

Aus der Abteilung für Molekulare Zellbiologie
des Instituts für Medizinische Biochemie und
Molekularbiologie am Universitätskrankenhaus Eppendorf

Direktor (komm.): Prof. Dr. med. Georg W. Mayr

**Antioxidative Vitamine (Vitamine C, E und A) in
Blut und Leber als indirekte Marker für die
Lipidperoxidation bei eisenüberladenen
Ratten unter Ethanolexposition**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Sven Christoph Beutelspacher
aus Karlsruhe

Hamburg im Februar 2000

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 02.10.2001

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Sprecher: Prof. Dr. med. Leichtweiß

Referent: PD Dr. med. Dr. rer. nat Nielsen

Korreferent: Prof. Dr. med. Mayr

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG..... | 1 |
| 1.1 | EISENSTOFFWECHSEL..... | 1 |
| 1.2 | PATHOBIOCHEMIE UND PATHOPHYSIOLOGIE DER HÄMOSIDEROSE BZW. HÄMOCHROMATOSE..... | 1 |
| 1.2.1 | <i>Schädigungswege, Lipidperoxidation und freie Radikale</i> | <i>3</i> |
| 1.2.2 | <i>Alkoholische Leberschädigung</i> | <i>6</i> |
| 1.3 | VITAMIN C..... | 7 |
| 1.4 | VITAMIN E..... | 8 |
| 1.5 | VITAMIN A..... | 9 |
| 1.6 | TIERMODELL..... | 10 |
| 1.7 | PROBLEMSTELLUNG..... | 11 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN..... | 13 |
| 2.1 | GRUPPENEINTEILUNG UND TIERMODELL | 13 |
| 2.2 | MATERIAL | 14 |
| 2.2.1 | <i>Gewinnung und Aufarbeitung der Serum-, Plasma- und Leberproben.....</i> | <i>17</i> |
| 2.2.2 | <i>Allgemeiner Betrieb der HPLC Einheiten.....</i> | <i>17</i> |
| 2.2.3 | <i>Vitamin C</i> | <i>18</i> |
| 2.2.4 | <i>Vitamine E und A</i> | <i>21</i> |
| | <i>I. Vitamin E</i> | <i>23</i> |
| 2.3 | INTESTINALE EISENABSORPTION UND GANZKÖRPER-RETENTION VON ⁵⁹ Fe BEI EISENÜBERLADENEN UND NICHT-EISENÜBERLADENEN RATTEN UNTER AKUTER BZW. CHRONISCHER ETHANOLEXPOSITION. | 27 |
| 2.3.1 | <i>Versuchsaufbau.....</i> | <i>27</i> |
| 2.3.2 | <i>Versuchsgruppen.....</i> | <i>27</i> |
| 2.3.3 | <i>Methoden.....</i> | <i>28</i> |
| 2.3.4 | <i>Applikation der Belastungslösungen.....</i> | <i>29</i> |
| 3 | ERGEBNISSE..... | 30 |
| 3.1 | VERLAUF DER LEBEREISENKONZENTRATIONEN..... | 30 |
| 3.2 | HISTOLOGIE | 31 |
| 3.3 | VERLAUF DER GESAMT- UND LEBERMASSEN | 31 |
| 3.4 | VITAMIN C IN PLASMA UND LEBER..... | 32 |
| 3.4.1 | <i>Vitamin C im Plasma</i> | <i>32</i> |
| 3.4.2 | <i>Vitamin C in der Leber.....</i> | <i>34</i> |
| 3.5 | VITAMIN E..... | 35 |
| 3.5.1 | <i>Vitamin E im Serum</i> | <i>35</i> |
| 3.5.2 | <i>Vitamin E in der Leber.....</i> | <i>37</i> |
| 3.6 | VITAMIN A..... | 39 |
| 3.6.1 | <i>Vitamin A im Serum</i> | <i>39</i> |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.6.2 | <i>Vitamin A in der Leber</i> | 41 |
| 3.7 | INTESTINALE EISENABSORPTION EINER TESTDOSIS ⁵⁹ Fe(II)SULFAT BEI RATTEN MIT NORMALEN BZW. ÜBERLADENEN EISENSPEICHERN. EINFLUSS VON ETHANOL IM APPLIKATIONSMEDIUM..... | 42 |
| 4 | DISKUSSION | 45 |
| 4.1 | VITAMINE UND LIPIDPEROXIDATION | 45 |
| 4.1.1 | <i>Vitamin C in Serum und Leber</i> | 45 |
| 4.1.2 | <i>Vitamin E in Serum und Leber</i> | 47 |
| 4.1.3 | <i>Vitamin A</i> | 50 |
| 4.2 | INTESTINALE EISENABSORPTION EINER TESTDOSIS ⁵⁹ Fe(II)SULFAT BEI RATTEN MIT NORMALEN BZW. ÜBERLADENEN EISENSPEICHERN. EINFLUSS VON ETHANOL IM APPLIKATIONSMEDIUM..... | 52 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 56 |
| 6 | LITERATURNACHWEIS | 58 |
| | DANKSAGUNG | 62 |
| | LEBENS LAUF | 63 |

1 Einleitung

1.1 Eisenstoffwechsel

Eisen ist sowohl auf der Erdoberfläche als auch in lebenden Organismen das häufigste Übergangsmetall. Zusammen mit weiteren Metallionen ist es ein essentieller Kofaktor bei einer Vielzahl biologischer Vorgänge. Hierzu zählen Redoxreaktionen, oxidative Phosphorylierungen, Genregulationsprozesse und die Homöostase freier Radikale. Eisen hat die Besonderheit, leicht mit Molekülen wie z.B. Sauerstoff reagieren zu können. So ist es z.B. im Hämoglobin enthalten und dient zum Sauerstofftransport im Blut.

Beim Menschen beträgt der Gesamteisenbestand etwa 3-5 g, bzw. 45-60 mg pro kg Körpergewicht. Mehr als 60 % des Gesamteisens sind an Hämoglobin, 4,5 % an Myoglobin und nur etwa 2 % an Enzymsysteme gebunden.

Die Regulation des Körpereisenbestandes erfolgt fast ausschließlich über die Eisenaufnahme. Diese wird über einen noch nicht in Einzelheiten aufgeklärten Mechanismus gesteuert. Es wird täglich nur soviel Eisen aufgenommen wie auch ausgeschieden wird, so dass der Gesamtkörpereisenbestand konstant bleibt. Die Eisenausscheidung erfolgt über Zellmauserung der Darmmukosa, in geringen Anteilen auch über Galle, Schweiß, Urin und Menstruationsblut. Die Eisenabsorption erfolgt größtenteils im proximalen Duodenum, nachdem im Magen unter Einfluss der Magensäure Eisen aus Komplexen freigesetzt wurde. Die Eisenabsorption bevorzugt eindeutig Ferro-Eisen (Fe(II)) vor Ferri-Eisen (Fe(III)). Außerdem ist die Eisenaufnahme stark von der Nahrungszusammensetzung abhängig. Das intestinal aufgenommene Eisen wird verwendet z.B. im Knochenmark der Erythropoese zur Verfügung gestellt, oder mittels Ferritin und Hämosiderin in der Leber gespeichert.

1.2 Pathobiochemie und Pathophysiologie der Hämosiderose bzw. Hämochromatose

Die primäre Hämochromatose ist eine angeborene Eisenstoffwechselerkrankung. Bedingt durch einen Gendefekt im HFE-Gen (C282Y-Mutation) in homozygoter Form kommt es über einen noch wenig verstandenen Mechanismus zu einer massiven intestinalen Eisenaufnahme (siehe Abbildung 1). Das absorbierte Eisen lagert sich in verschiedenen Organen wie z.B. Leber und Pankreas ab. Durch die zelltoxische Wirkung des Eisens kann es Verlauf der Erkrankung zur progressiven Organschädigung kommen. Makroskopisch zeigt sich bei der hereditären Hämochromatose meist eine Eisenüberladung der Leber, welche an einer deutlichen braunen Verfärbung dieses Organs erkennbar wird. Die Eisenspeicherung im Rahmen der

Hämochromatose erfolgt primär in den Hepatozyten, erst später folgen auch die Kupffer'schen Sternzellen, die Gallengangsepithelien und eine Eisenüberladung des gesamten Leberläppchens. Letztendlich sind Entzündung, Zellnekrose und eine fortschreitende Fibrose aufgrund der Zytotoxizität des ionisiert vorliegenden oder primär an Hämosiderin gebundenen intrazellulären Eisens abzusehen [Deugnier YM (1992)]. Die durch die hereditäre Hämochromatose induzierte Leberzirrhose bzw. -fibrose entsteht typischerweise periportal; trotz manifester Zirrhose können große Bereiche des Parenchyms noch intakt erscheinen.

Die hierbei beschriebenen Zellschäden werden möglicherweise durch Peroxidation der Membranlipide verursacht, in deren Folge es zu einer Mitochondrienschädigung und einer Lysosomendestabilisierung kommt [Powell LW (1980)]. Andere Theorien gehen von einer direkten Stimulation der Kollagenbiosynthese durch das Eisen aus. Der genaue Mechanismus der Zellschädigung wurde bisher noch nicht geklärt. In jedem Falle kommt den Kupffer'schen Sternzellen, die der Gruppe der mononukleären Phagozyten angehören und in der Lage sind, Bakterien, Viren, Zelldetritus, Immunkomplexe und Toxine zu phagozytieren, eine Schlüsselrolle zu. Bei dem Phagozytoseprozess der Kupffer'schen Sternzellen kommt es zur Bildung des entgiftungspflichtigen, hochtoxischen H_2O_2 , zur Prostaglandinsynthese und zur Freisetzung von Kollagenasen. Die Freisetzung dieser Stoffe und ein zusätzlicher Verlust antioxidativer Vitamine führen zu einer gesteigerten Bildung toxischer Peroxide.

