013	9
Vitamin E	Vitamin B6	0,782	0,013	9
Vitamin E	Folsäure	0,974	0,000	9
Vitamin B2	Vitamin B6	0,772	0,015	9
Vitamin B2	Folsäure	0,869	0,002	9
Vitamin B6	Vitamin B12	0,833	0,005	9
Vitamin B6	Folsäure	0,795	0,001	9
Vitamin A	Vitamin E	0,516	0,010	24
GOT	GPT	0,651	0,000	26
GOT	GLDH	0,518	0,007	26
GLDH	GGT	0,420	0,032	26
GGT	schwere Trinktage	0,562	0,002	28
GOT	GGT	0,512	0,008	26
GPT	GGT	0,423	0,031	26
GPT	ssb	-0,455	0,020	26
GLDH	schwere Trinktage	0,437	0,025	26
GPT	ssb	-0,455	0,02	26
T3	ssb	-0,783	0,022	8
Lipase	Fpg	-0,809	0,008	9
Phosphat	Fpg	0,792	0,011	9
TZ	Fpg	-0,847	0,008	8
T4	Fpg	0,750	0,032	8

Tab. 3.2 Statistisch signifikante Korrelationen (nach Pearson) der Blutparameter in der Kontrollgruppe.

Parameter 1	Parameter 2	Korrelation	Signifikanz	Probenzahl n
T ₀ Vitamin A	T ₀ Vitamin D	0,414	0,018	32
T ₀ Vitamin A	T ₀ Vitamin B6	-0,442	0,013	31
T ₀ Vitamin D	T ₀ dVitamin D	0,459	0,009	31
T ₀ Vitamin D	T ₀ Vitamin B12	-0,554	0,001	32
T ₀ dVitamin D	T ₀ Vitamin B12	-0,362	0,045	31
T ₀ Vitamin B1	T ₀ Folsäure	-0,518	0,004	29
T ₀ Vitamin B12	T ₀ Folsäure	0,439	0,013	31
T ₀ Vitamin A	T ₀ Vitamin E	0,410	0,020	32
T₀ ssb	T₁ ssb	0,674	0,000	31
T₀ ssb	T₂ ssb	0,552	0,001	31
T₁ ssb	T₂ ssb	0,582	0,001	31
T₀ Fpg	T₁ Fpg	0,814	0,000	31
T₀ Fpg	T₂ Fpg	0,636	0,000	31
T₁ Fpg	T₂ Fpg	0,604	0,000	30
T ₀ CDT	T ₀ GOT	0,404	0,033	28

T ₀ CDT	T ₀ GLDH	0,459	0,014	28
T ₀ MCV	T ₂ MCV	0,895	0,000	29
T ₀ GOT	T ₀ GPT	0,827	0,000	31
T ₀ GOT	T ₀ GLDH	0,714	0,000	31
T ₀ GLDH	T ₀ GGT	0,390	0,030	31
T ₀ GGT	Trinktage	0,395	0,041	27
T ₀ GOT	T ₀ AP	0,389	0,031	31
T ₀ GPT	T ₀ GLDH	0,597	0,000	31
T ₀ GLDH	T ₂ GLDH	0,497	0,006	29
T ₀ AP	T ₂ AP	0,730	0,000	29
T ₀ GGT	T ₂ GGT	0,598	0,001	29
T ₂ GOT	T ₂ GPT	0,855	0,000	30
T ₂ GOT	T ₂ GLDH	0,823	0,000	30
T ₂ GOT	T ₂ AP	0,528	0,003	30
T ₂ GOT	T ₂ GGT	0,625	0,000	30
T ₂ GPT	T ₂ GLDH	0,916	0,000	30
T ₂ GPT	T ₂ AP	0,376	0,041	30
T ₂ GPT	T ₂ GGT	0,542	0,002	30
T ₂ GLDH	T ₂ AP	0,420	0,021	30
T ₂ GLDH	T ₂ GGT	0,518	0,003	30
T ₂ AP	T ₂ GGT	0,519	0,003	30
T ₂ MCV	T ₂ ssb	-0,371	0,047	29
T ₁ ssb	GTM 90	0,440	0,019	28
T ₁ ssb	GTM 30	0,467	0,012	28
T ₁ ssb	GTM 60	0,397	0,036	28
T ₁ ssb	GTM 90	0,407	0,032	28
T ₀ GGT	GTM 90	0,731	0,000	27
T ₀ MCV	Trinktage	0,525	0,005	27
T ₀ MCV	schwere Trinktage	0,393	0,043	27
T ₀ GGT	schwere Trinktage	0,396	0,041	27
T ₀ Cl	T ₀ ssb	-0,412	0,026	29
T ₀ HS	T ₀ ssb	0,505	0,004	31
T ₀ Gluc	T ₀ ssb	0,543	0,001	32
T ₂ HDL	T ₂ ssb	-0,981	0,019	4
T ₂ RI	T ₂ ssb	0,996	0,004	4
T ₂ Leuko	T ₂ ssb	0,369	0,049	29
T ₂ MCV	T ₂ ssb	-0,371	0,047	29
T ₂ Throm	T ₂ ssb	0,434	0,019	29
T ₂ GEIW	T ₂ ssb	0,451	0,012	30
T ₂ PTT	T ₂ ssb	0,891	0,007	7
T ₀ MTV	T ₀ Fpg	0,358	0,048	31
T ₂ MTV	T ₂ Fpg	0,389	0,037	29
T ₂ GEIW	T ₂ Fpg	-0,374	0,042	30
T ₂ CRP	T ₂ Fpg	0,557	0,025	16

Tab. 3.3 Statistisch signifikante Korrelationen (nach Pearson) der Blutparameter in der Patientengruppe (alle Zeitpunkte).

Über die in den Tabellen 3.2 und 3.3 dargestellten Korrelationen hinaus gab es noch solche, die sowohl in den beiden Untergruppen also auch im gesamten Probandenkollektiv auftraten. Diese sind in Tabelle 3.4 aufgeführt und für die Beziehungen zwischen Vitamin A und Vitamin E, GOT und GPT und von GGT und Trinktage in den Abbildungen 3.74 bis 3.76 dargestellt.

Parameter 1	Parameter 2	Korrelation	Signifikanz	Probenzahl n
T ₀ Vitamin A	T ₀ Vitamin E	0,352	0,024	56
T ₀ GOT	T ₀ GPT	0,842	0,000	57
T ₀ GOT	T ₀ GLDH	0,781	0,000	57
T ₀ GLDH	T ₀ GGT	0,504	0,000	57
T ₀ GGT	Trinktage	0,461	0,000	55

Tab. 3.4 Korrelation von Blutparametern im Gesamtkollektiv

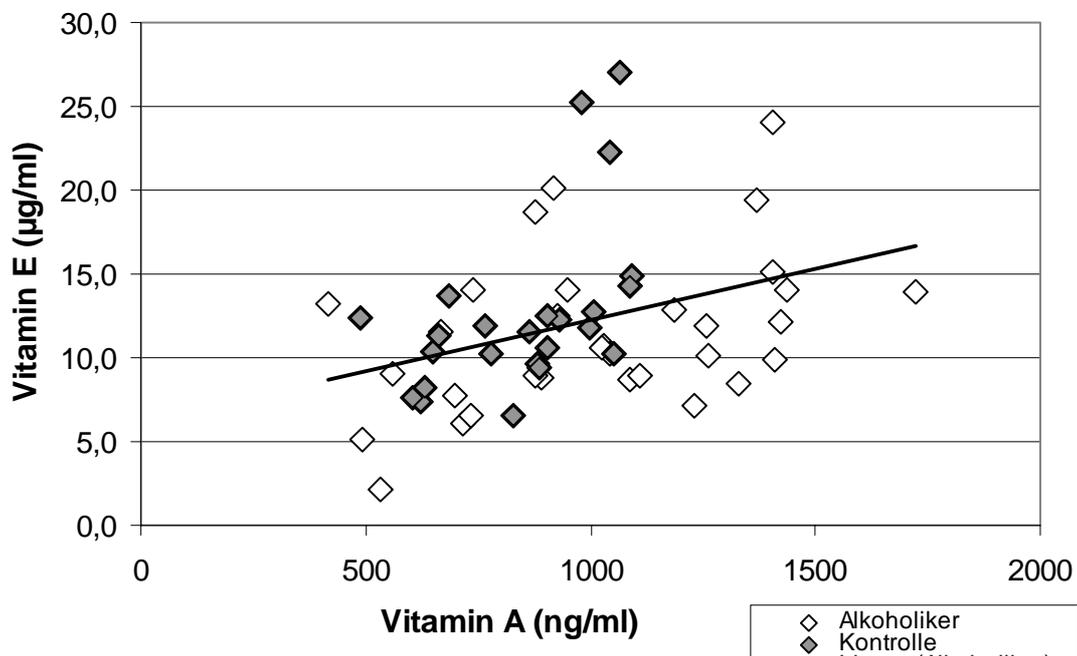


Abb. 3.74 Korrelation von Vitamin A- mit Vitamin E-Werten im Probandenkollektiv.

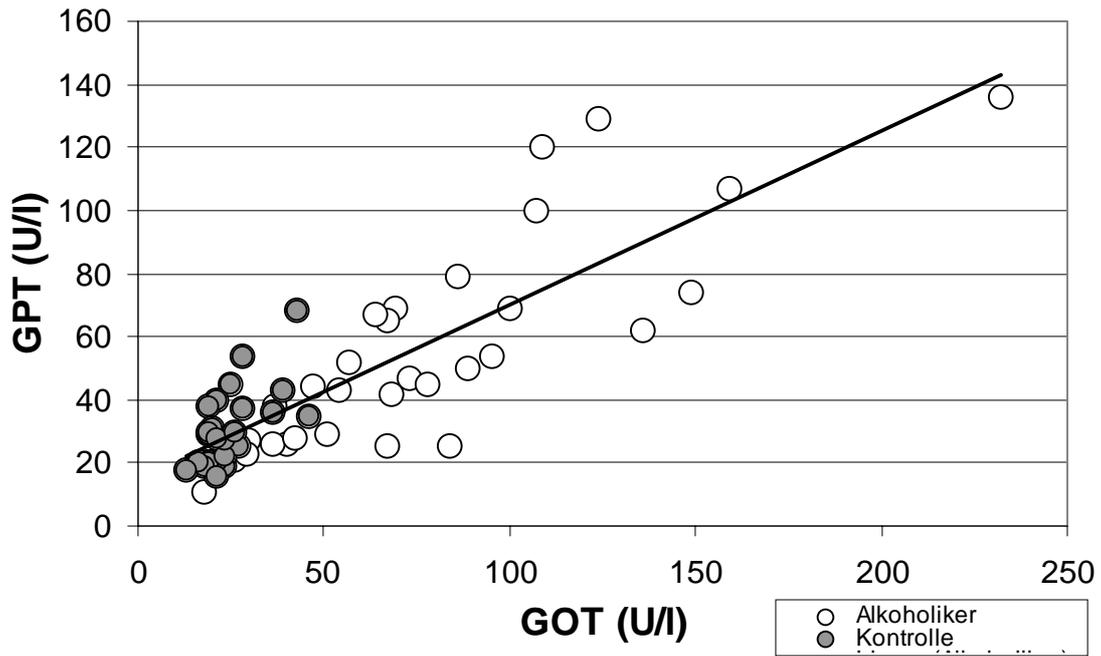


Abb. 3.75 Korrelation von GOT- mit GPT-Werten im Probandenkollektiv.

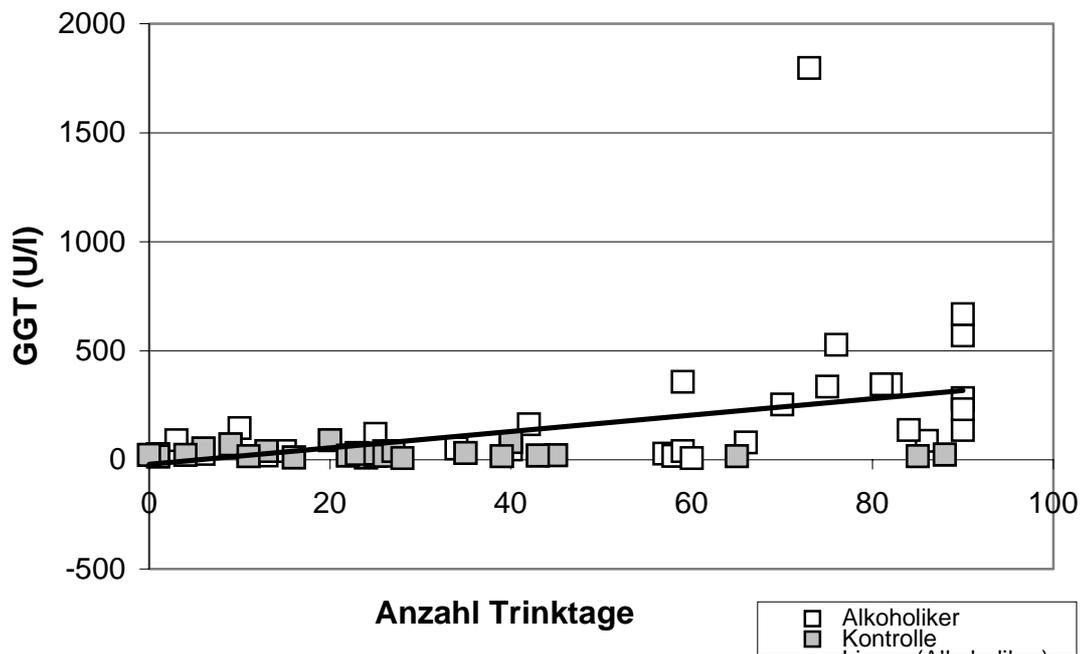


Abb. 3.76 Korrelation von GGT-Werten mit der Anzahl der Trinktage (innerhalb von 90 Tagen vor der Blutentnahme) im Probandenkollektiv.

3.8.5 Einfluß der Lagerzeit auf den DNA-Schaden

Um den Einfluß der Lagerzeit auf den DNA-Schaden in den Lymphozytenproben zu untersuchen, wurden alle Einzeluntersuchungen mit ihrer jeweiligen Lagerungszeit und den Fpg-sensitiven Modifikationen bzw. der Zahl der Einzelstrangbrüchen in Abbildungen 3.77 bzw. 3.78 dargestellt. Dabei zeigte sich bei den Fpg-sensitiven Läsionen kein Zusammenhang zur Lagerzeit, womit eine Vermessung der Lymphozytenproben unabhängig von der Lagerdauer erfolgen kann. Bei den Einzelstrangbrüchen war eine leichte Zunahme mit längerer Lagerzeit zu beobachten.

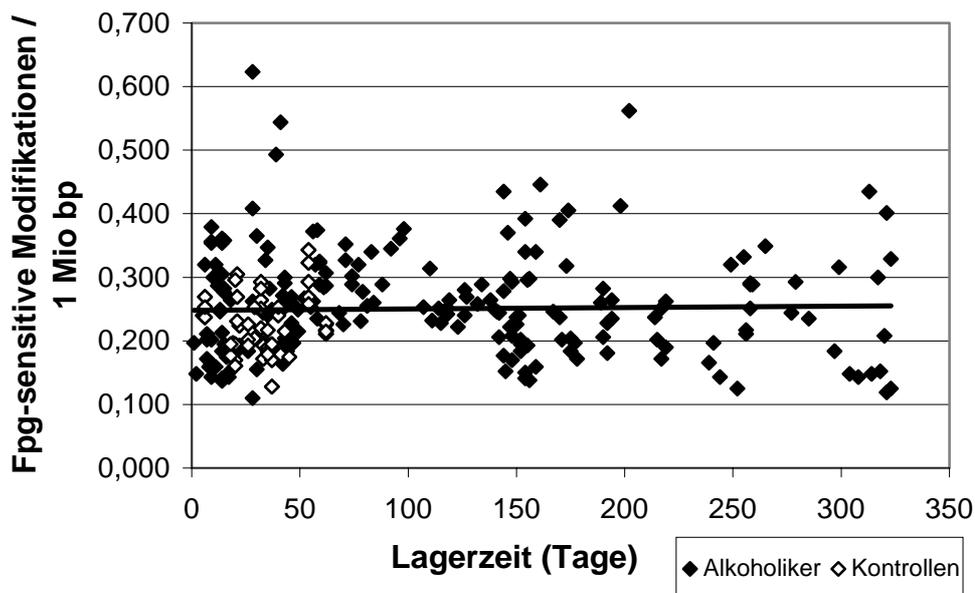


Abb. 3.77 Korrelation von der Lagerzeit der Proben mit den Fpg-sensitiven Modifikationen (für alle Einzelmessungen aller Probanden).

