

Zentrum für Experimentelle Medizin  
Institut für Molekulare Zellbiologie  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Frau Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel

**Schutzwirkung des Vitamins E  
in Abhängigkeit der Dosis auf den Grad  
der Eiseneinlagerung in Herz, Leber und Milz  
bei der primären, hereditären Hämochromatose**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Claudia Engert  
Hamburg, Oktober 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg  
am: 25.10.2007

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Frau Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Herr PD Dr. P. Nielsen

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. J. Düllmann

**Inhaltsverzeichnis**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>                               | <b>3</b>  |
| <b>Tabellenverzeichnis .....</b>                                 | <b>4</b>  |
| <b>1. Einleitung.....</b>  | <b>5</b>  |
| 1.1. Eisenstoffwechsel .....                                     | 5         |
| 1.2. Pathogenese der Eisenüberladung .....                       | 8         |
| 1.3. Schädigungswege, Lipidperoxidation und freie Radikale.....  | 13        |
| 1.4. Vitamin E (Tocopherol).....                                 | 15        |
| 1.5. Klinischer Einsatz von Vitamin E .....                      | 16        |
| 1.6. Vitamin A .....   | 18        |
| 1.7. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit.....             | 20        |
| <b>2. Material und Methoden.....</b>                             | <b>22</b> |
| 2.1. Das Rattenmodell und Gruppeneinteilung .....                | 22        |
| 2.2. Material.....   | 23        |
| 2.2.1. Futter .....  | 23        |
| 2.2.2. Chemikalien.....  | 23        |
| 2.2.3. Lösungen zur Eisenbestimmung in Milz, Leber und Herz..... | 23        |
| 2.2.4. Geräte .....  | 24        |
| 2.3. Gewinnung und Aufarbeitung der Serum- und Organproben ..... | 27        |
| 2.4. Gewebeeisenbestimmungen von Herz, Leber und Milz.....       | 27        |
| 2.4.1. Veraschung .....  | 27        |
| 2.4.2. Eisenauswertung.....                                      | 28        |
| 2.5. Vitamine A und E.....                                       | 29        |
| 2.5.1. Vitaminmessungen im Plasma .....                          | 29        |
| 2.5.2. Vitamin-E-Kalibrierung .....                              | 29        |
| 2.5.3. Vitamin A .....   | 32        |
| 2.6. Statistische Methoden.....                                  | 35        |

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3. Ergebnisse</b> .....                                       | <b>36</b> |
| 3.1. Ergebnisse der Eisen- und Vitaminmessungen .....            | 36        |
| 3.1.1. Gewebeeisenkonzentrationen .....                          | 37        |
| 3.1.2. Vitaminmessungen im Serum .....                           | 41        |
| <b>4. Diskussion</b> .....                                       | <b>45</b> |
| 4.1. Erläuterung und Abgrenzung der verwendeten Methoden.....    | 45        |
| 4.1.1. Eisenüberladungsmodell .....                              | 45        |
| 4.1.2. Eisenbestimmung .....                                     | 46        |
| 4.1.3. Vitaminbestimmung .....                                   | 47        |
| 4.2. Diskussion der Ergebnisse.....                              | 49        |
| 4.2.1. Eisenabsorption, Eisenüberladung und Antioxidantien ..... | 49        |
| 4.2.2. Ergebnisse der Eisenmessungen.....                        | 50        |
| 4.2.3. Vitamin E .....   | 52        |
| 4.2.4. Ergebnisse der Vitamin-E-Messungen.....                   | 53        |
| 4.2.5. Vitamin A .....   | 55        |
| 4.2.6. Ergebnisse der Vitamin-A-Messungen .....                  | 55        |
| 4.2.7. Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen.....      | 57        |
| <b>5. Zusammenfassung</b> .....                                  | <b>59</b> |
| <b>Literaturverzeichnis</b> .....                                | <b>60</b> |
| <b>Anhang</b> .....  | <b>73</b> |
| I. Originaldaten der Organ-Eisenwerte .....                      | 73        |
| II. Originaldaten der Serum-Vitaminwerte .....                   | 74        |

Danksagung

Erklärung

Lebenslauf

---

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abb. 1: Synthese von Hepsidin in der Leber.....   | 7  |
| Abb. 2: Regulation der Eisenabsorption bei normalem Eisenstoffwechsel.....  | 8  |
| Abb. 3: Mögliche Ereigniskaskade der Leberzellschädigung bei hereditärer Hämochromatose mit chronischer Eisenüberladung [Nielsen 2000]. ..... | 11 |
| Abb. 4: Kettenreaktion bei der Lipidperoxidation sowie die Rolle und Einbindung der Vitamine E und C .....                                    | 14 |
| Abb. 5: $\alpha$ -Tocopherol. ....  | 15 |
| Abb. 6: Vitamin-A-(Retinol-)Bildung aus dem Provitamin $\beta$ -Carotin. ....   | 18 |
| Abb. 7: Allgemeines Schema einer HPLC-Einheit .....   | 25 |
| Abb. 8: Eichgerade für $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E). ....   | 30 |
| Abb. 9: Originalchromatogramm für die Eichung von $\alpha$ -Tocopherolacetat, aufgetragen auf einer Zeitskala in Minuten. ....                | 30 |
| Abb. 10: Eichgerade für all-trans-Retinol. ....   | 33 |
| Abb. 11: Originalchromatogramm zur Vitamin-A-Kalibrierung, aufgetragen auf einer Zeitskala in Minuten. ....                                   | 34 |
| Abb. 12: Zunahme der Lebereisenkonzentration [ $\mu\text{g Fe/g}$ ] in Abhängigkeit zur Fütterungsdauer. ....                                 | 37 |
| Abb. 13: Zunahme der Milzeisenkonzentration [ $\mu\text{g Fe/g}$ ] in Abhängigkeit zur Fütterungsdauer.....                                   | 38 |
| Abb. 14: Zunahme der Herzeisenkonzentration ( $\mu\text{g Fe/g}$ ) in Abhängigkeit zur Fütterungsdauer. ....                                  | 39 |
| Abb. 15: Originalchromatogramm zu Versuchstier PC 1, aufgetragen auf einer Zeitskala in Minuten. ....   | 41 |
| Abb. 16: Abnahme der Vitamin-E-Konzentration in Abhängigkeit zur Fütterungsdauer. ....  | 42 |
| Abb. 17: Verlauf der Vitamin-A-Konzentration in Abhängigkeit zur Fütterungsdauer.   | 43 |

**Tabellenverzeichnis**

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1: Formen der hereditären Hämochromatose in der OMIM-Klassifikation.....  | 9  |
| Tabelle 2: Über die Versuchsgruppen (n = Anzahl der Versuchstiere) .....          | 22 |
| Tabelle 3: Über die Versuchsgruppen (n = Anzahl der Versuchstiere) .....          | 36 |
| Tabelle 4: Mittelwerte der Organeisenkonzentrationen .....                        | 40 |
| Tabelle 5: Mittelwerte der Vitaminkonzentration im Plasma der Versuchstiergruppen | 44 |

## 1. Einleitung

Bevor im Folgenden auf die genaue Problemstellung, auf der diese Arbeit basiert, eingegangen wird, sollen zunächst einige grundlegende Fakten bezüglich der Eisenüberladung und der Wirkungsweise von Vitamin E und A dargestellt werden.

### 1.1. Eisenstoffwechsel

Eisen ist das sechsthäufigste Element im Universum und das vierthäufigste in der Erdkruste. Es gehört zu den Übergangselementen und bildet im Wesentlichen zwei Oxidationsstufen [Fe(II) und Fe(III)] aus [Nielsen 2000]. Freies Eisen ist sehr reaktiv und demzufolge toxisch für die Zellen, weshalb diese einerseits über einen ausgeprägten Oxidationsschutz verfügen und andererseits das Eisen in für sie unschädlicher Form verpacken. Der menschliche Körper eines Erwachsenen enthält 3-5 g Eisen. Dabei beläuft sich der tägliche physiologische Eisenverlust in Form von abgeschilferten Epithelzellen sowie durch Schweiß und Urin lediglich auf etwa 0,03 %, d. h. ~ 1-2 mg [Knutson et al. 2003] und ist nicht regulierbar. Etwa 70 % sind an Hämoglobin gebunden und ca. 11 % in einer Reihe von Häm- oder Nicht-Hämeisenzymen enthalten bzw. als Depoteisen in Ferritin und Hämosiderin (19 %) gespeichert [Nielsen 2000]. Nur ca. 0,14 % des Eisens bewegt sich, an das Transportprotein Transferrin gebunden, im Plasma. Eisen dient in erster Linie der Sauerstoffversorgung des menschlichen Organismus, darüber hinaus ist es an der zellulären Energiebereitstellung (Cytochrom C), dem Xenobiotikametabolismus (Cytochrom-P450), an der DNA-Synthese und an der Entsorgung von Sauerstoffradikalen (Catalase, Peroxidase) beteiligt. Der Hauptort für die Absorption von Eisen in allen Formen ist das Duodenum und das obere Jejunum. Im starken Eisenmangel können aber auch tiefere Darmabschnitte zusätzlich substantielle Eisenmengen absorbieren. Das Eisen wird aus der Nahrung nach Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  – über den Protonensymporter DMT1 (divalent metal transporter 1) [Donovan et al. 2005, Gunshin et al. 1997, Latunde-Dada et al. 2002, Nielsen et al. 2003, Pantopoulos 2004, Powell 2004], der zweiwertiges Eisen und andere Schwermetalle transportiert, aufgenommen. Eisen kann auch mit intaktem Häm direkt aufgenommen werden, wobei es danach über Ferroportin in die Blutbahn ausgeschieden wird [Donovan et al. 2005, Fleming 2005, Gallati et al. 2002]. Im Blut wird Eisen an

Transferrin gebunden und über die Transferrinrezeptoren an die Zellen abgegeben, die ihren Bedarf an Eisen über IRPs (iron regulatory proteins) ausdrücken, welche die Expression von Transferrin-Rezeptor und Ferritin kontrollieren [Miret et al. 2003, Pantopoulos 2004]. Hieran ist vermutlich auch das HFE-Gen beteiligt [Gallati et al. 2002]. Der Bedarf des Organismus wird über mindestens drei Mechanismen auf dem Niveau des Dünndarms reguliert [Parkkila et al. 2001]: dem so genannten Eisenblock, der bei reichlichem Eisenangebot die Aufnahme normalerweise herunterreguliert, während sie bei Eisenmangel intensiver wird [Bacon et al. 1990, Long 2004], sowie zwei anderen, noch nicht eindeutig charakterisierten löslichen Faktoren, dem Speicherregulator und dem erythropoetischen Regulator [Gallati et al. 2002], wobei das im Jahre 2001 entdeckte 25 AS-Peptid Heparin als Speicherregulator eine Art Sensor darstellen könnte [Canonne-Hergaux et al. 2004, Fleming 2005, Gallati et al. 2002, Ganz 2003, Miret et al. 2003, Nicholas et al. 2001]. Zumindest ist inzwischen klar, dass Heparin den zentralen Regulator der intestinalen Eisenabsorption darstellt [Fleming 2005, Kemna et al. 2005, Leung et al. 2005, Nemeth et al. 2004, Papanikolaou et al. 2005, Roy et al. 2005]. Heparin bindet offenbar an IRE1 und bewirkt eine Internalisierung von diesem Protein, so dass der basolaterale Eisentransport herunterreguliert wird [Nemeth et al. 2004]. Die Synthese in der Leber ist abhängig von der Leber- und Plasmaeisenkonzentration, herunterreguliert bei Eisenmangel, erhöht bei Eisenüberladung (Abb. 1).

Die Absorption von ionischem Nahrungseisen kann prinzipiell durch bestimmte Stoffe, die in vielen pflanzlichen Nahrungsmitteln vorhanden sind, wie z. B. pflanzliche Polyphenole in Tee oder Hülsenfrüchten, Phytate in Getreiden, Nüssen, Hülsenfrüchten, pflanzliche „nicht-Stärke-Polysaccharide“ in Getreiden sowie Calcium und Phosphat, z. B. in Coca-Cola und Limonaden, gehemmt werden. Die Wirkung dieser Inhibitoren beruht auf einer Komplexbildung bzw. teilweisen Ausfällung von ionischem Eisen im Gastrointestinaltrakt.

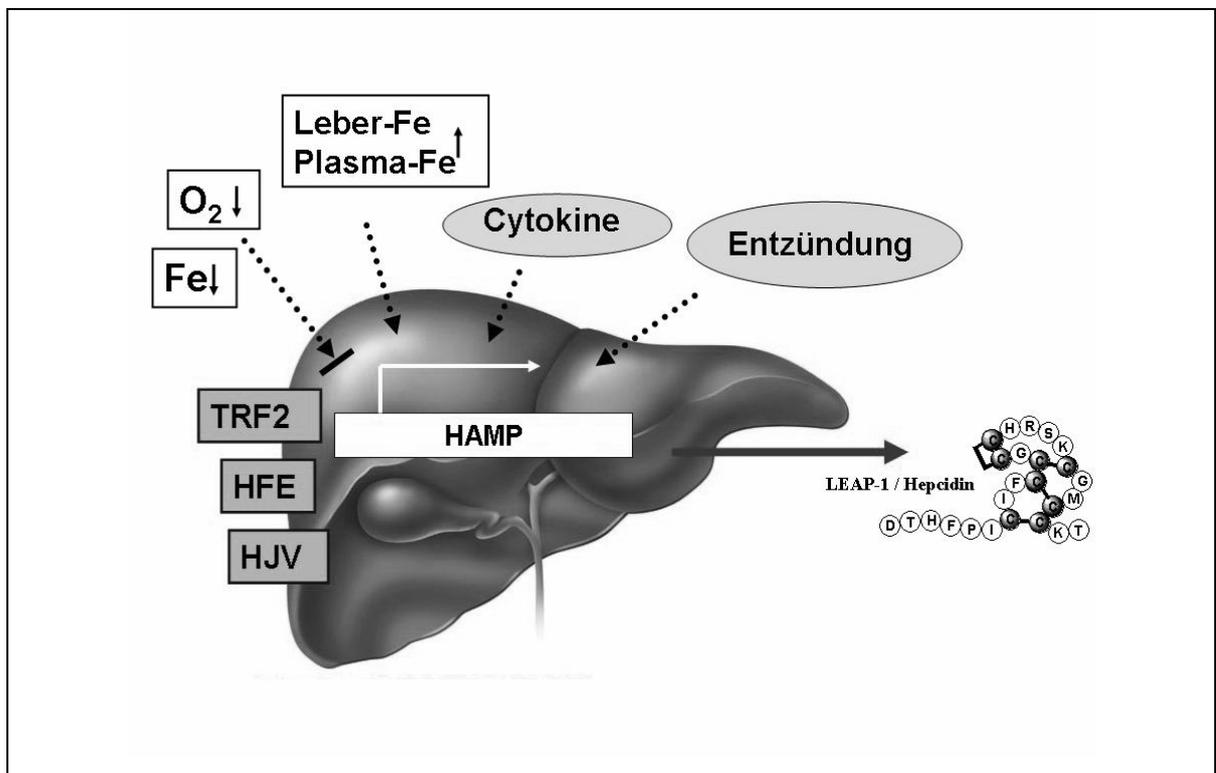


Abb. 1: Synthese von Heparin in der Leber.

HFE, Tfr2 (Transferrinrezeptor 2) und HJV (Hämojuvelin) müssen intakt vorhanden sein, weil Ausfall dieser Proteine zu unterschiedlichen Hämochromatoseformen (Typ 1-3) führen, die alle mit dem Fehlen von Heparin einhergehen. Eisenmangel hemmt, chronische Entzündungszustände stimulieren die Heparinsynthese, überfüllte Eisenspeicher in der Leber oder hohe Plasmaeisenkonzentrationen fördern die Heparinausschüttung. Ob Heparin selbst direkt den Sensor für Speichereisen darstellt oder ob die Heparinsynthese mit einem unbekanntem Sensor verknüpft ist, ist bisher nicht bekannt.

Die Eisenausscheidung erfolgt über Zellmauserung der Darmmukosa, zu geringen Anteilen auch über Galle, Schweiß, Urin und Menstruationsblut. Die Hauptspeicherorte für Eisen sind das so genannte retikuloendotheliale System (RES), die Skelettmuskulatur und die Leberparenchymzellen. Das Eisen im RES des Knochenmarks, der Milz und der Leber stammt hauptsächlich aus phagozytierten Erythrozyten und wird an Transferrin abgegeben und zur Hämatopoese ins Knochenmark transportiert [Gordeuk et al. 1987].

In Abbildung 2 wird die beschriebene Eisenabsorption anhand einer Graphik dargestellt.

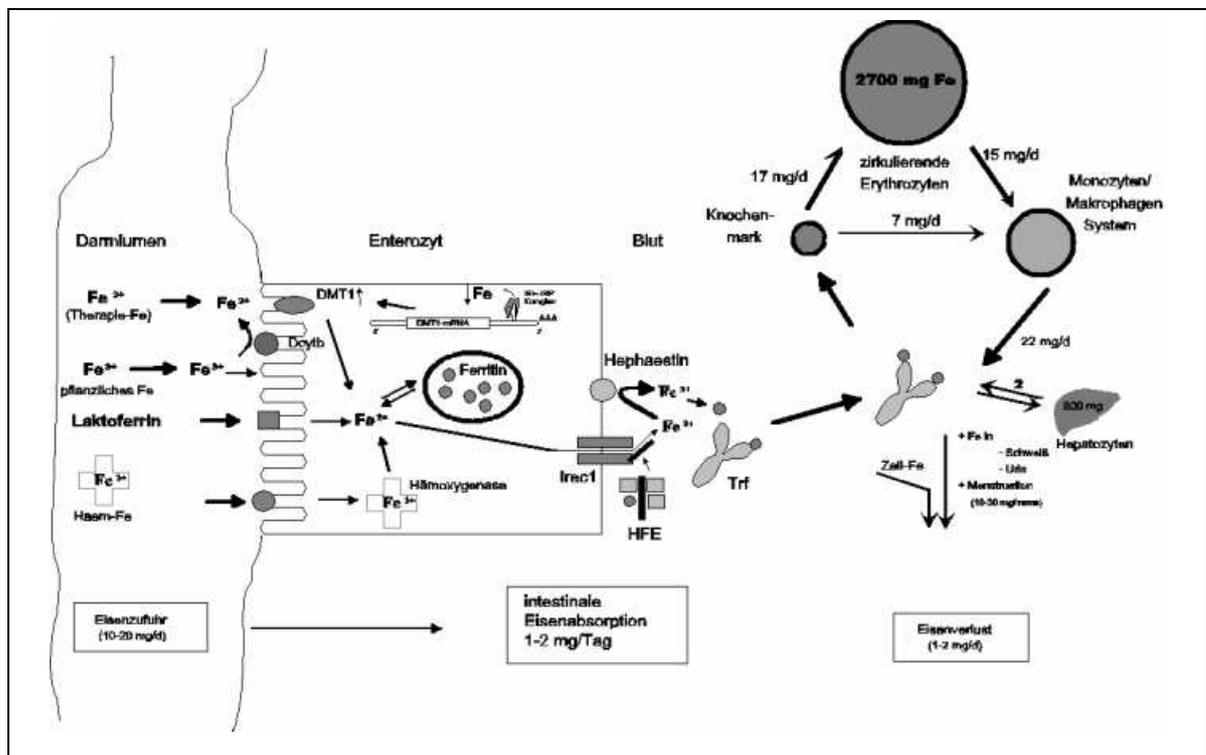


Abb. 2: Regulation der Eisenabsorption bei normalem Eisenstoffwechsel.

Gezeigt werden die Routen des Eisentransports bei einem Erwachsenen (Zahlenangaben in mg/Tag für einen 70 kg schweren Mann). Der Plasmaeisen-Pool besteht aus etwa 4 mg an Transferrin gebundenem Eisen, während der Turnover etwa 30 mg Eisen/Tag beträgt.

## 1.2. Pathogenese der Eisenüberladung

Ist die Balance zwischen Eisenausscheidung und -absorption gestört, kommt es entweder zum Eisenmangel oder zur Eisenüberladung (signifikant bei Werten über 5 g Körpereisen). Zu Gewebeschäden wie z. B. einer Leberzirrhose kommt es meist erst ab ca. 10 g Körpereisen [Pippard 1994]. Die pathologische Eisenüberladung wird in die genetische (primäre, hereditäre) und die sekundäre Transfusionssiderose untergliedert.

Bei Letzterer kommt es durch parenterale Eisenzufuhr oder durch eine erhöhte Resorption bei einer Hyperplasie mit ineffektiver Erythropoese zu einer Eisenüberladung. Exemplarisch seien hier die Thalassämia major und sideroblastische Anämie, chronische Lebererkrankungen (alkoholische Leberzirrhose und porto-kavaler Shunt), die erhöhte orale Aufnahme (medizinische Überdosierung) und andere erbliche oder kongenitale Störungen (Porphyria cutanea tarda, kongenitale Atransferrinämie) genannt.

Bei der genetischen Eisenüberladung handelt es sich um die primäre Hämochromatose, eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung. 1996 wurde auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 in der Nähe des HLA-Komplexes ein Gen lokalisiert, welches heute HFE-Gen (Human-Leukozyte-Antigen) genannt wird [Beutler 2002, Feder et al. 1996, Gallati et al. 2002, Pietrangelo 2004]. So weisen sehr viele Patienten in Nordeuropa, USA und Australien mit klinisch festgestellter homozygoter Hämochromatose eine bestimmte Punktmutation (C282Y) in diesem Gen (Hämochromatose-Gen) auf [Feder et al. 1996, Powell 2004, Wood et al. 1998]. Diese Mutation fand sich bei 95–100 % der untersuchten Hämochromatosepatienten in Deutschland [Nielsen et al. 1998]. Inzwischen wurden vier Formen der Hereditären Hämochromatose charakterisiert, welche in Tabelle 1 dargestellt werden.

| Grundformen                   | HFE-assoziierte Hämochromatose | Juvenile Hämochromatose |                 | TfR2-assoziierte Hämochromatose | Ferroportin-assoz. Eisenüberladung |
|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------|-----------------|---------------------------------|------------------------------------|
| OMIM Klassifikation           | Typ 1                          | Typ 2, Subtyp A         | Typ 2, Subtyp B | Typ 3                           | Typ 4                              |
| Betroffenes Gen und Chromosom | HFE, 6p21.3                    | HFE2, 1q21              | HAMP, 19q13.1   | TfR2, 7q22                      | SLC40A1, 2q32                      |
| Name des Genprodukts          | HFE                            | Hämojuvelin             | Hepcidin        | Transferrin Rezeptor 2          | Ferroportin                        |
| Vererbung                     | autos.-rez.                    | autos.-rez.             | autos.-rez.     | autos.-rez.                     | autos.-dom.                        |

Tabelle 1: Formen der hereditären Hämochromatose in der OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)-Klassifikation. [Pietrangelo 2004]

Die idiopathische Hämochromatose zählt zu den häufigsten vererbten Stoffwechselerkrankungen in Nordeuropa. Das Manifestationsalter liegt in der Regel zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr [Pietrangelo 2004]. Die Prävalenz homozygoter Personen liegt bei 1 : 300 bis 1 : 400, die der heterozygoten bei 1 : 10 bis 1 : 20 [Feder et al. 1996]. Dabei sind fast alle Patienten mit Hämochromatose in Nordeuropa homozygot für die

C282Y-Mutation [Nielsen et al. 1998b]. Die phänotypische Ausprägung der Erkrankung variiert und hängt nicht nur von genetischen, sondern darüber hinaus von weiteren Faktoren ab, die auf Eisenaufnahme oder -verlust einwirken, wie z. B. Alkoholkonsum, Eisengehalt der Nahrung und Blutverlust durch Menstruation, sodass die Prävalenz der manifesten Hämochromatose nur bei etwa 1 : 4000 bis 1 : 5000 liegt. Frauen sind 5 bis 10 Mal seltener betroffen als Männer. Heterozygote zeigen zwar manchmal Auffälligkeiten im Eisenstoffwechsel (z. B. zeitweilig erhöhtes Serum-Eisen), entwickeln aber nach bisherigen Erkenntnissen lebenslang keine klinisch relevante Eisenüberladung [Beutler et al. 2002].