Klinische Studien zur Eisenüberladung konnten einen Zusammenhang zwischen Lebereisenkonzentration und dem Auftreten einer Leberschädigung (Fibrose, Zirrhose, hepatozelluläres Karzinom) zeigen. Durch Reduzierung der Lebereisenkonzentration kann die klinische Situation der betroffenen Patienten deutlich verbessert werden [Bomford A (1976); Niederau C (1985); Bradbear RA (1985); Bassett M (1986); Tavill AS (1986)].

Therapeutisch stehen die von Davis eingeführte erschöpfende Aderlassbehandlung oder die parenterale Anwendung eines Eisen-Chelators (Desferoxamin) zur Verfügung.

Eine Frühdiagnose ist daher vor Auftreten einer Leberzirrhose oder eines Diabetes mellitus von großer Bedeutung, da die Prognose durch eine konsequente und auch rechtzeitige Aderlasstherapie entscheidend verbessert werden kann. Wegweisend in der Diagnostik sind hier die Histologie von entnommenen Gewebebiopsien und die Bestimmung von freiem Eisen, Ferritin und der Transferrinsättigung im Serum. Die genannten Serumparameter sind hier deutlich gegenüber der Norm erhöht.

Abbildung 1 stellt den Eisenstoffwechsel im Normalzustand dem bei der hereditären Hämochromatose veränderten gegenüber.

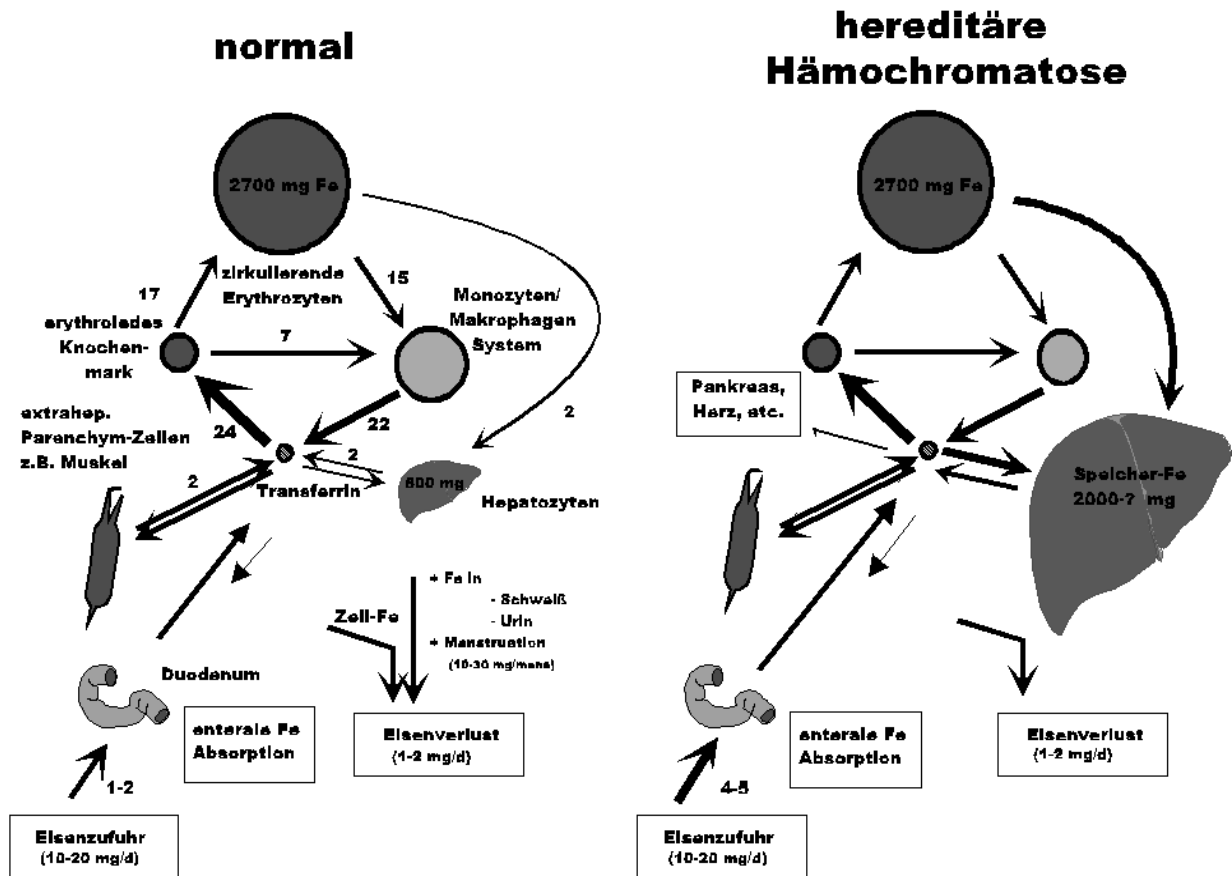


Abbildung 1 Dieses Diagramm stellt die physiologischen Vorgänge im Eisenstoffwechsel den im Rahmen der hereditären Hämochromatose auftretenden pathologisch veränderten Stoffwechselwegen gegenüber. Die Zahlenangaben entsprechen den transportierten oder gespeicherten Eisenmengen in Milligramm/Tag.

1.2.1 Schädigungswege, Lipidperoxidation und freie Radikale

Eine wichtige Rolle bei der Leberschädigung durch Eisen schreibt man Ferritin und Hämosiderin zu. In eisenüberladenen Hepatozyten, besonders in der Lysosomenfraktion, akkumulieren diese am Eisentransport, an der Eisenaufnahme und an der Eisenspeicherung beteiligten Moleküle. Im Zuge einer Lebereisenschädigung kommt es elektronenmikroskopisch nachweisbar zu einer Hypertrophie der Lysosomenfraktion und damit zu einem verstärkten Vorkommen zelltoxischer Enzyme, welche eine weitere Progredienz der Organschädigung bewirken [Myers BM (1991)]. In vitro konnte gezeigt werden, dass unter dem in Lysosomen physiologischerweise leicht aziden pH-Wert sowohl Transferrin als auch Ferritin in der Lage sind, die Lipidperoxidation ohne Vorliegen eines Reduktionsmittels zu stimulieren [O'Connell M (1985)]. Intra-hepatozellulär vorkommendes Transferrin und Hämosiderin können jeweils kleine Anteile des gespeicherten Eisens aus der Bindung entlassen; dieses Eisen scheint bei der Initiation der Lipidperoxidation eine wichtige Rolle zu spielen [Bradbear RA (1985)].

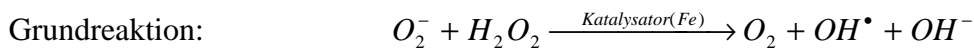
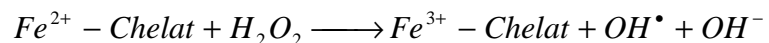
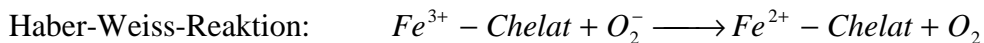
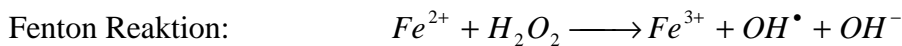
Die Lipidperoxidation läuft in folgenden drei Stufen ab:

1. *Initiation*, 2. *Propagierung*, 3. *Abbruch*.

Bereits an der Initiation der Lipidperoxidation sind mehrere Reaktionen beteiligt, in denen Eisen eine entscheidende Rolle in der Erzeugung eines peroxidativen Schadens zukommt.

Eisen (Fe^{2+}) kann mit vorbestehenden Lipid-Hydroperoxiden (LOOH) reagieren und Alkoylradikale bilden ($LOOH + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + LO^\bullet$). Ferner kann Eisen (Fe^{3+}) auf ähnliche Weise mit Lipid-Hydroperoxiden reagieren und Peroxylradikale bilden ($LOOH + Fe^{3+} \longrightarrow Fe^{2+} + H^+ + LOO^\bullet$).

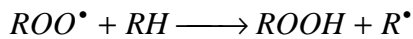
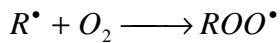
Sowohl Peroxyl- als auch Alkoylradikale können die später beschriebene Kettenreaktion der Lipidperoxidation auslösen, indem weitere Wasserstoffatome aus der Kette abgespalten werden. Ebenso ist es möglich, dass Hydroxylradikale (OH^\bullet) aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gemäß der Fenton- oder Haber-Weiss-Reaktion entstehen [Bradbear RA (1985)].



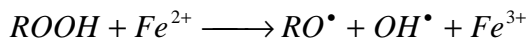
Den hierbei anfallenden Hydroxyl-Radikalen (OH^\bullet) wird die Initiation der Lipidperoxidation zugeschrieben [Aisen P (1990)]. Dieses sehr reaktive OH^\bullet -Radikal tritt sofort nach seiner Entstehung mit umgebenden Reaktionspartnern in Wechselwirkung. Der entstehende Schaden ist von Ort und Stärke der Reaktion abhängig. Umgebende Membranen werden im Zuge der Peroxidation zerstört. Als Angriffspunkt der OH^\bullet -Radikale dienen an den Membranen die ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen [Dresow B (1995)].