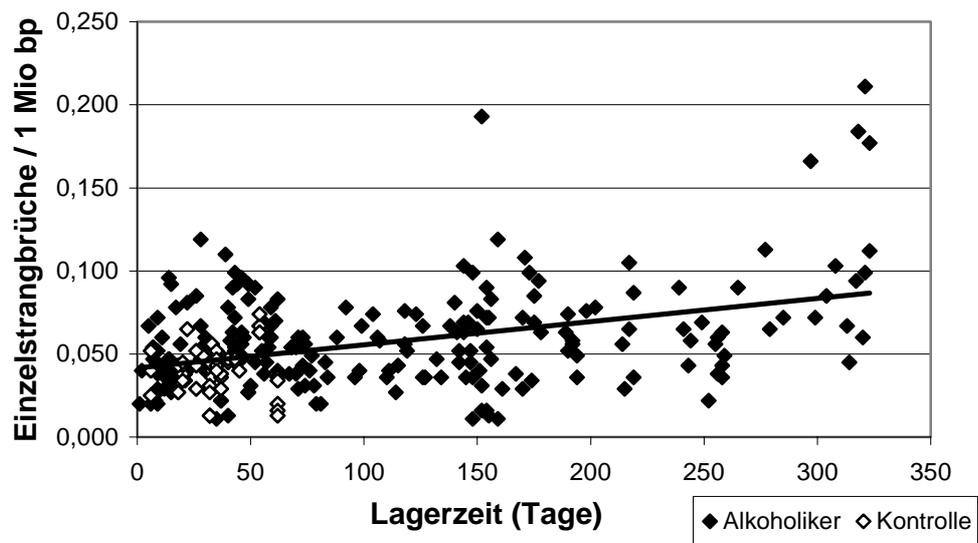


Abb. 3.78 Korrelation von der Lagerzeit der Proben mit der Anzahl der Einzelstrangbrüche (für alle Einzelmessungen aller Probanden).

4 Diskussion

4.1 Wirkung von Vitamin C auf den oxidative DNA-Schaden in Zellkultur und *in vivo*

In dieser Arbeit wurde der Einfluß von Vitamin C auf eine DNA-Schädigung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. Obwohl der Hamster nicht zu den Spezies mit Mangel an L-Gulonolacton-Oxidase gehört, findet sich in routinemäßig kultivierten AS52-Zellen nur eine sehr niedrige Konzentration an Ascorbinsäure (Abb.3.1). Der Gehalt kann aber effektiv innerhalb von 2 h durch Supplementierung des Zellkulturmediums mit für den Menschen physiologischen Konzentrationen von 50 und 100 µM Vitamin C erhöht werden (Abb. 3.1). Auch die Resorption einer oralen Gabe von 1 g Ascorbinsäure aus dem Gastrointestinal-Trakt ins Blut erfolgt rasch und erhöht innerhalb von 1 h den Plasmaspiegel beim Menschen (Abb. 3.18). Pharmakokinetische Untersuchungen zeigen zwar eine dosisabhängige Reduktion der Resorptionsquote von Ascorbinsäure (Mutschler *et al.*, 2001), doch auch in allen früheren Studien führte jede orale Dosis zu einer Erhöhung des Vitamin C-Plasmaspiegels (Vojdani *et al.*, 2000; Jacobson *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1998).

Bei der Bestimmung des Untergrundspiegels an oxidativen DNA-Schäden in AS52-Zellen ergab sich keine Veränderung durch eine Präinkubation mit Ascorbinsäure in einem Konzentrationsbereich bis 1 mM (Abb. 3.2). Frühere Untersuchungen im Arbeitskreis zeigten, dass bei höheren Konzentrationen (10 und 20 mM) der oxidative Schadens zunimmt, also eine pro-oxidative Wirkung von Vitamin C zu beobachten ist (Will *et al.*, 1999). In anderen *in vitro*-Untersuchungen an isolierter DNA oder an Zellkernen fand sich ein pro-oxidativer Effekt von Vitamin C nur in Gegenwart von zusätzlichen Metallionen, so daß ROS über eine Fenton-Reaktion generiert werden konnten (vgl. Kapitel 1.1 und 1.2) und dadurch DNA-Schäden möglich waren (Drouin *et al.*, 1996 ; Fischer-Nielsen *et al.*, 1992; Hu *et al.*, 1997). Bei *in vitro*-Inkubation für 2 h von humanen Lymphozyten mit Ascorbinsäure erhöhte sich die Anzahl der Einzelstrangbrüche ab einer Konzentration von 500 µM, während sich die Fpg-sensitiven Modifikationen nicht veränderten (Abb. 3.26). In der Literatur wird von einem Effekt auf Einzelstrangbrüche unter diesen Bedingungen bereits ab einer Konzentration von 200 µM Vitamin C berichtet (Green *et al.*, 1994). Weiterhin fiel auf, daß 100 µM Vitamin C - eine nicht DNA-schädigende Dosis - einen signifikanten

Einfluß auf die Bildung von Mikrokerne hatte (Abb. 3.7), welcher bei 50 µM noch nicht auftrat.

Bei exogen induzierten DNA-Schäden war Ascorbinsäure in der Lage, den durch sichtbares Licht induzierten Schaden signifikant und den durch UVB hervorgerufenen nicht signifikant zu verhindern (Abb. 3.3 und Abb. 3.5). Hier wirkte Ascorbinsäure also protektiv. Ähnliches fanden auch andere Arbeitsgruppen. Diese fanden einen antioxidativen Effekt von Ascorbinsäure in Abwesenheit von Metallionen, durch den sowohl im zellfreien System (Fiala *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 1998) als auch in Zellkultur (Noroozi *et al.*, 1998, Fischer-Nielsen *et al.*, 1993, Pflaum *et al.*, 1998) die Bildung von 8-oxoG durch UV-Strahlung und andere Oxidantien verhindert werden konnte. Erstaunlicherweise zeigte Vitamin C aber gegenüber der Schädigung mit Photosensibilisator Ro 19-8022 und sichtbarem Licht keinen Schutzeffekt (Abb. 3.4), obwohl hier, genau wie bei Behandlung mit sichtbarem Licht, die Bildung von Singulett-Sauerstoff der schädigende Vorgang war. Möglicherweise können die hier entstehenden ROS nicht abgefangen werden oder sie werden in unmittelbarer Nähe der DNA gebildet, so daß eine Schadensverhinderung nicht möglich ist.

Betrachtet man die Mikrokernraten der genannten Behandlungen, so fanden sich hier protektive Effekte. Ascorbinsäure verhinderte die Mikrokerninduktion durch Photosensibilisator Ro 19-8022 und durch UVB, aber nicht die durch sichtbares Licht (Abb. 3.8, Abb. 3.9 und Abb.3.11). Dabei ließ sich dieser Schutzeffekt nicht auf eine Verhinderung des DNA-Schadens zurückführen, insbesondere nicht auf eine veränderte Induktion von Einzelstrangbrüchen, die für die Entstehung von Mikrokerneln normalerweise verantwortlich gemacht werden. Die Spiegel an Einzelstrangbrüchen waren in den bereits beschriebenen Bestimmungen des DNA-Schadens so niedrig, daß eine Beeinflussung weder ausgeschlossen noch nachgewiesen werden konnte. Nur bei der Schädigung mit UVB wurde eine Erhöhung der Einzelstrangbrüche erkennbar, die allerdings gegenläufig zu dem protektiven Effekt in Bezug auf die Mikrokerninduktion war. Die erhöhte Mikrokernrate durch die Behandlung mit 100 µM Vitamin C konnte ebenfalls nicht eindeutig auf eine Häufung von Einzelstrangbrüchen zurückgeführt werden. Genauso wenig läßt sich aus Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zur Bildung von Einzelstrangbrüchen durch Vitamin C auf einen Zusammenhang mit Mikrokerneln schließen. So wurden einmal in verschiedenen Zelltypen mit Hilfe des Comet Assay vermehrte Einzelstrangbrüche nach Vorbehandlung mit 25, 50 und

100 μM Ascorbinsäure gefunden (Singh, 1997) und andererseits mit derselben Technik in lymphoblastoiden Zellen ein protektiver Effekt durch 60 μM Vitamin C auf die Einzelstrangbrüche beobachtet (Sweetman *et al.*, 1997). Es bleibt also unklar, ob sich die Erhöhung der Mikrokernrate in AS52-Zellen durch Inkubation mit Ascorbinsäure auf eine erhöhte Bildung von Einzelstrangbrüchen zurückführen läßt.

Die Toxizitätsdaten weisen insgesamt auf einen eher protektiven Effekt von Ascorbinsäure hin. Die Substanz selbst war im gewählten Konzentrationsbereich nicht toxisch (Abb. 3.12) und verhinderte den zytotoxischen Effekt der Schädigung mit Photosensibilisator und Licht (Abb. 3.15). Da die Behandlung mit sichtbarem Licht auch bei höheren Dosen nicht toxisch war (Abb. 3.13), konnte hier keine Aussage zum Einfluß von Ascorbinsäure gemacht werden (Abb. 3.17). Dagegen wirkten sich die für eine Induktion oxidativer DNA-Schäden notwendigen Dosen von UVB derart gravierend auf das Überleben der Zellen aus, daß man nur kürzere Bestrahlungszeiten hierfür betrachten konnte. Bei einer Dosis von 550 J/m^2 konnte eine Präinkubation mit Vitamin C die Überlebensrate leicht erhöhen. Als Ursache für einen protektiven Effekt auf die Lebensfähigkeit wäre eine Membran-schützende Eigenschaft von Ascorbinsäure (Inhibition der Lipidperoxidation) denkbar. Ein Einfluß von Vitamin C auf die Bildung der Pyrimidindimere, die vermutlich maßgeblich für die Toxizität von UVB verantwortlich sind, kann ausgeschlossen werden, da diese Modifikationen durch direkte Anregung der DNA erzeugt werden.

In humanen Lymphozyten *in vivo* verursachte eine einmalige, orale Gabe von 1 g Vitamin C eine leichte Senkung der Fpg-sensitiven Modifikationen und hatte keinen Einfluß auf die Anzahl an Einzelstrangbrüchen (Abb. 3.24 und 3.25). Dies entspricht eher einem antioxidativen als einen pro-oxidativen Effekt von Ascorbinsäure. Betrachtet man andere Humanstudien, in denen der Einfluß von Vitamin C untersucht wurde, so überwiegen die antioxidativen Beobachtungen. Carr und Frei (1999) diskutierten in ihrem Übersichtsartikel insgesamt 44 Untersuchungen zum Effekt von Ascorbinsäure auf den DNA-Schaden, Lipidperoxidation und Proteinoxidation. Sie kamen zu dem Schluß, daß ein Vergleich der Studien aufgrund der unterschiedlichen Studiendesigns und Methodik schwierig sei, wobei aber die meisten Untersuchungen eine Senkung und nur wenige eine Erhöhung der Parameter zeigten (Carr *et al.*, 1999). Die Veröffentlichung von Podmore *et al.* zur pro-oxidativen Wirkung von Vitamin C hat für großes Aufsehen auch in der Regenbogenpresse gesorgt (Podmore *et al.*, 1998). In

diesem Artikel wurde über eine Erhöhung der 8-oxoA in peripheren Lymphozyten durch die Supplementierung mit Vitamin C berichtet und gleichzeitig von einer Senkung der 8-oxoG. Bei der Bewertung der Ergebnisse dieser Studie sind allerdings folgende Punkte zu beachten. Zum einen war in allen Probanden der Untergrundspiegel an Ascorbinsäure im Blut bereits sehr hoch, so daß kaum noch weitere Effekte durch eine Supplementation zu erwarten waren (Carr *et al.*, 1999, Levine *et al.*, 1998). Zum anderen ist die Bildung von 8-oxoA nicht von so großer Bedeutung für die Mutagenese wie 8-oxoG, da es im Vergleich seltener im Schädigungsprofil auftritt und im bakteriellen Testsystem auch eine 10 mal geringere Mutagenität aufweist (Prigent *et al.*, 1992). Außerdem wurde als Meßmethode GC/MS verwendet, welche durch Artefaktbildung bei der Aufarbeitung der Proben im Allgemeinen 10- bis 100-fach höhere Meßwerte ergibt als andere Methoden (Collins *et al.*, 1997). Auf diesen letzten Punkt ist die Arbeitsgruppe um Podmore in einer erneuten Analyse der gleichen Proben durch HPLC/ECD selbst eingegangen (Cooke *et al.*, 1998). Hier wurden zwar nur die 8-oxoG-Spiegel bestimmt und keine absoluten Schadenswerte genannt - ein direkter Vergleich zu der ersten Veröffentlichung ist also nicht möglich - doch fand sich auch hier eine Senkung des 8-oxoG-Spiegels. Darüberhinaus wurden auch Daten zur Ausscheidung von 8-oxoG im Urin mit der ELISA-Technik präsentiert (Carr *et al.*, 1999). Da sich hier nach längerer Vitamin C-Supplementation eine Erhöhung der Exkretion fand, schlossen die Autoren auf einen wenig ausgeprägten, preventiven Effekt auf die Bildung oxidativer DNA-Schäden und stattdessen auf eine Induktion der Reparatur von 8-oxoG durch Vitamin C. In Bezug auf die Veröffentlichung von Podmore *et al.* vermuten sie, daß diese Reparaturinduktion bei 8-oxoA nicht erfolgt und sich so keine Verringerung des Schadens ergibt. Die Gruppe um Barry Halliwell kam in ihrer Studie zur Supplementierung mit Ascorbinsäure und Eisen(II)sulfat zu einer ähnlichen Einschätzung (Rehman *et al.*, 1998). Zunächst zeigte sich hier eine Abhängigkeit der Spiegel an oxidativen DNA-Schäden von der Plasma-Vitamin C-Konzentration. In der Gruppe mit einem niedrigen Ausgangsspiegel an Ascorbinsäure ($< 50 \mu\text{M/l}$) sank der DNA-Schaden durch die Supplementierung, während in der Gruppe mit einem hohen Ausgangsplasmaspiegel ($> 72 \mu\text{M/l}$) an Vitamin C dieser durch die Supplementierung nicht mehr anstieg. Hier sank zwar ein Teil der DNA-Schäden, 8-oxoG und 8-oxoA, aber ein anderer, 5-Hydroxyhydantoin und Fapy-Guanosin, stieg im gleichen Ausmaß an. Da auch diese Studie auf GC/MS-Messungen

beruhte und es außerdem weder eine reine Eisen-, eine Placebo- noch eine Vitamin C-Gruppe gab, sind auch diese Daten umstritten. Allerdings ergab eine erneute Analyse der hier veröffentlichten Daten durch Carr und Frei eine negative Korrelation der Plasmakonzentration an Vitamin C und dem DNA-Schaden in Bezug auf 13 Modifikationen, unter denen sich 8-oxoG, 8-oxoA und Fapy-Guanin befanden (Carr *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu den oben beschriebenen *in vitro*-Daten, die einen pro-oxidativen Effekt von Ascorbinsäure in Kombination mit Eisen(II)-Ionen belegen, lassen die *in vivo*-Daten für die Cosupplementierung keinen negativen Einfluß erkennen. Das läßt sich durch eine mit der Vitamin C-Konzentration ansteigenden Transferrinsättigung erklären (Carr *et al.*, 1999), welche ein Auftreten von freien Eisenionen und somit auch mögliche Fentonreaktionen verhindert.