Bei der homozygoten Form kommt es zu einer massiven intestinalen Aufnahme nicht benötigten Eisens, welches nicht ausgeschieden werden kann und deshalb in verschiedenen Geweben (besonders in Leber und Milz) abgelagert werden muss. Dort wirkt es zelltoxisch und führt zu Nekrosen [Sharma et al. 1990], sodass es unbehandelt im weiteren Verlauf zu Leberzirrhose, Hepatomegalie, Splenomegalie, Hyperpigmentierung der Haut (Bronzediabetes), multiplen Endokrinopathien (z. B. Diabetes), einer dilatativen Myokardiopathie und unspezifischen Beschwerden wie Oberbauchschmerzen, Müdigkeit und verminderter Leistungsfähigkeit, die Ausdruck der Lebererkrankung sind, kommt [Adams et al. 1997, Niederau et al. 1985]. Eine Frühdiagnose vor dem Auftreten von Leberzirrhose und Diabetes mellitus ist von großer Bedeutung, weil die Prognose durch konsequente Aderlasstherapie entscheidend verbessert werden kann. Frühe Befunde sind Arthralgien, die besonders die Metakarpophalangealgelenke der Hände betreffen, abdominelle Beschwerden und frühzeitige Impotenz bzw. Amenorrhoe und Hepatosplenomegalie. Zu eiseninduzierten Organschäden kommt es erst jenseits des 45. Lebensjahres. Im Serum sind Eisen, Ferritin und Transferrinsättigung erhöht. Der Mechanismus der zytotoxischen Wirkung des Eisens ist noch unklar, eine Schlüsselrolle kommt hier jedoch in jedem Falle den Kupffer'schen Sternzellen zu [Miret et al. 2003], die der Gruppe der mononukleären Phagozyten angehören und in der Lage sind, Bakterien, Viren, Zelldetritus, Immunkomplexe und Toxine zu phagozytieren. Bei diesem Prozess kommt es zur Bildung des entgiftungspflichtigen, hochtoxischen  $H_2O_2$ , zur Prostaglandinsynthese und zur Freisetzung von Kollagenasen. Zusammen mit dem

zusätzlichen Verlust antioxidativer Vitamine führt dies zu einer gesteigerten Bildung toxischer Peroxide.

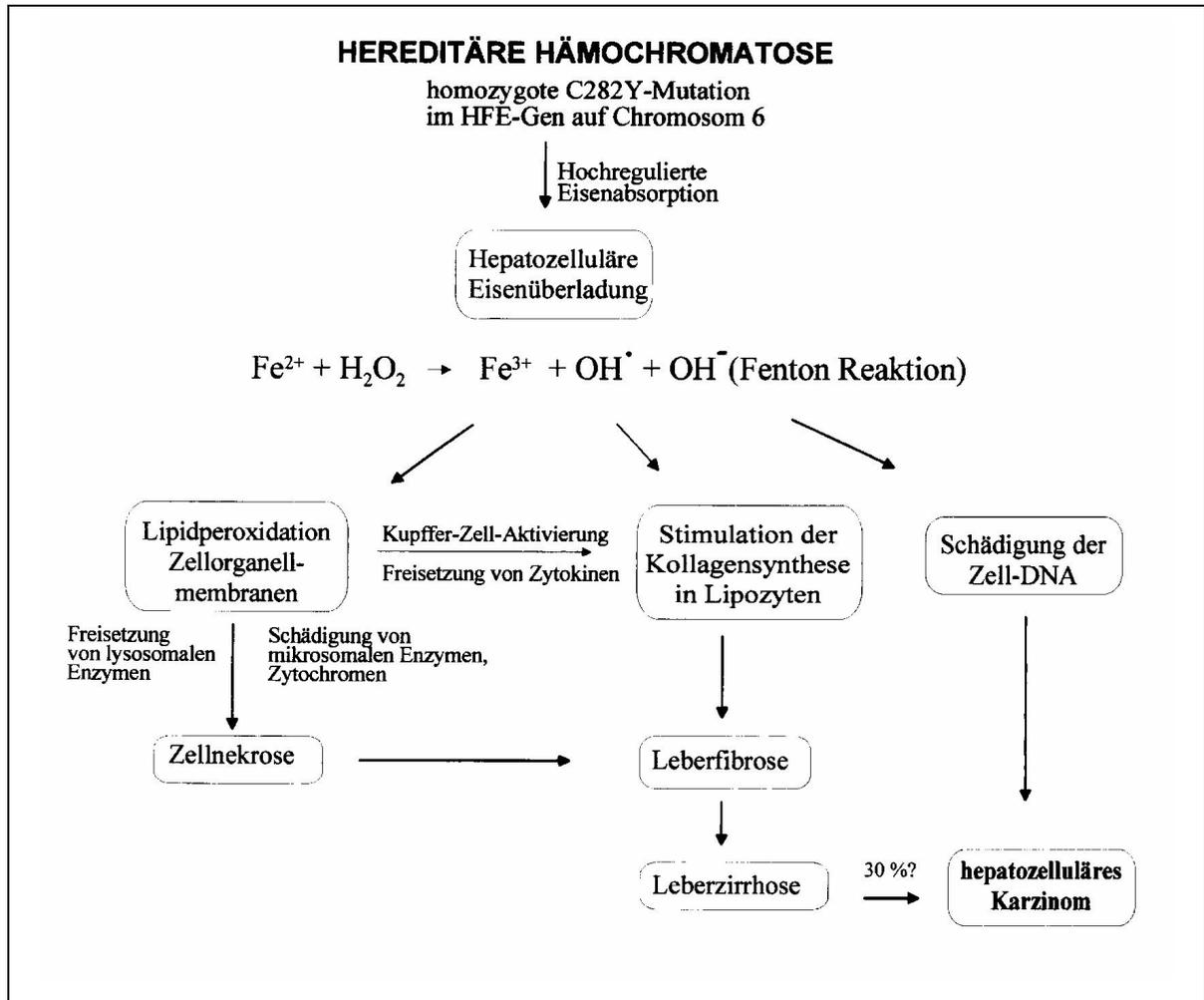


Abb. 3: Mögliche Ereigniskaskade der Leberzellschädigung bei hereditärer Hämochromatose mit chronischer Eisenüberladung [Nielsen 2000].

Die Eisenspeicherung im Rahmen der Hämochromatose erfolgt primär in den Hepatozyten, erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt auch eine Eisenüberladung der Kupfer'schen Sternzellen, der Gallengangsepithelien und des gesamten Leberläppchens. Die durch die hereditäre Hämochromatose induzierte Leberzirrhose bzw. -fibrose entsteht typischerweise periportal.

Die Diagnostik besteht aus der Analyse der Laborbefunde (die Kombination aus der Erhöhung des Ferritins und der Transferrinsättigung auf über 60 % spricht für eine

Hämochromatose) und einer Leberpunktion (hierbei ist insbesondere der hepatische Eisenindex = hepatischer Eisengehalt [ $\mu\text{mol/g}$ ]/Alter [Jahre] von Bedeutung) [Powell 2004]. Eine Ablagerung des überschüssigen Eisens in den Gallengangsepithelien ist ebenfalls ein Indiz für eine hereditäre Hämochromatose, da man diese Form der Eisenablagerung bei keiner anderen Siderose findet. Diese invasive Leberpunktion kann seit einigen Jahren auch durch die nichtinvasive Messung der Leber-Eisen-Konzentration mithilfe eines SQUID-Biomagnetometers (Supraconducting quantum interference device) vermieden werden. Diese Methode wird inzwischen jährlich bei Hunderten von Patienten angewandt [Beutler et al. 2002, Fischer et al. 2003, Starr et al. 2001]. Eine annähernd alternative Methode ist das quantitative MRI [Fischer et al. 2003, Kaltwasser et al. 1990]. Zudem können die Untersuchungen seit neuestem durch einen Nachweis von Genveränderungen im HFE-Gen ergänzt werden [Feder et al. 1996, Powell 2004].

Therapie: Das Therapieziel bei Hämochromatosen ist die Entspeicherung des Eisendepots im Körper, sodass die erschöpfende Aderlasstherapie (etwa 500 ml Blutentzug = 250 mg Eisen/Woche) die effektivste Behandlungsmöglichkeit darstellt [Beutler et al. 2002], bei der so lange therapiert wird, bis sich eine leichte Eisenmangelanämie (Hb stabil < 11 g/dl) einstellt. Nach einer Therapiepause von etwa 6–12 Monaten wird dann nach Wiederanstieg der empfindlichen Blutparameter (Serum-Fe, Transferrin-Fe-Sättigung) eine Erhaltungstherapie (3–6 Aderlässe/Jahr) durchgeführt, um die weiter überschüssig aufgenommenen Eisenmengen sofort wieder zu entfernen und somit einer Reakkumulation von Eisen dauerhaft entgegenzuwirken [Nielsen 2000]. Die Aderlasstherapie ist als sicher und allgemein gut verträglich bekannt. Geht die Hämochromatose gleichzeitig mit einer Anämie einher, kann die Eisenüberladung mit dem Eisen-Chelatbildner Desferoxamin behandelt werden, wobei jedoch erst nach mehreren Jahren eine Entspeicherung des Körpereisendepots zu erwarten ist [Nielsen et al. 2003, Powell 2004]. Bei bereits schwer kranken Patienten, die eine Aderlasstherapie anfangs nicht tolerieren, empfiehlt sich ebenfalls eine Therapie mit Desferoxamin [Nielsen 2000].

Erfolgt eine konsequente Therapie der Hämochromatose im präzirrhotischen Stadium ohne Diabetes mellitus, weicht die Lebenserwartung nicht relevant von derjenigen der altersentsprechenden Normalbevölkerung ab [Adams et al. 1997, Niederau et al. 1985 und

1996]. Liegt bereits eine Leberzirrhose vor, beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate bei konsequenter Therapie 70 %; die Eisenentspeicherung mindert in diesem Fall nicht das Risiko der Entwicklung eines primären Leberzellkarzinoms. Hepatosplenomegalie, Fibrose und Hautpigmentierung können sich zwar während der Aderlasstherapie zurückbilden, die endokrinen Störungen und die Arthropathie sind allerdings in der Regel irreversibel.

### **1.3. Schädigungswege, Lipidperoxidation und freie Radikale**

Eine wichtige Rolle bei der Leberschädigung durch Eisen wird dem Ferritin und dem Hämosiderin zugeschrieben [Jucket et al. 1995]. In eisenüberladenen Hepatozyten, besonders in der Lysosomenfraktion, akkumulieren diese an der Eisenspeicherung beteiligten Moleküle, sodass es hier elektronenmikroskopisch nachweisbar zu einer Hypertrophie und damit zu einem verstärkten Vorkommen zelltoxischer Enzyme, welche eine weitere Progredienz der Organschädigung bewirken, kommt [Myers et al. 1991]. In vitro konnte gezeigt werden, dass unter dem in Lysosomen physiologisch leicht aziden pH-Wert sowohl Transferrin als auch Ferritin in der Lage sind, die Lipidperoxidation ohne Vorliegen eines Reduktionsmittels zu stimulieren [O'Connell 1985, Gutteridge et al. 1990]. Intra-hepatozellulär vorkommendes Transferrin und Hämosiderin können jeweils kleine Anteile des gespeicherten Eisens aus der Bindung entlassen, welches bei der Initiation der Lipidperoxidation eine wichtige Rolle zu spielen scheint [Bradbear 1985].

### Lipidperoxidation:

Bei der in drei Schritten ablaufenden Lipidperoxidation (LPO; siehe Abbildung 4) reagiert ein reaktives Radikal (z. B.  $\text{OH}^\bullet$ ) mit der Seitenkette einer mehrfach ungesättigten Fettsäure eines Lipoproteins oder eines Phospholipids der Zellmembran. Es kommt zu einer Kettenreaktion, bei der die Membranlipide beschädigt werden und die Membran selbst durchlässig wird, was eine Zellschädigung zur Folge hat (Halliwell, 1994). Die LPO kann durch Antioxidantien verhindert oder gestoppt werden, wobei zum einen die körpereigenen Enzyme Superoxiddismutase und Katalase reagieren, zum anderen Vitamine, besonders das Vitamin E, als nicht-enzymatische Radikalfänger wirken.

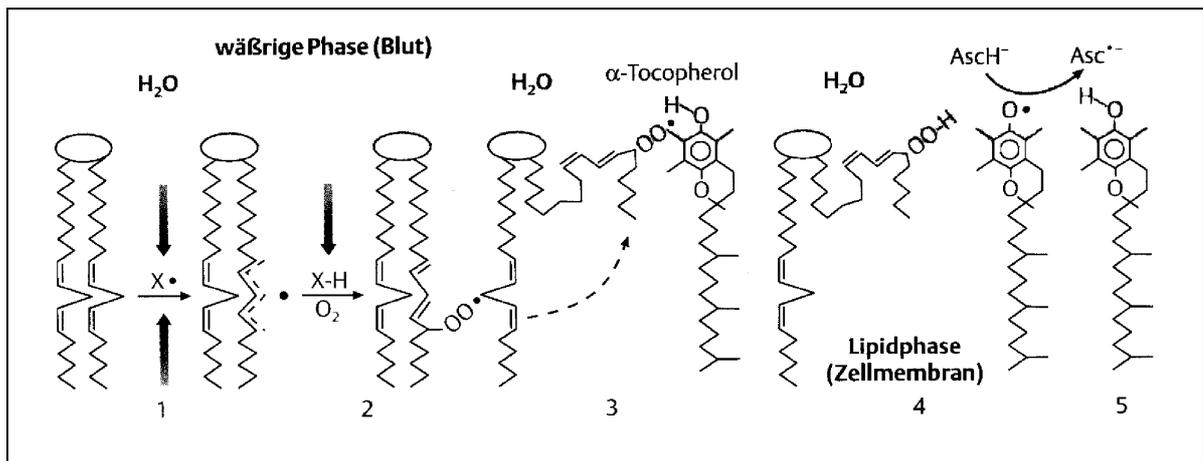


Abb. 4: Kettenreaktion bei der Lipidperoxidation sowie die Rolle und Einbindung der Vitamine E und C (entnommen aus Biesalski et al. 1999).

1. Initiierung zum Beispiel durch Superoxidanionen oder Singulett-Sauerstoff.
2. Addition von molekularem  $\text{O}_2$  mit Bildung eines aggressiven Peroxyl-Radikals  $\text{-OO}^\bullet$  (PR). Wird diese Reaktion nicht unterbrochen, so generiert das PR ein neues PR und wird dabei selbst zum Hydroperoxid ( $\text{OO-H}$ ), wodurch eine Kettenreaktion eingeleitet wird, die sich so lange über die Membran ausbreitet, bis zum Beispiel ein kettenbrechendes Antioxidans wie
3. Vitamin E die Reaktion unterbricht.

4. Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) wird durch diese Reaktion selbst zum Radikal, reagiert aber kaum mit benachbarten Fettsäuren.
5. Durch Vitamin C (AscH) kann das Vitamin-E-Radikal wieder regeneriert werden.

#### 1.4. Vitamin E (Tocopherol)

Vitamin E besteht aus einem Chromanolring, an den zwei bis vier Methylgruppen gebunden sind. Ferner ist in der Position 2 eine gesättigte oder ungesättigte isoprenoide  $C_{16}$ -Seitenkette verankert. Die acht natürlichen Vitamin-E-Verbindungen gliedern sich in vier Tocopherole ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherol) mit gesättigter und vier Tocotrienole ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocotrienole) mit ungesättigter Seitenkette. Der Begriff Vitamin E gilt für alle Derivate des Tocols und Tocotrienols, die qualitativ die höchste biologische Aktivität des  $\alpha$ -Tocopherols aufweisen [Brigelius-Flohe et al. 1999, Nelis et al. 2000]. Für dessen natürliche stereoisomere Form wird die Bezeichnung RRR- $\alpha$ -Tocopherol verwendet (siehe Abbildung 5).

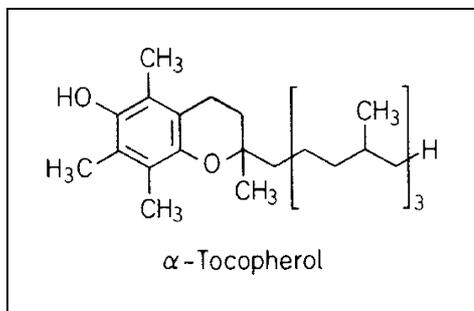


Abb. 5:  $\alpha$ -Tocopherol.

Das  $\alpha$ -Tocopherol ist bei Tier, Pflanze und Mensch überwiegend in den subzellulären Membranen der Mitochondrien, Mikrosomen und Chloroplasten lokalisiert und ist somit Bestandteil biologischer Membranen [Martin et al. 1999] und essenziell für den Erhalt ihrer Funktion [Young 1994]. Ein Mangel an Vitamin E führt zur Destabilisierung von Membranen und kann somit z. B. eine Hämolyse der Erythrozyten bewirken und mikrosomale Membranen schädigen. Das mit der Nahrung aufgenommene Vitamin E wird zusammen mit Fetten unter Einwirkung von Gallensäuren und Pankreasenzymen im

Dünndarm resorbiert. Die Resorptionsrate beträgt im physiologischen Bereich etwa 25–60 % und nimmt im höheren Dosisbereich ab [Bässler et al., 2002]. Nach Resorption wird es in Chylomikronen gebunden und über den Ductus lymphaticus in den systemischen Blutkreislauf abgegeben. Die Leber bindet das Vitamin E über ein spezielles Transferprotein in VLDL ein und gibt es an das Blut ab, die Ausscheidung erfolgt hauptsächlich mit dem Stuhl, nur etwa 1 % werden mit dem Harn ausgeschieden [Bässler et al. 2002]. Ein Mangel an Vitamin E ist selten und kann durch mangelnde Zufuhr, Malabsorption oder exzessiven Verbrauch durch oxidativen Stress entstehen [Nelis et al. 2000]. Vitamin E wirkt als Redoxsystem: Es ist ein lipophiles Antioxidans und inhibiert die eiseninduzierte Peroxidation von membrangebundenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Membranlipiden [Dillard et al. 1984, Dresow et al. 1995, Nelis et al. 2000]. Darüber hinaus schützt es Vitamin A und Thiolgruppen vor Oxidation, wobei Tocopherol selbst zum Chinon oxidiert wird. Beim Angriff eines Radikals auf eine mehrfach ungesättigte Fettsäure der Membranlipide wird von der Methylengruppe zwischen zwei Doppelbindungen ein Wasserstoffatom abstrahiert, sodass ein hoch reaktives Lipidradikal entsteht. Ohne Antioxidantien würde eine autokatalytische Kettenreaktion einsetzen, die sich in kürzester Zeit über die Membran fortpflanzen und dazu führen würde, dass die Membranlipide zu Lipidperoxiden oxidieren. Da Vitamin E eine sehr hohe Affinität zu Lipidperoxyl-Radikalen hat, fängt es diese ab, bevor neue Fettsäuren angreifen können, sodass es zum Abbruch der Kettenreaktion kommt [Nelis et al. 2000].

### **1.5. Klinischer Einsatz von Vitamin E**

In der Vergangenheit konnte nachgewiesen werden, dass die Konzentration von Vitamin E bei Patienten mit hereditärer Hämochromatose und bei experimentell erzeugter Eisenüberladung abnimmt [Brown et al. 1997]. Die Gabe von Vitamin E unterdrückt die eiseninduzierte Lipidperoxidation [Dillard et al. 1984, Dresow et al. 1995, Inan et al. 1998, Srigiridhar et al. 2000] und mindert somit die hierdurch entstehenden Folgeschäden.

Darüber hinaus wird auch bei anderen Erkrankungen ein therapeutischer Einsatz von Vitamin E in der Fachliteratur beschrieben:

Da die Oxidation von Lipoproteinen als wichtiger Faktor der Pathogenese des Morbus Alzheimer angesehen wird [Karten et al. 1997, Kontush et al. 1999, Kontush et al. 2001, Schippling et al. 2000], wurden in diesem Zusammenhang einige Studien in Bezug auf die Konzentration verschiedener Antioxidantien im Körper (Plasma, Liquor) und deren Supplementation durchgeführt. Hierbei zeigten sich niedrige Konzentrationen der als Antioxidantien wirksamen Vitamine C und E in Liquor und Plasma. Die Supplementation beider Vitamine konnte deren Konzentration sowohl im Plasma als auch im Liquor erhöhen und zusätzlich die Oxidation der Lipoproteine senken, sodass die Vermutung nahe liegt, dass eine entsprechende Behandlung die Entwicklung eines Morbus Alzheimer verzögern könnte [Kontush et al. 2001].

Bezüglich der Entstehung einer Atherosklerose besteht der Verdacht, dass die Oxidation von Lipoproteinen in der Arterienwand ein wichtiger Faktor der Pathogenese dieser Erkrankung ist [Bunout 2000, Leger 2000], sodass auch auf diesem Gebiet Studien zur Therapie mit Vitamin E als Antioxidans durchgeführt wurden. In der Fachliteratur finden sich hierzu jedoch widersprüchliche Ergebnisse: So beschreiben einige Autoren, dass Vitamin E die Oxidation von Lipoproteinen hemmt, nicht aber antiatherosklerotisch wirkt [Djahansouzi et al. 2001, D'Odorico et al. 2000], andere wiederum gehen von einer antiatherosklerotischen Wirkung aus [Ozer et al. 2000].

Bei der *Escherichia coli* Peritonitis wurde in Studien eine Imbalance zwischen Oxidantien und Antioxidantien zu Ungunsten Letzterer beschrieben. Die Gabe von Vitamin E den hieraus resultierenden oxidativen Stress während der Peritonitis [Konukoglu et al. 1999].

Einige Studien haben sich mit der Linsendegeneration und ihrer Prävention durch Vitamin E beschäftigt, dem ein verzögernder Effekt auf die Entwicklung eines Katarakts nachgewiesen wurde [Avunduk et al. 1999, Nagata et al. 1999].

Zudem wurden einige Studien zu Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis (rheumatoide Arthritis) durchgeführt [Sangha et al. 1998, Venkatramann et al. 1999, Wittenborg et al. 1998]. Dabei wurde herausgefunden, dass Vitamin E besonders auf die Reduzierung der Schmerzen [Sangha et al. 1998], aber auch auf die Verminderung der

Morgensteifigkeit und die Erhöhung der Griffstärke [Wittenborg et al. 1998] einen positiven therapeutischen Effekt hat.

### 1.6. Vitamin A

Bei Vitamin A (Retinol) handelt es sich um einen aus vier Isopreneinheiten zusammengesetzten Alkohol. Aus der Nahrungsfraction können sowohl die Vorstufe, das Provitamin  $\beta$ -Karotin, als auch das Vitamin direkt zusammen mit der Fettfraktion aufgenommen werden. Provitamine A sind eine sehr heterogene Gruppe von Karotinoiden, die im Organismus in die Vitaminform umgewandelt werden können (s. Abbildung 6) [Friedrich 1987, Stahl 2002].

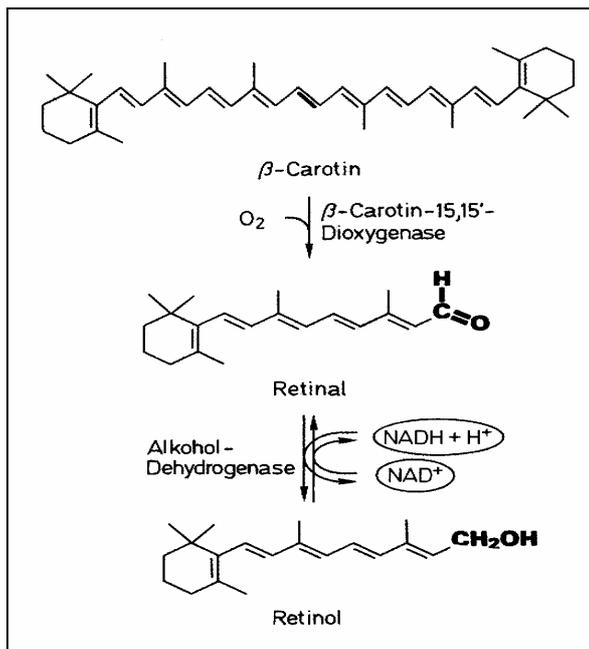


Abb. 6: Vitamin-A-(Retinol-)Bildung aus dem Provitamin  $\beta$ -Carotin.

Vitamin A ist licht- und wärmeempfindlich [Barua et al. 2000]. Führt man das Molekül in die Esterform über, so weist es eine höhere Stabilität auf als der Alkohol. Alle Retinoide sind sehr leicht oxidierbar [Barua et al. 2000]. Ein Schutzmechanismus durch  $\alpha$ -Tocopherol gegenüber der Oxidation ist bekannt, es besteht ferner eine hohe Stabilität gegenüber Basen. In Bezug auf Säuren ist das Vitamin A jedoch empfindlich. Es wird in spezifischen Fettspeicherzellen der Leber gespeichert, wobei es jedoch auch Hinweise auf das Vorliegen

von mehreren Vitamin-A-Pools in der Leber gibt [Barua et al. 2000]. In erster Linie dienen die Ito-Zellen, welche eine 10-fach höhere Kollagenbildungskapazität als das übrige Leberparenchym besitzen, der Speicherung von Retinol. Vorwiegend wird hierbei der Kollagen-Typ I synthetisiert. Bei guter Ernährungslage ist der Vitamin-A-Spiegel im Blut sehr konstant, wofür eine gleichmäßige Freisetzung von Vitamin A aus der Leber verantwortlich ist. Erst bei Erschöpfung dieses Speichers sinkt auch der Spiegel in der Peripherie [Catagnani 1986].