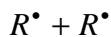
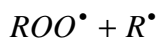
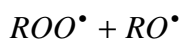
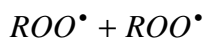
Bei der Propagierung reagiert in einem ersten Schritt das bei der Initiation entstandene R^\bullet -Radikal mit O_2 und es entsteht ein Alkoyl-Radikal, welches wie unten beschrieben weiterreagiert:



Im nächsten Schritt kommt es zur Kettenverzweigung:



Der Kettenabbruch erfolgt in mehreren Schritten:



Legende: *RH*: ungesättigte Fettsäure; *R[•]*: Lipidradikal; *ROO[•]*: Peroxidradikal; *RO[•]*: Alkoylradikal; *ROOH*: Lipidperoxid [Aisen P (1990)]

Unter physiologischen Bedingungen sind Lipidperoxide stabil, jedoch wird durch die Anwesenheit von Übergangsmetallen der Zerfallsprozess stark beschleunigt. Unter Einfluss von Eisen kommt es zu Kettenverzweigungen, indem Lipidperoxide mit Eisen reagieren und neue Kettenreaktionen ausgelöst werden [Aisen P (1990)].

Der Kettenabbruch erfolgt entweder durch Verbrauch oder Erschöpfung der Reaktionspartner, durch Einsatz von Radikalfängern (Scavengers) oder durch Radikal-Radikal-Reaktionen.

Abbildung 2 zeigt die Schädigungsmechanismen der Lipidperoxidation am Beispiel der Leber. Im Zentrum der Leberzerstörung steht die massive Eiseneinlagerung. Die Eisenspeicherung stimuliert zum einen die Kollagensynthese, zum anderen die Lipidperoxidation. Aufgrund der direkten Membranfunktionsänderung kommt es zu irreversiblen Membranschäden, in der Folge zu Nekrose und Zelluntergang. Enzymübertritte ins Blut machen diesen Schritt messbar. Die mangelnde Stoffpermeation (Carnitin-Carrier) erklärt die deutliche Triglyceridretention in der geschädigten Leber. Zur Fetteinlagerung kommt es meist bereits vor der mikroskopisch erkennbaren Fibrose.

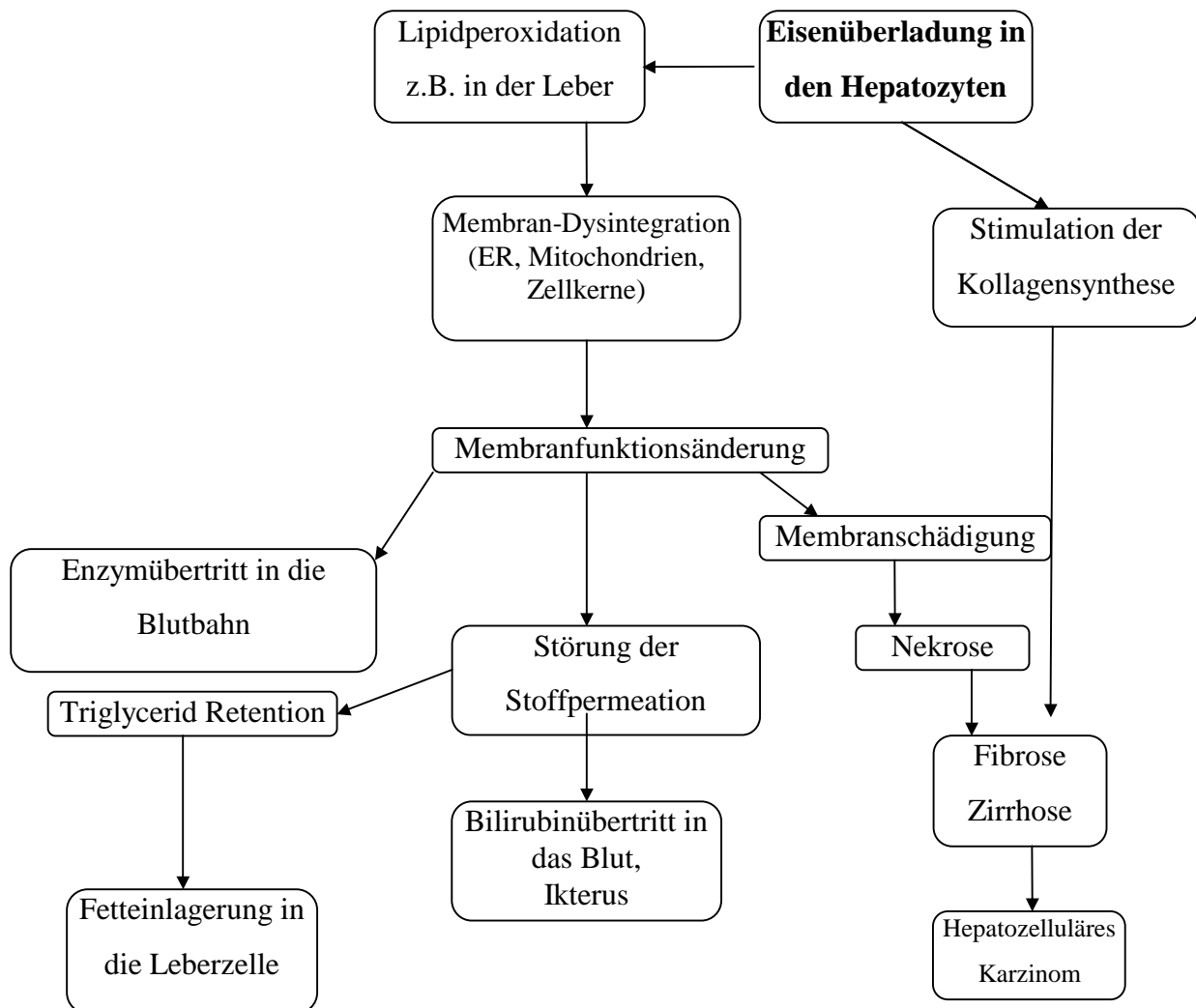


Abbildung 2 Folgen der Lipidperoxidation im Flussdiagramm. Die massiven Schäden in der Leber und an anderen Organsystemen sind auf die hochtoxische Wirkung des Eisens zurückzuführen.

1.2.2 Alkoholische Leberschädigung

Durch regelmäßigen Alkoholkonsum kommt es in einem ersten Schritt zu einer noch reversiblen Alkoholfettleber. Die zweite Stufe der Schädigung zeigt sich als alkoholische Hepatitis, der dritte Schritt stellt die Leberzirrhose dar.

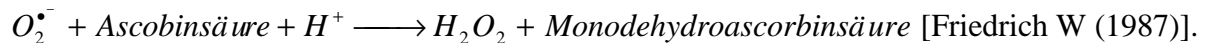
Verantwortlich für die alkoholischen Leberschäden sind das aus Ethanol unter der Wirkung der Alkoholdehydrogenase gebildete hochtoxische Acetaldehyd, eine Störung der mischfunktionellen Oxigenasen, eine Stimulation der Lipidperoxidation (mit Anstau von membrantoxischen Peroxiden) sowie eine gesteigerte Neutralfettsynthese (VLDL-Vermehrung und Hyperlipidämie). Eine besondere Rolle in der Entstehung der peroxidativ bedingten Leberzirrhose nehmen ein Mangel an den antioxidativ wirkenden Vitaminen A, C und E und eine Umwandlung der Ito-Zellen in Fibroblasten ein.

1.3 Vitamin C

Alle Lebewesen, mit Ausnahme des Menschen, einiger Primaten und des Meerschweinchens, sind in der Lage, Vitamin C endogen zu synthetisieren. Ascorbinsäure ist essentiell an reversiblen Redoxreaktionen beteiligt. Vorwiegend Hydroxylierungen werden über Vitamin C beeinflusst. Bei Vitamin-C-Mangelzuständen werden diese Reaktionen beeinträchtigt und es kommt zu Mangelercheinungen (z.B. Skorbut). Aus diesem Grund muss den Lebewesen, die nicht zur Synthese ausgerichtet sind (Genmutation: es fehlt das Enzym L-Guanolonlactonoxidase) Ascorbat zugeführt werden. In Gegenwart von Metallen (z.B. Kupfer oder Eisen) kann Ascorbinsäure besonders unter Einfluss von Wärme (z.B. Kochen) leicht zerstört werden. In der Nahrung kommt Vitamin C vorwiegend in frischem Obst und Gemüse vor.

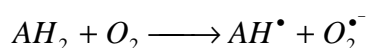
Zu den wichtigsten Aufgaben von Vitamin C gehört auch die „Entgiftung“ von aktivem Sauerstoff. Zu den Sauerstoffformen, die für die Zelle gefährlich sind, gehören das Superoxidanionradikal $O_2^{\bullet-}$, das Hydroxylradikal OH^{\bullet} , der Singulett-Sauerstoff 1O_2 und das Wasserstoffperoxid H_2O_2 . [Arad ID (1980)].

Folgende nicht enzymatisch ablaufende Reaktion ist hier entscheidend:



In Versuchen hat sich ein synergistisches Verhalten von Vitamin C und Vitamin E ergeben [Leung HW (1981); Niki E (1984)]. Man geht hierbei von einer primären Reaktion der freien Lipidperoxidradikale mit Vitamin E aus, wonach ein reaktives Vitamin-E-Radikal entsteht. Dieses Vitamin-E-Radikal ist in der Zellmembran lokalisiert und regeneriert sich an im Plasma enthaltenen Vitamin C.

Vitamin C zeigt auch peroxidative Eigenschaften, die besonders unter dem Einfluss von Metallionen auftreten. Vitamin C reduziert besonders Cu(II)- und Fe(III)- Ionen; die so reduzierten Ionen bilden bei ihrer Reoxidation toxische Sauerstoffradikale. So führt z.B. die Reaktion der beiden genannten Ionen mit Ascorbinsäure zur Bildung von Hydroxylradikalen und Superoxidanionen, die in vielen biologischen Systemen stark destruktiv wirken [Friedrich W (1987)]. Ferner kann Vitamin C auch eine direkte Reaktion mit molekularem Sauerstoff eingehen, wo es zur Bildung von Superoxidanionen ($O_2^{\bullet-}$) kommt [Scarpa M (1983)]:



Im Rahmen der hereditären Hämochromatose kommt es zu einem Verlust von Vitamin C, ohne dass ein nutritiver Mangelzustand bestehen muss [Bendich A (1995)].