Da Raucher wie bereits beschrieben einen höheren DNA-Schaden und gleichzeitig niedrige Plasma-Vitamin C-Konzentrationen aufweisen (Fraga *et al.*, 1996), wurde in dieser Gruppe von Lee *et al.* der Effekt einer Ascorbinsäuresupplementation untersucht. Tatsächlich ließ sich durch die orale Gabe von Vitamin C der Spiegel an 8-oxoG in Lymphozyten verringern (Lee *et al.*, 1998). Auch Analysen des DNA-Schadens in Spermatozyten zeigten eine Abhängigkeit von der Vitamin C-Versorgung. So wurde durch eine Ascorbinsäure-arme Diät der DNA-Schaden erhöht und durch eine Supplementation signifikant erniedrigt. Wurden periphere Lymphozyten *ex vivo* mit H₂O₂ oder ionisierender Strahlung geschädigt und mit dem Comet Assay die Zahl der Einzelstrangbrüche bestimmt, so zeigte sich ebenfalls ein protektiver Effekt bei den mit Vitamin C behandelten Probanden gegenüber dieser Schädigungen (Anderson *et al.*, 1997; Green *et al.*, 1994; Panayiotidis *et al.*, 1997).

Zusammengefaßt ergibt sich aus den bereits veröffentlichten und eigenen Untersuchungen, daß Vitamin C antioxidative Eigenschaften besitzt, auch wenn diese nicht bei allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Behandlungen sichtbar wurden. Außerdem bleibt es fraglich, ob Ascorbinsäure neben der Schadensverhinderung auch die Reparatur von oxidativen Modifikationen induzieren kann und in wieweit die Plasma- oder Gewebekonzentration vor der Supplementation einen Einfluß auf das Ausmaß exogen induzierter DNA-Schäden hat. Worauf sich der pro-oxidative Effekt von Ascorbinsäure auf die spontane Mikrokernrate zurückführen läßt, bleibt ebenfalls unklar. Allerdings scheint es trotz dieses erhöhten Untergrundes eine Schutzwirkung vor weiteren exogenen Schädigungen zu geben, womit sich insgesamt wieder ein

antioxidativer Effekt ergibt. Es wäre also tatsächlich eine insgesamt protektive Wirkung als Summe aus anti- und pro-oxidativen Eigenschaften von Vitamin C denkbar (Halliwell, 1999).

Über die Beeinflussung des DNA-Schadens durch Ascorbinsäure hinaus wurde auch untersucht, in wieweit eine *ex vivo*-Schädigung humaner, peripherer Lymphozyten in Human-Studien bei der Aufarbeitung und Lagerung der Blutproben bzw. der isolierten Zellen verhindert werden kann. Dafür wurde Blutproben Katalase (315 U/ml) zugesetzt, um eine eventuelle Artefaktbildung z.B. im Sinne einer Fenton-Reaktion während der Zellisolierung und –aufarbeitung zu verhindern. Abb. 3.22 zeigt durch die Gegenüberstellung von Proben mit und Proben ohne Katalasezusatz, daß das Enzym einen Teil der Fpg-sensitiven Modifikationen verhindern konnte. Diese müssen während der Aufarbeitung entstanden sein, da andere Effekte, die eine Veränderung hervorrufen könnten wie z.B. eine Schadensreparatur, während des gleichen Zeitraumes nicht möglich waren. Ein weiterer Aspekt ist die Lagerung von isolierten Lymphozyten, die dadurch notwendig wurde, daß die Proben eines Individuums zwar zu verschiedenen Zeitpunkten genommen werden, aber gleichzeitig bzgl. ihres DNA-Schadens analysiert werden sollten. Der Vorgang des Einfrierens in fetalem Kälberserum mit DMSO (im Verhältnis 10:1) zeigte keine Veränderung des DNA-Schadens gegenüber der Analyse von nicht eingefrorenen Zellen des gleichen Probanden zum gleichen Zeitpunkt der Blutabnahme (Abb. 3.24). Erstaunlicherweise zeigte sich bei dem Vergleich der kryokonservierten Zellen kein Effekt des Katalase-Zusatzes (Abb. 3.23), was allerdings auch durch die sehr kleine Fallzahl der katalasefreien Proben bedingt sein könnte. Die Lagerungszeit hatte keinen Einfluß auf die Höhe des Fpg-sensitiven DNA-Schadens in kryokonservierten Lymphozyten und erhöhte die Zahl der Einzelstrangbrüche nur geringfügig (Abb. 3.76 und 3.77). Eine weitere Auffälligkeit ist in Abb. 3.21 dargestellt. Die Werte der Fpg-sensitiven Modifikationen schwankten deutlich zwischen verschiedenen Probanden und auch zwischen verschiedenen Proben ein- und desselben Probandens. Dies kann auf unterschiedliche körperliche Belastungen zurückgeführt werden, die der jeweiligen Probennahme vorausgingen. Bei der Höhe des Schadens spielt die jeweilige Ernährungsweise, also z.B. eine vitaminreiche Ernährung, aber auch die Umsetzung von Sauerstoff eine Rolle. So wurde z.B. festgestellt, daß bei erhöhter körperlicher Anstrengung wie Sporttraining auch der DNA-Schaden aufgrund von vermehrter Bildung von ROS zunimmt (Huang *et al.*, 2000; Niess *et al.*, 1996).

Darüberhinaus stieg der DNA-Schaden in Blutzellen von Probanden, die mit hyperbarem Sauerstoff behandelt wurden an (Dennog *et al.*, 1999), während humane Lungen-Zellen, die unter Vitamin C-Behandlung einer Hypoxie ausgesetzt wurden, eine niedrigere Rate an DNA-Strangbrüchen (Zhang *et al.*, 2001) zeigten. Rauchen ist ein weiterer Faktor, der im Vergleich zu Nichtrauchern zu einem höheren DNA-Schaden führt (Fraga *et al.*, 1996).

4.2 Einfluß von MMPDCD auf den oxidativen DNA-Schaden

MMPDCD wurde als Derivat von Carazostatin, eines Alkaloids aus *Streptomyces*, welches in *in vitro* Versuchen antioxidative Wirkung hatte (Iwatsuki *et al.*, 1993), auf seine gentoxischen Eigenschaften hin untersucht. Dabei zeigte es einen dosisabhängigen, senkenden Effekt auf die Untergrundspiegel Fpg-sensitiver Modifikationen, während es die Anzahl Einzelstrangbrüche leicht erhöhte (Abb.3.27). Bei einer Schädigung mit sichtbarem Licht war eine Präinkubation mit MMPDCD nicht in der Lage, die nachfolgende Induktion der Schäden ohne MMPDCD im Medium zu verhindern. Bei der höchsten getesteten Konzentration stieg sogar die Anzahl der induzierten Einzelstrangbrüche gegenüber der Kontrolle an (Abb. 3.28). Hierbei muß allerdings berücksichtigt werden, daß in den einzelnen Versuchen jeweils eine völlig unbehandelte Kontrolle als abzuziehender Untergrund in die Berechnung einging. Führte man die Schädigung durch Licht in Gegenwart von MMPDCD durch, so bestätigte sich die direkte Beeinflussung der Schadensinduktion durch MMPDCD. Während bei Konzentrationen von 100 nM und höher die Zahl der Einzelstrangbrüche stieg, sanken die Fpg-sensitiven Modifikationen signifikant gegenüber der bestrahlten Kontrolle (Abb. 3.29). Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Anwesenheit von MMPDCD in der Lösung möglicherweise die Entstehung von ROS während der Bestrahlung stärker verhindern kann, als wenn es nur intrazellulär vorliegt. Allerdings müßte man auch die Effektivität der Resorption durch die einstündige Präinkubation, also die intrazelluläre Konzentration an MMPDCD, bestimmen, um diese mit der extrazellulären Konzentration als effektive Konzentration vergleichen zu können.

Bei einer Schädigung mit Photosensibilisator Ro 19-8022 in Gegenwart von steigenden Konzentrationen von MMPDCD ergab sich bei den Fpg-sensitiven Modifikationen eine U-förmige Dosis-Wirkungskurve, bei der das Minimum bei 30 nM MMPDCD lag. Aber auch bei der höchsten Konzentration (1000 nM) war der Schaden

immer noch signifikant unter dem Wert der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.30). MMPDCD konnte also abhängig von der Konzentration sowohl die basalen Spiegel oxidativer DNA-Schäden als auch die Induktion zusätzlicher oxidativer Schäden durch den Photosensibilisator verhindern.

Bei der Bildung von Mikrokernen zeigte sich ein anderes Bild. Der Untergrundspiegel war hier bereits bei einer Konzentration von 30 nM signifikant erhöht (Abb. 3.31) und eine zusätzliche Bestrahlung mit sichtbarem Licht erhöhte ebenfalls signifikant die Mikrokernrate (Abb. 3.32). Dagegen führte ein Vorinkubation mit niedrigen Konzentrationen an MMPDCD (3 und 10 nM) nach einer Schädigung mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022 zu einer signifikanten Senkung der Mikrokernbildung, während höhere Konzentrationen diese signifikant erhöhten (Abb. 3.33). Konzentrationen unter 30 nM besitzen folglich einen leicht protektiven Effekt auf die Mikrokernrate, während höhere Konzentrationen diese deutlich erhöhen. Da bei höheren Konzentrationen der Substanz mit der Alkalischen Elution erhöhte Spiegel an Einzelstrangbrüchen gemessen wurden, könnten sich die hier entstehenden Mikrokerne – zumindestens zum Teil - auch auf die Behandlung mit MMPDCD zurückführen lassen.

MMPDCD zeigte nur geringe Toxizität sowohl bei der Präinkubation als auch unter Schädigungsbedingungen (Abb. 3.34 bis Abb. 3.36). Allerdings war selbst im ungünstigsten Fall die Überlebensrate immer noch bei 87 % im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle lag. Insgesamt hatte MMPDCD einen schützenden Effekt nur auf den Untergrund der Fpg-sensitiven Läsionen und in niedrigen Konzentrationen auf die Induktion von Mikrokernen. Bei höheren Konzentrationen überwiegen pro-oxidative Eigenschaften.

In der Literatur gibt es verschiedene Hinweise auf antioxidative Eigenschaften von Alkaloiden aus *Streptomyces ssp.* aus der Gruppe der Carbazole (Aygün *et al.*, 2000). So zeigten sich Carazostatin und Carbazomycin B in *in vitro*-Oxidationssystemen als starkes Antioxidans (Iwatsuki *et al.*, 1993). Kato *et al.* kamen zu ähnlichen Ergebnissen und untersuchten zusätzlich auch strukturelle Einflüsse auf die antioxidative Eigenschaften der Stoffgruppe (Kato *et al.*, 1993). Dabei erwiesen sich die sekundäre Aminofunktion und eine freie Hydroxylgruppe am C₃-Atom als essentiell für die Wirkung. Dihydroxyderivate zeigten eine schwächere Wirkung und bei Methoxyverbindungen war eine vorangegangene Hydrolyse des Ethers entscheidend. Daraus

ließe sich schließen, daß für eine mögliche antioxidative Wirkung von MMPDCD zunächst eine Reduktion der Ketostruktur notwendig ist. Im Zellkulturmodell ist eine solche Reduktion zwar möglich, dürfte aber das zelluläre, antioxidative Systemschwächen. Daß MMPDCD auf den Untergrund der oxidativen DNA-Schäden einen protektiven Einfluß hat, ließe sich durch eine ausreichende Kapazität der Zelle zur Reduktion von MMPDCD und anschließender Wirkungsentfaltung von reduziertem MMPDCD erklären. Bei zusätzlicher oxidativer Belastung wäre die Zelle dann aber ab einer bestimmten Konzentration nicht mehr in der Lage, eine adäquate Stressantwort zu geben, und es käme zu einer Häufung von DNA-Schäden. Die Beeinflussung der Mikrokernbildung läßt sich durch diese Theorie allerdings nur teilweise erklären. Die Dosisabhängigkeit des schädigenden Effekts durch MMPDCD ließe sich zwar ebenfalls auf ein erschöpftes zelluläres Puffersystem zurückführen, allerdings kann dies nicht die Ursache für die deutliche Beeinflussung der spontanen Mikroikernrate sein. Es ist denkbar, daß MMPDCD selbst, neben den antioxidativen Eigenschaften seiner reduzierten Form, pro-oxidative Effekte besitzt. Durch Untersuchungen z.B. in einem zellfreien System, in dem eine Reduktion der Substanz ausgeschlossen werden kann, könnte diese Annahme überprüft werden.

4.3 EPA als untypisches Antioxidans

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der ω 3-Fettsäure EPA auf genotoxische Endpunkte untersucht. Bei der Betrachtung der oxidativen DNA-Schäden zeigte sich keine Beeinflussbarkeit des Untergrundspiegels in AS52-Zellen durch Vorbehandlung mit EPA in Konzentrationen bis 500 μ M (Abb. 3.41), obwohl die Substanz in diesem Zeitraum sowohl in die Zelle als auch in den Zellkern aufgenommen wird (Abb. 3.37 bis 3.40). Die Resorption der Fettsäure aus dem Zellkulturmedium ist insofern problematisch, da zum einen der Fettsäuregehalt des dem Routinemedium zugesetzten fetalem Kälberserums unbekannt ist und zum anderen die Vorbehandlung mit EPA mit einer nicht Fettsäure-freien BSA-Lösung erfolgt. Deshalb sind Verunreinigungen mit anderen mehrfach ungesättigten Fettsäuren nicht auszuschließen und daher läßt sich auch die Zunahme an anderen ω 3-Fettsäuren durch die EPA-Präinkubation erklären (Abb. 3.37 bis 3.40).

Bei exogener Schadensinduktion mit sichtbarem Licht, UVB oder Photosensibilisator Ro 19-8022 veränderte eine Vorbehandlung mit 50 μ M EPA nicht

die Höhe des DNA-Schadens in den Zellen (Abb. 3.42 bis 3.44). Lediglich bei der Behandlung mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022 war eine Senkung der Anzahl an Einzelstrangbrüchen sichtbar (Abb. 3.44). Dagegen hatte die Präinkubation mit 50 μ M EPA im Mikrokerntest einen durchgehend protektiven Effekt. Sie verhinderte signifikant die Rate der induzierten Mikrokerne bei den durchgeführten Schädigungen (Abb. 3.46 bis 3.48), ohne den Untergrund gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu verändern (Abb. 3.45). Auf die Toxizität der untersuchten Behandlungsarten hatte EPA erstaunlicherweise keinen Einfluß (Abb. 3.49 bis Abb. 3.51), obwohl sie die Fettsäurezusammensetzung von Lipidmembranen verändert (Leaf *et al.*, 1988; Goodnight *et al.*, 1982) und so auch die Empfindlichkeit der Zelle gegenüber äußeren Noxen verändern könnte. Andere Untersuchungen (Eckert, I., persönliche Mitteilung) mit EPA-Supplementation in primären, humanen Keratinozyten zeigten ebenfalls eine signifikante Hemmung der Mikrokernraten, die auf die gleiche Weise wie in den AS52-Zellen induziert wurden. Da eine Kontrolle mit Ölsäure-Supplementierung die Mikrokernrate nicht beeinflusste, ist die Senkung der Mikrokernraten eindeutig auf EPA zurückzuführen und nicht zellspezifisch. In Bezug auf die oxidativen DNA-Schäden unterschieden sich die Keratinozyten von den AS52-Zellen nur bei der Schädigung mit sichtbarem Licht, bei der eine Hemmung der induzierten Läsionen durch EPA erkennbar war. Auch bei der Behandlung mit EPA lassen sich die protektiven Effekte bei der Generierung von Mikrokernen, genau wie bei der Behandlung mit Vitamin C (siehe Kapitel 4.1), nicht auf einen verringerten oxidativen DNA-Schaden zurückführen.