Stoffwechsel, Funktion und Bedarf: Bei ausreichender Fettaufnahme wird Nahrungsvitamin A zu ca. 80% resorbiert [Gerster 1997]. Die in der Nahrung vorliegenden Retinylester werden im Darm zu Retinol hydrolysiert und bei Anwesenheit von Gallensäuren zu 70-90% von Enterocyten resorbiert. Nach Reveresterung werden sie von Chylomikronen aufgenommen und zur Leber transportiert. Ca. 50–80 % des gesamten Vitamin A werden in der Leber gespeichert. Zu 98 % liegt es in den Kupfer-Sternzellen der Leber als Ester vor und ist in Lipidtröpfchen verpackt (Blomhoff 1994). Beim gesunden Erwachsenen beträgt die durchschnittliche Konzentration an Retinylestern 100 bis 300 g und bei Kindern 20 bis 100 g pro g Leber [Biesalski 1989]. Die Halbwertszeit der in der Leber gespeicherten Retinylester beträgt 50-100 Tage, bei starkem Alkoholkonsum auch weniger. Retinylester können nach erneuter Hydrolyse in Form von Retinol aus der Leber freigesetzt werden. Retinol wird im Plasma an Retinol-bindendes Protein (RBP) und an Transthyretin gebunden, um in dieser Form zu den Zielzellen transportiert zu werden, von denen es rezeptorvermittelt aufgenommen wird. In den Zellen wird Retinol hauptsächlich zu Retinaldehyd und zum Teil weiter zu Retinsäure oxidiert. Andere Stoffwechselprodukte sind 13-cis-Retinsäure und seine 4-oxo-Metaboliten. Durch Isomerisierung wird außerdem ein Teil der all-trans-Retinsäure zu 9-cis-Retinsäure umgelagert [Gerster 1997]. Retinol wird Cytochrom-P-450-abhängig hydroxyliert, glukuronidiert und renal eliminiert.

Resorption, Speicherung und Freisetzung von Retinol-bindendem Protein werden streng homöostatisch kontrolliert, so dass die Retinolspiegel im Plasma außer in Zuständen extremer Hypo- oder Hypervitaminose A relativ konstant zwischen 300 und 700 g/L (1,05-2,45 mol/L) gehalten werden. Die Zufuhr von präformiertem Vitamin A aus der Nahrung

korreliert daher normalerweise nicht mit der Retinolkonzentration im Plasma [Solomons 2001].

Funktion: Vitamin A und seine Metaboliten sind für die Oogenese, Spermatogenese sowie die plazentare und embryonale Entwicklung aber auch für Proliferation und Differenzierung von Epithelien von Bedeutung. Wachstum, Entwicklung und Fortpflanzung sind also von einer ausreichenden Vitamin-A-Zufuhr abhängig. Außerdem ist Vitamin A essentiell für den Sehvorgang (als 11-cis-Retinaldehyd) sowie für das Hören, Schmecken und Riechen [Gerster 1997, Russel 2000, Solomons 2001].

Vitamin A und die Lipidperoxidation: Zellschützende Eigenschaften werden in erster Linie den Karotinoiden zugeschrieben: Präsensibilisierte Moleküle können mithilfe von Licht ihre Energie auf Sauerstoff übertragen. Der dabei gebildete Singulett-Sauerstoff reagiert anschließend sofort mit ungesättigten Verbindungen, was zum Tod der beteiligten Zelle führen kann. Die Karotinoide können dann sowohl mit dem Singulett-Sauerstoff als auch mit den aktivierten Molekülen reagieren [Glover 1983]. In einer Studie von Steinberg et al. 1998 konnte eine signifikante Verminderung der Atmungs-Pentan-Ausscheidung als Marker der LPO unter Zufuhr von Beta-Karotinoiden nachgewiesen werden. In Experimenten mit Rattenlebermikrosomen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit all-trans-Retinolsäure eine Abnahme der LPO bewirkt. Eine noch stärkere Wirkung hat das Retinol: Steigert man die LPO exogen mittels Eisenüberladung, so kommt es zu einer Verminderung der wirksamen Antioxidantien, insbesondere des  $\beta$ -Karotins.

### **1.7. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit**

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass im Zuge einer progressiven Eisenüberladung das Ausmaß der Lipidperoxidation in vivo immer weiter ansteigt [Dillard et al. 1984, Dresow et al. 1995]. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Vitamin E als antioxidatives Vitamin die Lipidperoxidation bis zu einem gewissen Grad unterdrückt [Dillard et al. 1984, Dresow et al. 1995, Steinberg et al. 1998], allerdings reichen bei schwerer Eisenüberladung bei Ratten die normalen Nahrungsvitamin-E-Mengen nicht aus [Dresow et al. 1995]. Frühere Ergebnisse von Alamian zeigten eine verminderte Lebereisenkonzentration bei

Ratten unter einer eisenreichen Diät, die zusätzlich mit Vit.E supplementiert wurden gegenüber einer Gruppe ohne zusätzliche Vit. Gabe im Futter [Alamian 1997].

In der vorliegenden Arbeit soll überprüft werden, ob und ggf. in wieweit eine überhöhte Supplementation von Vitamin E als Antioxidans zu einer Verminderung des Ausmaßes der Eiseneinlagerung in Herz, Leber und Milz von weiblichen Wistar-Ratten führt. Hierzu wird in weiblichen Wistarratten eine Eisenüberladung durch Verabreichung einer eisenangereicherte Diät (3%iges elementares Eisen, „Carbonyleisen“) erzeugt. Vitamin E wird über das Futter bzw. zusätzlich in verschiedenen Konzentrationen über das Trinkwasser zugeführt.

Aus diesen tierexperimentellen Befunden können evtl. auch Hinweise erhalten werden, ob und inwieweit eine Vitamin-E-Supplementation bei Patienten mit Eisenüberladungserkrankungen beim Menschen sinnvoll ist, um die nutritiv erzeugte Eisenüberladung evtl. zu begrenzen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Das Rattenmodell und Gruppeneinteilung

Versuchsaufbau: Es wurden insgesamt 30 weibliche Wistarratten (Firma Wiga/Hannover) eingesetzt und auf drei Gruppen verteilt. Alle Tiere erhielten als Standarddiät eine eisenarme und vitaminnormale Diät (163,95 mg/kg Vitamin E) mit Zusatz von 3 % Carbonyleisen (Altromin C1038a, Firma Fluka). Über das Trinkwasser wurden verschiedene Mengen an Vitamin E zugeführt (s. hierzu Tabelle 2).

| Gruppe | n  | Trinkwasser   |
|--------|----|---|
| A      | 10 | Destilliertes Wasser  |
| B      | 10 | Destilliertes Wasser und Zusatz von 500 mg Vitamin-E-Acetat (Trolox)/l Wasser                     |
| C      | 10 | Destilliertes Wasser und Zufuhr von 10 mg Vitamin-E-Acetat über eine Schlundsonde 2 Mal pro Woche |

Tabelle 2: Über die Versuchsgruppen (n = Anzahl der Versuchstiere)

Versuchsbeschreibung: Die Tiere wurden in Gruppen zu je 5 Tieren in rostfreien Polyethylenkäfigen mit Edelstahlgitterrosten gehalten und über einen Zeitraum von 28 bzw. 84 Tagen mit einer eisen- und vitaminhaltigen Diät ad libitum gefüttert. Der Versuch wurde entsprechend den Bedingungen des Hamburger Tierschutzgesetzes durchgeführt. Genehmigungsnummer: F II 17/98.

Trinkwasser: Das Trinkwasser der Gruppe A erhielt keine weiteren Zusätze, das der Gruppen B und C wurde im Labor zubereitet. Dabei wurden für die Gruppe B 0,5 g Vitamin E Acetat-Pulver (Trolox) in 1 Liter destilliertes Wasser unter Zuhilfenahme eines Magnetrührers gelöst. Da Trolox schlecht löslich ist, wurde der pH-Wert mit NaOH auf einen Wert von 7–8 gebracht, bis sich das Pulver löste. Diese Lösung wurde mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das Trinkverhalten der Ratten dieser Gruppe belief sich auf täglich etwa 10–15 ml, sodass die Tiere theoretisch etwa 5–7,5 mg Vitamin-E-Acetat pro Tag aufnahmen.

Da das Trinkverhalten der einzelnen Tiere variiert, wurde zusätzlich die Gruppe C eingerichtet. Diese Ratten erhielten das Vitamin-E-Acetat über eine Knopfsonde (Schlundsonde) und nahmen somit eine stets gleiche Menge an Vitamin E auf. Hierzu wurde 1 g Vitamin E Acetat in 50 ml Thiglycol (Neutralöl) gelöst. Von dieser Lösung erhielten die Tiere der Gruppe C jeweils 0,5 ml zweimal pro Woche über eine Schlundsonde, sodass sie dabei theoretisch 20 mg/Woche des Vitamin-E-Acetats aufnahmen.

Im Verlauf des Versuches wurden nach vier Wochen aus jeder Gruppe drei Tiere und der Rest nach drei Monaten getötet, um so die erforderlichen biochemischen Parameter zu bestimmen. Organ- und Serumproben wurden bis zu ihrer jeweiligen Bestimmung bei -80° C gelagert.

## **2.2. Material**

### **2.2.1. Futter**

Alle Tiere erhielten die Altromin Sonderdiät „Eisenarmes Futter C1038a“ (Grundgehalt Fe: 6 mg/kg) mit 3 % Carbonyleisen. Der Gehalt an Vitamin E betrug 164 mg/kg, der an Vitamin A 5,16 mg/kg.

### **2.2.2. Chemikalien**

Sowohl das DL- $\alpha$ -Tocopherol als auch das DL- $\alpha$ -Tocopherolacetat wurden mit der für biochemische Zwecke notwendigen Reinheit bei der Firma E. Merck (Darmstadt) bezogen, die auch die Lösungsmittel für die Elutionsmittel in LiChrosolv-Qualität lieferte.

### **2.2.3. Lösungen zur Eisenbestimmung in Milz, Leber und Herz**

#### A: Proteinfällungsreagenz

5 ml            40 % 6 molar Trichloressigsäure (Merck 811)

6,4 ml        37 % rauchende HCL (Merck 317)

1,2 ml        Thioglykolsäure (Merck 700)

ad 40 ml dest. Wasser

B: Chromogenlösung (250 mg Bathophenantrolindisulfonat/l, 2 mol/l Natriumacetat)

82 g Natriumacetat, wasserfrei (Merck 6264)

125 g Bathophenantrolindisulfonat (Merck 24516)

ad 500 ml dest. Wasser

C: Eisenstandard-Lösung (10 mg Fe<sup>3</sup>/ml in 1.2 mol/l HCL)

7,16 g Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in

20–50 ml 37 % HCL unter Kochen lösen, abkühlen lassen,

ad 500 ml dest. Wasser

D: Serum-Eisen-Standard-Lösung (5 µg Fe/ml in 0,01 mol/l HCL)

0,5 ml Eisenstandardlösung (C)

1,0 ml 37 % HCL

ad 1000 ml dest. Wasser

## 2.2.4. Geräte

### I. Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Da sämtliche Vitaminparameter mithilfe der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt wurden, soll dieses Verfahren hier kurz erläutert werden:

Unter dieser Technik versteht man ein automatisches, schnelles und besonders leistungsfähiges Verfahren, welches sich durch die Fähigkeit auszeichnet, in Säulen hochauflösende Trennungen in einem weiten Bereich von Substanzklassen innerhalb weniger Minuten bis zu einer Stunde durchzuführen. So können mit dieser Methode nicht nur organische Substanzen (z. B.: Hormone, Vitamine, pharmazeutische Wirkstoffe, Nukleinsäuren u. a.), Makromoleküle wie Polymere und Biopolymere eingeschlossen, und sogar ganze Zellen nachgewiesen bzw. abgetrennt, sondern zudem auch einfache anorganische Stoffe, wie z. B. viele Ionen, analytisch erfasst werden. Die HPLC wird häufig zur qualitativen und quantitativen Bestimmung vorgenannter Stoffe eingesetzt. Wie jede andere Chromatographie-Methode besteht sie aus einer mobilen und einer stationären Phase,

wobei Erstere hier besonders feinkörnig ist, sodass ein hoher Druck (ca. 100 bar) benötigt wird, um das betreffende Laufmittelsystem durch die Säule zu transportieren. Die mobile Phase findet in einem Behälter mithilfe einer oder zwei gegenläufig synchron arbeitenden Membranpumpen mit regelbarem Druck statt (s. Abbildung 7, allgemeiner Aufbau einer HPLC).

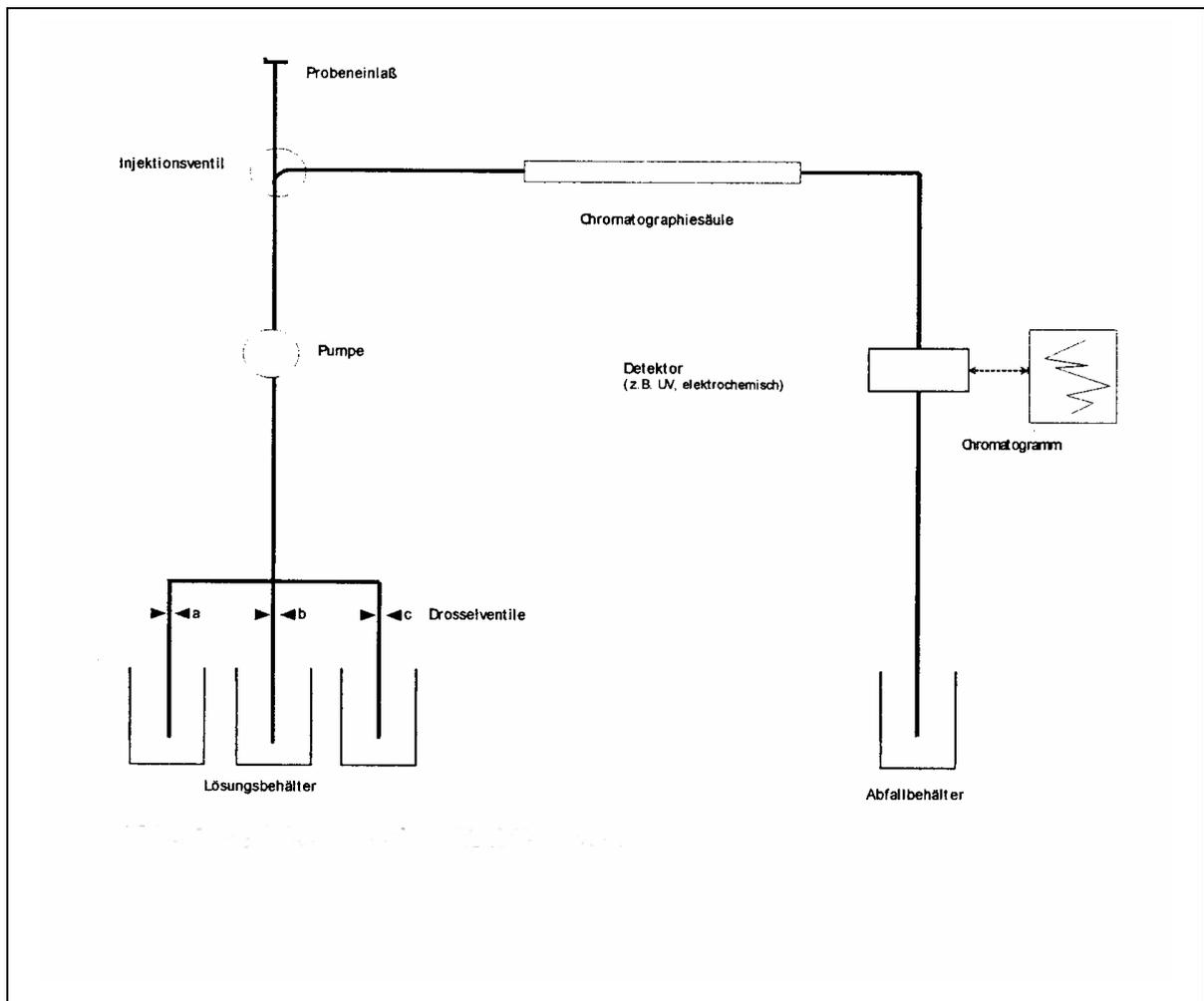


Abb. 7: Allgemeines Schema einer HPLC-Einheit

Für die vorliegende Arbeit wurde die Technik der Reversed-Phase-Chromatography verwendet, bei der die mobile Phase polar und die stationäre Phase apolar ist. Die Retentionszeiten sind vor allem von dem pH-Wert des Elutionsmittels und dem Grad der Polarität des Analysats abhängig.

Die HPLC-Bedingungen wurden so optimiert, dass die Vitamine A und E in einem einzigen HPLC-Lauf gemessen werden konnten. Da beide Vitamine ihr Absorptionsmaximum bei unterschiedlichen Wellenlängen haben, wurde die Messwellenlänge nach Elution des Vitamin A mithilfe eines programmierbaren Detektors umgeschaltet, damit das später eluierende Vitamin E ebenfalls detektiert werden konnte.

Die Auftrennung des all-trans-Retinols und des  $\alpha$ -Tocopherols wurde mit einer HPLC-Anlage der Firma LKB (2152 LC Controller und 2249 HPLC Pump) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem in Reihe geschalteten UV-Detektor (Knauer Variable Wavelength Monitor), die Trennung durch eine reversed-phase-Chromatographie an einer  $4 \times 250$  mm LKB Supercap Cartridge Säule (Pack Mat. Inertsil ODSII), der eine  $4 \times 10$  Pep-S  $5 \mu\text{m}$ -Vorsäule vorgeschaltet war. Das Elutionsmittel wurde bei einer Fließgeschwindigkeit von  $0,7 \text{ ml/min}$  und einem Druck von  $\sim 110 \text{ bar}$  durch das System gepumpt. Höhere Fließgeschwindigkeiten führten zu einem zu starken Anstieg des Drucks und niedrigere erzeugten breitere Peaks und zu hohe Retentionszeiten. In den ersten 8–12 Minuten jeder Messung wurde die Wellenlänge auf  $325 \text{ nm}$  eingestellt, da der Vitamin-A-Peak in dieser Zeitspanne zu erwarten war. Nach dessen Auftreten wurde zur Registrierung des Vitamin E und des Vitamin-E-Acetats auf eine Wellenlänge von  $275 \text{ nm}$  umgeschaltet. Hinter dieses System war ein Fluoreszenzdetektor geschaltet (Shimadzu RF-535, Fluorescence HPLC-Monitor), der die Absorptionen der einzelnen Fraktionen maß.

Als Eluent wurde ein Gemisch aus  $99,5 \%$  Methanol und  $0,5 \%$   $\text{H}_2\text{O}$ -Tridest verwendet.

Für die Probeninjektion wurde eine  $250 \mu\text{l}$ -Hamilton-Spritze benutzt und die Säulenaufgabe erfolgte über eine  $200 \mu\text{l}$ -Probenschleife. Der UV-Detektor war mit einem Merck/Hitachi D2500-Chromatointegrator verbunden, der das Chromatogramm plottete und die Peakflächen integrierte. Dies geschah dann auch mit den Signalen des Fluoreszenz-Detektors, die zu diesem Zweck an eine Auswertungssoftware (Harley Systems-Peak-Master 3) weitergeleitet wurden.

## II. Organaufschluss

Für den Organaufschluss wurde eine Mikrowellen-Apparatur (Milestone MLS-1200 Mikrowellen-Aufschlussgerät) verwendet.

## III. Spektralphotometrie

Für die quantitative Eisenbestimmung wurde die spektralphotometrische Methode (Komplexierung mit farbbildenden Reagentien) gewählt. Hierzu wurden ein Eppendorf-Photometer sowie 1 cm Halbmikroküvetten der Firma Greiner Labortechnik benutzt.

### **2.3. Gewinnung und Aufarbeitung der Serum- und Organproben**

Zur Gewinnung der Proben wurden die Ratten nach einer 12-stündigen Nahrungskarenz unter einer Äthernarkose durch erschöpfende Blutentnahme aus der Aorta abdominalis getötet. Anschließend wurden Herz, Leber und Milz entnommen und sofort gewogen. Jeweils 0,5–1 g Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff zunächst schockgefroren und dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Aufarbeitung gelagert. Das Blut wurde in Heparin-beschichtete Röhrchen gefüllt und für 5 min hochtourig zentrifugiert. Das so erhaltene Serum wurde schließlich in Kryoröhrchen pipettiert, ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Aufarbeitung gelagert.

### **2.4. Gewebeeisenbestimmungen von Herz, Leber und Milz**

#### **2.4.1. Veraschung**

Für diese Arbeit wurde die Methode der Nassveraschung nach Düllmann et al. (1992) gewählt, bei der zur Bestimmung des Eisenorgehalts 0,5–0,9 g Organewebe in eisenfrei gewaschene Teflongefäße eingewogen, mit 5 ml 65%iger  $\text{HNO}_3$ -Lösung sowie 1 ml konzentrierter  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung versetzt und in einer Mikrowellen-Apparatur (Milestone MLS-1200 Mikrowellen-Aufschlussgerät) verascht wurden.

Veraschungsprogramm: 10 min bei 250 W, 5 min bei 500 W, 5 min bei 400 W, 2 min bei 300 W und 12 min Ventilation.

Nach Ablauf des Veraschungsprogramms wurden die Teflongefäße mit der nun klaren Lösung zum Abkühlen für ca. 20 min in ein Eisbad gestellt, anschließend in 50-ml-Messkolben überpipettiert und auf 50 ml mit dest. Wasser aufgefüllt.

### 2.4.2. Eisenauswertung

Zur Eisenauswertung wurden die nachfolgenden Formeln verwendet:

a)  $c(\text{Organ-Aufschluss})[\mu\text{g/dl}] =$

$$c(\text{Standard})[\mu\text{g/dl}] \times (E_{\text{Probe}} - E_{\text{Reagenz}}) / (E_{\text{Standard}} - E_{\text{Reagenz}}) \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

b)  $c(\text{Organ})[\text{mg Fe/g Organ}] = c(\text{Leberaufschluss}) \times 0,5 \text{ dl} / (\text{Organeinwaage} \times 1000)$

#### Berechnungsbeispiel:

##### *Ratten-Leber PA2:*

|                       |       |                      |
|-----------------------|-------|----------------------|
| Standard-Extinktionen | 0,615 |                      |
|                       | 0,617 | Mittelwert = 0,61567 |
|                       | 0,615 |                      |

|                         |       |                      |
|-------------------------|-------|----------------------|
| Reagentien-Extinktionen | 0,099 |                      |
|                         | 0,099 | Mittelwert = 0,09933 |
|                         | 0,100 |                      |

Extinktion 0,32 bei einer 1 : 5 Verdünnung

Organeinwaage 0,75 g Leber

$$c = 500 \mu\text{g/dl} \times (0,32 - 0,09933) / (0,61567 - 0,09933) \times 5 = 1068,43 \mu\text{g/dl}$$

$$c(\text{Leber}) = 1068,4336 \mu\text{g/dl} \times 0,5 \text{ dl} / (0,75 \text{ g} \times 1000) = 0,71 \text{ mg Fe/g Leber}$$

Leberfrischgewicht: 7,3 g

$$\text{Gesamtlebereisengehalt: } = 0,7123 \text{ mg Fe/g Leber} \times 7,3 \text{ g Leber} = 5,2 \text{ mg Eisen}$$

## 2.5. Vitamine A und E

### 2.5.1. Vitaminmessungen im Plasma

Diese Messungen erfolgten mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).

Für das hier eingesetzte HPLC-System und zur Verdünnung der Analysate wurde eine Lösung bestehend aus 99,5 % Methanol und 0,5 % H<sub>2</sub>O-Tridest als mobile Phase verwendet. Um einer Veränderung dieses Mischungsverhältnisses vorzubeugen, wurde die Lösung vor Raumluft abgeschlossen und nach 2 Tagen erneuert.

### 2.5.2. Vitamin-E-Kalibrierung

Zur Herstellung eines Stockstandards für die Eichung wurden ca. 0,5 g  $\alpha$ -Tocopherol in 100 ml Ethanol gelöst und mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt. Die weiteren Verdünnungen erfolgten ausgehend von dieser Lösung.

#### Berechnungsbeispiel:

0,5 g  $\alpha$ -Tocopherol- bzw. Tocopherolacetat auf 100 ml Ethanol abs.

theoretische Konzentration:  $c = 5 \text{ mg/ml}$

Verdünnung: 1 : 2000 ( $c = 0,0025 \text{ mg/ml}$ )

#### Kalibrierung

Für die Konzentrationsbestimmung des  $\alpha$ -Tocopherols wurde durch Injektion von 100  $\mu\text{l}$  verschiedener Verdünnungsgrade der Stockstandardlösung eine Eichgerade erstellt, wobei die Peakhöhen (cm) des Fluoreszenzdetektor-Chromatogramms gegen die injizierten Verdünnungen aufgetragen wurden.