1.4 Vitamin E

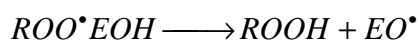
Tocopherole bestehen aus einer Gruppe von Molekülen, die als einheitliche Grundstruktur den Chromanring und eine isoprenoide (C₁₆) Seitenkette aufweisen. Es handelt sich um lipophile Strukturen, deren Aufnahme aus dem Darm zusammen mit der Fettfraktion unter Aufschluss durch die Gallensäuren erfolgt. Der besondere Wirkort von Vitamin E ist aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften in fetthaltigen Strukturen, also besonders in Fettgewebe und an Membrangrenzflächen zu suchen. Peroxide sind in der Lage, die Tocopherole zu zerstören [Kon'ia (1985)]. Vitamin E ist essentiell zum Erhalt der Funktion biologischer Membranen [Young IS (1994)]. Man erkannte auch, dass ein Mangel an Vitamin E zur Destabilisierung von Membranen führt [Buttris JL (1984)]. Ein Mangel an Vitamin E kann somit z.B. eine Hämolyse der Erythrozyten bewirken und mikrosomale Membranen schädigen [Young IS (1994)].

Ihre Funktion als Vitamin entfalten sie als Redoxsystem, welches Hand in Hand mit dem oben beschriebenen Vitamin-C-Redoxsystem arbeitet. Das bei der Reaktion mit primären Radikalen entstehende toxische Vitamin-E-Radikal wird an Vitamin C regeneriert [Leung HW (1981), Niki E (1984)]. Aggressive Sauerstoffformen wirken auf die Zelle ein. Hierzu zählen molekularer Sauerstoff - er kann selbst mit Lipid-Radikalen unter Bildung von Peroxyl-Radikalen reagieren -, das Superoxidion $O_2^{\bullet -}$, der Singulett-Sauerstoff¹ und Wasserstoffperoxid. Besonders bei Phagozytoseprozessen oder antibakteriellen Prozessen entstehen diese aggressiven Radikale. In diesen Schädigungsmechanismus greift Vitamin E schützend ein.

Für die Wirkung als Vitamin sind mindestens eine Methylgruppe und eine Hydroxylgruppe am Ring wichtig. Man kann die verschiedenen Tocopherole durch die Stellung und Anzahl der Methylgruppen am Ring voneinander unterscheiden

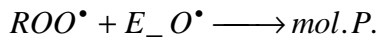
Vitamin E gehört zu den sekundären Antioxidantien, da es nicht die Initiation der Lipidperoxidation, sondern den Kettenabbruch bewirkt, also die Termination der Lipidperoxidation einleitet.

Die Grundgleichung hierzu lautet:



¹ Singulett-Sauerstoff: eine angeregte Form des molekularen Sauerstoffs, der unter Lichtemission umgewandelt werden kann. Wegen der hohen Reaktivität zählt der Singulett-Sauerstoff zu den aggressiveren Sauerstoffformen in biologischen Systemen [Young IS (1994)].

Bei der Weiterreaktion entstehen molekulare Produkte:



Legende: *E_OH*: Vitamin E; *mol. P.*: molekulare Produkte

Vitamin E kann zwei Peroxylradikale „abfangen“ und damit zwei Reaktionsketten abbrechen [Young IS (1994)]. Unter dem Einfluss von Ethanol kommt es zu einem Abfall der antioxidativen Hauptssysteme (Selen, Vitamin E, Vitamin A etc.) [Nordmann R (1990)].

Vitamin E und Eisenüberladung: Im Zustand der Eisenüberladung kommt es zu einem vermehrten Auftreten von freiem (ionisiertem) Eisen. Dieses Eisen ist in der Lage, freie Hydroxylradikale zu bilden (Fenton- und Haber-Weis-Reaktion). Ebenso kann es zu einem Verlust der sekundären Antioxidantien beitragen. Dies kann besonders bei Patienten mit hereditärer Hämochromatose beobachtet werden. Im Verlauf dieser Erkrankung kommt es zu verminderten Spiegeln der antioxidativen Vitamine [Young IS (1994)]. In Versuchen mit in-vivo Markern für die Lipidperoxidation konnte man feststellen, dass Vitamin E in der Lage ist, die Lipidoxidation signifikant zu verringern [Lawrence GD (1984)].

1.5 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 β -Karatol, als auch das Vitamin direkt zusammen mit der Fettfraction aufgenommen werden. Provitamine A sind eine sehr heterogene Gruppe von Karotinoiden. Diese können im Organismus in die Vitaminform umgewandelt werden [Friedrich W (1987)].

Vitamin A ist empfindlich gegenüber Licht und Wärme. Führt man das Molekül in die Esterform über, so weist es eine höhere Stabilität auf als der Alkohol. Ein Schutzmechanismus durch α -Tocopherol gegenüber der Oxidation von Vitamin A ist bekannt. Ferner besteht eine hohe Stabilität gegenüber Basen, gegenüber Säuren ist Vitamin A jedoch empfindlich.

Der Speicherort in der Leber sind spezifische Fettspeicherzellen, in denen das Vitamin als Ester vorliegt. Es gibt jedoch auch Hinweise auf das Vorliegen von mehreren Vitamin-A-Pools in der Leber. Besonders die Ito Zellen dienen der Speicherung von Retinol. Sie haben eine 10fach höhere Kollagenbildungskapazität als das übrige Leberparenchym. Es wird vorwiegend Kollagen Typ I synthetisiert.

Bei guter Ernährungslage und ausreichender Versorgung des Körpers ist der Vitamin-A-Spiegel im Blut sehr konstant. Hierfür ist eine gleichmäßige Freisetzung von Vitamin A aus der

Leber verantwortlich; erst bei Erschöpfung des Leberspeichers sinkt auch der Spiegel in der Peripherie [Catagnani GL (1986)].

Zum Transport des Vitamin A im Körper dienen mehrere Proteincarriersysteme, so z.B. auch das retinolbindende Protein (RBP) und das Albumin. Intrazellulär wirksam sind die zellulären Retinol-, Retinolsäure- und Retinsäure-bindenden Proteine.

Die bekannteste physiologische Funktion von Vitamin A ist die Beteiligung am Sehprozess in Form von 11-cis-Retinol im Sehpigment. Ferner sind ausreichend hohe Konzentrationen unerlässlich für den Erhalt und die Funktion von biologischen Membranen wie z.B. der Mitochondrienmembran. Auf Grund seiner Molekülstruktur ist es Vitamin A möglich, in biologische Membranen einzudringen und deren Eigenschaften zu verändern. Wachstum, Differenzierung und Entwicklung von Geweben werden von Vitamin A positiv beeinflusst. Umgekehrt kann es bei Vitamin-A-Mangel zu Wachstums und Fortpflanzungsstörungen kommen [Glover J (1983)].

Aufgrund der Fähigkeit des Körpers, Vitamin A in großen Mengen speichern zu können, kann bei hoher Zufuhr leicht Hypervitaminose auftreten. Symptome einer Vitamin-A-Hypervitaminose können Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerz, allgemeines Unwohlsein, Juckreiz, Exfoliation der Haut und zerebrale Krampfanfälle sein. Darüber hinaus wurden teratogene Wirkungen beschrieben [Glover J (1983)].

Vitamin A und die Lipidperoxidation: Zellschützende Eigenschaften schreibt man hauptsächlich den Karotinoiden zu. Unter Bildung von Singulett-Sauerstoff ($^1O_2^*$) können durch Licht präsensibilisierte Moleküle ihre Energie auf Sauerstoff übertragen. Der gebildete Singulett-Sauerstoff reagiert anschließend sofort mit ungesättigten Verbindungen, was zum Zelltod der beteiligten Zelle führen kann. Die Karotinoide können sowohl mit dem Singulett-Sauerstoff als auch mit den aktivierten Molekülen reagieren [Glover J (1983)]. Auch wurde eine Hemmung der Lipidperoxidation unter Einfluss von Vitamin A beobachtet. In Experimenten mit Rattenlebermikrosomen konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit all-trans Retinolsäure eine Abnahme der Lipidperoxidation bewirkt. Eine stärkere Wirkung hat das Retinol. Steigert man die Lipidperoxidation exogen mittels Eisenüberladung, so kommt es zu einer Verminderung der wirksamen Antioxidantien, insbesondere des β -Karotins.

1.6 Tiermodell

Unter den verschiedenen Modellen einer experimentellen Eisenüberladung kann das in der vorliegenden Arbeit verwendete Eisenüberladungsmodell mit TMH-Ferrosen noch am besten

die Verhältnisse einer hereditären Hämochromatose am Menschen simulieren [Düllmann J et al. 1992, Nielsen P et al. (1993)]. Die Bioverfügbarkeit von TMH-Ferrosen ist besonders hoch und man kann in kurzer Zeit eine starke Eisenüberladung erzielen. Die hohe orale Bioverfügbarkeit von TMH-Ferrosen erklärt sich aus einem fehlenden selbstlimitierenden oder autoregulativen Mechanismus zur Eisenaufnahme; vielmehr wird das Eisen in der Fettfraktion der Nahrung nahezu unbegrenzt mit aufgenommen. Fast 80 % des oral applizierten Eisens wird in der Leber eingespeichert. Eine Diät mit einer Konzentration von 0,1 %-TMH-Ferrosen (Trimethylhexanoyl-Ferrosen) reicht aus, um bei Ratten nach nur 14 Fütterungstagen eine ausgeprägte hepatozelluläre Siderose auszulösen [Longueville A (1986)]. Es wurde nachgewiesen, dass es bei einer Befütterung mit einer 0,5 %-igen TMH-Ferrosen-Diät in einem Zeitraum von 26 Wochen Versuchsdauer zu einer linearen Zunahme der Eisenkonzentration in der Leber kommt. Im Zuge der Eisenüberladung mit TMH-Ferrosen konnte gezeigt werden, dass sich die Anzahl der eisenüberladenen Lysosomen in den Hepatozyten erhöht; ebenso kommt es zu einer verstärkten Aktivität der lysosomalen Enzyme [Ward RJ (1991)]. Bei langdauernder Befütterung mit TMH-Ferrosen wird bei Ratten sowohl eine signifikante perisinusidale als auch eine portale Fibrose [Düllmann J (1992)] beobachtet. In einzelnen Tieren kam es nach langdauernder Fütterung auch zur Ausbildung einer Leberzirrhose [Düllmann J, persönliche Mitteilung].