Bei der Humanstudie mit EPA-Supplementierung (4 g EPA oder Ölsäure/Tag über 3 Monate; siehe Kapitel 2.2.2) ergab sich kein Unterschied zwischen Placebo- und Verumgruppe in Bezug auf die Anzahl oxidativer DNA-Schäden in den jeweiligen Lymphozytenproben. Der Untergrundspiegel der Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen nach erfolgter Supplementierung entsprach in beiden Gruppen dem Ausgangsspiegel. In der Placebogruppe ergab sich ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der Einzelstrangbrüchen, während die Verumgruppe einen erniedrigten Wert für diesen Parameter zeigte (Abb. 3.54). In Bezug auf andere Endpunkte wurden von den Kooperationspartnern in Liverpool aber durchaus Effekte durch die Supplementierung beobachtet (Rhodes, 2000; Rhodes *et al.*, 1994). So erhöhte sich der EPA-Gehalt in der Haut von 0,1 auf 0,6 mol %, was für eine Resorption und eine Verteilung im Organismus spricht. Darüberhinaus stieg nach einer UV-Behandlung die

Lipidperoxidation an, während die Expression von p53 nach dieser Behandlung innerhalb von 24 h auf 50 % des Wertes in der Kontrollgruppe sank. Außerdem stieg die minimale Erythem-bildende Dosis (MED) in der Verumgruppe im Vergleich zur Placebogruppe um 30 % sowohl bei UVB- als auch UVA-Bestrahlung an. Zuvor wurde dieser protektive Effekt gegenüber einer UV-induzierten Hautschädigung bereits bei der Behandlung von Mäusen mit Fischöl beobachtet (Orengo *et al.*, 1992). Diese Ergebnisse zeigen eine Verringerung der Entzündungsreaktion und eine Schutzwirkung gegenüber UV-Strahlung durch die EPA-Supplementation. In Versuchen an Mäusen wurde nach EPA-Supplementation und UV-Behandlung eine verringerte Immunsuppression festgestellt (Moison *et al.*, 2001).

Bei der Erforschung der Wirkung von ω 3-Fettsäuren stand zunächst die Protektion bezüglich der Herz-Kreislauf-Erkrankungen im Vordergrund (siehe Kapitel 1.5.2). Darauf aufbauend wurden aber auch zahlreiche andere Untersuchungen durchgeführt. Ein Ansatzpunkt war die Beeinflussung des Tumorzellwachstums durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Hier zeigte sich in insgesamt 97 Studien an Ratten und Mäusen, daß ω 6-Fettsäuren eine starke tumorpromovierende Wirkung haben, während ω 3-Fettsäuren einen leichten, nicht signifikanten protektiven Effekt zeigten (Fay *et al.*, 1997). Darüberhinaus erhöhten ω 6-Fettsäuren in trächtigen Ratten die Empfindlichkeit gegenüber einer Mammakarzinominduktion mit 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen, was auf eine erhöhte Östrogenbildung zurückgeführt wurde (Hilakivi-Clarke *et al.*, 1996), während die ω 3-Fettsäure EPA die Induktion von Colon-Karzinomen in Ratten durch Azoxymethan verhinderte (Minoura *et al.*, 1988). ω 3-Fettsäuren waren außerdem in der Lage, kompetitiv die tumorpromovierenden Effekte von ω 6-Fettsäuren im Tierversuch zu verhindern (Rose, 1997; Karmali, 1987; Karmali *et al.*, 1984; Matsuba *et al.*, 1998; Minoura *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1997; Hubbard *et al.*, 1998). In einer Bevölkerungsstudie zum Zusammenhang von Fischkonsum, und damit Aufnahme von ω 3-Fettsäuren über mehrere Jahre, und der Mortalität durch Colon-Karzinom fand sich eine negative Korrelation, was auf eine Hemmung der Promotion hindeutet (Caygill *et al.*, 1995; Caygill *et al.*, 1996). Ein ähnliches Ergebnis zeigten auch Fall-Kontroll-Studien bezüglich einer Supplementierung mit Fischöl und Colon-Karzinom (La Vecchia *et al.*, 1988; Steinmetz *et al.*, 1993; Franceschi, 1997).

Als Ursachen für die unterschiedliche Beeinflussung des Tumorzellwachstums und der Kanzerogenese durch ω 3- und ω 6-Fettsäuren werden verschiedene Mechanismen

diskutiert. Da langkettige Fettsäuren, vor alle ω 3-Fettsäuren, nach Phosphorylierung zu einer Suppression des Apoptose-hemmenden Proteins Bcl-2 und dadurch zu einer vermehrten Lipidperoxidation führen, können sie so vermutlich auch die Apoptose induzieren (Wertz *et al.*, 1996; Das, 1999; Horrocks *et al.*, 1999). Außerdem hemmt EPA die Mitose von Zellen und fördert so ihre Ablösung aus dem Zellverband. Anschließend leiten diese Zellen dann die Apoptose ein, die man bei dem hier fehlenden Zell-Zell-Kontakt als Anoikis bezeichnet (Clarke *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 1997).

Ein anderer Aspekt ist die Aufnahme und Metabolisierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Durch Supplementierung mit ω 3-Fettsäuren verändert sich der Aufbau der Phosphorlipidmembranen, da zugunsten von EPA z.B. Arachidonsäure und andere ω 6-Fettsäuren verdrängt werden (Schwartz, 2000; Schmitz *et al.*, 2000). Da ω 3- und ω 6-Fettsäuren strukturell sehr ähnlich sind, werden sie von den gleichen Enzymen verstoffwechselt. Allerdings unterscheiden sich die jeweiligen Produkte deutlich in ihrer Wirkung (siehe Kapitel 1.5.2). Steigt die Konzentration an ω 3-Fettsäuren, entsteht durch ihre Kompetition bei der Umsetzung von Arachidonsäure weniger PGE₂ und TXA₂, welche über die Bildung von PDGF (platelet-derived growth factor) die Zellproliferation fördern (Schmitz *et al.*, 2000; Nitta *et al.*, 1998; Sylvester *et al.*, 1994; Riku *et al.*, 1993; Cybulski *et al.*, 1992). Desweiteren wurde in Gegenwart von ω 3-Fettsäuren eine Hemmung der Aufnahme von anderen Fettsäuren in Tumorzellen beobachtet, was zu einer Verstärkung der protektiven Eigenschaften der ω 3-Eicosanoide führte (Sauer *et al.*, 2000).

In Bezug auf die Immunantwort gibt es ebenfalls Einflüsse, die von der Fettsäuregruppe abhängig sind. So steigt bei Supplementierung mit ω 6-Fettsäuren die Bildung von TNF $_{\alpha}$ und Cytokinen, welche z.B. über die Aktivierung von NO-Synthase ROS generieren können. Wird dagegen mit ω 3-Fettsäuren supplementiert, verringert sich die Menge an TNF $_{\alpha}$ und Cytokinen, wodurch protektive PG entstehen und die Belastung durch ROS sinkt (Darlington *et al.*, 2001). Außerdem wurde nachgewiesen, daß EPA und Docosahexaensäure direkt und indirekt die Genexpression *in vivo* beeinflussen (Fernandes *et al.*, 1998). So können diese Fettsäuren an regulatorische Transkriptionsfaktoren binden und intrazelluläre, sekundäre Botenstoffe wie Diacylglycerol oder Ceramid beeinflussen.

Ein weiterer Effekt betrifft die bereits erwähnte Lipidperoxidation, der grundsätzlich alle mehrfach ungesättigten Fettsäuren unterliegen können und bei der

verstärkt ROS entstehen (Dreher *et al.*, 1996). Für ω 6-Fettsäuren wurde gezeigt, daß Aldehyde gebildet werden, die zu exocyclischen, promutagenen DNA-Addukten führen. Diese Addukte, vor allem Etheno-Addukte, verursachen vermehrt Fehlpaarungen und dadurch Punktmutationen in Säugerzellen (Vaca *et al.*, 1988; Bartsch *et al.*, 1994; Chung *et al.*, 1996). Auch in einer Humanstudie wurde nach Supplementation mit ω 6-Fettsäuren in weißen Blutzellen eine erhöhte Anzahl an DNA-Addukten bestimmt, die sich auf das bei der Lipidperoxidation entstehende Malondialdehyd zurückführen lassen (Nair *et al.*, 1997).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es auf zellulärer Ebene Befunde gibt, die die antikanzerogenen und immunmodulatorischen Effekte von ω 3-Fettsäuren, im speziellen EPA, und das unterschiedliche Verhalten von ω 6-Fettsäuren erklären können (Bartsch *et al.*, 1999). Mögliche Mechanismen hierbei sind die Bildung protektiver Eicosanoide, die Interaktion in die Signaltransduktion, und damit auch in die Genexpression, und strukturelle und funktionelle Veränderungen von Zellmembranen. Dem gegenüber steht die vermehrte Lipidperoxidation auch durch EPA, welche zu einer vermehrten Generierung von ROS führt, die aber wiederum wie oben beschrieben auch die Apoptose einleiten können.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse ergänzen die vorangegangenen Überlegungen. EPA beeinflusst weder *in vivo* noch *in vitro* die Spiegel an oxidativen DNA-Modifikationen und der Einzelstrangbrüche, obwohl dies durch ROS, die bei der Lipidperoxidation und bei der Metabolisierung entstehen, durchaus möglich wäre. Offensichtlich sind die pro-oxidativen Wirkungen nur gering. Die Supplementierung mit EPA erhöht die Überlebensrate der AS52-Zellen nach den verschiedenen Behandlungen nicht, was der Induktion von Apoptose nicht eindeutig widerspricht, sie allerdings auch nicht bestätigt. Hier wäre es sicherlich interessant, auch höhere EPA-Konzentrationen zu untersuchen und neben der Cloning efficiency auch die Apoptoserate z.B. in lymphatischen Zellen zu bestimmen, um einen Rückschluß auf die Ursache des bei der Behandlung auftretenden Zelltodes zu erhalten. Andererseits wurde von einer Induktion der Apoptose nur in entarteten Zellen berichtet, so daß dieser EPA-Effekt eventuell auch nur gekoppelt an den Verlust der Wachstumskontrolle auftreten könnte. Auffällig ist aber der protektive Effekt von EPA auf die Induktion von Mikrokernen. Unwahrscheinlich ist, daß sich durch eine vermehrte Apoptose stark geschädigter, Mikrokern-haltiger Zellen die Gesamtzahl von Mikrokernen in der Kultur

vermindert, da sich dies dann auch als zusätzlicher toxischer Effekt bei der Bestimmung der Überlebensrate zeigen müßte. Da dies nicht der Fall ist, bleibt anzunehmen, daß EPA im Kern auf die Stabilität der Chromatinstruktur Einfluß nimmt und die chromosomale Integrität effektiv erhöhen kann. Es ist durchaus denkbar, daß der neu gefundene protektive Effekt von EPA auch an der antikanzerogenen Wirkung beteiligt ist, da die genetische Instabilität des Genoms von Tumorzellen für die fortschreitende Entartung eine große Rolle spielt und eine Erhöhung der Stabilität durch EPA, die sich in der Senkung der Mikrokernrate zeigt, so die Tumorpromotion bzw. Progression verlangsamt.

4.4 Effekte durch Ethanol

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Ethanol auf den oxidative DNA-Schaden *in vitro* und *in vivo* untersucht. In AS52-Zellen zeigte Ethanol nach einmaliger, kurzzeitiger Exposition eine nicht signifikante Erhöhung der Einzelstrangbrüche und der Fpg-sensitiven Modifikationen (Abb. 3.55). Blasiak *et al.* berichten ebenfalls über vermehrte Einzelstrangbrüche durch *in vitro*-Inkubation von Lymphozyten und Colonzellen mit Ethanol, welche aber innerhalb von 4 h wieder vollständig repariert wurden (Blasiak *et al.*, 2000). Darüberhinaus zeigten andere Untersuchungen mit Thymozyten signifikant erhöhte Apoptoseraten in alkoholbehandelten Zellen (Ewald *et al.*, 1993; Slukvin *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 1995a), was also einen toxischen Effekt von Ethanol widerspiegelt. Eine möglicher Mittlerrolle bei der Auslösung gentoxischer Wirkungen könnte Acetaldehyd haben, der bei der Metabolisierung von Ethanol entsteht. In einem Vektorsystem konnte gezeigt werden, daß Acetaldehyd selbst Vernetzungen innerhalb und zwischen DNA-Strängen bilden kann, die wiederum GG-Tandemmutationen verursachen (Matsuda *et al.*, 1998; Blasiak *et al.*, 2000).

In der durchgeführten Studie mit alkoholabhängigen Patienten ergab die Messung der oxidative DNA-Schäden in der Alkoholikergruppe eine signifikante Erhöhung der Fpg-sensitiven Modifikationen gegenüber der Kontrollgruppe, wobei sich die Anzahl der Einzelstrangbrüche nicht unterschied (Abb. 3.62). Von anderen Arbeitsgruppen wurde berichtet, daß Ethanol im Tierversuch wenige Stunden nach Applikation eine reversible Erhöhung der Einzelstrangbrüche hervorruft (Singh *et al.*, 1995b; Navasumrit *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 1995a; Cahill *et al.*, 1999; Renis *et al.*, 1996). In Versuchen

mit Ratten wurde nach einer einmaligen Gabe von Ethanol innerhalb von wenigen Stunden sowohl eine vermehrte Bildung von Hydroxyethylradikalen als auch ein vermehrtes Auftreten von Einzelstrangbrüchen beobachtet. Durch eine chronische Ethanolzufuhr war die Radikalbildung nach einer Woche signifikant erhöht, was mit einer Induktion von CYP 2E1 erklärbar wäre, und sank danach wieder. Entsprechend traten zunächst innerhalb von drei Tagen Einzelstrangbrüche auf, die unter chronischen Bedingungen in den folgenden fünf Wochen wieder abnahm (Navasumrit *et al.*, 2000). Ein ähnlicher, zeitabhängiger Effekt auf die Einzelstrangbrüche wäre auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten denkbar. Dieser konnte allerdings nicht im Rahmen der Studie erfaßt werden, sondern nur die bereits wieder niedrigen Werte zum Zeitpunkt t_0 , die denen der Kontrollgruppe entsprachen. Die erhöhten Fpg-sensitiven Läsionen der Patientengruppe ließen dann auf einen erhöhten DNA-Schaden durch den chronischen Alkoholkonsum schließen. In anderen Humanstudien wurde von einer Erhöhung der ROS-Spiegel berichtet und die Strangbrüche gemessen, aber nicht 8-OxoG (Thome *et al.*, 1997; Mutlu-Turkoglu *et al.*, 2000). In Studien an Ratten wurde dagegen neben der Erhöhung der ROS-Bildung und der Anstieg der Strangbrüche auch von einem signifikant erhöhtem Auftreten von 8-OxoG in der DNA berichtet (Cahill *et al.*, 1997; Cahill *et al.*, 1999).