Die Abbildungen 8 und 9 zeigen die auf diese Weise ermittelte Eichgerade und ein Beispielchromatogramm für die Eichung von  $\alpha$ -Tocopherolacetat:

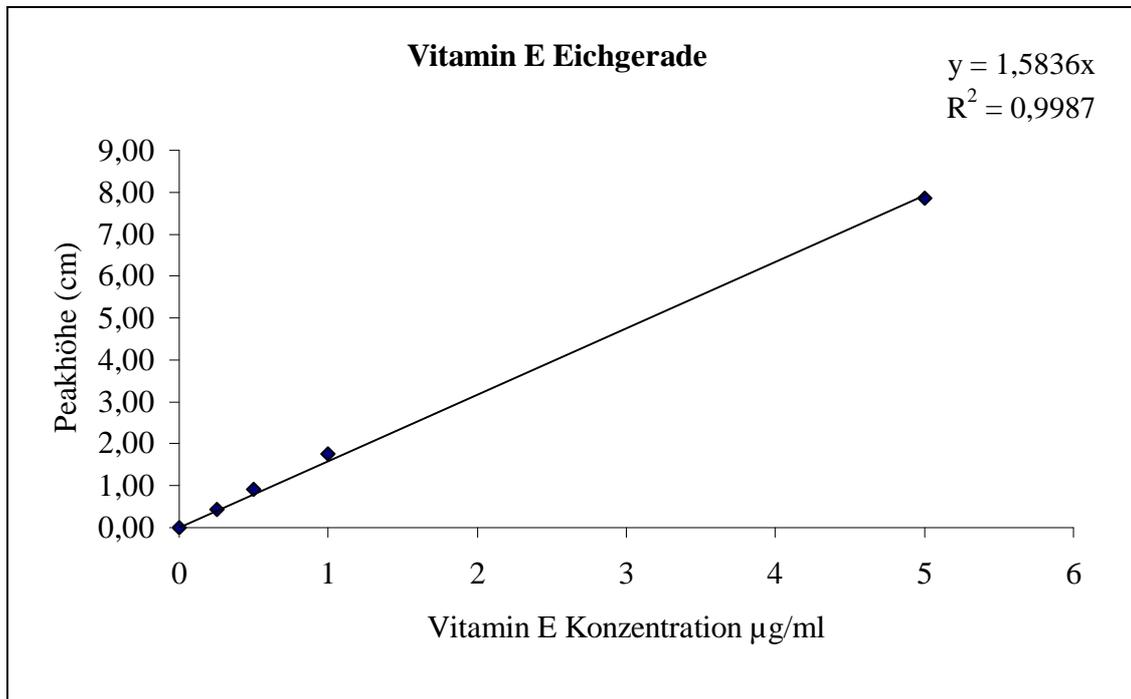


Abb. 8: Eichgerade für  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E).

Durch Injektion von je 100  $\mu$ l verschiedener Verdünnungsgrade des  $\alpha$ -Tocopherols wurde eine Eichgerade erstellt. Es wurden die Peakhöhen (cm) des Fluoreszenzdetektor-Chromatogramms gegen die injizierten Volumina aufgetragen.  $R^2 =$  Bestimmtheitsmaß.

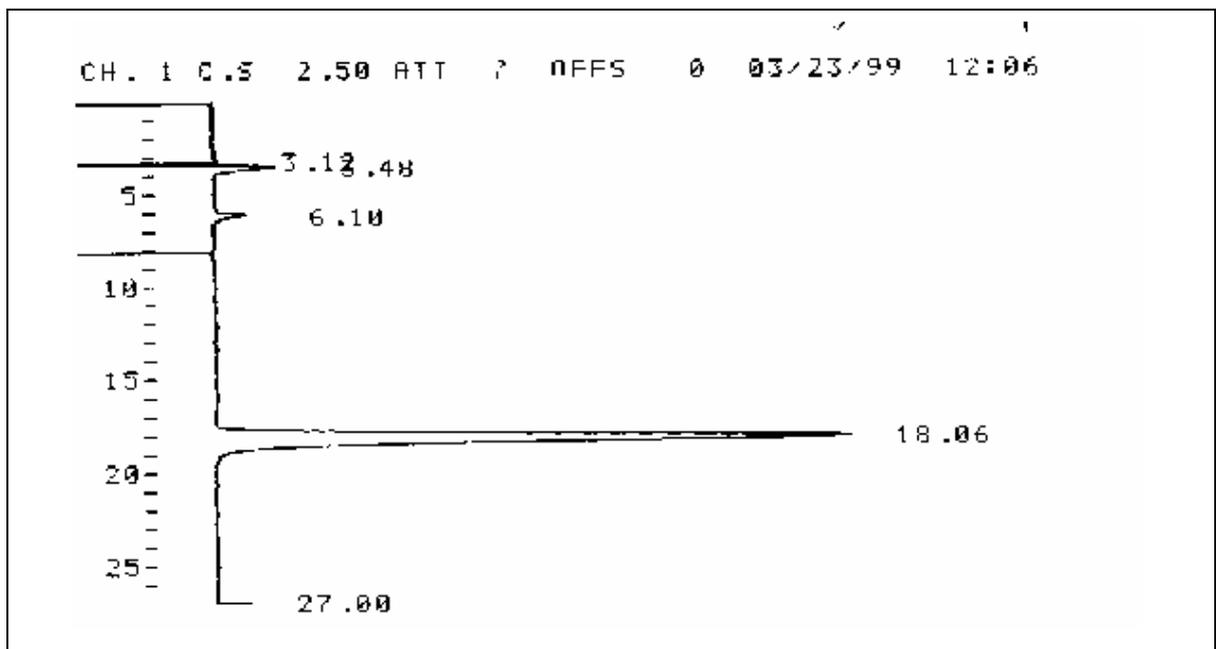


Abb. 9: Originalchromatogramm für die Eichung von  $\alpha$ -Tocopherolacetat, aufgetragen auf einer Zeitskala in Minuten.

Der Peak bei 18.06 Minuten zeigt die Vitamin-E-Konzentration der Probe an.

Vitamin-E-Berechnung für die Eichgerade:Eichgerade im Fluoreszenzdetektor:  $h = m \cdot c$ Das Bestimmtheitsmaß beträgt  $R^2 = 0,99$ .c Serum = Konzentration v. Vitamin E im Serum [ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ] gemessen $h_{(\text{cm})}$  = Peakhöhe des Vitamin-E-Peaks $m_{(\text{cm})}$  = Steigung der Eichgeraden (beträgt 0,1584)Aufarbeitungskontrolle (interner Standard)

Bei der Probenvorbereitung für die Vitamin-E-Bestimmung wurde das fettlösliche  $\alpha$ -Tocopherol mit n-Hexan extrahiert. Um den Extraktionserfolg zu überprüfen, wurde der aufzuarbeitenden Probe (Plasma) eine ähnliche Verbindung ( $\alpha$ -Tocopherol und  $\alpha$ -Tocopherolacetat) als Aufarbeitungskontrolle zugesetzt (interner Standard). Es zeigte sich, dass beide Substanzen vom zuvor beschriebenen HPLC-System sowohl getrennt als auch mit dem UV-Detektor aufgezeichnet werden können. Ein Versuch, bei dem ein Substanzgemisch unaufgearbeitet injiziert und ein anderes zunächst aufgearbeitet und dann injiziert wurde, zeigte, dass das Peakflächenverhältnis ( $\alpha$ -Tocopherol-Peak zu  $\alpha$ -Tocopherolacetat-Peak) bei beiden so erhaltenen Chromatogrammen gleich blieb. Daraus folgt, dass man bei Zusatz einer definierten Menge an  $\alpha$ -Tocopherolacetat die Extraktionseffektivität bestimmen und so die  $\alpha$ -Tocopherolmenge der Ausgangsprobe besser annähern kann, indem man die Extraktionsverluste in die Berechnung mit einbezieht.

Probenvorbereitung

Eine direkte Bestimmung von  $\alpha$ -Tocopherol in organischen Materialien ist nicht möglich, vielmehr kann eine Quantifizierung mittels HPLC erst nach einer Extraktion der fettlöslichen Bestandteile mit n-Hexan durchgeführt werden.

a)  $\alpha$ -Tocopherol-Acetat

Um die Methode zu kalibrieren, wurden 0,5 g  $\alpha$ -Tocopherolacetat, das der Aufarbeitungskontrolle für die verwendeten Proben dient, in 100 ml Puffer gelöst. Hierzu

wurde durch mehrfache Injektion von 200 µl des verdünnten Stockstandards (1 : 2000 ) eine 100 %-Bestimmung durchgeführt.

#### b) Plasma-Aufarbeitung

400 µl einer Heparin-Plasma-Probe wurden 400 µl Tocopherol-Acetat-Standard (interner Standard in einer Verdünnung von 1 : 2000 mit Methanol) zugegeben und 15 sek intensiv vermischt. Um sowohl das lipidlösliche α-Tocopherol als auch das zugesetzte α-Tocopherol-Acetat zu extrahieren, wurden anschließend 800 µl n-Hexan hinzugegeben. Dieses Extraktionsgemisch wurde erneut 1 min intensiv vermischt und danach 2 min hochtourig zentrifugiert. Von dem so erhaltenen Überstand (n-Hexan-Phase) wurde ein Aliquot von 400 µl abpipettiert, mit Stickstoffgas eingengt und mit 400 µl Methanol-Puffer rückgelöst, welches darauf 15 sek intensiv vermischt und von dem anschließend mit einer Hamilton-Spritze 200 µl aufgenommen und in das HPLC-System injiziert wurden.

#### Berechnung von Vitamin E im Serum:

$$c = \frac{h}{m} \cdot d \cdot \frac{100}{V} \cdot \left\langle \frac{\text{Peakhöhe-Vit.E-Acetat}_{(\text{theoretisch})}}{\text{Peakhöhe-Vit.E-Acetat}_{(\text{praktisch})}} \right\rangle$$

h = Peakhöhe des Vitamin-E-Peaks

c = Vitamin-E-Konzentration [µg/ml] im Serum

V = eingespritztes Volumen der Probe

d = Verdünnungsfaktor (beträgt 2)

m = Steigung der Eichgeraden (beträgt 1,5836)

### **2.5.3. Vitamin A**

Zur Herstellung des Retinolstockstandards wurden 0,1 g all-trans-Retinol in 50 ml Ethanol gelöst, mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt und nach Bedarf verdünnt. Auch diese Lösung wurde sofort verwertet. Für die Konzentrationsbestimmung des all-trans-Retinols wurde die Stammlösung hierfür in verschiedenen Volumina injiziert. Um eine Gerade zu erstellen, wurden die Peakhöhen (cm) des Fluoreszenzdetektor-Chromatogramms gegen die injizierten Volumina aufgetragen.

Berechnungsbeispiel:

0,1 g all-trans-Retinol auf 50 ml Ethanol abs.

theoretische Konzentration:  $c = 2 \text{ mg/ml}$

Verdünnung: 1 : 10.000 ( $c = 0,0002 \text{ mg/ml}$ )

Die Abbildungen 10 und 11 zeigen die auf diese Weise ermittelte Eichgerade und ein Beispielchromatogramm für die Eichung von all-trans-Retinol:

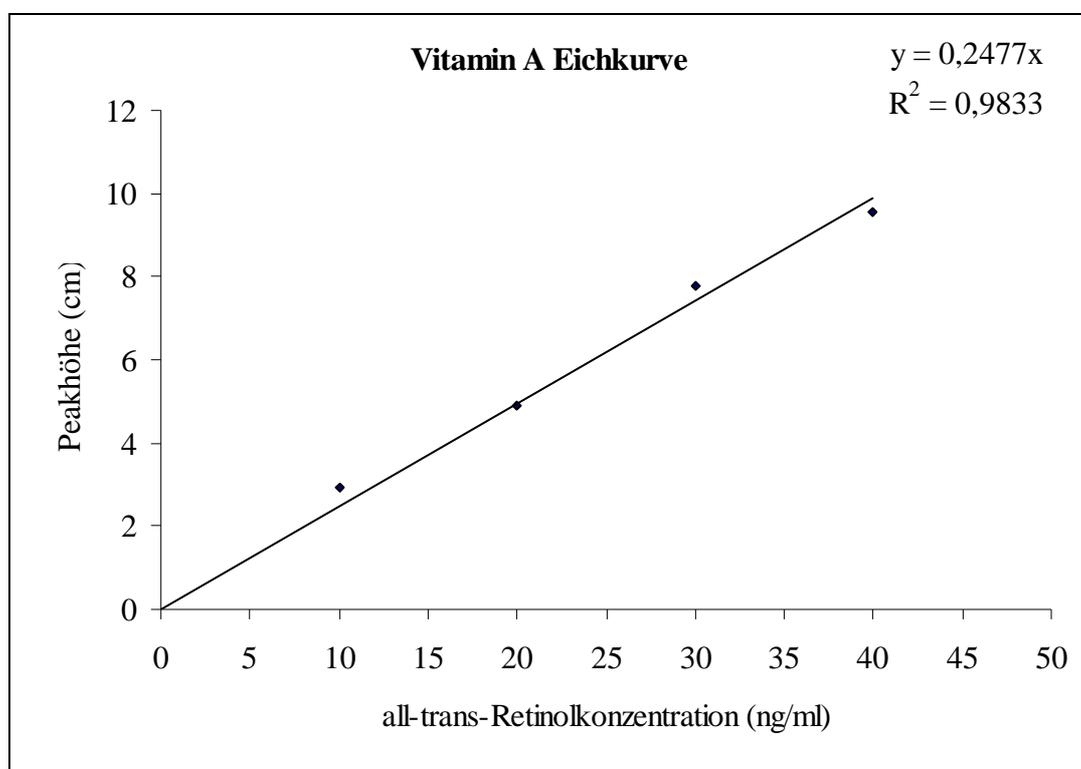


Abb. 10: Eichgerade für all-trans-Retinol.

Durch Injektion von je 100  $\mu\text{l}$  verschiedener Verdünnungsgrade des all-trans-Retinols wurde eine Eichgerade erstellt. Es wurden die Peakhöhen (cm) des Fluoreszenzdetektor-Chromatogramms gegen die injizierten Volumina aufgetragen.  $R^2 =$  Bestimmtheitsmaß.

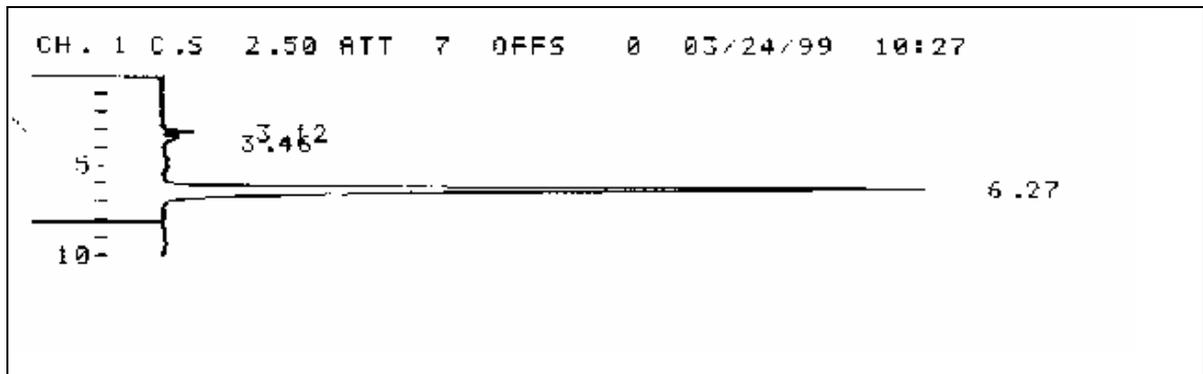


Abb. 11: Originalchromatogramm zur Vitamin-A-Kalibrierung, aufgetragen auf einer Zeitskala in Minuten.

Der Peak bei 6,27 Minuten zeigt die Vitamin-A-Konzentration der Probe an.

#### Eichkurvengleichung für Vitamin A:

$$h = m \cdot c$$

Das Bestimmtheitsmaß beträgt  $R^2 = 0,98$ .

h = Peakhöhe gemessen

c = Konzentration von Vitamin A [ $\mu\text{g/ml}$ ] gemessen

m = Steigung der Eichgeraden

#### I. Aufarbeitung der Serumproben:

400  $\mu\text{l}$  einer Heparin-Plasma-Probe wurden 400  $\mu\text{l}$  Tocopherol-Acetat-Standard (interner Standard in einer Verdünnung von 1 : 2000 mit Methanol) zugegeben und 15 sec. intensiv vermischt. Um sowohl das lipidlösliche Vitamin A als auch das zugesetzte  $\alpha$ -Tocopherol-Acetat zu extrahieren, wurden anschließend 800  $\mu\text{l}$  n-Hexan hinzugegeben. Dieses Extraktionsgemisch wurde erneut 1 min intensiv vermischt und danach 2 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Von dem so erhaltenen Überstand (n-Hexan-Phase) wurde ein Aliquot von 400  $\mu\text{l}$  abpipettiert, mit Stickstoffgas eingengt und mit 400  $\mu\text{l}$  Methanol Lösung rückgelöst, welches darauf 15 sek intensiv vermischt und von dem anschließend mit einer Hamilton-Spritze 200  $\mu\text{l}$  aufgenommen und in das HPLC-System injiziert wurden.

## II. $\alpha$ -Tocopherolacetat

Um die Methode zu kalibrieren, wurden 0,5 g  $\alpha$ -Tocopherolacetat, das der Aufarbeitungskontrolle für die verwendeten Proben dient, in 100 ml Puffer gelöst. Hierzu wurde durch mehrfache Injektion von 200  $\mu$ l des verdünnten Stockstandards (1 : 2000) eine 100 %-Bestimmung durchgeführt.

## III. Berechnung von Vitamin A im Serum:

$$c = \frac{h}{m} \cdot d \cdot \frac{100}{V} \cdot \left\langle \frac{\text{Peakhöhe - Vit.E - Acetat}_{(\text{theoretisch})}}{\text{Peakhöhe - Vit.E - Acetat}_{(\text{praktisch})}} \right\rangle$$

h = Peakhöhe [cm] des Vitamin-A-Peaks

c = Vitamin-A-Konzentration [ $\mu$ g/ml] im Serum

V = eingespritztes Volumen der Probe

d = Verdünnungsfaktor (beträgt 2)

m = Steigung der Eichgeraden (beträgt 0,2477)

## **2.6. Statistische Methoden**

Alle Daten, Grafiken und Tabellen wurden mithilfe des Programms Excel 2000 erstellt und ausgewertet. Mittelwerte und deren Standardabweichungen wurden errechnet und die Statistik mithilfe eines T-Tests durchgeführt. Ein Wert wurde hierbei dann als statistisch schwach signifikant bezeichnet, wenn  $p < 0,05$ , als signifikant, wenn  $p < 0,01$ , und als hoch signifikant, wenn  $p < 0,001$  betrug.

### 3. Ergebnisse

Für die vorliegende Dissertationsarbeit wurden 30 weibliche Wistarratten auf drei verschiedene Gruppen mit unterschiedlichem Vitamin-E-Gehalt verteilt. Alle Tiere erhielten als Standarddiät 3%iges Carbonyleisenfutter. Im Verlauf wurden Serumproben sowie Organproben von Herz, Leber und Milz entnommen und die Eisenkonzentration der Organproben sowie die Vitamin E und A Konzentrationen im Serum bestimmt.

#### 3.1. Ergebnisse der Eisen- und Vitaminmessungen

Über eine Versuchsdauer von 84 Tagen wurden 30 weibliche Wistarratten in 3 Trinkwassergruppen, die unterschiedliche Mengen an Vitamin-E-Zusätzen erhielten, eingeteilt: in Gruppe A Wasser ad libitum ohne weiteren Vitamin-E-Zusatz, in Gruppe B zusätzlich 500 mg Trolox in das Trinkwasser (Vitamin-E-Acetat) und in Gruppe C 10 mg Vitamin-E-Acetat/ml Wasser ad libitum zwei Mal in der Woche über eine Schlundsonde. Alle Tiere erhielten als Standarddiät 3%iges Carbonyleisenfutter. Im Versuchsverlauf wurden nach vier Wochen je drei Tiere aus jeder Gruppe getötet, um Hinweise auf eine entstehende Eisenüberladung und auf den Vitaminstatus der Vitamine A und E im Serum zu erhalten. Nach drei Monaten wurden auch die restlichen Tiere unter Äthernarkose durch erschöpfende Blutentnahme aus der Aorta abdominalis getötet und der Eisenstatus durch Veraschung von Herz-, Milz- und Leberproben und anschließender spektralphotometrischer Messung bestimmt.

| Gruppe | n  | Trinkwasser   |
|--------|----|---|
| A      | 10 | Destilliertes Wasser  |
| B      | 10 | Destilliertes Wasser und Zusatz von 500 mg Vitamin-E-Acetat (Trolox)/l Wasser                     |
| C      | 10 | Destilliertes Wasser und Zufuhr von 10 mg Vitamin-E-Acetat über eine Schlundsonde 2 Mal pro Woche |

Tabelle 3: Über die Versuchsgruppen (n = Anzahl der Versuchstiere)

### 3.1.1. Gewebeeisenkonzentrationen

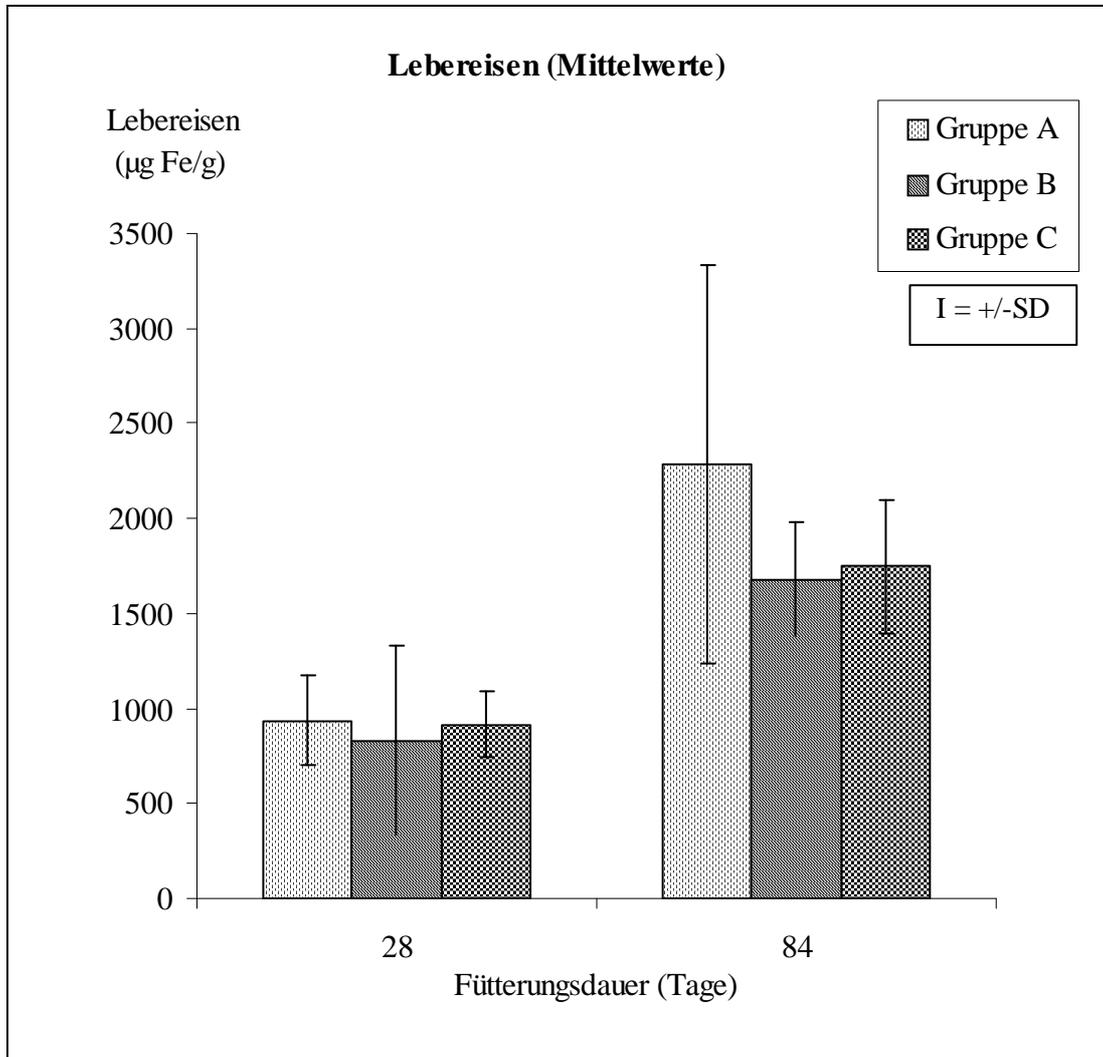


Abb. 12: Zunahme der Lebereisenkonzentration [ $\mu\text{g Fe/g}$ ] in Abhängigkeit zur Fütterungsdauer.