1.7 Problemstellung

Ob chronischer Alkoholkonsum zu einer verstärkten Eisenaufnahme führt, wurde in den letzten Jahren immer wieder kontrovers diskutiert. Frühere Arbeiten zeigten, dass fast 30 Prozent der an Hämochromatose (HC) leidenden Patienten auch Alkoholiker sind, so dass die Vermutung nahe lag, dass zur Ausbildung des vollen Krankheitsbildes der HC einer exzessiven Alkoholaufnahme eine entscheidende Rolle zukommt. Inzwischen steht jedoch fest, dass die HC autosomal rezessiv vererbt wird. Zur vollen Ausbildung des Krankheitsbildes ist wohl Homozygotie notwendig; heterozygote Genträger zeigen, auch wenn sie gleichzeitig Alkoholiker sind, nur eine leichte Lebersiderose, wobei sich das Eisen hauptsächlich in den Kupffer'schen Sternzellen anreichert.

Der einzige Fall einer alkoholinduzierten, nutritiven Eisenüberladung, stellt die Bantusiderose dar. Bei den „Bantu“ handelt es sich um ein südafrikanisches Naturvolk. Bei diesen war es üblich, größere Mengen eines selbst gebrauten, stark eisenhaltigen Bieres zu konsumieren. Der hohe Eisengehalt des Bieres wurde durch die besondere Zubereitung in eisenhaltigen Kesseln erklärt. Für die hier entstehende, hohe Eisenüberladung wird neuerdings auch ein genetischer

Defekt diskutiert. [Seftel HC (1966); Lynch SR, Seftel HC (1967); Lynch SR (1967); Buchanan WM (1969); Wapnick AA (1971); Senba M (1989); Gordeuk V (1992),]

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zusammenhänge zwischen Alkoholaufnahme und Eisenüberladung untersucht. Es wurde dazu das „TMH-Ferrozen-Modell“ einer nutritiven Eisenüberladung bei Ratten verwendet [Nielsen P, Heinelt S (1993)]. Es wurden Gruppen von Versuchstieren mit oder ohne Eisenüberladung sowie mit und ohne Alkoholexposition (2-8% im Trinkwasser) gebildet und mit entsprechenden Kontrollgruppen verglichen.

Es sollte geprüft werden, ob Alkoholexposition bei eisenüberladenen Tieren einen zusätzlich toxischen Effekt z.B. auf die Leberhistologie (Bildung einer Leberfibrose) oder auf biochemische Parameter (Antioxidantienstatus) aufweist.

In einem zweiten Versuch wurde der Einfluss von Alkohol auf die intestinale Eisenabsorption aus einer oralen ^{59}Fe -Testdosis bei Ratten mit normalen oder erhöhten Eisenspeichern untersucht. Dies sollte klären, ob Alkohol direkt die Eisenabsorption erhöht.

bestimmen. Organ- oder Serumproben wurden bis zur jeweiligen Bestimmung von Parametern bei -80°C gelagert.

2.2 Material

1. Futter

Die Kontrollgruppen erhielten die „Altromin-Kontrolldiät C1000“ mit einem Gehalt an Vitamin A von 5,16 mg/kg, an Vitamin C von 20,00 mg/kg, an Vitamin E von 164 mg/kg und an Eisen von 180 mg/kg.

Die Versuchsgruppen wurden mit der Altromin Sonderdiät „Eisenarmes Futter C1038“ (Grundgehalt Fe: 6 mg/kg) mit 0,5% TMH-Ferrozen (entsprechend 816 mg Fe/ kg) versetzt, befüttert. Die übrige Zusammensetzung unterschied sich nicht von der Diät C1000.

2. Chemikalien

Ferrozen sowie Toluol wurden von Fluka (Neu-Ulm) bezogen. Ethanol absolut, *di*-Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat, *meta*-Phosphorsäure Nr. 253-433-4, L(+)-Ascorbinsäure, DL-alpha-Tocopherol für biochemische Zwecke Art. 8283, all-trans-Retinol Nr. R 7632, DL-alpha-Tocopherolacetat für biochemische Zwecke Art. 8284 und Methanol Gradient Grade wurden in „pro analysi-Qualität“ von Merck Darmstadt erhalten.

In dem zweiten Versuchsteil wurde die intestinale Eisenabsorption bei Ratten mit bzw. ohne bestehende Eisenüberladung getestet. Die orale Testdosis wurde per Schlundsonde appliziert und bestand aus 1 ml einer $^{59}\text{Fe(II)-SO}_4$ /Askorbatlösung (1mg Fe). Zur Herstellung der Testverbindung wurde eine Tracerdosis $^{59}\text{Fe(III)-Chlorid}$ (Amersham Buchler, Braunschweig) mit Ascorbinsäure reduziert und mit kaltem FeSO_4 verdünnt. Diese Lösung enthielt die 10-fache molare Menge an Ascorbinsäure.

Synthese von TMH-Ferrozen

I. Synthese von 3,5,5-Trimethylhexanoylchlorid

500 ml 3,5,5-Trimethylhexanal wurden für 36 Stunden mit einem schwachen Sauerstoffstrom in einem 1 l-Erlenmeierkolben begast. Das Reaktionsgemisch wurde in einen 2 l-Rundkolben überführt, mit 175 g (1,27 mol) Phosphortrichlorid versetzt und unter Feuchtigkeitsabschluss (Trockenrohr) 5 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Es bildeten sich zwei Phasen. Die

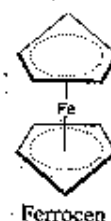
obere organische Phase wurde abdekantiert und anschließend im Wasserstrahlvakuum fraktioniert

Siedepunkt: 74 – 76° C; 26.7 mbar

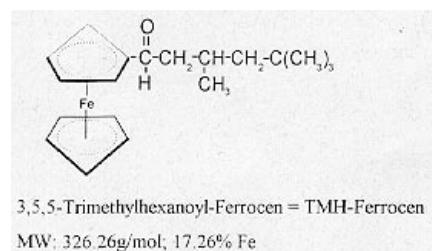
Ausbeute: 356 g (73,8 %) 3,5,5-Trimethylhexanoylchlorid

II. Synthese von 3,5,5-Trimethylhexanoyl-Ferrocen (TMH-Ferrocen)

In einem 2 l-Zweihalskolben (mit Magnetrührer, Tropftrichter und Rückflusskühler mit Calciumchloridröhrchen) wurden 250 g (1,34 mol) Ferrocen und 141,3 g (1,06 mol) feinpulverisiertes Aluminiumchlorid in 1,4 l Methylenechlorid gerührt. Zum Reaktionsgemisch wurden 153 g (0,87 mol) 3,5,5-Trimethylhexanoylchlorid tropfenweise unter ständigem Rühren und Eiskühlung zugeführt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend bis zum Erreichen der Raumtemperatur stehengelassen und auf ca. 250 g Eis gegossen. Die organische Phase wurde abdekantiert und im Vakuum eingedampft. Die tiefschwarze Methylenechloridphase wurde im Scheidetrichter abgetrennt.



Der Rückstand der eingedampften organischen Phase wurde in 60 ml Toluol aufgenommen, auf eine Kieselgel-Chromatographiesäule (9 x 85 cm) aufgetragen und mit Toluol als Laufmittel eluiert. Die Analyse des Eluats erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie auf mit Silicagel 60-beschichteten Aluplatten. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus Toluol/Ethylacetat (45/5; v/v). Es wurden drei Fraktionen aufgefangen. Fraktion 1 enthielt 27 g Edukt, Fraktion 2 ($R_f = 0,53$) TMH-Ferrocen verunreinigt mit Edukt, Fraktion 3 reines TMH-Ferrocen. Fraktion 3 wurde aufgefangen und das Toluol im Vakuum eingedampft. Der tiefrote ölige Rückstand wurde in Ethanol gelöst, filtriert und anschließend lyophilisiert. Schließlich resultiert eine rot-bräunlicher, amorph-feste Masse.



Ausbeute: 186 g (65,8 %) TMH-Ferrocen

Schmelzpunkt: 43 – 45° C

3. Geräte

Es wurden für jede Messung verschiedene 10 ml Spritzen von Braun™, Venenpunktionskanülen von Braun Melsungen, Eppendorff-Pipetten geeicht auf 200 µl und

400 µl, Millex-HV13 Millipore-Filter, Homogenisator Potter S von Braun Melsungen und eine pH-Einstabmeßkette von Schott Typ-Nr. N 6280 verwendet.