Der in Abbildung 3.65 dargestellte Verlauf der oxidative DNA-Schäden während der Entgiftung zeigte eine Erhöhung der Einzelstrangbrüche zum Zeitpunkt t_1 , welche möglicherweise eine Anpassung an die durch Alkoholentzug veränderte Enzymaktivität und -induktion sein könnte. Zum Zeitpunkt t_2 war dieser kurzfristige Effekt wieder ausgeglichen und stattdessen die Anzahl der Fpg-sensitiven Läsionen erhöht. Dieser letzte Befund deutete daraufhin, daß durch den Entzug von Ethanol auch dessen antioxidativer Effekt einer akuten Dosis wegfiel (Abb. 3.63. und 3.66) und somit der DNA-Schaden mittel- oder langfristig stieg. Vielleicht rückte zu diesem Zeitpunkt aber auch das ausgeprägte Rauchverhalten der Patienten in den Vordergrund, was ja selbst auch eine DNA-schädigende Wirkung hat. Dem widerspricht allerdings der Befund anderer Studien, in denen ein synergistischer Effekt von Rauchen und Alkohol gefunden wurde (Castelli *et al.*, 1999; Autrup *et al.*, 1992). Wie aus den Abbildungen 3.70 und 3.71 hervorgeht, gab es in der gesamten Probandengruppe eine Korrelation zwischen dem Alkoholkonsum, sowohl über 30 als auch über 90 Tage, und der Anzahl der Einzelstrangbrüche, während sich im Vergleich der beiden Gruppen nur eine leicht

niedrigere Tendenz für diesen Parameter in der Kontrollgruppe ergab. Außerdem wurde in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen bei der Betrachtung der Mikrokernbildung in Lymphozyten bei Alkoholikern in einer Humanstudie eine signifikant erhöhte MK-Rate gefunden, was für einen clastogenen Effekt von Ethanol spricht (Maffei *et al.*, 2000).

Bei einem Vergleich der Blutparameter ergaben sich mehrere signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen. So hatten die Patienten einen signifikant niedrigeren Spiegel an Vitaminen (Vitamin B₁, B₂, B₆, D, E und Folsäure), mit Ausnahme von Vitamin A, welches dort signifikant höher war. Dieser Befund deckt sich mit anderen veröffentlichten Beobachtungen (Lecomte *et al.*, 1994a; Lecomte *et al.*, 1994b). Alle Leberwerte (GOT, GPT, GGT und CDT) waren in der Patientengruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe, was sich durch eine ausgeprägte Leberschädigung erklären läßt, wobei CDT als sensitiver Marker für Alkoholabusus von besonderer Bedeutung ist (Lakshman *et al.*, 2001). Ein anderer Marker für länger andauernden, starken Alkoholkonsum ist der MCV-Wert (mittleres zelluläres Volumen), der auch hier in der Patientengruppe signifikant erhöht war und auch im Laufe der Entgiftung nicht sank. In der Patientengruppe sank der LDL-Wert signifikant und der HDL-Wert war signifikant erhöht. Dies spiegelte sich auch im RI-Index wieder, der ein Maß für das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen ist. Viele epidemiologische Studien weisen darauf hin, daß das Auftreten dieser Erkrankungen durch Ethanolkonsum verhindert werden kann (Wu *et al.*, 2001). Hier könnte eine Induktion von Abbaumechanismen von Phospholipiden eine Rolle spielen, die vermutlich von der Aktivität freier Radikale abhängig ist (Fink *et al.*, 1985). In wieweit die anderen signifikant unterschiedlichen Parameter kausal von Ethanol abhängen, ist noch unklar und bedarf weiterer Erforschung der molekularen Mechanismen nach Alkoholkonsum. Darüberhinaus muß beachtet werden, daß die Zuordnung der Probanden zur jeweiligen Gruppe durch die in Kapitel 1.6.2 beschriebene Diagnose der Abhängigkeit erfolgte und nicht nach der konsumierten Alkoholmenge vor der Probennahme (siehe Abb. 3.56 bis 3.59). Bei der Korrelation über das gesamte Probandenkollektiv fiel besonders auf, daß CDT nicht mit dem ermittelten Alkoholkonsum zusammenhing. Eine Korrelation fand sich nur zwischen den anderen Leberwerten. Von diesen korrelierte nur GGT mit der Anzahl der Trinktage und ansonsten fanden sich erwartete Zusammenhänge von Vitamin A mit Vitamin E, von

GOT mit GPT, von GOT mit GLDH und von GLDH mit GGT (Lecomte *et al.*, 1994a; Lecomte *et al.*, 1994b; Mansouri *et al.*, 2001).

5 Zusammenfassung

Nach heutigen Erkenntnissen sind für die Krebsentstehung Mutationen in Genen somatischer Zellen verantwortlich, die durch chemische Modifikationen der DNA (DNA-Schäden) hervorgerufen werden. Als DNA-schädigende Agentien sind besonders reaktive Sauerstoffspezies (ROS) von Bedeutung, die sowohl endogen, z.B. in der Lipidperoxidation und der mitochondrialen Atmungskette, als auch exogen, z.B. durch Xenobiotika und Strahlung, entstehen können. Der stets in jeder Zelle vorhandene Untergrundspiegel an DNA-Modifikationen ergibt sich aus dem Gleichgewicht zwischen Schadensbildung und den zellulären antioxidativen Schutz- und den Reparaturmechanismen. Ziel dieser Arbeit war, die Beeinflussung oxidativer DNA-Schäden durch verschiedene, vom Menschen zumeist oral aufgenommene Stoffe unter Normalbedingungen und unter exogenem, oxidativem Stress zu untersuchen. Ein besonderes Augenmerk lag auch auf der Untersuchung *in vivo*.

Sowohl in *in vitro*- als auch in *in vivo*-Versuchen wurde der Einfluß von Ascorbinsäure, Eicosapentaensäure und Ethanol und zusätzlich noch *in vitro* der Effekt von MMPDCD, einem synthetischen Antioxidans, untersucht. Zur Induktion von zusätzlichem oxidativen Stress wurden AS52-Zellen (CHO-Zellen) mit UVB oder sichtbarem Licht bzw. sichtbarem Licht und Photosensibilisator bestrahlt. Die Bestimmung der oxidativen DNA-Schäden in den Zellen (AS52 oder humane Lymphozyten) erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Elution, wobei als Sonde das Fpg-Protein, eine DNA-Reparaturenuklease, die vor allem 8-oxoG erkennt, verwendet wurde.

In der *in vivo*-Studie ergab sich kein signifikanter Effekt von Ascorbinsäure auf den oxidativen DNA-Schaden in den Lymphozyten, obwohl mit der Einmalgabe von 1 g Vitamin C der Plasmaspiegel deutlich erhöht wurde. Bei den *in vitro*-Untersuchungen zeigten sich sowohl anti- als auch pro-oxidative Wirkungen. Der Untergrundspiegel an DNA-Schäden in AS52-Zellen wurde durch Ascorbinsäure-Inkubation nicht beeinflusst. Bei Schädigung durch Bestrahlung (sichtbares Licht und UVB) konnte eine Präinkubation mit 50 bzw. 100 µM Ascorbinsäure das induzierte Schadensausmaß senken, sowohl in Bezug auf den oxidativen DNA-Schaden als auch auf die Mikrokernrate. Dieselben Konzentrationen von Vitamin C erhöhten allerdings die

Spontanrate der Mikrokerne signifikant. Ascorbinsäure hatte also auch eine prooxidative Wirkung, wobei die zelluläre Zielstruktur dieses Effektes noch unklar ist.

Als Derivat des antioxidativen Naturstoffes Carazostatins wurde MMPDCD bezüglich seiner Effekte auf den zellulären oxidativen DNA-Schaden untersucht. Es zeigte sich in Untersuchungen mit AS52-Zellen, daß MMPDCD eine Senkung der Untergrundspiegel der Fpg-sensitiven Basenmodifikationen bewirkte, die allerdings mit einer Erhöhung der Einzelstrangbrüche einherging. Auch die Zahl der durch Photosensibilisator Ro 19-8022 oder sichtbares Licht induzierten oxidativen DNA-Schäden war in Gegenwart von MMPDCD signifikant reduziert. Andererseits erhöhte die Substanz die basale Mikrokernraten bereits bei Konzentration größer 30 nM, während niedrigere Konzentrationen eine zusätzliche Mikrokerninduktion verhindern konnten.

Die aus Fischöl stammende mehrfach ungesättigte Fettsäure EPA ist vor allem wegen ihrer kardioprotektiven Wirkung bekannt geworden. Darüberhinaus zeigt sie eine Photoprotektion gegenüber einer Erythembildung, deren Zusammenhang mit oxidativen DNA-Schäden hier untersucht wurde. In der in Kooperation mit dem University Hospital Liverpool durchgeführten Probandenstudie, bei der über drei Monate EPA oral zugeführt wurde, zeigte sich kein Einfluß von EPA auf die oxidativen DNA-Schäden im Vergleich zu einer Placebo-behandelten Kontrollgruppe. In Versuchen mit AS52-Zellen fand sich kein Einfluß der Substanz auf den Untergrundschaden und ein schützender Effekt nur bezüglich der Schädigung mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022. Außerdem fand sich bei der Mikrokerninduktion sowohl durch sichtbares Licht, durch Photosensibilisator Ro 19-8022 als auch durch UVB eine Schutzwirkung durch Präinkubation mit EPA. Vermutlich ist der antiinflammatorische und immunsuppressive Effekt von EPA eher auf anderer Ebene als der des DNA-Schadens begründet, z.B. Interaktion mit der Signaltransduktion oder mit der Genexpression, da sie trotz erhöhter Lipidperoxidation, und damit vermehrter Bildung von ROS, protektiv wirkt.

Der Einfluß von Ethanol auf den DNA-Schaden in Lymphozyten und auf verschiedene Blutparameter wurde in einer Probandenstudie in Zusammenarbeit mit der Klinik für Psychiatrie der Universität Mainz durchgeführt. Dabei wurde eine Gruppe von 32 Patienten mit chronischem Alkoholabusus mit 28 Kontrollpersonen verglichen. Bei der Analyse der oxidativen DNA-Schäden zeigte sich ein signifikant höherer Spiegel an Fpg-sensitiven Modifikationen in der Alkoholikergruppe, während die Zahl der

Einzelstrangbrüche in beiden Gruppen gleich war. Darüberhinaus waren mehrere Blutparameter in der Patientengruppe signifikant verändert. Dazu zählte eine Erhöhung der Leberwerte (CDT, GOT, GPT, GGT, GLDH), des MCV und der EVB und eine Verringerung der Vitamin-Spiegel, Vitamin A ausgenommen, welches signifikant erhöht war. Im Verlauf der Entgiftung der Patienten über ca. zwei Wochen fiel gegenüber dem Zeitpunkt der ersten Bestimmung eine vorübergehende, signifikante Erhöhung der Einzelstrangbrüche auf und eine ebenfalls signifikant erhöhte Anzahl an Fpg-sensitiven Läsionen zum Zeitpunkt der Entlassung und des Entgiftungsendes. Dabei ist der Effekt auf die Strangbrüche möglicherweise durch eine erhöhte Reparatur von DNA-Schäden erklärbar und die Erhöhung der Fpg-Werte auf einen Wegfall eines antioxidativen Effektes einer hohen, akuten Alkoholkonzentration oder eventuell auch auf einen verstärkten Tabakkonsum und dessen ebenfalls DNA-schädigenden Einfluß zurückführbar. Ethanol erwies sich in der Probandenstudie langfristig als pro-oxidativ, wobei er im Zellkultursystem keinen schädigenden Effekt hatte.

6 Abkürzungen

8-oxoA	8-Hydroxyadenin
8-oxoG	8-Hydroxyguanin
Abb.	Abbildung
ADH	Alkoholdehydrogenase
AP-Läsion	Basenfreie Stelle in der DNA (apurinisch/apyrimidinisch)
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CYP	Cytochrom P 450
dest.	destilliert
DH	Dehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EPA	Eicosapentaensäure (eicosapentaenoic acid)
f	femto
Fapy-Guanin	2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin
FCS	fötales Kälberserum (fetale calw serum)
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
Gl.	Gleichung
GSH	Glutathion
GSSG	Oxidiertes Dimer aus 2 GSH
h	Stunde
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (high pressure liquid chromatography)
l	Liter
LT	Leukotrien
μ	mikro
M	molar

m	milli
MEOS	Mikrosomales Ethanol oxidierendes System
min	Minute
Mio	Million
MMPDCD	2-Methyl-1-(4-methylphenyl)-4,9-dihydro-3H-3,4-carbazoldion
M _R	Relatives Molekulargewicht
n	nano
n	Anzahl unabhängiger Versuche
n.b.	nicht bestimmt
NAD	Nicotinamid-adenosin-dinukleotid
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
OGG	8-oxoGuanin-Glykosylase
p	pico
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.a.	zur Analyse
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBSCMF	phosphatgepufferte Salzlösung, Calcium- und Magnesiumfrei
PG	Prostaglandin
Ro 19-8022	[R]-1[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl)carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
ssb	Einzelstrangbrüche (single strand breaks)
ssp	subspecies
SOD	Superoxid-Dismutase
Tab.	Tabelle
TX	Thromboxan
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Units pro Milliliter
UV	ultraviolett
z.B.	zum Beispiel

7 Literatur

Anon. (1996). Ascorbic acid: biochemistry and biomedical cell biology, Plenum Press, New York, London.

Anon. (1997). GU Nährwert- und Kalorien-Tabelle, Gräfe und Unzer Verlag GmbH, München.

Albano, E., French, S. W., und Ingelman-Sundberg, M. (1999). Hydroxyethyl radicals in ethanol hepatotoxicity. *Front Biosci.* 4, D533-D540.

Ames, B. N. (1989). Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radic.Res Commun.* 7, 121-128.

Anand, B. S. und Velez, M. (2000). Influence of chronic alcohol abuse on hepatitis C virus replication. *Dig.Dis.* 18, 168-171.

Anderson, D., Phillips, B. J., Yu, T., Edwards, A. J., Ayesh, R., und Butterworth, K. R. (1997). The effects of vitamin C supplementation on biomarkers of oxygen radical generated damage in human volunteers with "low" or "high" cholesterol levels. *Environ.Mol.Mutagen.* 30, 161-174.

Anderson, L. M., Souliotis, V. L., Chhabra, S. K., Moskal, T. J., Harbaugh, S. D., und Kyrtopoulos, S. A. (1996). N-nitrosodimethylamine-derived O(6)-methylguanine in DNA of monkey gastrointestinal and urogenital organs and enhancement by ethanol. *Int.J Cancer* 66, 130-134.

Anderson, R. und Lukey, P. T. (1987). A biological role for ascorbate in the selective neutralization of extracellular phagocyte-derived oxidants. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 498, 229-247.

Aust, S. D., Morehouse, L. A., und Thomas, C. E. (1985). Role of metals in oxygen radical reactions. *J Free Radic.Biol.Med* 1, 3-25.

Astrup, J. L., Hansen, C., und Astrup, H. (1992). Detection of tobacco smoke carcinogen-DNA adducts in cultured rat buccal mucosa cells following exposure to ethanol and total cigarette smoke condensate or chewing tobacco. *Chem.Biol.Interact.* 85, 141-150.

Aygün, A. und Pindur, U. (2000). A new and effective method to carbazoquinocin C and related carbazole-3,4-quinones as biological antioxidants: key reactions of 2-vinylindoles with oxalyl chloride. *Synlett* 1757-1760.

Ballmaier, D. und Epe, B. (1995). Oxidative DNA damage induced by potassium bromate under cell-free conditions and in mammalian cells. *Carcinogenesis* 16, 335-342.

Bartley, W. H., Krebs, A., und O'Brien, J. R. P. (1953). Vitamin C requirement of human adults. *Med.Res.Council Spec.Rep.Ser.* 280, 1-79.

Bartsch, H., Barbin, A., Marion, M. J., Nair, J., und Guichard, Y. (1994). Formation, detection, and role in carcinogenesis of ethenobases. *Drug Metab.Rev.* 26, 349-371.