Anzahl der Tiere (n) nach 28 Tagen = 3, nach 84 Tagen = 7. Gruppe A (Vitamin-E-normale Ernährung, p nach 28/84 Tagen = 0,025, damit signifikant), Gruppe B (Vitamin-E-normale Ernährung und Zusatz von Vitamin E über das Trinkwasser, p nach 28/84 Tagen = 0,001, damit hoch signifikant) und Gruppe C (Vitamin-E-normale Ernährung und Zusatz von Vitamin E über die Schlundsonde, p nach 28/84 Tagen = 0,001, damit hoch signifikant). Zwischen den Gruppen kam es nach 28 Tagen zu keinen signifikanten Unterschieden und nach 84 Tagen nur zwischen den Gruppen A und B zu einem schwach signifikanten Unterschied.

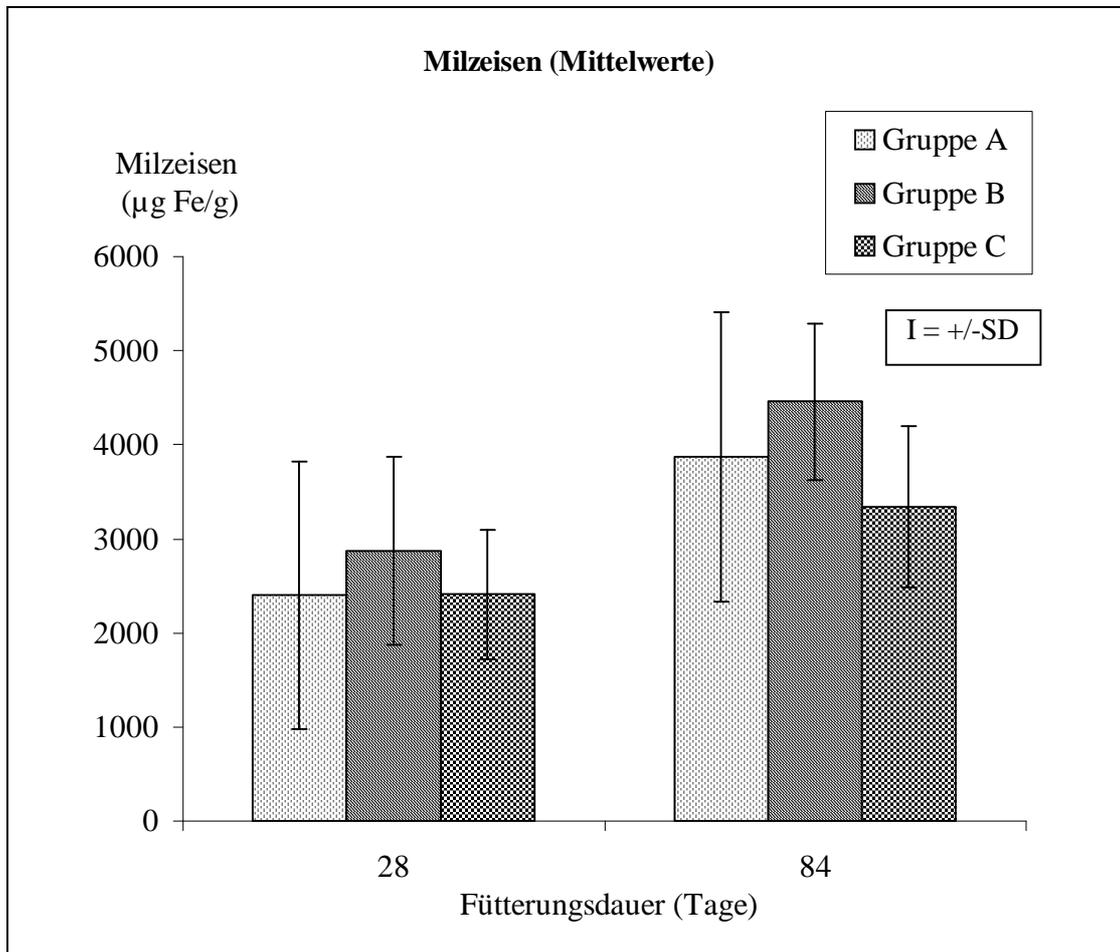


Abb. 13: Zunahme der Milzeisenkonzentration [ $\mu\text{g Fe/g}$ ] in Abhängigkeit zur Fütterungsdauer.

Anzahl der Tiere (n) nach 28 Tagen = 3, nach 84 Tagen = 7. Gruppe A (Vitamin-E-normale Ernährung, p nach 28/84 Tagen = 0,05, damit schwach signifikant), Gruppe B (Vitamin-E-normale Ernährung und Zusatz von Vitamin E über das Trinkwasser, p nach 28/84 Tagen = 0,01, damit signifikant) und Gruppe C (Vitamin-E-normale Ernährung und Zusatz von Vitamin E über die Schlundsonde, p nach 28/84 Tagen = 0,05, damit schwach signifikant). Zwischen den Gruppen kam es nach 28 Tagen zu keinen signifikanten Unterschieden und nach 84 Tagen zwischen den Gruppen B und C zu einem signifikanten Unterschied (p = 0,01).

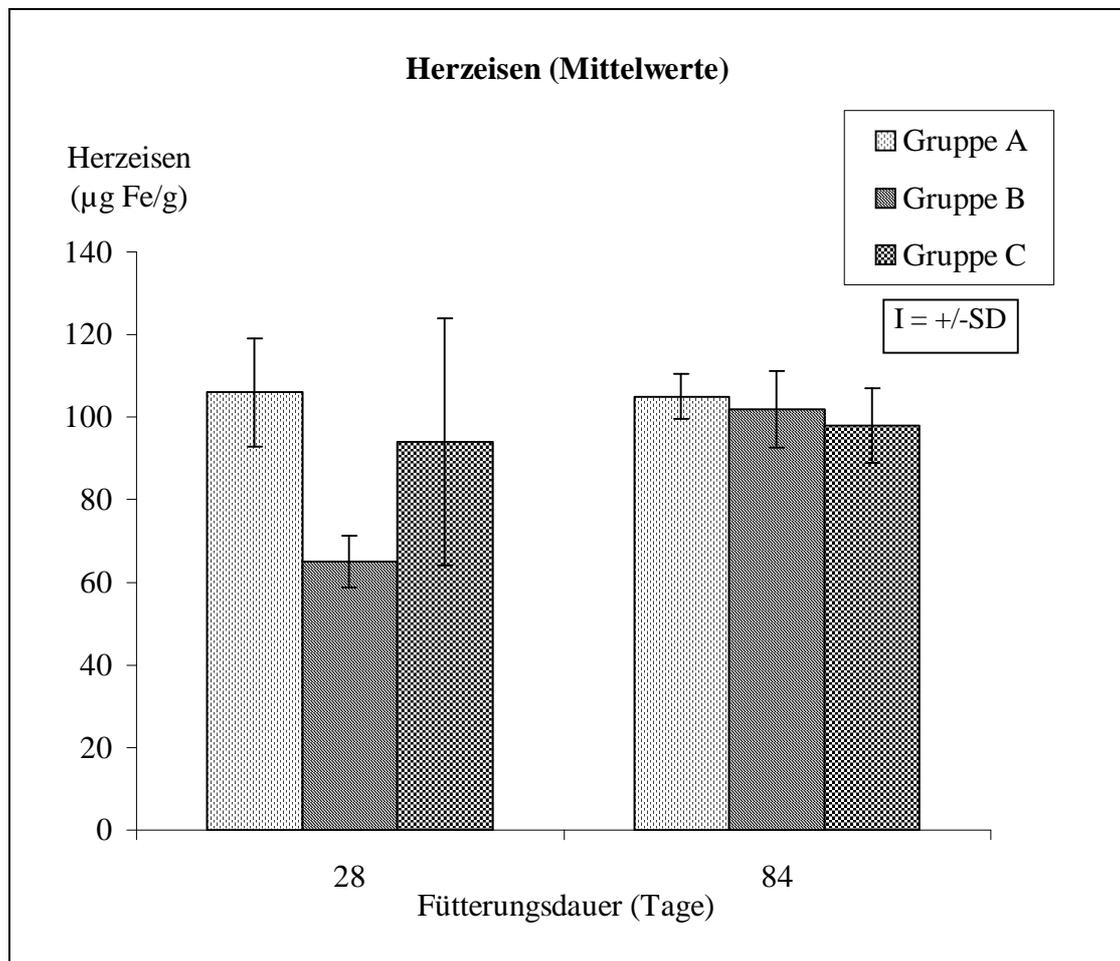


Abb. 14: Zunahme der Herzeisenkonzentration ( $\mu\text{g Fe/g}$ ) in Abhängigkeit zur Fütterungsdauer.

Anzahl der Tiere (n) nach 28 Tagen = 3, nach 84 Tagen = 7. Gruppe A (Vitamin-E-normale Ernährung, nach 28/84 Tagen  $p = 0,25$ ), Gruppe B (Vitamin-E-normale Ernährung und Zusatz von Vitamin E über das Trinkwasser,  $p > 0,001$ ) und Gruppe C (Vitamin-E-normale Ernährung und Zusatz von Vitamin E über die Schlundsonde,  $p = 0,25$ ).

#### Verlauf der Organeisenkonzentration:

Aus den Verlaufsgrafiken der Abbildungen 12, 13 und 14 geht hervor, dass es im Beobachtungszeitraum in allen Versuchstiergruppen zu einer signifikanten Zunahme der Lebereisenkonzentration kommt (Gruppe A:  $p = 0,0025$ , damit signifikant, Gruppe B:  $p = 0,001$ , damit hoch signifikant, und Gruppe C:  $p = 0,001$ , damit hoch signifikant). Der Vergleich der Gruppen untereinander zeigte bei der Entwicklung der Lebereisenkonzentration nach 28 Tagen keine signifikanten Unterschiede, nach 84 Tagen waren lediglich zwischen den Gruppen A und B mit  $p = 0,05$  schwach signifikante Unterschiede festzustellen.

Die Entwicklung der Milzeisenkonzentration weist ebenfalls in allen drei Gruppen eine signifikante Zunahme auf (Gruppe A mit  $p = 0,05$ , damit schwach signifikant, Gruppe B mit  $p = 0,01$  damit signifikant, und Gruppe C mit  $p = 0,05$ , damit schwach signifikant). Die Entwicklung der Milzeisenkonzentration zeigte wie schon die der Leberwerte nach 28 Tagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen, diese fanden sich erst nach 84 Tagen zwischen den Gruppen A und C mit  $p = 0,01$ .

Der Verlauf der Herzeisenkonzentration lieferte bereits nach 28 Tagen zwischen den Gruppen A und B mit  $p = 0,001$  ein sehr hoch signifikantes Ergebnis, zwischen den anderen Gruppen kam es jedoch zu keinen signifikanten Unterschieden. Nach 84 Tagen konnte lediglich zwischen den Gruppen A und C mit  $p = 0,05$  ein schwach signifikantes Ergebnis festgestellt werden.

In Tabelle 4 werden die in den Grafiken verwendeten Mittelwerte der Organeisenkonzentrationen dargestellt:

| <b>Gruppe</b> | <b>Anzahl d. Tiere (n)</b> | <b>Fütterungsdauer (Tage)</b> | <b>Leber (<math>\mu\text{g Fe/g}</math>)</b> | <b>Milz (<math>\mu\text{g Fe/g}</math>)</b> | <b>Herz (<math>\mu\text{g Fe/g}</math>)</b> |
|---------------|----------------------------|-------------------------------|--|---|---|
| <b>A</b>      | 3                          | 28                            | 938  | 2400  | 106   |
| <b>A</b>      | 7                          | 84                            | 2284   | 3870  | 105   |
| <b>B</b>      | 3                          | 28                            | 832  | 2874  | 65  |
| <b>B</b>      | 7                          | 84                            | 1681   | 4458  | 102   |
| <b>C</b>      | 3                          | 28                            | 915  | 2412  | 94  |
| <b>C</b>      | 7                          | 84                            | 1747   | 3342  | 98  |

Tabelle 4: Mittelwerte der Organeisenkonzentrationen

### 3.1.2. Vitaminmessungen im Serum

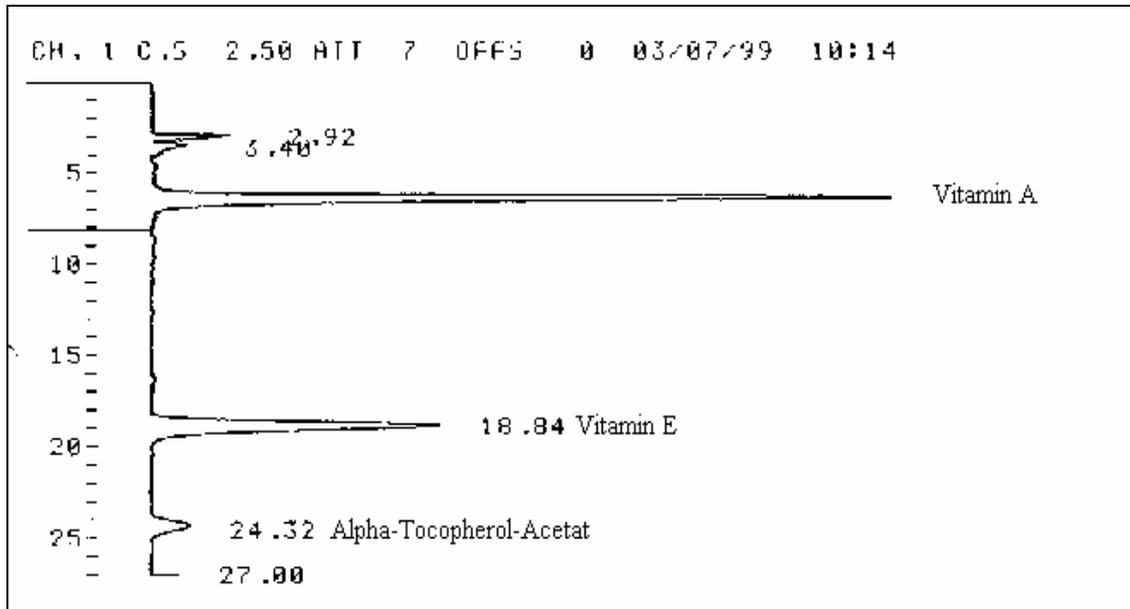


Abb. 15: Originalchromatogramm zu Versuchstier PC 1, aufgetragen auf einer Zeitskala in Minuten.

Der Peak bei 6,32 Minuten entspricht dem Vitamin-A, der Peak bei 18,84 Minuten dem Vitamin-E und der Peak bei 24,32 Minuten dem  $\alpha$ -Tocopherolacetat, welches der Probe als Aufarbeitungskontrolle zugefügt wurde.

Aus Abbildung 16 geht hervor, dass die Plasma-Vitamin-E-Konzentration über den gesamten Beobachtungszeitraum in allen drei Versuchstiergruppen absinkt, und zwar in Gruppe A von 3,2  $\mu\text{g/ml}$  nach 28 Tagen auf 2,1  $\mu\text{g/ml}$ , in Gruppe B von 3,4  $\mu\text{g/ml}$  auf 2,9  $\mu\text{g/ml}$  und in Gruppe C von 8,8  $\mu\text{g/ml}$  auf 8,3  $\mu\text{g/ml}$ . Jedoch kam es nur innerhalb der Gruppe A zu einer sehr hoch signifikanten Abnahme der Vitamin-E-Konzentration ( $p < 0,0005$ ), innerhalb der Gruppen B und C waren diese Veränderungen nicht signifikant. Vergleicht man nun die Gruppen miteinander, so kam es nach 28 Tagen zwischen den Gruppen A und C sowie B und C jeweils zu sehr hoch signifikanten Unterschieden ( $p < 0,0005$ ). Nach 84 Tagen lieferte der Vergleich der Gruppen A und B mit  $p = 0,025$  ein signifikantes, der Vergleich der Gruppen A und C mit  $p < 0,0005$  ein sehr hoch signifikantes Ergebnis, ebenso wie der Vergleich der Gruppen B und C mit  $p < 0,0005$ .

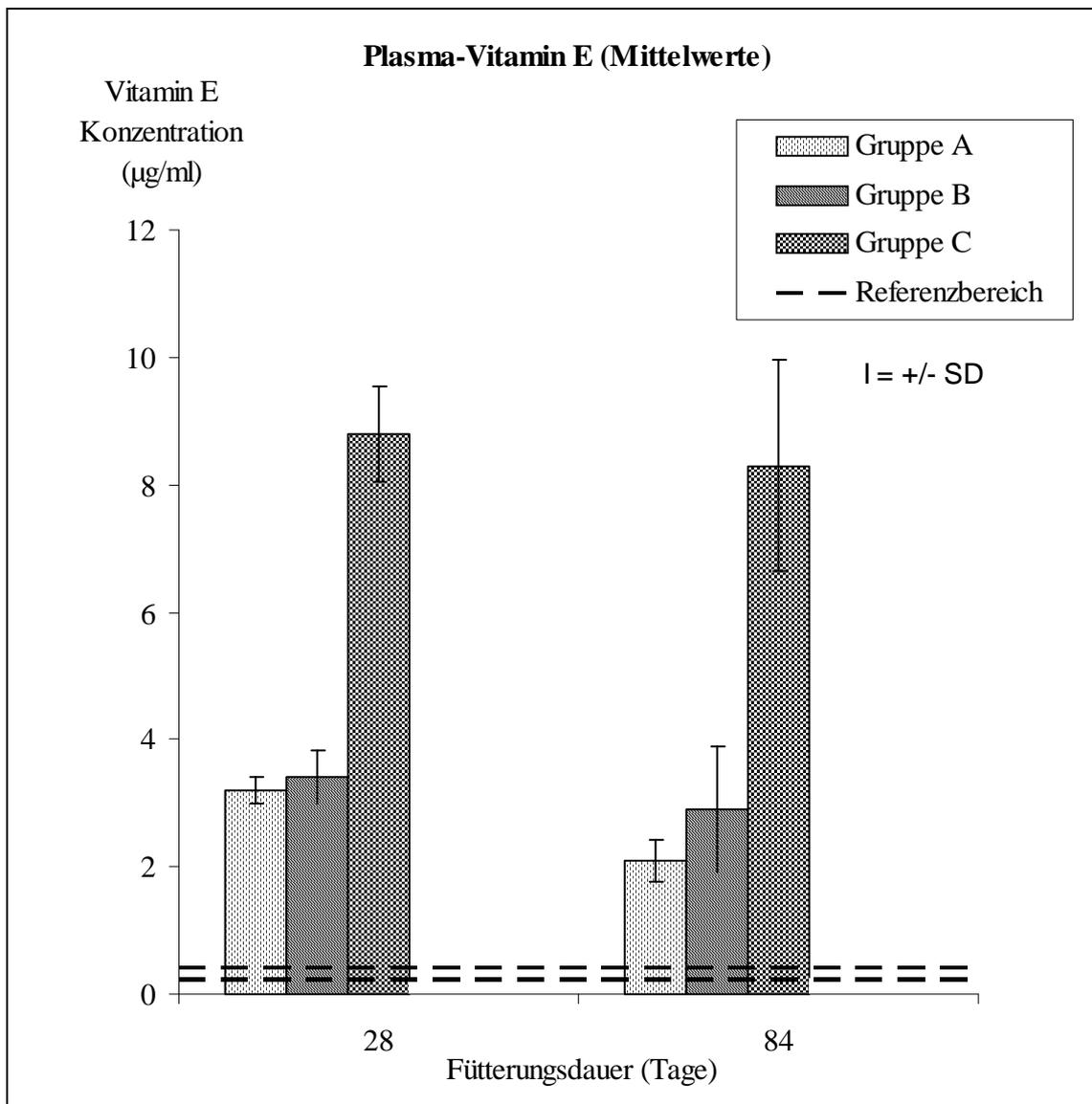


Abb. 16: Abnahme der Vitamin-E-Konzentration in Abhängigkeit zur Fütterungsdauer.

Anzahl der Tiere (n) nach 28 Tagen = 3, nach 84 Tagen = 7. Gruppe A (Vitamin-E-normale Ernährung: p nach 28/84 Tagen = 0,0005, damit sehr hoch signifikant), Gruppe B (Vitamin-E-normale Ernährung und Zusatz von Vitamin E über das Trinkwasser, n = 10, p nach 28/84 Tagen = 0,2, damit nicht signifikant) und Gruppe C (Vitamin-E-normale Ernährung und Zusatz von Vitamin E über Schlundsonde, p nach 28/84 Tagen = 0,3, damit nicht signifikant). Referenzbereich:  $0,33 \pm 0,09 \mu\text{g}$  Vitamin E/ml Serum.

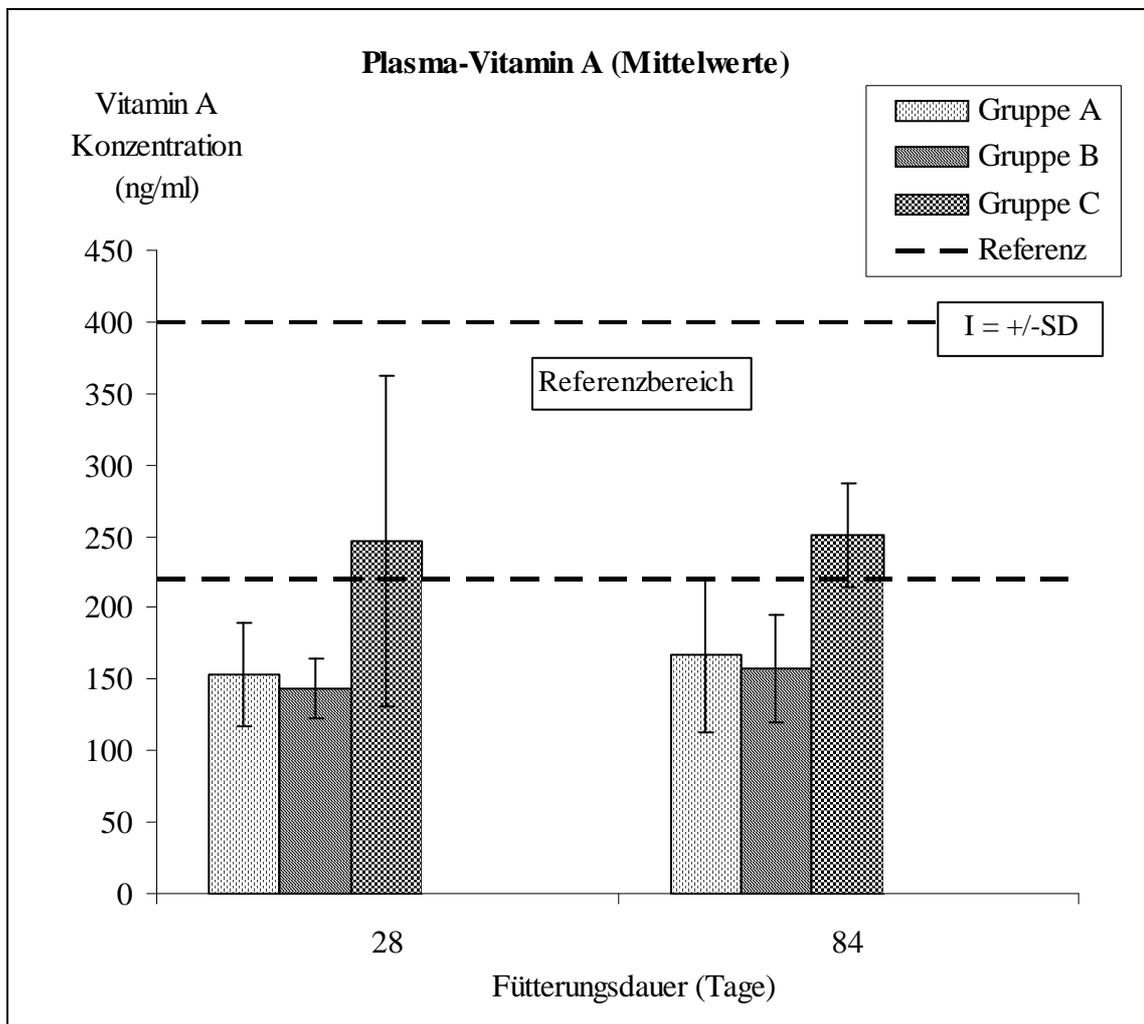


Abb. 17: Verlauf der Vitamin-A-Konzentration in Abhängigkeit zur Fütterungsdauer.