I. Zur quantitativen Bestimmung von Vitamin C wurden ein HPLC-System bestehend aus HPLC-Pumpe 2248 Pharmacia Biotech, Low Pressure Mixer mit Luftblasenfalle von Pharmacia Biotech, Elektrochemischem Detektor von Pharmacia LKB Biotech, HPLC-Säule: SuperPac Sephasil C18 5 µm, mit einer Größe von 4 x 250 mm, Chromato-Integrator D-2500 von Merck mit UV-Detektor auf Messkanal 1 und elektrochemischem Detektor auf Kanal 2 eingesetzt. Somit wurden beide Detektoren simultan benutzt. Folgende Einstellungen wurden vorgenommen:

Elektrochemischer Detektor: Potential 0,7 V, Range 20 nA, Offset 150 nA

II. Zur quantitativen Bestimmung von Vitamin E und A in Serum und Leberhomogenaten wurde wiederum ein HPLC-System mit 2 getrennten Messeinheiten eingesetzt. Dieses HPLC-System bestand aus der HPLC-Pumpe 2248 von Pharmacia Biotech, dem Low-Pressure-Mixer von Pharmacia LKB Biotech, Chromatographiesäule: Typ ChromSa (1/16'' Innengewinde) mit einer Größe von X ID = 250 X 4.0 [mm], Gel: Inertsil ODS-2 5 [µm] und dem Spektralphotometer mit Digitalanzeige von Knauer. In den ersten 8-12 Minuten jeder Messung wurde die Wellenlänge auf 325 nm eingestellt, da der Vitamin-A-Peak in dieser Zeitspanne zu erwarten war. Nach Auftreten des Peaks wurde die Wellenlänge zur Registrierung der Vitamin-E- und Vitamin-E-Acetat-Peaks auf eine Wellenlänge von 275 nm umgeschaltet. Gleichzeitig wurde Vitamin E auch auf dem Fluoreszenzdetektor „Fluorescence HPLC Monitor RF-535T“ von Shimadzu dargestellt. Die Ausgangssignale dieser beiden Messeinheiten wurden mit Hilfe des Chromato-Integrator D-2500 von Pharmacia Biotech aufgezeichnet.

Einstellungen: Response = fast, Range = 16, Sensitivity = high, Wellenlänge Emission = 325 nm, Wellenlänge Extinktion = 295 nm. Es handelt sich hierbei um die von Catagnani et al. 1986 vorgestellte Methode [Catagnani GL (1986)].

Die Applikation der Proben erfolgte jeweils mit geeichten HPLC-Spritzen mit 50 µl oder 100 µl Volumen.

2.2.1 Gewinnung und Aufarbeitung der Serum-, Plasma- und Leberproben

2.2.1.1 Gewinnung der Proben

Zur Gewinnung der Proben wurden die Tiere zuerst mittels Äther narkotisiert. Nach Eröffnung der Bauchhöhle und Freipräparation bzw. Darstellung von Vena Cava inferior und Aorta abdominalis wurden mit Hilfe einer 10 ml Spritze und einer Venenpunktionskanüle aus der Aorta abdominalis durchschnittlich 5 ml Blut gewonnen und die Tiere dadurch getötet. Anschließend wurde die Leber reseziert. Das gewonnene Blut wurde sofort auf Heparin-Plasma- und Serum-Röhrchen aufgeteilt. Die Blutröhrchen wurden danach sofort unter Kühlung bei +2°C zentrifugiert.

2.2.1.2 Behandlung der frisch entnommenen Blut- und Gewebeproben:

Die Zentrifugation von Serum und Plasma erfolgte in einer auf +2°C heruntergekühlten Zentrifuge mit einer Dauer von 5 Minuten und einer Rotationsfrequenz von 5000 U/min.

Von Serum und Plasma wurden jeweils mittels Eppendorff-Pipetten 400 µl abgenommen und in verschiedene Kryo-Röhrchen überführt. Zur Stabilisierung des Vitamin C und zur Proteinausfällung wurden den Plasmaproben 400 µl 10%-ige Metaphosphorsäure hinzugefügt. Ebenso wurden vier bis fünf 0,3 g - 1 g schwere Leberteile auf verschiedene Kryo-Röhrchen verteilt.

Alle Kryo-Röhrchen wurden in Stickstoffatmosphäre verschlossen und mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Aufbewahrung bis zur Analyse erfolgte bei -80° C.

2.2.2 Allgemeiner Betrieb der HPLC Einheiten

Da alle Vitaminparameter mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie“ (HPLC) bestimmt werden, wird dieses Verfahren kurz erläutert:

Die HPLC ist gut geeignet, um verschiedene organische und biochemische Verbindungen (z.B. Vitamine, Aminosäuren, Pharmazeutika) zu analysieren. Wie bei jeder anderen Chromatographie-Methode besteht auch die HPLC aus mobiler und stationärer Phase. Die stationäre Phase ist bei der HPLC besonders feinkörnig, so dass ein hoher Druck notwendig ist (ca. 100 bar) um das betreffende Laufmittelsystem durch eine Säule zu transportieren.

Die mobile Phase befindet sich in einem Behälter und wird mittels einer oder zwei gegenläufig synchron arbeitenden Membranpumpen mit regelbarem Druck durch das System gepumpt.

In unserem Fall wurde die Technik der Reversed-Phase-Chromatography angewandt. Dabei ist die stationäre Phase apolar und die mobile Phase polar.

Hierbei sind die Retentionszeiten vor allem vom pH-Wert des Elutionsmittels und dem Grad der Polarität des Analysats abhängig.

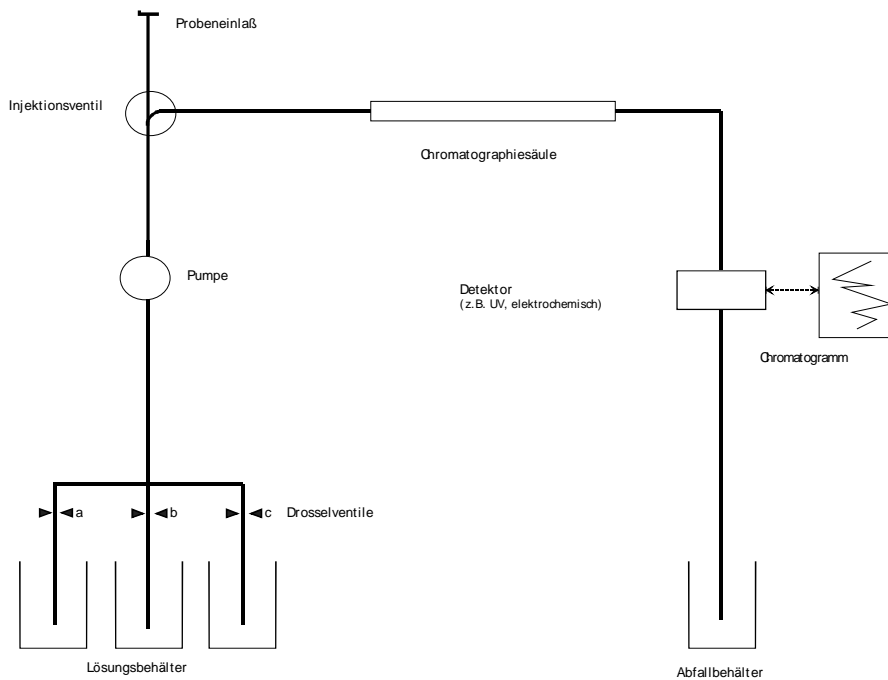


Abbildung 3 Schema einer HPLC-Einheit

2.2.3 Vitamin C

Zum Betrieb des HPLC-Messsystems wurde eine mobile Phase mit 2,5 mM di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat-Lösung mit einem pH-Wert von 2,95 benutzt. Die Eichung des Messsystems erfolgte mit einer Vitamin-C-Stocklösung (70 mg Vitamin C in 100 ml Pufferlösung). Mit einer 1:200000 Verdünnung dieser Stocklösung wurde der elektrochemische Detektor geeicht (3-Punkte-Mehrfacheichung). Der lineare Messbereich lag zwischen 0,0005 µg und 0,25 µg Vitamin C pro ml Analysat, bei einer Nachweisgrenze von 0,0001 µg Vitamin C.

```

FILE 3   SYS 1   SEQ 18
CH. 2<A> C. S 2.50 ATT 10 OFFS 0 11/28/96 14:48

```

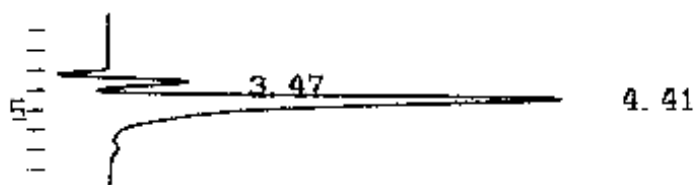


Abbildung 4 Beispielchromatogramm für die Eichung von Vitamin C im elektrochemischen Detektor nach dem Prinzip der Amperometrie. Der Vitamin-C-Peak zeichnet sich nach 4.41 min ab. Der Peak nach 3.47 min ist ein Artefakt und wurde nicht weiter analysiert.

Aufarbeitung der Plasmaproben: Die Proben wurden für fünf Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:10 mit dem Puffer verdünnt und mittels eines Filters (Millex-HV13) ultrafiltriert. Aus jeweils 100 µl dieser Lösung wurde das Vitamin C quantitativ bestimmt. Das Plasma wurde 1:2 mit 10 % *meta*-Phosphorsäure und 1:10 mit Puffer verdünnt.

Aufarbeitung der Leberproben: Im Homogenisator (Potter S von Braun/Melsungen) wurden jeweils 0,5 g der Leberprobe mit 3 ml isotonischer 0° C kalter NaCl-Lösung versetzt und mechanisch homogenisiert. Dem Homogenat wurden 1 ml einer 0,1 molaren kalten Natrium-Dodecylsulfat-Lösung zugesetzt. Anschließend wurden 2 ml dieser Suspension mit einer geeichten Pipette abpipettiert. Ein Aliquot hiervon wurde mit 2 ml 10 %-iger *meta*-Phosphorsäure durchmischt, und für 5 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, mit dem Puffer 1:10 verdünnt und ultrafiltriert. In die HPLC-Säule wurden vom Filtrat jeweils 30 µl eingepipettiert. Abbildung 5 zeigt die Aufarbeitung des Lebergewebes im Homogenisator.