Bartsch, H., Nair, J., und Owen, R. W. (1999). Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 20, 2209-2218.

Bendich, A. und Shapiro, S. S. (1986). Effect of beta-carotene and canthaxanthin on the immune responses of the rat. *J Nutr.* 116, 2254-2262.

Blasiak, J., Trzeciak, A., Malecka-Panas, E., Drzewoski, J., und Wojewodzka, M. (2000). In vitro genotoxicity of ethanol and acetaldehyde in human lymphocytes and the gastrointestinal tract mucosa cells. *Toxicol.In Vitro* 14, 287-295.

Boiteux, S. (1993). Properties and biological functions of the NTH and FPG proteins of *Escherichia coli*: two DNA glycosylases that repair oxidative damage in DNA. *J.Photochem.Photobiol.B* 19, 87-96.

Boiteux, S., Gajewski, E., Laval, J., und Dizdaroglu, M. (1992). Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry* 31, 106-110.

Booth, J. C. (1998). Chronic hepatitis C: the virus, its discovery and the natural history of the disease. *J.Viral Hepat.* 5, 213-222.

Bowry, V. W., Ingold, K. U., und Stocker, R. (1992). Vitamin E in human low-density lipoprotein: when and how this antioxidant becomes a pro-oxidant. *Biochem.J.* 288, 341-344.

Bram, S., Froussard, P., Guichard, M., Jasmin, C., Augery, Y., Sinoussy-Barre, F., und Wray, W. (1980). Vitamin C preferential toxicity for malignant melanoma cells. *Nature* 284, 629-631.

Brigelius-Flohé, R. and Flohé, L. (1996). Ascorbic acid, cell proliferation and cell differentiation in culture. In *Subcellular Biochemistry* (J.R.Harris, Ed.), Vol. 25, pp. 83-108. Plenum Press, New York and London.

Cadet, J., Anselmino, C., Douki, T., und Voituriez, L. (1992). Photochemistry of nucleic acids in cells. *Photochem.Photobiol.* 15, 227-298.

Cadet, J., Berger, M., Douki, T., Morin, B., Raoul, S., Ravanat, J. L., und Spinelli, S. (1997). Effects of UV and visible radiation on DNA-final base damage. *Biol.Chem.* 378, 1275-1286.

Cahill, A., Stabley, G. J., Wang, X., und Hoek, J. B. (1999). Chronic ethanol consumption causes alterations in the structural integrity of mitochondrial DNA in aged rats. *Hepatology* 30, 881-888.

- Cahill, A., Wang, X., und Hoek, J. B. (1997). Increased oxidative damage to mitochondrial DNA following chronic ethanol consumption. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 235, 286-290.
- Carr, A. und Frei, B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* 13, 1007-1024.
- Castelli, E., Hrelia, P., Maffei, F., Fimognari, C., Foschi, F. G., Caputo, F., Cantelli-Forti, G., Stefanini, G. F., und Gasbarrini, G. (1999). Indicators of genetic damage in alcoholics: reversibility after alcohol abstinence. *Hepatogastroenterology* 46, 1664-1668.
- Caygill, C. P. J., Charlett, A., und Hill, M. J. (1996). Fat, fish, fish oil and cancer. *Br.J.Cancer* 74, 159-164.
- Caygill, C. P. J. und Hill, M. J. (1995). Fish, n-3 fatty acids and human colorectal and breast cancer. *Eur.J.Cancer Prev.* 4, 329-332.
- Cerutti, P. A. (1985). Prooxidative state and tumor promotion. *Science* 227, 375-381.
- Chung, F. L., Chen, H. J. C., und Nath, R. G. (1996). Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. *Carcinogenesis* 17, 2105-2111.
- Churchill, M. E., Peak, J. G., und Peak, M. J. (1991). Repair of near-visible- and blue-light-induced DNA single-strand breaks by the CHO cell lines AA8 and EM9. *Photochem.Photobiol.* 54, 639-644.
- Clarke, R. G., Lund, E. K., Latham, P., Pinder, A. C., und Johnson, I. T. (1999). Effect of eicosapentaenoic acid on the proliferation and incidence of apoptosis in the colorectal cell line HT29. *Lipids* 34, 1287-1295.
- Collins, A., Cadet, J., Epe, B., und Gedik, C. (1997). Problems in the measurement of 8-oxoguanine in human DNA. Report of a workshop, DNA oxidation, held in Aberdeen, UK, 19-21 January, 1997. *Carcinogenesis* 18, 1833-1836.
- Collins, A. R., Gedik, C. M., Olmedilla, B., Southon, S., und Bellizzi, M. (1998). Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates. *FASEB J.* 12, 1397-1400.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Podmore, I. D., Herbert, K. E., Mistry, N., Mistry, P., Hickenbotham, P. T., Hussieni, A., Griffiths, H. R., und Lunec, J. (1998). Novel repair action of vitamin C upon in vivo oxidative DNA damage. *FEBS Lett.* 439, 363-367.
- Cowen, M. S. und Lawrence, A. J. (1999). The role of opioid-dopamine interactions in the induction and maintenance of ethanol consumption. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 23, 1171-1212.
- Culp, B. R., Titus, B. G., und Lands, W. E. (1979). Inhibition of prostaglandin biosynthesis by eicosapentaenoic acid. *Prostaglandins Med* 3, 269-278.

- Cybulski, A. V., Goodyer, P. R., Cyr, M. D., und McTavish, A. J. (1992). Eicosanoids enhance epidermal growth factor receptor activation and proliferation in glomerular epithelial cells. *Am J Physiol* 262, F639-F646.
- Darlington, L. G. und Stone, T. W. (2001). Antioxidants and fatty acids in the amelioration of rheumatoid arthritis and related disorders. *Br.J.Nutr.* 85, 251-269.
- Das, U. N. (1999). Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 61, 157-163.
- Dekant, W. und Vamvakas, S. (1994). *Toxikologie für Chemiker und Biologen*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Demple, B. und Harrison, L. (1994). Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu.Rev.Biochem.* 63, 915-948.
- Dennog, C., Radermacher, P., Barnett, Y. A., und Speit, G. (1999). Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutat.Res.* 428, 83-89.
- Dilling, H., Mombour, W., und Schmidt, M. H. (1991). *Internationale Klassifikation psychischer Störungen*, Huber, Bern.
- Douki, T. und Cadet, J. (1999). Modification of DNA bases by photosensitized one-electron oxidation. *Int.J Radiat.Biol.* 75, 571-581.
- Dreher, D. und Junod, A. F. (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur.J.Cancer* 32A, 30-38.
- Drouin, R., Rodriguez, H., Gao, S. W., Gebreyes, Z., O'Connor, T. R., Holmquist, G. P., und Akman, S. A. (1996). Cupric ion/ascorbate/hydrogen peroxide-induced DNA damage: DNA-bound copper ion primarily induces base modifications. *Free Radic.Biol.Med* 21, 261-273.
- Duchstein, H. J. und Riederer, S. (1995). Cytochrom P-450: Enzymsystem zur NO-Freisetzung. *Pharmzeitung* 140, 25-29.
- Dugal, L. P. (1961). Ascorbic Acid and acclimatization to Cold in Monkeys. *Annals of the New York Academy of Science* 92, 307.
- Dyerberg, J. und Bang, H. O. (1979). Lipid metabolism, atherogenesis, and haemostasis in Eskimos: the role of the prostaglandin-3 family. *Haemostasis* 8, 227-233.
- Dyke, G. W., Craven, J. L., Hall, R., und Garner, R. C. (1994). Effect of vitamin C supplementation on gastric mucosal DNA damage. *Carcinogenesis* 15, 291-295.
- Englard, S. und Seifter, S. (1986). The biochemical functions of ascorbic acid. *Annu.Rev.Nutr.* 6, 365-406.
- Epe, B. (1991). Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem.Biol.Interact.* 80, 239-260.
- Epe, B. und Hegler, J. (1994). Oxidative DNA damage: endonuclease fingerprinting. *Methods Enzymol.* 234, 122-131.

- Epe, B., Mutzel, P., und Adam, W. (1988). DNA damage by oxygen radicals and excited state species: a comparative study using enzymatic probes in vitro. *Chem.Biol.Interact.* 67, 149-165.
- Epe, B., Pflaum, M., und Boiteux, S. (1993). DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems. *Mutat.Res.* 299, 135-145.
- Ewald, S. J. und Shao, H. (1993). Ethanol increases apoptotic cell death of thymocytes in vitro. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 17, 359-365.
- Fahn, S. und Cohen, G. (1992). The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease - evidence supporting it. *Ann.Neurol.* 32, 804-812.
- Fang, J. L. und Vaca, C. E. (1995). Development of a ³²P-postlabelling method for the analysis of adducts arising through the reaction of acetaldehyde with 2'-deoxyguanosine-3'- monophosphate and DNA. *Carcinogenesis* 16, 2177-2185.
- Fang, J. L. und Vaca, C. E. (1997). Detection of DNA adducts of acetaldehyde in peripheral white blood cells of alcohol abusers. *Carcinogenesis* 18, 627-632.
- Fay, M. P., Freedman, L. S., Clifford, C. K., und Midthune, D. N. (1997). Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Res.* 57, 3979-3988.
- Fernandes, G., Troyer, D. A., und Jolly, C. A. (1998). The effects of dietary lipids on gene expression and apoptosis. *Proc.Nutr.Soc.* 57, 543-550.
- Feskens, E. J. und Kromhout, D. (1993). Epidemiologic studies on Eskimos and fish intake. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 683, 9-15.
- Fiala, E. S., Sodum, R. S., Bhattacharya, M., und Li, H. (1996). (-)-Epigallocatechin gallate, a polyphenolic tea antioxidant, inhibits peroxynitrite-mediated formation of 8-oxodeoxyguanosine and 3-nitrotyrosine. *Experientia* 52, 922-926.
- Fink, R., Clemens, M. R., Marjot, D. H., Patsalos, P., Cawood, P., Norden, A. G., Iversen, S. A., und Dormandy, T. L. (1985). Increased free-radical activity in alcoholics. *Lancet* 2, 291-294.
- Fischer-Nielsen, A., Loft, S., und Jensen, K. G. (1993). Effect of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Carcinogenesis* 14, 2431-2433.
- Fischer-Nielsen, A., Poulsen, H. E., und Loft, S. (1992). 8-Hydroxydeoxyguanosine in vitro: effects of glutathione, ascorbate, and 5-aminosalicylic acid. *Free Radic.Biol.Med* 26, 585-592.
- Fraga, C. G., Motchnik, P. A., Wyrobek, A. J., Rempel, D. M., und Ames, B. N. (1996). Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat.Res.* 351, 199-203.
- Franceschi, S. (1997). Micronutrients and breast cancer. *Eur.J.Cancer Prev.* 6, 535-539.

Frei, B., England, L., und Ames, B. N. (1989). Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* 86, 6377-6381.

Frenkel, K. (1992). Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmacol.Ther.* 53, 127-166.

Gajewski, E., Fuciarelli, A. F., und Dizdaroglu, M. (1988). Structure of hydroxyl radical-induced DNA-protein crosslinks in calf thymus nucleohistone in vitro. *Int.J Radiat.Biol.* 54, 445-459.

Garro, A. J., Espina, N., Farinati, F., und Salvagnini, M. (1986). The effects of chronic ethanol consumption on carcinogen metabolism and on O6-methylguanine transferase-mediated repair of alkylated DNA. *Alcohol Clin Exp Res* 10, 73S-77S.

Garro, A. J., McBeth, D. L., Lima, V., und Lieber, C. S. (1991). Ethanol consumption inhibits fetal DNA methylation in mice: implications for the fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 15, 395-398.

Gerber, J. G., Anderson, R. J., Schrier, R. W., und Nies, A. S. (1982). Prostaglandins and the regulation of renal circulation and function. *Adv.Prostaglandin Thromboxane Leukot.Res* 10, 227-254.

Goldman, D. W., Pickett, W. C., und Goetzl, E. J. (1983). Human neutrophil chemotactic and degranulating activities of leukotriene B5 (LTB5) derived from eicosapentaenoic acid. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 117, 282-288.

Goodnight, S. H. Jr., Harris, W. S., Connor, W. E., und Illingworth, D. R. (1982). Polyunsaturated fatty acids, hyperlipidemia, and thrombosis. *Arteriosclerosis* 2, 87-113.

Green, M. H., Lowe, J. E., Waugh, A. P., Aldridge, K. E., Cole, J., und Arlett, C. F. (1994). Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells. *Mutat.Res.* 316, 91-102.

Halliwell, B. (1999). Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? *Trends Biochem.Sci.* 24, 255-259.

Halliwell, B. (2000). The antioxidant paradox. *Lancet* 355, 1179-1180.

Halliwell, B. und Arouma, O. I. (1991). DNA damage by oxygen-derived radicals, transition metals and disease. *Biochem.J.* 219, 1-14.

Halliwell, B. und Dizdaroglu, M. (1992). The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques. *Free Radic.Res.Comm.* 16, 75-87.

Halliwell, B. und Gutteridge, J. M. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch.Biochem.Biophys.* 280, 1-8.

Halliwell, B. und Gutteridge, J. M. C. (1985). *Free radicals in biology and medicine.* Clarendon Press, Oxford.

Hamberg, M., Svensson, J., Hedqvist, P., Strandberg, K., und Samuelsson, B. (1976). Involvement of endoperoxides and thromboxanes in anaphylactic reactions. *Adv.Prostaglandin Thromboxane Res* 1, 495-501.

Hamberg, M., Svensson, J., und Samuelsson, B. (1975). Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* 72, 2994-2998.

Hamilton, S. R., Hyland, J., McAvinchey, D., Chaudhry, Y., Hartka, L., Kim, H. T., Cichon, P., Floyd, J., Turjman, N., Kessie, G., und . (1987b). Effects of chronic dietary beer and ethanol consumption on experimental colonic carcinogenesis by azoxymethane in rats. *Cancer Res* 47, 1551-1559.

Hamilton, S. R., Sohn, O. S., und Fiala, E. S. (1987a). Effects of timing and quantity of chronic dietary ethanol consumption on azoxymethane-induced colonic carcinogenesis and azoxymethane metabolism in Fischer 344 rats. *Cancer Res* 47, 4305-4311.

Hammerstrom, S. und Samuelsson, B. (1980). Detection of leukotriene A4 as an intermediate in the biosynthesis of leukotrienes C4 and D4. *FEBS Lett.* 122, 83-86.

Heddle, J. A., Cimino, M. C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M. D., Tucker, J. D., Vanparys, P., und MacGregor, J. T. (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ.Mol.Mutagen.* 18, 277-291.

Henning, S. M., Zhang, J. Z., McKee, R. W., Swendseid, M. E., und Jacob, R. A. (1991). Glutathione blood levels and other oxidant defense indices in men fed diets low in vitamin C. *J.Nutr.* 121, 1969-1975.

Hilakivi-Clarke, L., Onojafe, I., Raygada, M., Cho, E., Clarke, R., und Lippman, M. E. (1996). Breast cancer risk in rats fed a diet high in n-6 polyunsaturated fatty acids during pregnancy. *J.Natl.Cancer Inst.* 88, 1821-1827.

Horrocks, L. A. und Yeo, Y. K. (1999). Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol.Res.* 40, 211-225.

Hu, M. L. und Shih, M. K. (1997). Ascorbic acid inhibits lipid peroxidation but enhances DNA damage in rat liver nuclei incubated with iron ions. *Free Radic.Res* 26, 585-592.

Huang, H. Y., Helzlsouer, K. J., und Appel, L. J. (2000). The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 9, 647-652.

Hubbard, N. E., Lim, D., und Erickson, K. L. (1998). Alteration of murine mammary tumorigenesis by dietary enrichment with n-3 fatty acids in fish oil. *Cancer Letter* 124, 1-7.