Anzahl der Tiere (n) nach 28 Tagen = 3, nach 84 Tagen = 7. Gruppe A (Vitamin-E-normale Ernährung, p nach 28/84 Tagen = 0,3, damit nicht signifikant), Gruppe B (Vitamin-E-normale Ernährung und Zusatz von Vitamin E über das Trinkwasser, p nach 28/84 Tagen = 0,3, damit nicht signifikant) und Gruppe C (Vitamin-E-normale Ernährung und Zusatz von Vitamin E über die Schlundsonde, p nach 28/84 Tagen = 0,45, damit nicht signifikant). Referenzbereich: 0,31 +/- 0,09 µg Vitamin A/ml Serum.

Aus der Verlaufsbeobachtung in Abbildung 17 geht hervor, dass die Plasma-Vitamin-A-Konzentration in allen drei Gruppen leicht zunahm: Die Mittelwerte stiegen in Gruppe A von 152 nach 28 Tagen auf 167 ng/ml nach 84 Tagen, in Gruppe B von 144 nach 28 Tagen auf 156 ng/ml nach 84 Tagen und in Gruppe C von 246 nach 28 Tagen auf 251 ng/ml nach 84 Tagen, was jedoch alles keine signifikanten Änderungen sind. Der Vergleich der Gruppen untereinander ergab nach 84 Tagen zwischen Gruppe A und B kein signifikantes,

zwischen Gruppe A und C mit  $p = 0,001$  ein hoch signifikantes und zwischen Gruppe B und C mit  $p = 0,0005$  ein sehr hoch signifikantes Ergebnis.

Statistik:

Die Mittelwerte der Plasma-Vitamin-E- und Plasma-Vitamin-A-Konzentrationen nach 28 und 84 Tagen werden in Tabelle 5 dargestellt:

| <b>Gruppe</b> | <b>Anzahl der Tiere (n)</b> | <b>Fütterungsdauer (Tage)</b> | <b>Vitamin-E-Konz. (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b> | <b>Vitamin-A-Konz. (ng/ml)</b> |
|---------------|-----------------------------|-------------------------------|--|--------------------------------|
| <b>A</b>      | 3                           | 28                            | 3,2  | 152                            |
| <b>A</b>      | 7                           | 84                            | 2,1  | 167                            |
| <b>B</b>      | 3                           | 28                            | 3,4  | 144                            |
| <b>B</b>      | 7                           | 84                            | 2,9  | 156                            |
| <b>C</b>      | 3                           | 28                            | 8,8  | 246                            |
| <b>C</b>      | 7                           | 84                            | 8,3  | 251                            |

Tabelle 5: Mittelwerte der Vitaminkonzentration im Plasma der Versuchstiergruppen

## **4. Diskussion**

Die Biochemie der Lebensvorgänge im oxydierenden Milieu ist mit oxidativem Stress verbunden, also dem Entstehen von kurzlebigen, hochreaktiven sauerstoffhaltigen Radikalen. Hierbei sind kleine Mengen von zellulärem Eisen, die nicht durch Bindung an Ferritin oder Transferrin „maskiert“ sind, an der Bildung von toxischen Sauerstoffradikalen beteiligt (Fenton- bzw. Haber-Weiss-Reaktion). Dieser Effekt wird bei einer Eisenüberladung für die entstehenden Organschäden verantwortlich gemacht. Ein System von Antioxidantien „entgiftet“ diese Sauerstoffradikale und schützt so insbesondere biologische Membranen vor Schäden durch Lipidoxidation.

In der vorliegenden Arbeit wurde der quantitative Einfluss von im Trinkwasser supplementiertem Vitamin E als Antioxidans auf den Grad der Eiseneinlagerung in Herz, Leber und Milz im Rahmen einer experimentell erzeugten Eisenüberladung bei weiblichen Wistar-Ratten untersucht. Hierbei wurde sich u. a. an Bacon et al. 1983 orientiert, d. h., zur Erzeugung der Eisenüberladung wurde Carbonyleisenfutter mit einem normalen Vitamin-E-Gehalt (163,95 mg/kg) verwendet. Die Tiere wurden in drei Gruppen mit unterschiedlichem Vitamin-E-Trinkwasserzusatz eingeteilt, wobei in Gruppe A lediglich destilliertes Wasser, in Gruppe B zusätzlich 500 mg Trolox (Vitamin-E-Acetat) und in Gruppe C 10 mg Vitamin-E-Acetat/ml Wasser zwei Mal in der Woche über eine Schlundsonde verabreicht wurde.

### **4.1. Erläuterung und Abgrenzung der verwendeten Methoden**

#### **4.1.1. Eisenüberladungsmodell**

Aus einer Reihe von experimentellen Eisenüberladungsmodellen musste ein geeignetes für den Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit ausgewählt werden. Zur häufigen Anwendung bei ähnlich gelagerten Versuchen gelangte das TMH-Ferrocen-Modell, welches zu einer schnellen und progressiven Eisenüberladung führt und die Fütterung von elementarem Eisen (Carbonyleisen) [Braumann et al. 1992 und 1994, Cable et al. 1999, Düllmann et al. 1992, Nielsen et al. 1993, Park et al. 1987]. Auch die Arbeit mit parenteraler Applikation von Fe(III)-Verbindungen [Bacon et al. 1983] oder der oralen Gabe von Fe(II)-Salzen [Richter

et al. 1984] ist vorzufinden. Diese Modelle führen zwar zu einem erhöhten Eisenstatus, jedoch nicht zum histologischen Bild einer hereditären Hämochromatose.

Aus diesem Grund wurde das Carbonyleisenmodell ausgewählt, da diese Futter-Supplementierung in den ersten drei bis vier Monaten eine nahezu identische Symptomatik der Eisenüberladung aufweist, wie sie bei der hereditären Hämochromatose beim Menschen vorliegt. Wird dieser Zeitraum jedoch überschritten, kommt es zu nekrotischen Eiseneinlagerungen in den Hepatozyten, Makrophagen und Kupferzellen, ein Phänomen, welches beim Menschen nicht beobachtet wurde. Darüber hinaus kommt es zudem noch zu einer Stagnation des Anstiegs der Lebereisenkonzentration [Nielsen et al. 1993]. Da der Fütterungszeitraum im Rahmen dieser Dissertationsarbeit lediglich zwölf Wochen betrug, kann das Carbonyleisen-Modell als durchaus adäquate Methode, welche das Bild einer hereditären Hämochromatose zutreffend wiedergibt, bezeichnet werden.

#### **4.1.2. Eisenbestimmung**

Die Veraschung des Probenmaterials dient der Beseitigung von organischen Matrixanteilen, die nicht nur Störungen bei Vorbehandlungs-Atomisierungsvorgängen bewirken, sondern auch zur Verdünnung des Analyten beitragen. Gegenüber den Extraktionsmethoden, bei denen der Analyt ohne weitere Vorbehandlung von der Matrix getrennt wird und bei denen die Ursachen für eine ungenügende Wiederfindungsrate oft nur schwer nachzuvollziehen sind, besitzen Veraschungsverfahren den Vorteil, dass Verluste lediglich durch überhöhte Temperatur oder Bildung leichtflüchtiger Verbindungen verursacht werden.

Grundsätzlich werden zwei Veraschungsverfahren unterschieden: die trockene Veraschung, die eine einfache thermische Zersetzung darstellt, und die Nassveraschung, die mit Zusatz von oxidierenden Säuren bei vergleichsweise niedrigen Temperaturen erfolgt.<sup>1</sup> Die dabei entstehenden Rückstände werden im Allgemeinen in Wasser oder Säure aufgenommen. Als problematisch erweist sich bei der Veraschung der mögliche Verlust an Analyten durch Verflüchtigung oder Bildung schwerlöslicher Verbindungen [Mader et al. 1998].

---

<sup>1</sup> Eine Übersicht über Veraschungsverfahren findet sich bei Christie et al. 1989.

Für die vorliegende Arbeit wurde zur Eisenbestimmung die Methode der Nassveraschung nach Düllmann et al. (1992) gewählt. Die Vorteile gegenüber den trockenen Verfahren bestehen zum einen in der geringeren Temperatur, wodurch Verluste durch volatile Bestandteile niedrig gehalten werden, und zum anderen in der kürzere Veraschungszeit. Als Nachteil muss der durch die verwendeten Reagenzien eingeschleppte Blindwert betrachtet werden.

Das höchste Oxidationspotential der hierfür angeführten Säuren beim Erhitzen bis zum Siedepunkt weist Perchlorsäure auf, die jedoch bei biologischen Proben nicht direkt eingesetzt werden kann, da bei dem Vorliegen leichtoxidierbarer Komponenten heftige Explosionen auftreten. Salpetersäure hingegen entwickelt zwar erst unter Druck ein hohes Oxidationspotential, kann dafür allerdings gut in Kombination mit anderen stark oxidierenden Reagenzien wie  $\text{HClO}_4$  oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  eingesetzt werden.

Als oxidierende Reagenzien wurden Salpetersäure ( $\text{HNO}_3$ ) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) verwendet, deren Vorteil in der geringen Erzeugung von Blindwerten liegt. Jedoch besteht bei der Arbeit mit diesen Stoffen eine hohe Explosionsgefahr.

Zur Nassveraschung beim Versuchsaufbau dieser Arbeit wurde ein Mikrowellengerät verwendet, da durch die deutlich kürzeren Reaktionszeiten nicht nur der Arbeitsaufwand, sondern auch die Kontaminationsgefahr durch die Behälter geringer wird.

#### **4.1.3. Vitaminbestimmung**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Serumkonzentrationen der Vitamine A und E bestimmt, und zwar bei den Tocopherolen ausschließlich das  $\alpha$ -Tocopherol, da es die im menschlichen Körper vorherrschende Form darstellt [Bieri et al. 1965]. Die Vitaminkonzentrationen verteilen sich auf mehrere Kompartimente, sodass mit der Serumfraktion nicht die Gesamtvitaminmenge gemessen wird: Vitamin A wird in großen Mengen in der Leber gespeichert [Barua et al. 2000], Tocopherol wirkt aufgrund seiner Lipophilie besonders im Fettgewebe und an den Zellmembranen [Nelis et al. 2000]. Es wird im Plasma an Lipoproteine gebunden transportiert, weshalb eine Abhängigkeit vom

Lipidstatus besteht. So kann z. B. bei einer Hyperlipidämie ein Vitamin-E-Mangel trotz normaler Vitamin-E-Serumwerte vorliegen [von Herbay et al. 1994].

Die Vitaminbestimmung in der Plasma- oder Serumfraktion ist aufgrund ihrer leichten Zugänglichkeit insbesondere beim Menschen eine gängige Methode [von Herbay et al. 1994, Lang et al. 1986, Livrea et al. 1996, Young et al. 1994]. Die Bestimmung der Vitamine A und E erfolgte mithilfe der Reversed-Phase-HPLC, die in der Fachliteratur als beste, genaueste und einfachste quantitative Bestimmungsmethode beschrieben wird [Friedrich et al. 1992, Ruperez et al. 1999, Barua et al. 2000, Nelis et al. 2000], wobei sich auch hier aufgrund der Aufarbeitung des biologischen Materials Varianzen ergeben können. Eine direkte Bestimmung im biologischen Material war jedoch nicht möglich, da es zu erheblichen Störungen geführt hätte, sodass das  $\alpha$ -Tocopherol aus dem Plasma extrahiert werden musste. Zur Quantifizierung von Aufarbeitungsverlusten wurde ein bekannter Zusatz an  $\alpha$ -Tocopherolacetat zum Probenmaterial verwendet. Da das lipidlösliche und oxidationsempfindliche Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) im Serum von Lipoproteinen transportiert wird, während es im Gewebe hauptsächlich membrangebunden vorliegt, muss es zu Analysezwecken zunächst mit einem geeigneten Lösungsmittel extrahiert und von störenden Proteinen und Membranlipiden getrennt werden, bevor es über die HPLC nachgewiesen werden kann. Nach Driskell et al. (1982) wurde zunächst Hexan hierfür benutzt, was jedoch in Wechselwirkung mit den Lipoproteinen tritt und teils in Micellen festgehalten wird, sodass die Extraktion des  $\alpha$ -Tocopherols nur unvollständig gelingt [MacCrehan und Schönberger 1987, Nelis et al. 2000] und ein geeigneter interner Standard benötigt wurde. Doch besonders bei der Extraktion des Vitamin E aus dem Gewebe nach vorangegangener Verseifung der störenden Lipide [Staats et al. 1988b in Anlehnung an Driskell et al. 1982] erwies sich nicht nur der interne Standard Retinol-Acetat als instabil, zudem konvertiert das gesuchte  $\alpha$ -Tocopherol im alkalischen Milieu während der Verseifung zum hydrophilen Phenolat-Anion [MacCrehan und Schönberger 1987]. Nur die direkte Extraktion von Vitamin E aus Serum und Gewebe mit Aceton unter Verwendung von  $\alpha$ -Tocopherolacetat als internen Standard [Zaspel und Csallany 1983, Nelis et al. 2000] brachte hohe und gleichmäßige Wiederfindungsraten (Gewebe 83 %, Serum 85 %) bei

akzeptablen Laufzeiten, sodass diese Methode für den Versuchsaufbau dieser Arbeit am besten geeignet schien.

## **4.2. Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1. Eisenabsorption, Eisenüberladung und Antioxidantien**

Eisen wird mithilfe des Protonensymporters DMT1 (divalent metal transporter) von  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert und im Duodenum und oberen Jejunum absorbiert [Donovan et al. 2005, Gunshin et al. 1997, Latunde-Dada et al. 2002, Nielsen et al. 2003, Pantopoulos 2004, Powell 2004]. Daneben kann Eisen allerdings auch mit intaktem Häm direkt aufgenommen werden. Ein weiterer Transportweg (mobilferrin) ist molekular noch nicht eindeutig charakterisiert worden [Gallati et al. 2002]. Schließlich wird das Eisen – immer noch in zweiwertiger Form – über Ferriportin in die Blutbahn abgegeben. Das Ferriportin kann mit der Ferroxidase Hephästine assoziiert sein, welche das Eisen wieder zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert. Dies kann auch im Blut durch Caeruloplasmin und andere Ferroxidasen geschehen, wo das Eisen an Transferrin gebunden und über Transferrinrezeptoren an die Zellen, die ihren Bedarf über Eisen-Regulator-Proteine ausdrücken, welche wiederum die Expression von Transferrin, dessen Rezeptoren und Ferritin kontrollieren, abgegeben wird. An diesem Mechanismus ist wahrscheinlich auch das HFE-Gen beteiligt [Beutler 2002, Feder et al. 1996, Gallati et al. 2002, Pietrangelo 2004]. Der Eisenbedarf des Organismus wird über verschiedene Mechanismen auf dem Niveau des Dünndarms reguliert, von denen einer der sogenannte Eisenblock ist, welcher die Eisenaufnahme nach einem großen Angebot herunterreguliert. Zwei andere Mechanismen sind die bisher noch schlecht charakterisierten löslichen Faktoren: der Speicherregulator (z. B. Heparin) und der erythropoetische Regulator [Gallati et al. 2002].

In der Vergangenheit wurde bereits mehrfach nachgewiesen, dass es einen Zusammenhang zwischen der Eisenüberladung, der LPO und dem Vorhandensein von antioxidativ wirksamen Vitaminen gibt: Young et al. machten dies 1994 bei langjähriger Hämochromatose an dem Vorliegen von teilweise deutlich verminderten Serumspiegeln der Vitamine A, C und E fest, von Herbay et al. fanden ebenfalls 1994 bei Hämochromatosepatienten erhöhtes Serumeisen, erhöhtes Ferritin und im Vergleich dazu

auffallend niedrige Vitamin-E-Werte im Plasma vor. Vor diesem Hintergrund erhofft man sich, durch eine Substitution mit Vitaminen somit über einen Anstieg der Vitaminkonzentration eine Steigerung der antioxidativen Wirkung zu erzielen und auf diese Weise besonders die Toxizität freier Radikale einschränken zu können. Diese Hypothese galt es zu überprüfen.

#### **4.2.2. Ergebnisse der Eisenmessungen**

Die durchgeführten Untersuchungen dieser Studie führten in Leber und Milz nach 84 Tagen zu einer signifikanten Zunahme der Organeisenkonzentration, während der Verlauf der Herzeisenkonzentration nur in Gruppe B eine signifikante Veränderung aufwies. Da hier der Wert nach 28 Tagen aber deutlich unter dem der anderen Gruppen lag und sich nach 84 Tagen auf deren Niveau befand, stellt sich hier die Frage, ob diese Abweichung auf die individuelle Disposition der drei Versuchstiere zurückzuführen ist (die Werte aller Tiere liegen mit 58, 68 und 70  $\mu\text{g Fe/g}$  sehr dicht beieinander)<sup>2</sup> oder ob in Gruppe B tatsächlich eine Verzögerung der Herzeiseneinlagerung stattgefunden hat. Ein Versuchstier der Gruppe C weist zudem einen Wert auf, der mit 59  $\mu\text{g Fe/g}$  dem Niveau von Gruppe B entspricht. Ob es sich hierbei um einen Ausreißer nach unten oder bei den anderen beiden Tieren der Gruppe C (107 und 115  $\mu\text{g Fe/g}$  und damit auf dem Niveau der Gruppe A mit einer durchschnittlichen Herzeiseneinlagerung von 106  $\mu\text{g Fe/g}$ ) um einen nach oben handelt, ist bei der untersuchten Anzahl von drei Tieren nach 28 Tagen nicht feststellbar. Hier wäre es interessant, eine Versuchsreihe mit einer größeren Kohorte durchzuführen.

Ähnlich verhält es sich mit den Werten der Lebereiseneinlagerung nach 28 Tagen: Die Gruppen A und C weisen hier recht homogene Werte und demzufolge auch einen ähnlichen Durchschnittswert auf (938 bzw. 915  $\mu\text{g Fe/g}$ ), während dieser bei Gruppe B mit 832  $\mu\text{g Fe/g}$  doch schon deutlich darunter liegt. Hier ist jedoch bei den Werten der einzelnen Ratten eine große Heterogenität festzustellen (664, 1395 und 436  $\mu\text{g Fe/g}$ ), sodass hier keine Rückschlüsse auf eine Regelmäßigkeit möglich sind.

---

<sup>2</sup> Die einzelnen Werte der Versuchstiere finden sich im Anhang (Kapitel 7.1.).

Es fällt auf, dass die Mittelwerte für die Eisenkonzentrationen in Herz, Leber und Milz in der Gruppe A (Vitamin-E-normale Ernährung) nach 84 Tagen über denjenigen der anderen beiden Gruppen (zusätzliche Supplementierung mit Vitamin E) lagen. Interessanterweise findet sich nach 84 Tagen in der Gruppe C (Schlundsonde) mit 1747 µg/g ein höherer Mittelwert für die Lebereisenkonzentration als in der Gruppe B (Vitamin-E-Zusatz über das Trinkwasser) mit 1681 µg/g, allerdings ohne dass hier eine Signifikanz vorläge. Aufgrund der deutlich höheren Serum-Vitamin-E-Konzentrationen in der Gruppe C gegenüber der Gruppe B wäre zu erwarten gewesen, dass die Organeisenkonzentrationen hier wesentlich niedriger ausfallen würden, was bei der Herzeisenkonzentration ja auch tatsächlich der Fall ist. Der Verlauf der Milzeisenkonzentration zeigt überraschenderweise nach 84 Tagen einen deutlich höheren Wert in Gruppe B als in Gruppe A, wobei festgestellt werden muss, dass die Varianzen der Werte der einzelnen Versuchstiere bei der Milz ausgesprochen groß ist (nach 84 Tagen in Gruppe A zwischen 3059 und 5106, in Gruppe B zwischen 3304 und 5646 und in Gruppe C zwischen 2293 und 4683 µg Fe/g). Eine Erklärung für diese Auffälligkeit zu finden, gestaltet sich recht schwierig, da nur eine relativ geringe Anzahl an Versuchstieren zur Verfügung stand, sodass größere Veränderungen nur eines einzigen Versuchstieres relativ stark ins Gewicht fallen.

Die Ergebnisse dieser Studie konnten somit zwar zeigen, dass durch die zusätzliche Supplementierung mit Vitamin E durchaus ein günstiger Einfluss auf den Grad der Organeiseneinlagerung erreicht wird, der Nachweis, dass eine deutliche Zufuhr an Vitamin E über das normale Maß hinaus auch zu einer deutlichen Veränderung der Organeiseneinlagerung führt, konnte jedoch nicht eindeutig erbracht werden. Das wird vermutlich auf die bereits in anderen Studien beschriebene Tatsache zurückzuführen sein, dass die Schutzwirkung des Vitamin E bei höheren Organeisenkonzentrationen nicht mehr ausreicht, um die eiseninduzierte Lipidperoxidation zu unterdrücken [Dresow et al. 1995].

Zusammenfassend muss demzufolge festgestellt werden, dass der Versuch im Rahmen dieser Dissertationsarbeit über einen Zeitraum von 84 Tagen (12 Wochen) einen kontinuierlichen und signifikanten Anstieg des Eisengehaltes von Leber und Milz, nicht aber im Herzen nachgewiesen hat. Jedoch konnte die Ausgangsvermutung, dass diesem Effekt mit der Vergabe von zusätzlichem Vitamin E entgegengewirkt werden kann, nicht

eindeutig bestätigt werden konnte. Es wäre sinnvoll, diesen Versuchsaufbau mit einer deutlich größeren Anzahl von Versuchstieren durchzuführen, um so Rückschlüsse auf die Eisenkonzentration in den verschiedenen Organen zu bekommen und dementsprechend zu verifizieren, ob es sich bei den beobachteten Ausprägungen um generell auftretende Phänomene handelt oder ob diese lediglich auf Eigenarten einzelner Tiere zurückzuführen bzw. durch deren konstitutionelle Disposition bedingt sind, sodass in einer derart kleinen Gruppe wie im vorliegenden Versuchsaufbau eine überproportional hohe Verzerrung der Ergebnisse auftreten kann. So wäre es dann möglich, beispielsweise zu untersuchen, ob ein täglich erfolgender Zusatz von Vitamin E, wie dies in Gruppe B erfolgte, eventuell einen positiveren Effekt aufweist als eine höhere, aber dafür auch seltenere Gabe wie in Gruppe C über die Schlundsonde.

#### **4.2.3. Vitamin E**

Vitamin E wirkt aufgrund seiner Lipophilie in erster Linie im Fettgewebe und an den Zellmembranen [Nelis et al. 2000]. Bei erhöhtem Bedarf im Rahmen einer gesteigerten Lipidperoxidation wird Vitamin E aus den Speichern (Hauptspeicherorgan ist die Leber) freigesetzt, um so möglichst hohe Konzentrationen am Schädigungsort aufbauen zu können. Der Transport im Plasma erfolgt durch eine Bindung an Lipoproteine, weshalb hier eine Abhängigkeit vom Lipidstatus vorliegt.

Die physiologischen Vitamin-E-Speicher in der Leber beinhalten eine ca. 50- bis 100-fach höhere Menge, als im Plasma zirkuliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf Referenzwerte zurückgegriffen, die in der Literatur bereits angegeben sind. Diese liegen für die Rattenspezies zwischen 0,33 µg (mit einer Varianz von +/- 0,09) Vitamin E/ml Serum [Beutelspacher et al. 2004] und 1,11 µg/ml Serum [Lang et al. 1987], wobei bei letzterer Arbeit eine andere Rattenspezies verwendet wurde, sodass der Referenzwert aus der Arbeit von Beutelspacher et al. als Grundlage diene.

#### 4.2.4. Ergebnisse der Vitamin-E-Messungen

Die Ergebnisse der Versuchsreihe zeigen, dass der  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt im Plasma aller Ratten mit steigendem Herz-, Leber- und Milz-Eisen-Status abnahm, und zwar unabhängig davon, ob und wie stark die Ernährung der Tiere mit Vitamin E supplementiert wurde. Dabei verminderte sich die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in der Gruppe A (Vitamin-E-normale Ernährung) von 3,2 auf 2,1  $\mu\text{g/ml}$ , in der Gruppe B (Vitamin-E-Supplementierung über das Trinkwasser) von 3,4 auf 2,9  $\mu\text{g/ml}$  und in der Gruppe C (Vitamin-E-Supplementierung über eine Schlundsonde) von 8,8 auf 8,3  $\mu\text{g/ml}$ , wobei lediglich die Gruppe A mit  $p = 0,0005$  ein sehr hoch signifikantes Ergebnis lieferte.<sup>3</sup> Die Kontrollgruppe mit der normgerechten Vitamin-E-Ernährung (Gruppe A) zeigte dabei jedoch mit einer Vitamin-E-Restkonzentration, die nach 84 Tagen nur noch 66 % betrug, den stärksten Abfall des Plasma- $\alpha$ -Tocopherolgehalts, während die Vitamin-E-reich ernährten Ratten (Gruppen B = 85 % und C = 94 % Vitamin-E-Restkonzentration nach 84 Tagen) unabhängig vom Ausgangsstatus, welcher bei der Gruppe C (Schlundsondengruppe) mit 8,8  $\mu\text{g/ml}$  deutlich höher war als bei der Gruppe B (Trinkwassergruppe) mit 3,4  $\mu\text{g/ml}$ , ein ähnliches Absinken des  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalts aufwiesen. Da zudem die Varianz der Einzelwerte der Tiere in den Gruppen B und C recht hoch ist (die Werte liegen in Gruppe B zwischen 1,6 und 4,7, in Gruppe C zwischen 6,2 und 11,0  $\mu\text{g/ml}$ ), ließe sich eine exakte Aussage bezüglich der Tendenz des Vitamin-E-Gehalts im Serum nur treffen, wenn man eine deutlich größere Kohorte untersuchte, da das vorliegende geringfügige Absinken durchaus auch auf extreme Werte einzelner Tiere zurückzuführen sein kann.