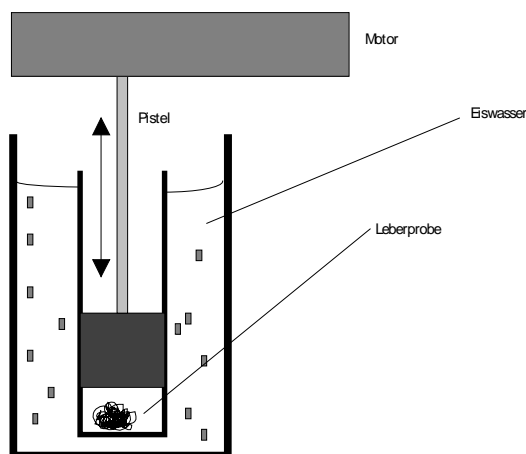


Abbildung 5 Aufarbeitung der Leberproben im Homogenisator „Potter S“. Eine Leberprobe wird unter ständiger Rotation und unter Auf- und Abbewegungen des Glaspistels homogenisiert. Kühlung und damit Stabilisierung der Probe durch Eiswasser (0° C).

2.2.3.1 Berechnung von Vitamin C in Serum und Leber

Durch wiederholtes Einspritzen von Messlösungen mit verschiedenen Vitamin-C-Konzentrationen wurde das Messsystem geeicht, wobei mittels linearer Regression (Abbildung 6) der Eichpunkte folgende Kalibrationsgerade $h = 70456 \cdot c_{(\text{Serum})}$ ($R^2 = 0,93$) ermittelt werden konnte.

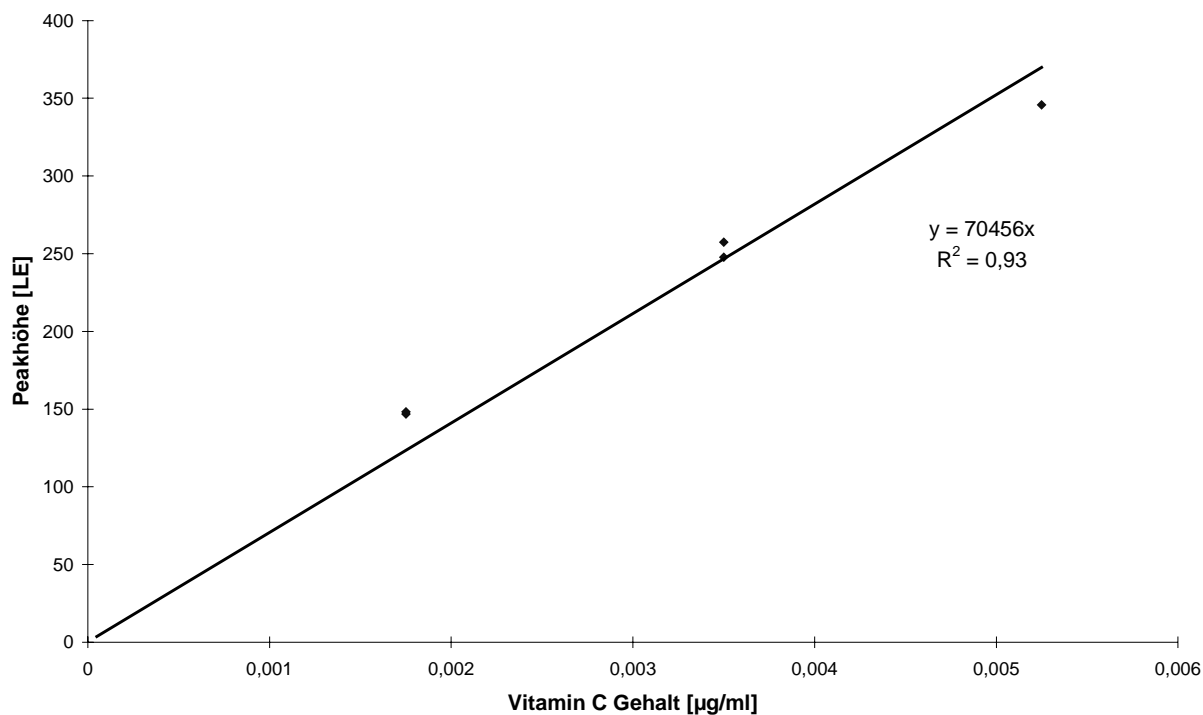


Abbildung 6 Eichung von Vitamin C mittels HPLC und elektrochemischer Detektion.

Durch Umstellung der Gleichung der Eichgeraden lassen sich folgende Berechnungen angeben:

I. Serum:

$$c_{\text{Serum}} = \frac{h}{m} \cdot v$$

$c_{(\text{Serum})}$ = Konzentration v. Vitamin C im Serum [$\mu\text{g/ml}$]

h = Peakhöhe des Vitamin-C-Peaks [LE]

m = Steigung der Eichgeraden (beträgt 70456)

Gesamtverdünnung beträgt 1:20 \rightarrow Verdünnungsfaktor

v = 20

II. Leber:

$$c_{\text{Leber}} = \frac{h}{m} \cdot v \cdot \frac{100}{30}$$

$c(\text{Leber}) = \text{Konzentration v. Vitamin C in der Leber } [\mu\text{g/ml}]$
 $h = \text{Peakhöhe des Vitamin-C-Peaks [LE]}$

Analysat: 30 μl

Gesamtverdünnung beträgt 1: $\left| \frac{n+4}{n} \cdot 40 \right| \rightarrow \text{Verdünnungsfaktor}$

$v = \frac{(n+4)}{n} \cdot 40$ bei

$n = \text{Leber [ml] und}$

$\square \text{Rattenleber} = 1 \text{ mg/ml.}$

$m = \text{Steigung der Eichgeraden}$

2.2.4 Vitamine E und A

Eine Lösung bestehend aus 99,5 % Methanol und 0,5 % H₂O-Tridest diente als mobile Phase zum Betrieb der hier eingesetzten HPLC-Systeme und als Verdünnungsmittel für die Analysate. Um einer Veränderung des Mischungsverhältnisses vorzubeugen, wurde der Puffer gegenüber der Raumluft abgeschlossen und jeweils nach 2 Tagen erneuert.

I. Vitamin E

Es wurde eine Puffer-Verdünnungslösung aus 99,5 % Methanol und 0,5 % H₂O-Tridest hergestellt. Die Eichung erfolgte mit einer Vitamin-E-Stocklösung. Hierzu wurden 0,5 g alpha-Tocopherol in 100 ml Ethanol gelöst und ausgehend davon weiter verdünnt.

Fluoreszenzdetektor: Die Kalibrierung des Fluoreszenz-Detektors erfolgte mit einer Verdünnung des Stockstandards im Verhältnis 1:10000 als Mehrpunkteichung.

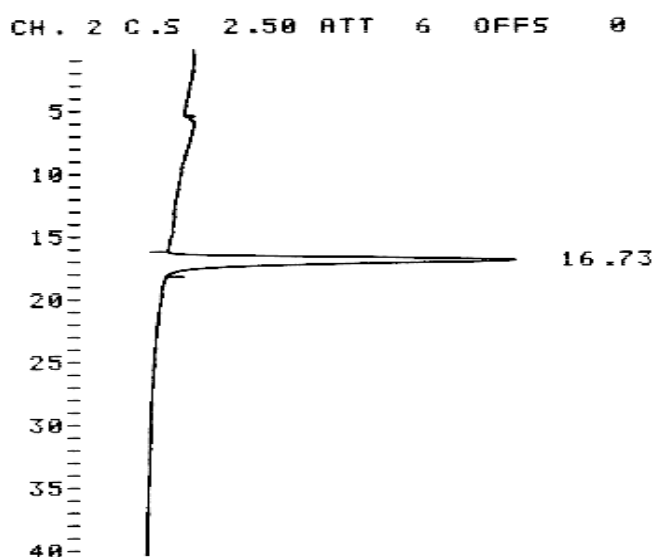


Abbildung 7 Beispielchromatogramm für die Eichung von Vitamin E im Fluoreszenzdetektor. HPLC-Methode. Vitamin-E-Peak nach einer Retentionszeit von 16.73 min.

Abbildung 8 zeigt die auf diese Weise ermittelte Eichgerade:

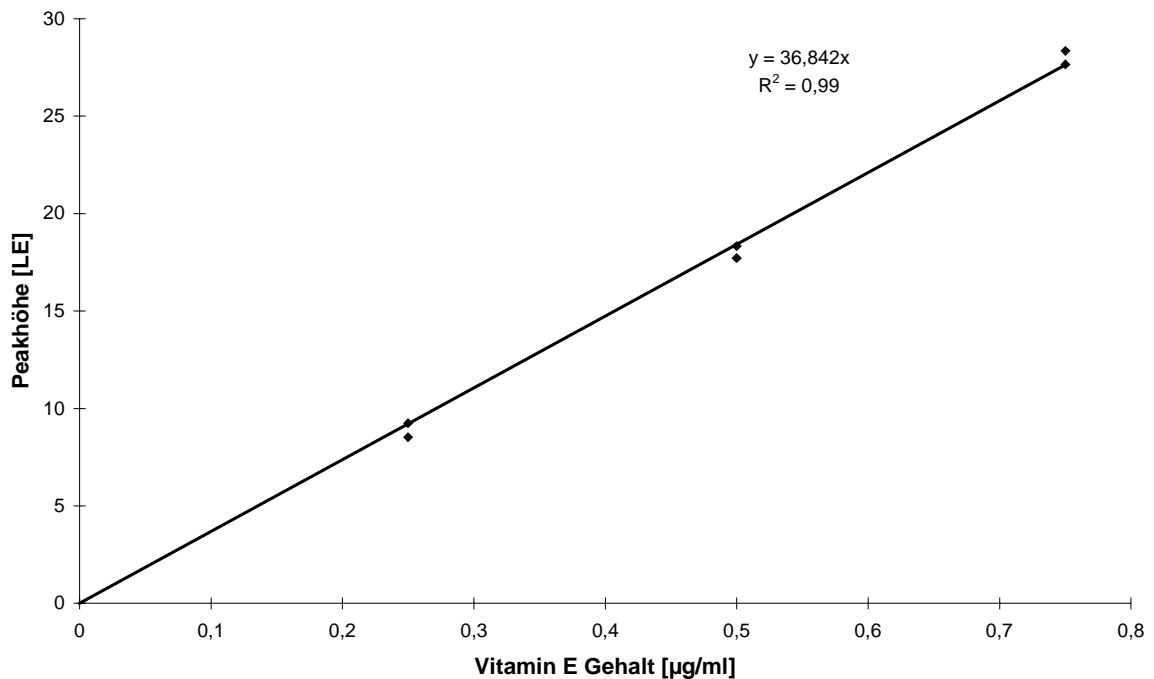


Abbildung 8 Eichgerade für Vitamin E für Fluoreszenz-Detektion.