Innis, S. M. und Kuhnlein, H. V. (1988). Long-chain n-3 fatty acids in breast milk of Inuit women consuming traditional foods. *Early Hum.Dev.* 18, 185-189.

- Iwatsuki, M., Niki, E., und Kato, S. (1993). Antioxidant activities of natural and synthetic carbazoles. *Biofactors* 4, 123-128.
- Jacobson, J. S., Begg, M. D., Wang, L. W., Wang, Q., Agarwal, M., Norkus, E., Singh, V. N., Young, T. L., Yang, D., und Santella, R. M. (2000). Effects of a 6-month vitamin intervention on DNA damage in heavy smokers. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 9, 1303-1311.
- Jain, A., Martensson, J., Mehta, T., Krauss, A. N., Auld, P. A. M., und Meister, A. (1992). Ascorbic acid prevents oxidative stress in glutathion-deficient mice - effects on lung type 2 cell lamellar bodies, lung surfactant, and skeletal muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89, 5093-5097.
- Jialal, I., Vega, G. L., und Grundy, S. M. (1990). Physiologic levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 82, 185-191.
- Johnson, L. R. und Guthrie, P. (1976). Effect of cholecystokinin and 16,16-dimethyl prostaglandin E2 on RNA and DNA of gastric and duodenal mucosa. *Gastroenterology* 70, 59-65.
- Johnston, C. S., Meyer, C. G., und Srilakshmi, J. C. (1993). Vitamin C elevates red blood cell glutathione in healthy adults. *Am.J.Clin.Nutr.* 58, 103-105.
- Jorgensen, K., Nielson AH, und Dyerberg, J. (1986). Hemostatic factors and renin in Greenland Eskimos on a high eicosapentaenoic acid intake: results of the Fifth Umanak Expedition. *Acta Med Scand* 219, 473-479.
- Joshi, P. C. (1985). Comparison of the DNA-damaging property of photosensitised riboflavin via singlet oxygen (1O_2) and superoxide radical O_2^- . mechanisms. *Toxicol.Lett.* 26, 211-217.
- Kadowitz, P. J., Chapnick, B. M., Feigen, L. P., Hyman, A. L., Nelson, P. K., und Spannhake, E. W. (1978). Pulmonary and systemic vasodilator effects of the newly discovered prostaglandin, PGI₂. *J Appl.Physiol* 45, 408-413.
- Kamineni, A., Williams, M. A., Schwartz, S. M., Cook, L. S., und Weiss, N. S. (1999). The incidence of gastric carcinoma in Asian migrants to the United States and their descendants. *Cancer Causes Control* 10, 77-83.
- Kanofsky, J. R. (1989). Singlet oxygen production by biological systems. *Chem.Biol.Interact.* 70, 1-28.
- Karmali, R. A. (1987). Eicosanoids in neoplasia. *Prev.Med.* 16, 493-502.
- Karmali, R. A., Marsh, J., und Fuchs, C. (1984). Effect of omega-3 fatty acids on growth of a rat mammary tumor. *J.Natl.Cancer Inst.* 73, 457-461.
- Kasai, H. und Nishimura, S. (1993). Formation of 8-hydroxyguanine by oxidative DNA damage, its repair and its mutagenic effects. *Adv.Mutagen.Res.* 4, 31-45.

Kasper (1996). Ernährungsmethodik und Diätetik, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore.

Kato, S., Kawasaki, T., Urata, T., und Mochizuki, J. (1993). In vitro and ex vivo free radical scavenging activities of carazostatin, carbazomycin B and their derivatives. *J.Antibiot.(Tokyo)* 46, 1859-1865.

Ketcham, A. S. et al. (1963). Effects of alcohol in mouse neoplasia. *Cancer Res.* 23, 667-670.

Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., und Van Hummelen, P. (1997). The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat.Res* 392, 19-30.

Klein, J. C., Bleeker, M. J., Saris, C. P., Roelern, H. C. P. F., Brugghe, H. F., van den Elst, H., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Westra, J. G., Kriek, E., und Berns, A. J. M. (1992). Repair and replication of plasmids with site-specific 8-oxodG and AAF-dG residues in normal and repair-deficient human cells. *Nucl.Acids Res.* 20, 4437-4443.

Klinedinst, D. K. und Drinkwater, N. R. (1992). Mutagenesis by apurinic sites in normal and ataxia teleangiectasia human lymphoblastoid cells. *Mol.Carcinogenesis* 6, 32-42.

Kohn, K. W., Erickson, L. C., Ewig, R. A. G., und Friedman, C. A. (1976). Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry* 15, 4629-4637.

Korycka-Dahl, M. und Richardson, T. (1980). Photodegradation of DNA with fluorescent light in the presence of riboflavin and photoprotection by flavin triplet-state quenchers. *Biochim.Biophys.Acta* 610, 229-234.

Koshiishi, I., Mamura, Y., und Imanari, T. (1997). Cyanate causes depletion of ascorbate in organisms. *Biochim.Biophys.Acta* 1336, 566-574.

La Vecchia, C., Negri, E., Decarli, A., D'Avanzo, B., Gallotti, L., Gentile, A., und Franceschi, S. (1988). A case-control study of diet and colorectal cancer in northern Italy. *Int.J.Cancer* 41, 492-498.

Lakshman, R., Tsutsumi, M., Ghosh, P., Takase, S., Anni, H., Nikolaeva, O., Israel, Y., Anton, R. F., Lesch, O. M., Helender, A., Eriksson, G., Jeppson, J., Marmillot, P., und Rao, M. N. (2001). Alcohol biomarkers: clinical significance and biochemical basis. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 25, 67S-70S.

Lambert, C. R., Reddi, E., Spikes, J. D., Rodgers, M. A. J., und Jori, G. (1986). The effects of porphyrin structure and aggregation state in aqueous and micellar media. *Photochem.Photobiol.* 44, 595-601.

Leaf, A. und Weber, P. C. (1988). Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. *N.Engl.J.Med.* 318, 549-557.

Lecomte, E., Grolier, P., Herbeth, B., Priollet, P., Musse, N., Paille, F., Braesco, V., Siest, G., und Artur, Y. (1994a). The relation of alcohol consumption to serum carotenoid and retinol levels. Effects of withdrawal. *Int J Vitam Nutr Res* 64, 170-175.

Lecomte, E., Herbeth, B., Pirollet, P., Chancerelle, Y., Arnaud, J., Musse, N., Paille, F., Siest, G., und Artur, Y. (1994b). Effect of alcohol consumption on blood antioxidant nutrients and oxidative stress indicators. *Am J Clin Nutr* 60, 255-261.

Lee, B. M., Lee, S. K., und Kim, H. S. (1998). Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, beta-carotene and red ginseng). *Cancer Lett.* 132, 219-227.

Leitch, A. G. (1984). Leukotrienes and the lung. *Clin Sci (Colch.)* 67, 153-159.

Levine, M., Daruwala, R. C., Park, J. B., Rumsey, S. C., und Wang, Y. (1998). Does vitamin C have a pro-oxidant effect? *Nature* 395, 231.

Lindahl, T. und Wood, R. D. (1999). Quality control by DNA repair. *Science* 286, 1897-1905.

Lopez-Anaya, A. und Mayersohn, M. (1987). Ascorbic and dehydroascorbic acids simultaneously quantified in biological fluids by liquid chromatography with fluorescence detection and comparison with a colorimetric assay. *Clin.Chem.* 33, 1874-1878.

Maffei, F., Fimognari, C., Castelli, E., Stefanini, G. F., Forti, G. C., und Hrelia, P. (2000). Increased cytogenetic damage detected by FISH analysis on micronuclei in peripheral lymphocytes from alcoholics. *Mutagenesis* 15, 517-523.

Mansouri, A., Demeilliers, C., Amsellem, S., Pessayre, D., und Fromenty, B. (2001). Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial DNA in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. *J Pharmacol Exp Ther* 298, 737-743.

Marchand, L. L. (1999). Combined influence of genetic and dietary factors on colorectal cancer incidence in Japanese Americans. *J Natl Cancer Inst Monogr* 26, 101-105.

Markant, A., Rimbach, G., Krämer, K., Mayer, H., und Pullauf, J. (1995). Reaktive Sauerstoffradikale: Entstehung, Wirkung, Eliminierung. *Pharmazeutische Zeitung* 140, 2313-2327.

Martensson, J. und Meister, A. (1991). Glutathione deficiency decreases tissue ascorbate levels in newborn rats: ascorbate spares glutathione and protects. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88, 4656-4660.

Martensson, J. und Meister, A. (1992). Glutathione deficiency increases hepatic ascorbic acid synthesis in adult mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89, 11566-11568.

Matsuba, S., Iroh, M., Joh, T., Takeyama, H., Dohi, N., Watanabe, S., und Okuyama, H. (1998). Effect of dietary linoleate/alpha-linolenate balance on experimentally induced gastric injury in rats. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 59, 317-323.

- Matsuda, T., Kawanishi, M., Yagi, T., Matsui, S., und Takebe, H. (1998). Specific tandem GG to TT base substitutions induced by acetaldehyde are due to intra-strand crosslinks between adjacent guanine bases. *Nucleic Acids Res* 26, 1769-1774.
- McGarrity, T. J. (1986). Dimethylhydrazine and ethanol. *Dis.Colon Rectum* 29, 289-290.
- Minoura, T., Takata, T., Sakaguchi, M., Takada, H., Yamamura, M., Hioki, K., und Yamamoto, M. (1988). Effect of dietary eicosapentaenoic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Res.* 48, 4790-4794.
- Moison, R. M. und Beijersbergen Van Henegouwen, G. M. (2001). Dietary eicosapentaenoic acid prevents systemic immunosuppression in mice induced by UVB radiation. *Radiat.Res.* 156, 36-44.
- Moncada, S., Gryglewski, R. J., Bunting, S., und Vane, J. R. (1976). A lipid peroxide inhibits the enzyme in blood vessel microsomes that generates from prostaglandin endoperoxides the substance (prostaglandin X) which prevents platelet aggregation. *Prostaglandins* 12, 715-737.
- Moriya, M. (1993). Single-stranded shuttle phage for mutagenesis studies in mammalian cell: 8-oxoguanine in DNA induces targeted GC-TA transversions in simian kidney cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 1122-1126.
- Moriya, M., Ou, C., Bodepudi, V., Johnson, F., Takeshita, T., und Grollmann, A. P. (1991). Site-specific mutagenesis using a gapped duplex vector: A study of translesion synthesis past 8-oxodeoxyguanosine in *E. coli*. *Mutat.Res.* 254, 281-288.
- Moss, R. W. (1987/1988). *Free radical: Albert Szent-Györgyi and the battle over Vitamin C*. Paragon House.
- Mulligan, R. C. und Berg, P. (1980). Expression of a bacterial gene in mammalian cells. *Science* 209, 1422-1424.
- Mutlu-Turkoglu, U., Dogru-Abbasoglu, S., Aykac-Toker, G., Mirsal, H., Beyazyurek, M., und Uysal, M. (2000). Increased lipid and protein oxidation and DNA damage in patients with chronic alcoholism. *J Lab Clin.Med* 136, 287-291.
- Mutschler, E., Geislinger, G., Kroemer, H. K., und Schäfer-Korting, M. (2001). *Arzneimittelwirkungen*.
- Nackerdien, Z., Rao, G., Cacciuttolo, M. A., Gajewski, E., und Dizdaroglu, M. (1991). Chemical nature of DNA-protein-cross-links produced in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of iron or copper ions. *Biochemistry* 30, 4873-4879.
- Nair, J., Vaca, C. E., Velic, I., Mutanen, M., Valsta, L. M., und Bartsch, H. (1997). High dietary omega6 polyunsaturated fatty acids drastically increase the formation of etheno-DNA base adducts in white blood cells of female subjects. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 6, 597-601.

- Navasumrit, P., Ward, T. H., Dodd, N. J., und O'Connor, P. J. (2000). Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented in vivo by antioxidants: effects of acute and chronic ethanol exposure. *Carcinogenesis* 21, 93-99.
- Needleman, P., Raz, A., Minkes, M. S., Ferrendelli, J. A., und Sprecher, H. (1979). Triene prostaglandins: prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* 76, 944-948.
- Neto, J. B., Gentil, A., Cabral, R. E., und Sarasin, A. (1992). Mutation spectrum of heat-induced abasic sites on a single-stranded shuttle vector replicated in mammalian cells. *J.Biol.Chem.* 267, 19718-19723.
- Niess, A. M., Hartmann, A., Grunert-Fuchs, M., Poch, B., und Speit, G. (1996). DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int.J.Sports Med.* 17, 397-403.
- Nitta, K., Uchida, K., Tsutsui, T., Honda, K., Kawashima, A., Yumura, W., und Nihei, H. (1998). Eicosapentaenoic acid inhibits mitogen-induced endothelin-1 production and DNA synthesis in cultured bovine mesangial cell. *Am J Nephrol* 18, 164-170.
- Noroozi, M., Angerson, W. J., und Lean, M. E. (1998). Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am.J.Clin.Nutr.* 67, 1210-1218.
- Obe, G., Natarajan, A. T., Meyers, M., und Hertog, A. D. (1979). Induction of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of human blood in vitro, and of SCEs in bone-marrow cells of mice in vivo by ethanol and its metabolite acetaldehyde. *Mutat.Res* 68, 291-294.
- Ochi, K., Yoshimoto, T., Yamamoto, S., Taniguchi, K., und Miyamoto, T. (1983). Arachidonate 5-lipoxygenase of guinea pig peritoneal polymorphonuclear leukocytes. Activation by adenosine 5'-triphosphate. *J Biol.Chem.* 258, 5754-5758.
- OhUigin, C., McDonnal, D. J., Kelly, J. M., und von der Putten, J. M. (1987). Methylene blue photosensitized strand cleavage of DNA: effects of dye binding and oxygen. *Nucl.Acids Res.* 15, 7411-7427.
- Olinski, R., Jaruga, P., und Zastawny, T. H. (1998). Oxidative DNA base modifications as factors in carcinogenesis. *Acta Biochim.Pol.* 45, 561-572.
- Oliw, E. H. (1983). Analysis of 1,2-diols of linoleic, alpha-linolenic and arachidonic acid by gas chromatography--mass spectrometry using cyclic alkyl boronic esters. *J Chromatogr.* 275, 245-259.
- Onkenhout, W., Venizelos, V., Van der Poel, P. F. H., Van den Heuvel, M. P. M., und Poorhuis, B. J. H. M. (1995). Identification and quantification of intermediates of unsaturated fatty acid metabolism in plasma of patients with fatty acid oxidation disorders. *Clin.Chem.* 41, 1467-1474.
- Orengo, I. F., Black, H. S., und Wolf, J. E. (1992). Influence of fish oil supplementation on the minimal erythema dose on humans. *Arch.Dermatol.Res.* 284, 219-221.