Bereits aus drei vorangegangenen Studien geht allerdings hervor, dass der  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt bei steigenden Eisenspeicherwerten abnimmt:

Ward et al. 1991: Hier wurden allerdings keine Angaben zum Vitamin-E-Gehalt des Futters gemacht.

Dresow et al. 1995: Hier lag der Vitamin-E-Gehalt des Futters zwischen 164 mg/kg (normal Vitamin E) und 0,5 mg/kg (Vitamin-E-arm).

---

<sup>3</sup> Die einzelnen Werte der Versuchstiere finden sich im Anhang (Kapitel 7.2.).

---

Brown et al. 1997: Der Vitamin E-Gehalt lag zwischen 50 mg und 200 IU  $\alpha$ -Tocopherolacetat pro kg Diät.

Während in den Studien von Dresow et al. und Ward et al. ein kontinuierlicher Abfall des Plasma- $\alpha$ -Tocopherol-Gehalts über den gesamten Beobachtungszeitraum nachgewiesen wurde, liefert die Studie von Brown et al. dem entgegenstehende Ergebnisse. Auch hier wird zwar ein kontinuierlicher Abfall des Plasma- $\alpha$ -Tocopherol-Gehalts beschrieben, jedoch ist in den Grafiken ein etwas anderer Verlauf zu erkennen: In den ersten 8 Monaten zeigt sich der auch in den übrigen Studien beobachtete Abfall des Plasma- $\alpha$ -Tocopherol-Gehalts, nach 14 Monaten ist hier allerdings bei gleich bleibender Ernährung (3 % Carboneisen plus 200 IU  $\alpha$ -Tocopherolacetat/kg Diät) ein Anstieg des Plasma- $\alpha$ -Tocopherol-Gehalts zu erkennen. Da sowohl die Studie im Rahmen dieser Arbeit (12 Wochen) als auch die von Dresow et al. (30 Wochen) eine wesentlich kürzere Dauer aufweisen, konnte dieses Phänomen in beiden Fällen nicht bestätigt werden.

In der Fachliteratur wird darüber hinaus auch noch zwischen oraler und parenteraler (intramuskulärer) Verabreichung von Vitamin E unterschieden. So konnte bei Thalassämiepatienten nur bei parenteraler Gabe ein signifikanter Vitamin-E-Konzentrationsanstieg beobachtet werden [Giardini et al. 1985].

Im Rahmen der vorliegenden Studie fällt auf ist, dass bereits zu Beginn der Messungen (nach 28 Tagen) die Werte aller Versuchstiergruppen signifikant über dem Referenzbereich lagen. Eine eindeutige Erklärung dieses Effektes ist schwierig, da kein entsprechendes Probenmaterial von den Tieren vor Versuchsbeginn (am Tag null) zur Verfügung stand und der Referenzbereich (wie oben beschrieben) aus der vorhandenen Literatur übernommen wurde. Denkbar wäre beispielsweise, dass es im Serum von Ratten ein im Wesentlichen altersabhängiges Abfallen der Vitamin-E-Konzentration gibt, was somit den eiseninduzierten Verbrauch von Vitamin E überlagern könnte. Eine andere Erklärung könnte durch die in der Literatur beschriebene Freisetzung von Vitamin E aus der Leber ins Plasma zu Beginn einer signifikanten Lipidperoxidation, welche bei Eisenüberladung auftritt, geliefert werden, sodass in diesem Fall sogar erhöhte Vitamin-E-Spiegel vorliegen könnten [Kawase 1989]. Dadurch wird die Frage aufgeworfen, ob das

Heranziehen von Vitamin E als indirekter Marker für oxidativen Stress unter diesen Versuchsbedingungen Sinn macht, da höchstens über einen absinkenden Vitamin-E-Spiegel auf ein lipidperoxidatives Geschehen Rückschlüsse gezogen werden können. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass der Vitamin-E-Spiegel von sehr vielen verschiedenen Faktoren abhängt (z. B. Nahrung, Blutlipidzusammensetzung etc.), sodass einmalige Messungen in keinem Falle hinreichend sein können.

Würde man die Versuchsanordnung zukünftig optimieren wollen, müsste wohl die Versuchstieranzahl deutlich erhöht werden, genauso wie die Anzahl der Messungsintervalle und damit die Zeitdauer des Versuchs. In diesem Zusammenhang wäre es dann auch sinnvoll, eine Versuchstiergruppe, welche Vitamin-E-arm ernährt würde, als Kontrollgruppe einzurichten.

#### **4.2.5. Vitamin A**

Die Vitamin A-Konzentrationen liegen in der Leber, dem Hauptspeicherorgan, in etwa um den Faktor 100 höher als im Plasma. Auch hierfür wurden Referenzwerte aus der Arbeit von Beutelspacher et al. 2004 zu Grunde gelegt.

#### **4.2.6. Ergebnisse der Vitamin-A-Messungen**

Im Verlauf des vorliegenden Versuchs erhöhte sich die Vitamin-A-Konzentrationen im Serum in der Versuchstiergruppe A von 152 auf 167 ng/ml, in Gruppe B von 144 auf 156 ng/ml und in Gruppe C von 246 auf 251 ng/ml. Sämtliche Veränderungen waren jedoch nicht signifikant. Damit konnte der in vorangegangenen Studien beobachtete Anstieg der Serum-Vitamin-A-Konzentration [Sato et al. 1982] im Rahmen dieser Arbeit zwar nachvollzogen werden, er erwies sich dabei jedoch nicht als signifikant. Auffallend war hier nur der deutlich höhere Wert in der Gruppe C, der im Vergleich zu Gruppe B als hoch signifikant und zu Gruppe A als signifikant bezeichnet werden muss. Da es zwar auch hier eine gewisse Heterogenität der Werte innerhalb der einzelnen Gruppen gab, so erscheinen

---

diese doch nicht als derart erheblich, dass einzeln herausragende Werte für diese Abweichung verantwortlich sein könnten.<sup>4</sup>

Auch hier gestaltet es sich schwierig, eine Erklärung für das Phänomen den geringen Anstieg des Vitamin-A-Gehalts im Serum zu finden, da die Leber-Vitamin-A-Konzentrationen nicht gleichzeitig gemessen wurden und somit nicht beobachtet werden konnte, ob eventuell in der Leber bereits erniedrigte Konzentrationen vorlagen. Da mit 84 Tagen eine im Vergleich zu anderen Studien relativ kurze Versuchsdauer gewählt wurde, wäre es denkbar, dass zunächst bei steigendem Eisen-Status im Organismus nicht nur Vitamin E, sondern auch Vitamin A im Serum verbraucht wird und erst dann auf die Speicher in der Leber zurückgegriffen wird, was dann – wie in vorangegangenen [Sato et al. 1982, Beutelspacher et al. 2004] Studien gezeigt wurde – zu einer vorübergehenden Erhöhung der Vitamin-A-Konzentration im Serum bei deren gleichzeitiger Verminderung in der Leber führen würde. Möglicherweise war der Zeitraum der Studiendauer also zu kurz gewählt, sodass der Organismus noch nicht auf seine Vitamin-Speicher zurückgegriffen hat. Da dies jedoch noch nicht den leichten Anstieg der Serum-Vitamin-A-Konzentration in den Versuchsgruppen zu erklären vermag, muss noch ein anderer Erklärungsansatz herangezogen werden: Es wäre denkbar, dass Vitamin A in relativ größeren Mengen als andere Vitamine in der Leber gespeichert wird, sodass es nicht so schnell verbraucht werden kann und möglicherweise in seiner Speicherform auch nicht sofort verfügbar ist. Der Organismus würde dieser Annahme zufolge daher bei erhöhtem Eisenstatus zunächst auf das Vitamin E als Antioxidans zurückgreifen. Der Organismus der Versuchstiere greift dann erst deutlich später auf seine Vitamin-A-Reserven in der Leber zurück, was zunächst zu einer Erhöhung des Serum-Vitamin-A-Spiegels führt.

---

<sup>4</sup> Die einzelnen Werte der Versuchstiere finden sich im Anhang (Kapitel 7.2.).

#### 4.2.7. Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen

Es gibt für den Menschen zwei Hauptformen von Siderosen, die hereditäre Hämochromatose und die sekundären Hämochromatosen bei transfusionspflichtigen Anämien, wie z. B. die  $\beta$ -Thalassämie major.

Bei Ersterer kommt es aufgrund eines genetisch determinierten Resorptionsdefektes für Eisen zu dessen gesteigerter Aufnahme aus dem Darm, wohingegen bei Letzterer die wiederholten Bluttransfusionen für die Eisenüberladung verantwortlich zeichnen.

Ob eine Eisenaufladung bzw. die Resorption von Eisen beim Menschen durch die Gabe von  $\alpha$ -Tocopherol beeinflusst werden kann, ist nicht bekannt. Arbeiten zu dieser Thematik liegen nicht vor. Es konnte aber nachgewiesen werden, dass es bei einer manifesten Eisenüberladung beim Menschen zu einem signifikanten Abfall der Serumkonzentration von Retinol,  $\alpha$ -Tocopherol und der Ascorbinsäure kommen kann [De Luca et al. 1999, Livrea et al. 1996, Reller et al. 1998, Young et al. 1994]. Dieser Effekt wurde als Verbrauch der Antioxidantien unter der eisenkatalysierenden Sauerstoffradikalbildung gedeutet.

Dieser Annahme zufolge wäre es denkbar, dass eine Stabilisierung des Antioxidantienstatus bei Hämochromatose-Patienten, zum Beispiel durch eine entsprechende Nahrungsergänzung, den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen könnte, sodass die Membranlipide von Leber, Milz, Herz und anderen Organen vor der verstärkt ablaufenden Lipidperoxidation geschützt würden. Zu diesem Thema sind die bereits laufenden Studien jedoch noch nicht abgeschlossen.

Umfassende Aussagen zu einem Nutzen-Risiko-Verhältnis einer begleitenden „Vitamintherapie“ können daher zurzeit aufgrund mangelnder Erfahrungen noch nicht gemacht werden. Neben einem möglichen therapeutischen Nutzen müssen selbstverständlich auch Risiken angenommen werden. So ist z. B. bei der ebenfalls antioxidativ wirksamen Ascorbinsäure bekannt, dass sie, besonders in höheren Konzentrationen, den klinischen Verlauf von Siderosen akut verschlechtern und im schlimmsten Falle sogar zum Tod des Patienten führen kann [Nienhuis et al. 1981], was vermutlich auf deren prooxidativen Effekt unter Anwesenheit von Eisen zurückgeführt wird.

Darüber hinaus begünstigt Ascorbinsäure die Eisenresorption aus dem Gastrointestinaltrakt durch seine reduzierende Eigenschaft.

Im Zusammenhang mit der Verabreichung höherer Vitamin-E-Mengen werden in erster Linie folgende Risiken diskutiert:

- Erhöhte Blutungsgefahr durch Hemmung der Thrombozytenaggregation, Vitamin-K-Antagonismus [Jandak 1989]: Grundsätzlich kann eine unkontrollierte Zufuhr größerer Vitamin-E-Mengen bei vorliegendem Vitamin-K-Mangel oder im Zusammenhang mit einer Antikoagulationstherapie mit einem erhöhten Blutungsrisiko behaftet sei [Garewal et al. 1995].
- Erhöhtes Risiko für hämorrhagische Hirninfarkte: In der Alpha-Tocopherol-Beta-Carotin-Krebspräventionsstudie [ATBC Study Group 1994] wurde bei Rauchern unter Gabe von 50 mg alpha-Tocopherol (als all-rac- $\alpha$ -Tocopherylacetat) täglich über einen Zeitraum von 6 Jahren verglichen mit der Kontrollgruppe eine um 50% erhöhte Mortalität an hämorrhagischen Hirninfarkten festgestellt. Wenngleich ein Zusammenhang zwischen Vitamin-E und einem erhöhten Risiko an hämorrhagischen Komplikationen denkbar ist, wird der Stellenwert dieses Befundes noch kontrovers diskutiert [FNB 2000]. In einer Auswertung einer randomisierten Subpopulation der ATBC-Studie, die 409 Männer umfasste, wurde über das vermehrte Auftreten von Zahnfleischbluten in der alpha-Tocopherol-Gruppe berichtet [Liede et al. 1998].

Aus Fallberichten und unkontrollierten Studien liegen Hinweise für verschiedene unerwünschte Wirkungen vor [Meyers et al., 1996]. Bei der Verabreichung von Dosen in einem Bereich von 800 mg und mehr pro Tag sind in Einzelfällen Magen- und Darmbeschwerden beschrieben worden. Bei längerer Einnahme von Dosen über 400 mg Vitamin E pro Tag kann es zu einer Senkung des Schilddrüsenhormonspiegels kommen. Andere berichtete Nebenwirkungen wie Thrombophlebitiden, Bluthochdruck, Muskelschwäche, Müdigkeit und Kopfschmerzen konnten bisher nicht bestätigt werden [BGA, 1994].

Um darüber hinaus Aussagen über Retinol und  $\alpha$ -Tocopherol treffen zu können, wären weitergehende Untersuchungen notwendig.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer oralen Vitamin E-Supplementierung auf den Grad der Eiseneinlagerung in Herz, Leber und Milz im Rahmen eines Tiermodells einer nutritiven Eisenüberladung bei Ratten untersucht. Ausgangspunkt waren Vorversuche, die einen Einfluss von Vitamin-E auf den Grad einer sich entwickelnden Eisenüberladung nahe legten (Dresow et al. unveröffentlichte Ergebnisse).

Über eine Versuchsdauer von 12 Wochen wurden weiblichen Wistarratten unterschiedliche Mengen an Vitamin-E zugeführt und, nach 4 bzw. 12 Wochen, der Eisengehalt mittels Mikrowellen-Nassveraschung und photometrischen Methode in Herz-, Milz- und Lebergewebe gemessen. Der Vitamin-A- und -E-Gehalt im Serums wurde mit einer Reversed-Phase-HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion bestimmt.

Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Nahrungssupplementierung mit Vitamin E und dem Grad der Eiseneinlagerung in Leber und Milz, nicht aber im Herzen nachgewiesen werden und somit vorangegangene Studien [Brown et al. 1997] bestätigt werden. Die Eiseneinlagerung in Herz, Leber und Milz bei den Vitamin-E-reich ernährten Tieren ging langsamer vonstatten als bei den Vitamin-E-normal ernährten Tieren, sodass Hinweise erhalten wurde, dass sich eine Nahrungsergänzung mit Vitamin E günstig auf den Grad der Organeiseneinlagerung auswirkt. Die zusätzliche Zufuhr sehr hohen Vitamin E-Mengen per Schlundsonde führte aber zu keiner weiteren Hemmung der Organeiseneinlagerung.

Vit.E-Konzentrationen im Plasma nahmen mit steigender Eisenkonzentration ab, womit frühere Studien bestätigt wurden Die Vitamin-A-Konzentration im Plasma veränderte sich nicht mit dem Grad der Eisenüberladung.

Aus den Ergebnissen wird geschlussfolgert, dass bei höherer Eisenüberladung die Schutzwirkung des Vitamin E auch bei erhöhter Zufuhr nicht mehr ausreichend ist, um die eiseninduzierte Lipidperoxidation unterdrücken zu können.

**Literaturverzeichnis**

- Adams, P. C., Deugnier, Y., Moirand, R., Brissot, P.: The relationship between iron overload, clinical symptoms and age in 410 patients with genetic hemochromatosis. *Hepatology* 1997; 25: 162-166.
- Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group (ATBC Study Group): The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med* 1994; 330: 1029-1035.
- Aalamian M., Dresow B., Düllmann J.: Vitamin E protects liver tissue from iron toxicity. *HPB* 1997; S1: 118 (Abstract).
- Avunduk, A. M., Yardimci, S., Avunduk, M. C., Kurnaz, L., Aydin, A., Kockar, M. C., Delibasi, T., Dayanir, V.: Prevention of lens damage associated with cigarette smoke exposure in rats by alpha-tocopherol (vitamin E) treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40 (2): 537–541.
- Bacon, B. R., Tavill, A. S., Brittenham, G. M., Park, C. H., Recknagel, R. O.: Hepatic lipid peroxidation in vivo in rats with chronic iron overload. *J clin Invest* 1983; 71: 429–439.
- Bacon, B. R., Britton, R. S.: The pathology of hepatic iron overload: A free radical-mediated process? *Hepatology* 1990; 11: 127–137.
- Barua, A. B., Olson J. A., Furr, H. C., Van Breemen, R. B.: Vitamin A and Carotenoids. *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins, Third Edition, Volume 84, New York Basel* 2000; 1-74.
- Bässler, K. H., Grünh, E, Loew, D., Pietrzik, K.: *Vitamin-Lexikon für Ärzte, Apotheker und Ernährungswissenschaftler. 3. Auflage* 2002, Urban & Fischer Verlag, München.
- Beutelspacher S. C., Serlecic, N., Tan, P. H., Mehrabi, M., Nielsen, P., Yamane, Y.: Low dose-ethanol modulates toxic effect of iron-overloading in the liver. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2004; 50(2): 78-86.

- Beutler, E: Medical use of Iron by the Ancients. *History of Iron in Medicine, Blood Cells, Molecules and Diseases* 2002; 29(3): 297-308.
- Beutler, E., Felitti, V., Ngoc, J., Gelbart, T.: Relationship of body iron stores to Levels of Serum Ferritin, Serum Iron, Unsaturated Iron, Binding Capacity and Transferrin Saturation in Patients with Iron Storage Disease. *Acta Haematol* 2002; 107: 145-149.
- Beutler, E., Felitti, E., Ngoc, J., Ho Gelbart, T.: Penetrance of 845 G-A (C282Y) HFE hereditary hemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* 2002; 359: 211-218.
- BGA Monographie: Vitamin E (Tocopherole und deren Ester). *BAnz* 1994; 46 Nr. 17: S. 672.
- Biesalski, H. K., Fürst, P., Kasper, H., Kluthe, R., Pölerl, W., Puchstein, Ch., Stähelin, H. B.: *Ernährungsmedizin*. 2. Auflage 1999, Thieme Verlag; Vitamine S. 127.
- Blomhoff, R.: Transport and metabolism of Vitamin A. *Nutr Rev* 1994; 52: 13-23.
- Bollwahn, W., Körl, H., Heinritzi, K.: Klinik und Diagnose des latenten Eisenmangels beim Ferkel. *Der Praktische Tierarzt* 1983; 64: 171-182.
- Bradbear, R. A., Bain, C., Siskind, V., Schofield, F. D., Webb, S., Axelsen, E. M., Halliday, J. W., Bassett, M. L., Powell, L. W.: Cohort study of internal malignancy in genetic hemochromatosis and other chronic non-alcoholic liver diseases. *J Natl Cancer Inst* 1985; 75: 81-84.
- Braumann, A., Wulfhekel, U., Dullmann, J., Nielsen, P.: Iron overload of the bone marrow by trimethylhexanoyl-ferrocene in rats. *Acta Anatomica* 1992; 144/4: 285-295.
- Braumann, A., Wulfhekel, U., Nielsen, P., Balkenhol, B., Dullmann, J.: Pattern of storage in the heart following iron overloading with trimethylhexanoyl-ferrocene. *Acta Anatomica* 1994; 150/1: 45-54.

- Brigelius-Flohe, R., Traber, M. G.: Vitamin E: function and metabolism. *Faseb J* 1999; 13 (10): 1145–1155.
- Brown, K. E., Poulos, J. E., Li, L., Soweid, A. M., Ramm, G. A., O'Neill, R., Britton, R. S., Bacon, B. R.: Effect of vitamin E supplementation on hepatic fibrogenesis in chronic dietary iron overload. *Am J Physiol* 1997; 272 (1 Pt 1): G116–123.
- Bunout, D.: Therapeutic potential of vitamin E in heart disease. *Expert Opin Investig Drugs* 2000; 9 (11): 2629–2635.
- Cable, E. E., Isom, H. C.: Metabolism of 3, 5, 5-trimethylhexanoyl-ferrocene by rat liver: Release of iron from 3, 5, 5-trimethylhexanoyl-ferrocene by a microsomal, phenobarbital-inducible cytochrome P-450. *Drug Metabolism and Disposition* 1999 1)p; 27/2: 255–260.
- Canonne-Hergaux, F., Levy, J. E., Fleming, M. D., Montross, L. K., Andrews, N. C., Gros, P.: Expression of the DMT1 (NRAMP2/DCT1) iron transporter in mice with genetic iron overload disorders. *Blood* 2001; Vol 97 (4): 1138-1140.
- Catagnani, G. L.: An HPLC method for the simultaneous determination of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in plasma and serum. *Methods in Enzymology* 1986; 123: 215–219.
- Christie, P., Dickson, E. L., Kilpatrick, D. J.: Comparison between wet and dry oxidation methods of sample preparation for copper and zinc analysis of grassland herbage, *J Sci Food Agric* 1989; 48: 155–164.
- De Luca, C., Filosa, A., Grandinetti, M., Maggio, F.: Blood antioxidant status and urinary levels of catecholamine metabolites in beta-thalassämia. *Free Radic Res* 1999; 30: 453–462.
- Dillard, C., Downey, J., Tappel, A.: Effect of antioxidants on lipid peroxidation in iron-loaded rats. *Lipids* 1984; 19: 127–133.

- Dillard, C., Tappel, A.: Lipid peroxidation and copper toxicity in rats. *Drug Chem Toxicol* 1984; 7 (5): 477–488.
- Djahansouzi, S., Braesen, J. H., Koenig, K., Beisiegel, U., Kontush, A.: The effect of pharmacological doses of different antioxidants on oxidation parameters and atherosclerosis in hyperlipidaemic rabbits. *Atherosclerosis* 2001; 154 (2): 387–398.
- D’Odorico, A., Martines, D., Kiechl, S., Egger, G., Oberhollenzer, F., Bonvicini, P., Sturniolo, G. C., Naccarato, R., Willeit, J.: High plasma levels of alpha- and beta-carotene are associated with a lower risk of atherosclerosis: results from the Bruneck study. *Atherosclerosis* 2000; 153 (1): 231–239.
- Donovan, A., Lima, C. A., Pinkus, J. L., Pinkus, G. S., Zon, L. J., Robine, S., Andrews, N. C.: The iron exporter ferroportin/SLC40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metabolism* 2005; Vol 1: 191-200.
- Dresow, B., Albert, C., Zimmermann, I., Nielsen, P.: Ethane Exhalation and Vitamin E/Ubiquinol Status as Markers of Lipid Peroxidation in Ferrocene Iron-Loaded Rats. *Comp Biochem Physiol* 1995; 1099–1105.
- Driskell, W. J., Neese, J. W., Bryant, C. C., Bashor, M. M.: Measurement of vitamin A and vitamin E in human serum by high-performance liquid chromatographie. *J Chromatogr* 1982; 231: 439–444.
- Düllmann, J., Wulfhekel, U., Nielsen, P., Heinrich, H. C.: Iron overload of the liver by trimethylhexanoylferrocene in rats. *Acta Anatomica* 1992; 143: 96–108.
- Feder, J. N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D. A., Basava, A.: A novel MCH class I-like gene is mutated in patients with hereditary maemochromatosis. *Nature Genetics* 1996; 13: 399–408.
- Fischer, R., Nielsen, P., Engelhardt, R., Buggisch, P., Janka, G. E., Greten, H.: Nicht-invasive Eisenbestimmung durch Biomagnetische Suszeptometrie. *Transfus Med Hemother* 2003; 30:27-36.

- Fleming, E. R.: Advances in understanding the molecular basis for the regulation of dietary iron absorption. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 201-206.
- Fleming, E. R.: The iron sensor: macrophage, hepatocyte, both? *Blood* 2005; 106: 1893-1894.
- FNB: Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotinoids.  
Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. National Academic Press, Washington 2000; p. 186-283.
- Friedrich, A., Schulz, R., Meyer, H.: Use of enzyme immunoassay and reverse-phase high-performance liquid chromatography to detect and identity of dexamethasone in eqine blood. *Am J Vet Res* 1992; Dec 53 (12): 2213–2220.
- Friedrich, W.: Handbuch der Vitamine, Urban und Schwarzenberg, München Wien Baltimore, Kapitel Vitamin A, S. 45 ff., Kapitel Vitamin E, 1987; S. 145 ff., S. 620 ff.
- Gallati, S., Reichen, J.: Pathophysiologie des Eisenstoffwechsels und Genetik der Hämochromatose. *Schweiz Med Forum* 2002; Nr. 41.
- Ganz, T.: Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 2003; 102: 783-788.
- Garewal, H. S., Diplock, A. T.: How safe are antioxidant vitamins? *Drug Safety* 1995; 13: 8-14.
- Gerster, H.: Vitamin A - functions, dietary requirements and safety in humans. *Int J Vitam Nutr Res* 1997; 67: 71-90.
- Giardini, O., Cantani, A., Donfrancesco, A., Martino, F., Mannarino, O., D'Eufemia, P., Miano, C., Ruberto, U., Lubrano, R.: Biochemical and clinical effects of Vitamin E Administration in Homozygous Betathalassemia. *Acta Vitaminol Enzymol* 1985; 7 (1–2): 55–60.
- Glover, J.: Factors affecting vitamin A transport in animals and man. *Proc Nutr Soc* 1983; 42 (1): 19–30.

- 
- Gordeuk, V. R., Bacon, B. R., Brittenham, G. M.: Iron Overload: Causes and Consequences. *Annu Rev Nutr* 1987; 7: 485–508.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V. et al.: Cloning and characterization of a mammalian proton-couplet metal-ion transporter. *Nature* 1997; 388: 482-488.
- Gutteridge, J. M., Halliwell, B.: (1990); The measurement and mechanism of lipidperoxidation in biological systems; *TIBS* 1990; 15: 129-135.
- Halliwell, B.: Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *The Lancet*, Vol 344, September 10, 1994; 721–724.
- Von Herbay, A., de Groot, H., Hegi, U., Stremmel, W., Strohmeyer, G., Sies, H.: Low vitamin E content in plasma of patients with alcoholic liver disease, hemochromatosis and Wilson's disease. *Journal of Hepatology* 1994; 20: 41–46.
- Inan, C., Kilinc, K., Kotiloglu, E., Akman, H. O., Kilic, I., Michl, J.: Antioxidant therapy of cobalt and vitamin E in hemosiderosis. *J Lab Clin Med* 1998; 132 (2): 157–165.
- Jandak, J., Steiner, M., Richardson, P. D.: Alpha-Tocopherol, an effective inhibitor of platelet adhesion. *Blood* 1989; 73: 141-149.
- Juckett, M. B., Balla, J., Balla, G., Jessurun, J., Jacob, H. S., Vercellotti, G. M.: Ferritin protects endothelial cells from oxidized low-density-lipoprotein in vitro. *American Journal of Pathology* 1995; Vol.147: 782-789
- Kaltwasser J. P., Gottschalk R., Schalk K. P., Hartl W.: Non-invasive quantitation of liver iron-overload by magnetic imaging. *Brit J Hämatol* 1990; 360-363
- Karten, B., Beisiegel, U., Gercken, G., Kontush, A.: Mechanisms of lipid peroxidation in human blood plasma: a kinetic approach. *Chem Phys Lipids* 1997; 88 (2): 83–96.
- Kawase, T., Kato, S., Lieber, C. S.: Lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat liver after chronic ethanol feeding. *Hepatology* 1989; 10 (5): 815–821.

- 
- Kemna, E., Tjalsma, H., Laarakkers, C., Nemeth, E., Willems, H., Swinkels, D.: Novel urine hepcidin assay by mass spectrometry. *Blood* 2005; 106: 3268-3270.
- Kontush, A., Spranger, T., Reich, A., Baum, K., Beisiegel, U.: Lipophilic antioxidants in blood plasma as markers of atherosclerosis: the role of alpha-carotene and gamma-tocopherol. *Atherosclerosis* 1999; 144 (1): 117-122.
- Kontush, A., Mann, U., Arlt, S., Ujeyl, A., Luhrs, C., Muller-Thomsen, T., Beisiegel, U.: Influence of vitamin E and C supplementation on lipoprotein oxidation in patients with Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 2001; 31 (3): 345-354.
- Konukoglu, D., Iynem, H., Ziylan, E.: Antioxidant status in experimental peritonitis: effects of alpha tocopherol and taurolin. *Pharmacol Res* 1999; 39 (3): 247-251.
- Lang, J. K., Gohil, K., Packer, L.: Simultaneous determination of Tocopherols, Ubiquinols and Ubiquinones in Blood, Plasma, Tissue Homogenates and Subcellular Fractions. *Anal Biochem* 1986; 157: 106-116.
- Latunde-Dada, G. O., Van der Westhuizen, J., Vulpe, C. D., Anderson, G. J., Simpson, R. J., McKie, A. T.: Molecular and Functional Roles of Duodenal Cytochrome B (Dcytb) in Iron Metabolism. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2002; 29 (3): 356-360.
- Leger, C.: Vitamin E and cardiovascular prevention. *Ann Biol Clin (Paris)* 2000; 58 (5): 527-540.
- Leung, P. S., Srai, S. K., Mascarenhas, M., Churchill, L. J., Debnam, E. S.: Increased duodenal iron uptake and transfer in a rat model of chronic hypoxia is accompanied by reduced hepcidin expression. *Gut* 2005; 54: 1391-1395.
- Liede, K. E., Haukka, J.-K., Saxen, L. M., Heinonen, O. P.: Increased tendency towards gingival bleeding caused by joint effect of alpha-tocopherol supplementation and acetylsalicylic acid. *Ann Med* 1998; 30: 542-546.
- Livrea, M. A., Tesoriere, L., Pintaudi, A., Calabrese, A., Maggio, A., Freisleben, H. J., D'Arpa, D., D'Anna, R., Buongiorno, A.: Oxidative Stress and Antioxidant

- Status in  $\beta$ -Thalassaemia Major: Iron Overload and Depletion of Lipid-Soluble Antioxidants. *Blood*, Vol. 88, No. 9 1996; 3608–3614.
- MacCrehan, W. A. und Schönberger, E.: Determination of retinol,  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene in serum by liquid chromatography with absorbance and electrochemical detection. *Clin Chem* 1987; 33: 1585–1592.
- Mader, P., Szakova, J., Miholova, D.: Classical dry ashing of biological and agricultural materials. Part II. Losses of analytes due to their retention in an insoluble residue. *Analysis* 1998; 26 (3): 121–129.
- Martin, A., Janigian, D., Shukitt-Hale, B., Prior, R. L., Joseph, J. A.: Effect of vitamin E intake on levels of vitamin E and C in the central nervous system and peripheral tissues: implications for health recommendations. *Brain Res* 1999; 845 (1): 50–59.
- Meyers, D. G., Maloley, P. A., Weeks, D.: Safety of antioxidant vitamins. *Arch Intern Med* 1996; 156: 925-935.
- Miret, S., Simpson, R. J., McKie, A. T. : Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. *Annu Rev Nutr* 2003; 23: 283–301.
- Myers, B. M., Prendergast, F. G., Holmann, R., Kuntz, S. M., La Russo, N. F.: Alterations in the structure, physicochemical properties and pH of hepatocyte lysosomes in experimental iron overload. *J Clin Invest* 1991; 88: 1207–1215.
- Nagata, M., Kojima, M., Sasaki, K.: Effect of vitamin E eye drops on naphthalene-induced cataract in rats. *J Ocul Pharmacol Ther* 1999; 15 (4): 345–350.
- Nelis, H. J., D'Haese, E., Vermis, K.: Vitamin E. *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*, Third Edition, Volume 84, New York Basel 2000; 143–227.
- Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., McVey, D., Ganz, T., Kaplan, J.: Heparin Regulates Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. *Science* 2004, 306: 1104-1107.

- 
- Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B. K., Ganz, T.: IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone Heparin-binding epidermal growth factor-like ligand (Hepcidin). *J Clin Invest* 2004; 113: 1271–1276.
- Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux J., Beaumont, C., Grandchamp, B. et al.: Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8780-8785.
- Niederau, C., Fischer, R., Sonnenberg, A., Stremmel, W., Trampisch, H. J., Strohmeyer, G.: Survival and causes of death in cirrhotic and non-cirrhotic patients with primary haemochromatosis. *N Engl J Med* 1985; 313: 1256–1262.
- Niederau, C., Fischer, R., Püschel, A., Stremmel, W., Häussinger, D., Strohmeyer, G.: Long-term survival in patients with hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* 1996; 110: 1107–1119
- Nielsen, P., Heinelt, S., Düllmann, J.: Chronic Feeding of Carbonyl-Iron and TMH-Ferrocene in rats. Comparison of two iron-overload models with different iron absorption. *Comp Biochem Physiol* 1993; 106C: 429–436.
- Nielsen, P., Fischer, R., Engelhardt, R., Dresow, B., Gabbe, E. E.: Neue Möglichkeiten in der Diagnose der hereditären Hämochromatose. *Deutsches Ärzteblatt* Nr. 46 1998; 46 (C): 2059–2066.
- Nielsen, P., Carpinteiro, S., Fischer, R., Cabeda, J. M., Porto, G., Gabbe, E. E.: Prevalence of the C282Y- and the H63D-mutation in the HFE-gene in patients with hereditary hemochromatosis and in control subjects from northern Germany. *Brit J Hämatol* 1998b; 103: 842-845.
- Nielsen, P.: Gendiagnostische Möglichkeiten der hereditären Hämochromatose. In Ganten, D., Ruckpaul, K. (Hrsg.): *Handbuch der Molekularen Medizin, Band 6: Monogen bedingte Erbkrankheiten*. Berlin Heidelberg, Springer Verlag 2000; 454–475.

- Nielsen, P., Fischer, R., Engelhardt, R., Düllmann, J.: Diagnosis of hereditary Haemochromatosis using Non-invasive Methods. *Transfus Med Hemother* 2003; 30: 27–36.
- Nienhuis, A. W.: Vitamin C and iron (letter). *N Engl J Med* 1981; 304: 170–171.
- O’Connell, M. J., Ward, R. J., Baum, H., Peters, T. J.: The role of iron in Ferritin and haemosiderin – mediated lipid peroxidation in lysosomes. *Biochem J* 1985; 229: 135-139.
- Ozer, N. K., Azzi, A.: Effect of vitamin E on the development of atherosclerosis. *Toxicology* 2000; 148 (2–3): 179–185.
- Palozza, P., Krimsky, N. I.: Antioxidant effects of carotenoids in vivo and vitro: an overview. *Methods Enzymol* 1992; 213: 403–420.
- Pantopoulos, K.: Iron Metabolism and the IRE/IRP regulatory system. An Update. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1012: 1-13.
- Papanikolaou, G., Tzilianos, M., Christakis, J. I., Bogdanos, D., Tsimirika, K., MacFarlane, J., Goldberg, Y. P., Sakellaropoulos, N., Ganz, T., Nemeth, E.: Heparin in iron overload disorders. *Blood* 2005; 105: 4103–4105.
- Park, C. H., Bacon, B. R., Brittenham, G. M., Tavill, A. S. S.: Pathology of dietary carbonyl-iron overload in rats. *Lab Invest* 1987; 57: 555–563.
- Parkkila, S., Niemelä, O., Britton, R. S., Fleming, R. E., Waheed, A., Bacon, B. R.: Molecular aspects of iron absorption and HFE expression. *Gastroenterology* 2001; 121: 1489–1496.
- Pietrangelo, A.: Hereditary Hemochromatosis – A New Look at an Old Disease. *N Engl Med* 2004; 350:2383-97.
- Pippard, M. J., Brock, J. W., Powell, L. W.: *Iron Metabolism in Health and Disease*. 1994; Eds.: pp 271–309.
- Powell, L.: Recent concepts in iron metabolism and HFE mutations. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2004; 258–263.

- 
- Reller, K., Dresow, B., Collell, M., Fischer, R., Engelhardt, R., Nielsen, P., Durken, M., Politis, C., Piga, A.: Iron overload and antioxidant status in patients with beta-thalassemia major. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 850: 463–465.
- Richter, G. W.: Studies of iron overload. Rat liver siderosome formation. *Lab Invest* 1984; 50: 26–35.
- Roeckel, I. E., Dickson, L. G.: Understanding iron absorption and metabolism, aided by studies of hemochromatosis. *Ann Clin Lab Sci* 1998, 28 (1): 30–33.
- Roy, C.N., Andrews NC: Anemia of inflammation: the hepcidin link. *Current Opinion in Hematology* 2005; 12: 107–111.
- Ruperez, F. J., Barbas, C., Castro, M., Herrera, E.: Determination of alpha-tocopherol and alpha-tocopherol acetate in diets of experimental animals. Study of stability in the diets. *J Chromatogr A* 1999; 839 (1–2): 93–99.
- Russell, R. M.: The Vitamin A spectrum: from deficiency to toxicity. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 878–884.
- Sangha, O., Stucki, G.: Vitamin E in therapy of rheumatic diseases. *Z Rheumatol* 1998; 57 (4): 207–214.
- Sato, M., Lieber, C. S.: Changes in vitamin A status after acute ethanol administration in the rat. *J Nutr* 1982; 112 (6): 1188–96.
- Schippling, S., Kontush, A., Arlt, S., Buhmann, C., Sturenburg, H. J., Mann, U., Muller-Thomsen, T., Beisiegel, U.: Increased lipoprotein oxidation in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 2000; 28 (3): 351–360.
- Sharma, B. K., Bacon, B. R., Britton, R. S., Park, C. H., Magiera, C. J., O'Neill, R., Dalton, N., Smanik, P., Speroff, T.: Prevention of hepatocyte injury and lipid peroxidation by iron chelators and alpha-tocopherol in isolated iron-loaded rat hepatocytes. *Hepatology* 1990; 12 (1): 31–39.
- Solomons, N. W.: Vitamin A and carotenoids. In: *Present Knowledge in Nutrition*, 8<sup>th</sup> Edition 2001.

- Srigiridhar, K., Nair, K. M.: Supplementation with alpha-tocopherol or a combination of alpha-tocopherol and ascorbic acid protects the gastrointestinal tract of iron-deficient rats against iron-induced oxidative damage during iron repletion. *Br J Nutr* 2000; 84 (2): 165–173.
- Staats, D. A., Lohr, D. P., Colby, H. D.: Effects of tocopherol depletion on the regional differences in adrenal microsomal lipid peroxidation and steroid metabolism. *Endocrinology* 1988; 123: 975–980.
- Stahl, W., Köhrle, J., Schürmann, K.: Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe. Carotinoide. Thieme Verlag 2002; p 41-49.
- Starr T. N., Fischer R., Ewing T., Longo F., Engelhardt R., Trevisiol E., Fagaly R. L., Paulson D. N., Piga A. A new generation SQUID biosusceptometer. *Biomag* 2000: Proceedings 12th Int Conf Biomagnetism (eds J Nenonen, RJ Ilmoniemi, T Katila). Helsinki University of Technology 2001; pp 986-989.
- Steinberg, F. M., Chait, A.: Antioxidant vitamin supplementation and lipid peroxidation in smokers. *The American Journal of Clinical Nutr* 1998; Vol 68 No 2.
- Venkatramann, J. T., Chu, W. C.: Effects of dietary omega-3 and omega-6 lipids and vitamin E on serum cytokines, lipid mediators and anti-DANN antibodies in an mouse model for rheumatoid arthritis. *J Am Coll Nutr* 1999; 18 (6): 602–613.
- Ward, R. J., Florence, A. L., Baldwin, D., Abiaka, C., Roland, F., Ramsey, M. H., Dickson, D. P. E., Peters, T. J., Crichton, R. R.: Biochemical and biophysical investigations of the ferrocence-iron-loadet rat. An animal model of primary haemochromatosis. *Eur J Biochem* 1991; 202: 405–410.
- Wittenborg, A., Petersen, G., Lorkowski, G., Brabant, T.: Effectiveness of vitamin E in comparison with diclofenac sodium in treatment of patients with chronic polyarthritis. *Z Rheumatol* 1998; 57 (4): 215–221.
- Wood, R. J., Han, O.: Recently identified molecular aspects of intestinal iron absorption. *J Nutr* 1998; 128 (11): 1841–1844.

- Young, I. S., Trouton, T. G., Torney, J. J., McMaster, D., Callender, M. E., Trimble, E. R.:  
Antioxidant status and lipid peroxidation in hereditary hemochromatosis. *Free  
Radic Biol Med* 1994; 16 (3): 393–397.
- Zaspel, B. J. und Csallany, A. S.: Determination of alpha-tocopherol in tissues and plasma  
by high-performance liquid chromatographie. *Anal Biochem* 1983; 130: 146–  
150.

## Anhang

### I. Originaldaten der Organ-Eisenwerte

| Proben-ID | Gesamtorganeisen/mg Gewebe<br>Feuchtgewicht |               |               | Fe-Konzentration |                 |                 |
|-----------|---|---------------|---------------|------------------|-----------------|-----------------|
|           | Leber<br>Fe/mg                              | Herz<br>Fe/mg | Milz<br>Fe/mg | Leber<br>µg Fe/g | Herz<br>µg Fe/g | Milz<br>µg Fe/g |
| PA1       | 7   | 0,12          | 2             | 927              | 112             | 4014            |
| PA2       | 5   | 0,12          | 0,9           | 712              | 116             | 1327            |
| PA3       | 8   | 0,1           | 1,3           | 1174             | 91              | 1859            |
| PA4       | 19  | 0,09          | 2             | 2734             | 104             | 5106            |
| PA5       | 14  | 0,11          | 1,8           | 1501             | 106             | 3059            |
| PA6       | 22  | 0,09          | 2,4           | 3317             | 103             | 4815            |
| PA7       | 21  | 0,09          | 1,9           | 1755             | 98              | 4481            |
| PA8       | 15  | 0,11          | 2,3           | 1871             | 101             | 4561            |
| PA9       | 20  | 0,09          | 1,7           | 3601             | 112             | 4242            |
| PA10      | 15  | 0,11          | 2,8           | 2348             | 112             | 4592            |
| PB1       | 5   | 0,06          | 2             | 664              | 58              | 3924            |
| PB2       | 9   | 0,06          | 1,2           | 1395             | 68              | 1937            |
| PB3       | 3   | 0,06          | 1,7           | 436              | 70              | 2762            |
| PB4       | 13  | 0,09          | 1,3           | 2159             | 117             | 3304            |
| PB5       | 10  | 0,11          | 2,1           | 1244             | 93              | 4197            |
| PB6       | 13  | 0,11          | 1,9           | 1482             | 96              | 4821            |
| PB7       | 12  | 0,1           | 2             | 1678             | 92              | 3982            |
| PB8       | 13  | 0,12          | 2,7           | 1708             | 108             | 5298            |
| PB9       | 13  | 0,1           | 1,6           | 1941             | 99              | 3961            |
| PB10      | 9   | 0,11          | 2,3           | 1558             | 106             | 5646            |
| PC1       | 7   | 0,11          | 1,3           | 1052             | 107             | 2119            |
| PC2       | 5   | 0,05          | 1,3           | 717              | 59              | 1920            |
| PC3       | 7   | 0,13          | 1,9           | 976              | 115             | 3197            |
| PC4       | 18  | 0,09          | 1,2           | 2108             | 96              | 2293            |
| PC5       | 13  | 0,1           | 1,9           | 1782             | 103             | 4683            |
| PC6       | 15  | 0,13          | 2,2           | 1605             | 95              | 3189            |
| PC7       | 11  | 0,11          | 2,5           | 1252             | 98              | 3523            |
| PC8       | 13  | 0,12          | 1,4           | 2045             | 112             | 2762            |
| PC9       | 12  | 0,08          | 1,1           | 2071             | 103             | 2737            |
| PC10      | 11  | 0,09          | 1,7           | 1367             | 83              | 4207            |

## II. Originaldaten der Serum-Vitaminwerte

| <b>Proben-ID</b> | <b>Vit. E<br/>µg/ml</b> | <b>Vit. A<br/>ng/ml</b> |
|------------------|-------------------------|-------------------------|
| PA1              | 3,4                     | 111                     |
| PA2              | 3,2                     | 170                     |
| PA3              | 3,0                     | 177                     |
| PA4              | 1,9                     | 150                     |
| PA5              |                         |                         |
| PA6              | 2,6                     | 167                     |
| PA7              | 2,0                     | 279                     |
| PA8              | 2,3                     | 167                     |
| PA9              | 2,3                     | 117                     |
| PA10             | 1,6                     | 124                     |
| PB1              | 3,1                     | 120                     |
| PB2              | 3,3                     | 157                     |
| PB3              | 3,9                     | 156                     |
| PB4              | 4,7                     | 202                     |
| PB5              | 1,6                     | 131                     |
| PB6              | 3,3                     | 216                     |
| PB7              | 2,8                     | 138                     |
| PB8              | 2,5                     | 125                     |
| PB9              | 2,3                     | 129                     |
| PB10             | 3,2                     | 157                     |
| PC1              | 9,1                     | 181                     |
| PC2              | 9,4                     | 380                     |
| PC3              | 8,0                     | 179                     |
| PC4              | 8,4                     | 262                     |
| PC5              | 6,6                     | 266                     |
| PC6              | 11,0                    | 265                     |
| PC7              | 9,7                     | 269                     |
| PC8              | 8,0                     | 292                     |
| PC9              | 6,2                     | 185                     |
| PC10             | 8,2                     | 218                     |

## **Danksagung**

Ich danke Herrn PD Dr. med. Gabbe und Frau Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel für die Überlassung des Themas und dafür, dass ich meine Dissertationsarbeit in ihrer Abteilung machen durfte.

Mein Dank gilt Herrn Dr. Bernd Dresow für die anfängliche Betreuung dieser Arbeit und die motivierende Unterstützung und Herrn PD Dr. Peter Nielsen für die spätere Übernahme der Betreuung sowie die Anregungen und Tipps, die er mir gab.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Labors, die mich alle geduldig und gewissenhaft eingearbeitet und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, insbesondere bei Inge Zimmermann, die mich in den ersten Wochen so verlässlich eingearbeitet hat, bei Rosemarie Kongi, die mich in alle Vorgänge, die zur Veraschung der Organe notwendig waren, eingearbeitet und mir wertvolle Tipps zur Berechnung meiner Ergebnisse gegeben hat, sowie bei Susanne Hoppe, die mich in die anschließende Eisenbestimmung eingearbeitet, mich dabei so geduldig im Erlernen der Pipettiermethoden unterstützt und mir wertvolle Erfahrungen vermittelt hat.

Mein Dank gilt auch Dagmar Krüger, die mich in die Methodik der HPLC sorgfältig und verlässlich eingearbeitet und mir dabei viele wertvolle Tipps gegeben hat.

Außerdem gilt mein Dank meinen Freunden, die mich unterstützt haben, indem sie mir Mut machten oder mir Anregungen und Tipps gaben. Hierbei möchte ich mich insbesondere bei Manuela März und Susanne Plotz bedanken, die immer wieder bereit waren, sich mit den Details dieser Arbeit zu befassen und mir mit ihren kritischen Anregungen wertvolle Hilfe haben zuteil werden lassen.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Hierbei gilt mein besonderer Dank meiner Mutter, die mich immer wieder ermutigte, wenn ich ein wenig mutlos wurde, und die immer an mich geglaubt hat.

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

## **Lebenslauf**

**Geburtsort:** Hamburg

**Geburtsdatum:** 25. 6. 1968

**Familienstand:** ledig

### **Schulbildung:**

1975–1979      Grundschule in Bargfeld-Stegen

1979–1985      Realschule in Bargteheide

1990–1993      Abendgymnasium in Hamburg

### **Berufsausbildung:**

09/85–08/87      Ausbildung für den mittleren Dienst in der Hamburger Steuer-  
verwaltung

### **Behördliche Berufspraxis:**

09/87–01/92      Mitarbeiterin in der Hamburger Steuerverwaltung (Beamtin)

08/93–10/94      Mitarbeiterin in der Hamburger Steuerverwaltung (Beamtin)

### **Hochschulausbildung:**

10/94–12/01      Medizinstudium in Hamburg

Physikum:                      04/97

1. Staatsexamen:              04/98

2. Staatsexamen:              09/00

3. Staatsexamen:              12/01

### **Ärztliche Tätigkeit:**

04/02–09/03      ÄIP im ev. Krankenhaus Alsterdorf

10/03–09/05      Assistenzärztin im Heinrich-Sengelmann-Krankenhaus

seit 10/05        Assistenzärztin im Landeskrankenhaus Lüneburg