- Padayatty, S. J. und Levine, M. (2001). New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. *CMAJ*. 164, 353-355.
- Panayiotidis, M. und Collins, A. R. (1997). Ex vivo assessment of lymphocyte antioxidant status using the comet assay. *Free Rad.Res.* 27, 533-537.
- Paolini, M., Pozzetti, L., Pedulli, G. F., Marchesi, E., und Cantelli-Forti, G. (1999). The nature of prooxidant activity of vitamin C. *Life Sci.* 64, L-8.
- Pauling, L. (1970). *Vitamin C and the common cold*, W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Peak, J. G. und Peak, M. J. (1991). Comparison of initial yields of DNA-to-protein crosslinks and singlestrand breaks induced in cultured human cells by far- and near-ultraviolet light, blue light and x-rays. *Mutat.Res.* 246, 187-191.
- Pflaum, M. Oxidative DNA-Modifikationen durch langwelliges UV-Licht und sichtbares Licht. *Pharmakologie und Toxikologie*, Universität Würzburg. 1996. Ref Type: Thesis/Dissertation
- Pflaum, M., Boiteux, S., und Epe, B. (1994). Visible light generates oxidative DNA base modifications in high excess of strand breaks in mammalian cells. *Carcinogenesis* 15, 297-300.
- Pflaum, M., Kielbassa, C., Garmyn, M., und Epe, B. (1998). Oxidative DNA damage induced by visible light in mammalian cells: extent, inhibition by antioxidants and genotoxic effects. *Mutat.Res.* 408, 137-146.
- Piette, J., Calberg-Bacq, C. M., und van der Vorst, A. (1981). Alteration of guanine residues during proflavine mediated photosensitization of DNA. *Photochem.Photobiol.* 33, 325-333.
- Podmore, I. D., Griffiths, H. R., Herbert, K. E., Mistry, N., Mistry, P., und Lunec, J. (1998). Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature* 392, 559.
- Pohl, H. und Reidy, J. A. (1989). Vitamin C intake influences the bleomycin-induced chromosome damage assay: implications for detection of cancer susceptibility and chromosome breakage syndromes. *Mutat.Res* 224, 247-252.
- Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., und Morrison, A. R. (1985). The effects of a diet rich in fish oil on human neutrophils: identification of leukotriene B5 as a metabolite. *Prostaglandins* 30, 209-227.
- Prigent, C., Lasko, D. D., Kodama, K., Woodgett, J. R., und Lindahl, T. (1992). Activation of mammalian DNA ligase I through phosphorylation by casein kinase II. *EMBO J.* 11, 2925-2933.
- Purmal, A. A., Kow, Y. W., und Wallace, S. S. (1994). Major oxidative products of cytosine, 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil, exhibit sequence context-dependent mispairing in vitro. *Nucleic Acids Res.* 22, 72-78.

Radicella, J. P., Dherin, C., Desmaze, C., Fox, M. S., und Boiteux, S. (1997). Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 8010-8015.

Rehman, A., Collis, C. S., Yang, M., Kelly, M., Diplock, A. T., Halliwell, B., und Rice-Evans, C. (1998). The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 246, 293-298.

Renis, M., Calabrese, V., Russo, A., Calderone, A., Barcellona, M. L., und Rizza, V. (1996). Nuclear DNA strand breaks during ethanol-induced oxidative stress in rat brain. *FEBS Lett.* 390, 153-156.

Rhodes, L. (2000). nicht veröffentlichte Daten. N.N.

Rhodes, L. E., O'Farrell, S., Jackson, M. J., und Friedmann, P. S. (1994). Dietary fish-oil supplementation in humans reduces UVB-erythematous sensitivity but increases epidermal lipid peroxidation. *J Invest Dermatol* 103, 151-154.

Riku, R., Nakitani, S., Okada, N., und Yoshikawa, K. (1993). Growth inhibitory effect of eicosapentaenoic acid on cultured human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* 5, 14-28.

Rose, D. P. (1997). Effects of dietary fatty acids on breast and prostate cancer: evidence from in vitro experiments and animal studies. *Am.J.Clin.Nutr.* 66, 1513S-1522S.

Rosen, G. M., Pou, S., Ramos, C. L., Cohen, M. S., und Britigan, B. E. (1995). Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J.* 9, 200-209.

Rosenstein, B. S. und Mitchell, D. L. (1991). The repair of DNA damage induced in normal human skin fibroblasts exposed to simulated sunlight. *Radiat.Res.* 126, 338-342.

Salmela, K. S., Roine, R. P., Hook-Nikanne, J., Kosunen, T. U., und Salaspuro, M. (1994b). Acetaldehyde and ethanol production by *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol.* 29, 309-312.

Salmela, K. S., Salaspuro, M., Gentry, R. T., Methuen, T., Hook-Nikanne, J., Kosunen, T. U., und Roine, R. P. (1994a). *Helicobacter* infection and gastric ethanol metabolism. *Alcohol Clin Exp Res* 18, 1294-1299.

Samuelsson, B. (1983). Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 220, 568-575.

Satoh, M. S. und Lindahl, T. (1994). Enzymatic repair of oxidative DNA damage. *Cancer Res.* 54, 1899s-1901s.

Sauer, L. A., Dauchy, R. T., und Blask, D. E. (2000). Mechanism for the antitumor and anticachectic effects of n-3 fatty acids. *Cancer Res* 60, 5289-5295.

Schmitz, P. G., Zhang, K., und Dalal, R. (2000). Eicosapentaenoic acid suppresses PDGF-induced DNA synthesis in rat mesangial cells: involvement of thromboxane A2. *Kidney Int.* 57, 1041-1051.

- Schwartz, J. (2000). Role of polyunsaturated fatty acids in lung disease. *Am.J.Clin.Nutr.* 71, 393S-396S.
- Seitz, H. K., Czygan, P., Waldherr, R., Veith, S., Raedsch, R., Kassmodel, H., und Kommerell, B. (1984). Enhancement of 1,2-dimethylhydrazine-induced rectal carcinogenesis following chronic ethanol consumption in the rat. *Gastroenterology* 86, 886-891.
- Seitz, H. K. und Homann, N. (1998). *Alcohol and Cancer*. DFG-Veröffentlichung.
- Seitz, H. K., Simanowski, U. A., und Kommerell, B. (1988). [Alcohol and cancer]. *Z.Gastroenterol.* 26 Suppl 3, 106-119.
- Seitz, K., Lieber, C., und Simanowski, U. (1995). *Handbuch Alkohol, Alkoholismus, Alkoholbedingte Organschäden.*, Barth, Leipzig.
- Serhan, C. N., Fahlstadius, P., Dahlen, S. E., Hamberg, M., und Samuelsson, B. (1985). Biosynthesis and biological activities of lipoxins. *Adv.Prostaglandin Thromboxane Leukot.Res* 15, 163-166.
- Serhan, C. N., Hamberg, M., und Samuelsson, B. (1984). Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* 81, 5335-5339.
- Shibutani, S. (1993). Quantification of base substitutions and deletions induced by chemical mutagens during DNA synthesis in vitro. *Chem.Res.Toxicol.* 6, 625-629.
- Siegel, B.V. (1993). *Vitamin C and the immune response in health and disease. In Human nutrition: a comprehensive treatise* pp. 167-196. Plenum Press, New York, London.
- Sies, H. (1986). Biochemie des oxidativen Stress. *Angew.Chem.* 98, 1061-1075.
- Siess, W., Roth, P., Scherer, B., Kurzmann, I., Bohlig, B., und Weber, P. C. (1980). Platelet-membrane fatty acids, platelet aggregation, and thromboxane formation during a mackerel diet. *Lancet* 1, 441-444.
- Sigma Chemical Company. For Isolation of Mononuclear Cells, Procedure No. 1077. 1994.
Ref Type: Catalog
- Singh, N. P. (1997). Sodium ascorbate induces DNA single-strand breaks in human cells in vitro. *Mutat.Res.* 375, 195-203.
- Singh, N. P. und Khan, A. (1995a). Acetaldehyde: genotoxicity and cytotoxicity in human lymphocytes. *Mutat.Res* 337, 9-17.
- Singh, N. P., Lai, H., und Khan, A. (1995b). Ethanol-induced single-strand DNA breaks in rat brain cells. *Mutat.Res* 345, 191-196.
- Singletary, K. (1997). Ethanol and experimental breast cancer: a review. *Alcohol Clin Exp Res* 21, 334-339.

Slukvin, I. I. und Jerrells, T. R. (1995). Different pathways of in vitro ethanol-induced apoptosis in thymocytes and splenic T and B lymphocytes. *Immunopharmacology* 31, 43-57.

Southorn, P. A. und Powis, G. (1988). Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biological reactions. *Mayo.Clin.Proc.* 63, 381-389.

Speek, A. J., Schrijver, J., und Chreurs, W. H. P. (1984). Fluorimetric determination of total vitamin C in whole blood by high-performance liquid chromatography with pre-column derivatisation. *J.Chromatogr.A.* 305, 53-60.

Stadtman, E. R., Starke-Reed, P. E., Oliver, C. N., Carney, J. M., und Floyd, R. A. (1992). Protein modification in aging. *EXS* 62, 64-72.

Statistisches Bundesamt. Gesundheitsbericht für Deutschland. 1998.
Ref Type: Report

Statistisches Bundesamt (2000). Statistik der Todesursachen 1999. *DAZ* 48.

Steinmetz, K. A. und Potter, J. D. (1993). Food-group consumption and colon cancer in the Adelaide case-control study. II Meat, poultry, seafood, dairy foods and eggs. *Int.J.Cancer* 53, 720-727.

Stone (1967). The Genetic disease hypoascorbemia. *Acta Geneticae Medicae et Gemellologiae* 16, 52.

Svensson, J. und Fredholm, B. B. (1977). Vasoconstrictor effect of thromboxane A₂. *Acta Physiol Scand* 101, 366-368.

Sweetman, S. F., Strain, J. J., und McKelvey-Martin, V. J. (1997). Effect of antioxidant vitamin supplementation on DNA damage and repair in human lymphoblastoid cells. *Nutr.Cancer* 27, 122-130.

Sylvester, P. W., Birkenfield, H. P., Hosick, H. L., und Briski, K. P. (1994). Fatty acid modulation of epidermal growth factor-induced mouse mammary epithelial cell proliferation in vitro. *Exp Cell Res* 214, 145-153.

Takahashi, M., Fukutake, M., Fukuda, K., Ohata, T., Yazawa, K., Sugimura, T., und Wakabayashi, K. (1997). Suppression of rat colon carcinogenesis by docosahexanoic acid. *Proc.Am.Assoc.Cancer Res.* 38, 109.

Tang, D. G., Guan, K. L., und Li, L. (1997). Suppression of W256 carcinosarcoma cell apoptosis by arachidonic acid and other polyunsaturated fatty acids. *Int.J.Cancer* 72, 1078-1087.

Terano, T., Salmon, J. A., Higgs, G. A., und Moncada, S. (1986). Eicosapentaenoic acid as a modulator of inflammation. Effect on prostaglandin and leukotriene synthesis. *Biochem.Pharmacol* 35, 779-785.

Thomas, D.B. (1995). Alcohol as a cause of cancer. *Environ.Health.Perspect.* 103(8), 153-160.

- Thome, J., Zhang, J., Davids, E., Foley, P., Weijers, H. G., Wiesbeck, G. A., Boning, J., Riederer, P., und Gerlach, M. (1997). Evidence for increased oxidative stress in alcohol-dependent patients provided by quantification of in vivo salicylate hydroxylation products. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 21, 82-85.
- Thorngren, M. und Gustafson, A. (1981). Effects of 11-week increases in dietary eicosapentaenoic acid on bleeding time, lipids, and platelet aggregation. *Lancet* 2, 1190-1193.
- Trigatti, B. L. und Gerber, G. E. (1995). A direct role for serum albumin in the cellular uptake of long-chain fatty acids. *Biochem.J.* 15, 155-159.
- Tudek, B., Boiteux, S., und Laval, J. (1992). Biological properties of imidazole ring-opened N7-methylguanine in M13mp18 phage DNA. *Nucleic Acids Res.* 20, 3079-3084.
- Tuyns, A. J., Pequignot, G., und Jensen, O. M. (1978). [Nutrition, alcohol and oesophageal cancer (author's transl)]. *Bull.Cancer* 65, 58-64.
- Vaca, C. E., Wilhelm, J., und Harms-Ringdahl, M. (1988). Interaction of lipid peroxidation products with DNA: a review. *Mutat.Res.* 195, 137-149.
- van der Kemp, P. A., Thomas, D., Barbey, R., de Oliveira, R., und Boiteux, S. (1996). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. *Proc.Natl.Acad. Sci U.S.A* 93, 5197-5202.
- Vapaatalo, H. und Parantainen, J. (1978). Prostaglandins; their biological and pharmacological role. *Med Biol.* 56, 163-183.
- Varma, S. D. (1987). Ascorbic acid and the eye with special reference to the lens. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 498, 280-306.
- Vojdani, A., Bazargan, M., Vojdani, E., und Wright, J. (2000). New evidence for antioxidant properties of vitamin C. *Cancer Detect.Prev.* 24, 508-523.
- Vojdani, A. und Ghoneum, M. (1993). In vivo effect of ascorbic acid on enhancement of human natural killer cell activity. *Nutr.Res.* 13, 753-764.
- von Sonntag, C. (1987). *The chemical basis of radiation biology.* Taylor & Francis, London.
- Wallace, S. S. (1988). AP endonucleases and DNA glycosylases that recognize oxidative DNA damage. *Environ.Mol.Mutagen.* 12, 431-477.

Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U., Barclay, L. R. C., und Locke, S. J. (1987). The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim.Biophys.Acta* 924, 408-419.

Wei, H., Cai, Q., Tian, L., und Lebwohl, M. (1998). Tamoxifen reduces endogenous and UV light-induced oxidative damage to DNA, lipid, and protein in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 19, 1013-1018.

Weiss, S. J. und Ward, P. A. (1982). Immune complex induced generation of oxygen metabolites by human neutrophils. *J Immunol.* 129, 309-313.

Wengler, G., Gorlin, J. B., Williamson, J. M., Rosen, F. S., und Bing, D. H. (1995). Nonrandom inactivation of the X chromosome in early lineage hematopoietic cells in carriers of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 85, 2471-2477.

Wertz, I. E. und Hanley, M. R. (1996). Diverse molecular provocation of programmed cell death. *TIBS* 21, 359-364.

White, B. C., Nayini, N. R., Krause, G. S., Aust, S. D., March, G. G., Bicknell, J. S., und Goosmann, M. (1988). Effect on biochemical markers of brain injury of therapy with deferoxamine or superoxide dismutase following cardiac arrest. *Am J Emerg.Med* 6, 569-576.

Wiesner, G. Alkoholassoziierte Mortalität. Caspar, W., Wiesner, G., and Bergmann, K. E. 10/95, 355-384. 1995. Berlin, RKI. Mortalität und Todesursachen in Deutschland. Ref Type: Report

Will, O., Mahler, H. C., Arrigo, A. P., und Epe, B. (1999). Influence of glutathione levels and heat-shock on the steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells. *Carcinogenesis* 20, 333-337.

Williams, G. M. und Jeffrey, A. M. (2000). Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 32, 283-292.

Wolfe, L. S. (1982). Eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, and other derivatives of carbon-20 unsaturated fatty acids. *J Neurochem.* 38, 1-14.

Wood, M. L., Dizdaroglu, M., Gajewski, E., und Essigmann, J. M. (1990). Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted in a unique site in a viral genome. *Biochemistry* 29, 7024-7032.

Wu, A. H., Ziegler, R. G., Horn-Ross, P. L., Nomura, A. M., Wetst, D. W., Kolonel, L. N., Rosenthal, J. F., Hoover, R. N., und Pike, M. C. (1996). Tofu and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5, 901-906.

Wu J.M., Wang Z.R., Hsieh T.C., Bruder J.L., Zou J.G. und Huang Y.Z. (2001). Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review). *Int J Mol Med* 8(1), 3-17

Wynder, E. L., Mabuchi, K., Maruchi, N., und Fortner, J. G. (1973a). A case control study of cancer of the pancreas. *Cancer* 31, 641-648.

Wynder, E. L., Mabuchi, K., Maruchi, N., und Fortner, J. G. (1973b). Epidemiology of cancer of the pancreas. *J Natl.Cancer Inst.* 50, 645-667.

Zhang, P. und Omaye, S. T. (2001). Antioxidant and prooxidant roles for beta-carotene, alpha-tocopherol and ascorbic acid in human lung cells. *Toxicol.In Vitro* 15, 13-24.

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Marie Isabel Homburg

Mainz, im Dezember 2001