Aufarbeitung der Serumproben: Jeweils 400 µl der Serumprobe wurden mit 400 µl alpha-Tocopherolacetat (in 1:1000 Verdünnung) und 800 µl n-Hexan durchmischt, um darin das fettlösliche Vitamin A aufzunehmen. Diese Emulsion wurde für zwei Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert und dann von der apolaren n-Hexanphase ein Aliquot von 400 µl abgenommen. Dieses wurde in Stickstoffatmosphäre bis zur völligen Trocknung eingengt und der Rückstand danach in 400 µl der Methanol/Wasser-Lösung eluiert. Von dieser Lösung wurden nun 100 µl in die Chromatographie-Säule injiziert.

Aufarbeitung der Leberproben:

Ein Milliliter des Leberhomogenats (siehe 2.2.3) wurde mit 1 ml des nachfolgend beschriebenen α -Tocopherolacetat-Standards und 2 ml n-Hexan intensiv gemischt. Diese Emulsion wurde für zwei Minuten bei 2000 Umdrehungen zentrifugiert. 400 µl der apolaren Phase wurden im Stickstoffstrom eingengt. Nach Zusatz von 400 µl des Methanol/Wasser-Systems und intensivem Mischen werden 100 µl dieser Probe in der HPLC-Einheit gemessen.

α -Tocopherolacetat

Zur Kalibrierung der Methode wurden 0,5 g DL-alpha-Tocopherolacetat in 100 ml Puffer gelöst und 1:1000 verdünnt. Diese Stocklösung diente als interner Korrekturstandard um die Verluste in der Aufarbeitung ausgleichen zu können.

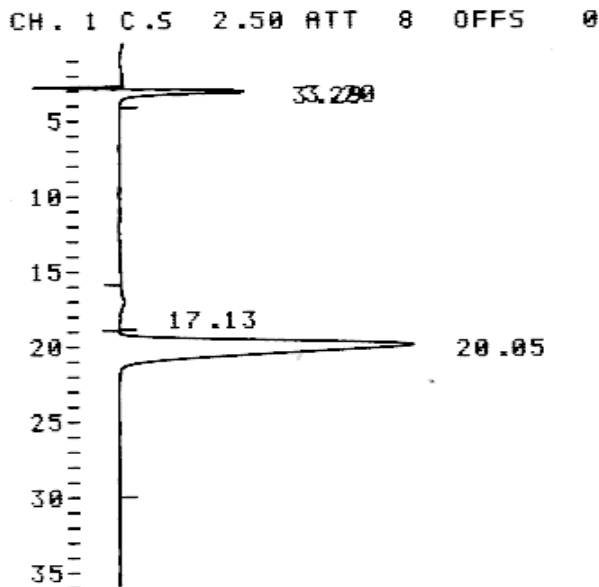


Abbildung 9 Beispielchromatogramm für die Eichung von α -Tocopherolacetat im UV-Detektor bei 275 nm. Methode: HPLC. α -Tocopherolacetat-Peak nach einer Retentionszeit von 20.05 min.

Der entsprechende Eichpeak (1,351 LE) wurde mit dem zu erwartenden Messpeak verglichen und die daraus resultierende prozentuale Abweichung auf die Berechnung der Vitamin-E-Konzentration angewendet. Hierbei ging man von äquivalenten Verlusten bei DL-alpha-Tocopherolacetat und Vitamin E aus.

2.2.4.1 Berechnung von Vitamin E in Serum und Leber

I. Vitamin E

Eichgerade im Fluoreszenzdetektor:

$$h_{(FL)} = m_{(FL)} \cdot C_{(FL)}$$

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

| | | |
|------------|---|--|
| $h_{(FL)}$ | = | Peakhöhe [LE] gemessen im Fluoreszenz-Detektor |
| $C_{(FL)}$ | = | Konzentration von Vitamin E [μ g/ml] gemessen im Fluoreszenz-Detektor |
| $m_{(FL)}$ | = | Steigung der Eichgerade für den Fluoreszenz-Detektor (beträgt 36,842) |

a. Serum

$$c_{(FL)} = \frac{h_{(FL)}}{m_{(FL)}} \cdot 2 \cdot \frac{100}{V} \cdot \left. \frac{\text{Peakhöhe - VitE - Acetat}_{(theoretisch)}}{\text{Peakhöhe - VitE - Acetat}_{(praktisch)}} \right\}$$

| | | |
|------------|---|---|
| $h_{(FL)}$ | = | Peakhöhe [LE] Vitamin-E-Peak aus dem Fluoreszenz-Detektor-Chromatogramm |
| $c_{(FL)}$ | = | Vitamin-E-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$] im Serum über Fluoreszenz-Detektor berechnet |
| V | = | eingespritztes Volumen der Probe |
| $m_{(FL)}$ | = | Steigung der Eichgerade für den Fluoreszenz-Detektor (beträgt 36,842) |
| d | = | Verdünnungsfaktor (beträgt 2) |

b. Leber

$$c_{(FL)} = \frac{h_{(FL)}}{m_{(FL)}} \cdot \left. \frac{n+4}{n} \cdot 2 \right\} \cdot \frac{100}{V} \cdot \left. \frac{\text{Peakhöhe - VitE - Acetat}_{(theoretisch)}}{\text{Peakhöhe - VitE - Acetat}_{(praktisch)}} \right\}$$

| | | |
|---------------------|---|---|
| $h_{(FL)}$ | = | Peakhöhe [LE] Vitamin-E-Peak aus dem Fluoreszenz-Detektor-Chromatogramm |
| $c_{(FL)}$ | = | Vitamin-E-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$] im Serum über Fluoreszenz-Detektor berechnet |
| V | = | eingespritztes Volumen der Probe (150 μl) |
| $m_{(FL)}$ | = | Steigung der Eichgerade für den Fluoreszenz-Detektor (beträgt 36,842) |
| d | = | Verdünnungsfaktor beträgt $\left. \frac{n+4}{n} \right\} \cdot 2$ |
| n | = | Leber [ml] für ρ Rattenleber = 1g/ml |
| Korrekturfaktor k | = | $\frac{2,0265}{PK}$ |

II. Vitamin A

Es wurde eine Puffer-Verdünnungslösung aus 99,5 % Methanol und 0,5 % H₂O-Tridest hergestellt. Die Eichung erfolgte mit einer Vitamin-A-Stocklösung. 100 mg Vitamin A wurden in 100 ml der Pufferlösung (1000 μg Vitamin A / 1 ml Puffer) gelöst und ausgehend hiervon weiter verdünnt.

Als Eichkurve wurde mittels Spektralphotometer folgende Gleichung ermittelt:

$$h = m \cdot C$$

Der Bestimmtheitsmaß beträgt $R^2 = 0,99$.

| | | |
|-----|---|---|
| h | = | Peakhöhe [LE] gemessen im Spektralphotometer |
| C | = | Konzentration von Vitamin A [$\mu\text{g/ml}$] gemessen im Spektralphotometer |
| m | = | Steigung der Eichgerade nur spektralphotometrisch bestimmt (beträgt 39,007) |

Zur Kalibrierung der Meßsysteme erfolgten Verdünnungen dieser Stocklösung von 1:100 und 1:10000 mit oben genanntem Puffer.

Vitamin A wurde mit Hilfe des Spektralphotometers bei 325 nm Wellenlänge gemessen.

Die Verdünnungen erfolgten im Verhältnis 1:100 und 1:10000.

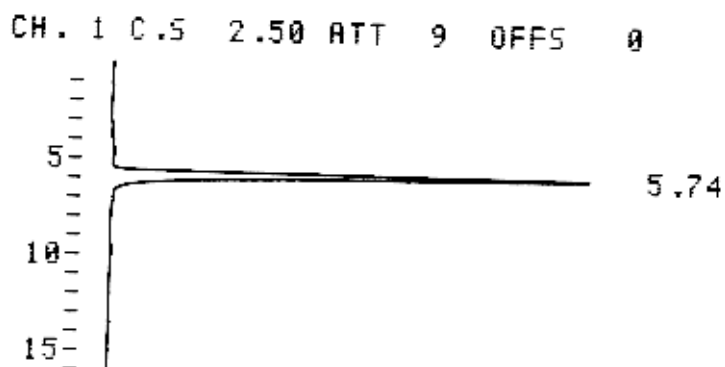


Abbildung 10 Beispielchromatogramm für Vitamin A. UV-Detektion bei 325 nm. Vitamin A-Peak nach einer Retentionszeit von 5,74 min.

Mit diesen Messungen konnte folgende Eichgerade erstellt und in Abbildung 11 eingezeichnet werden.

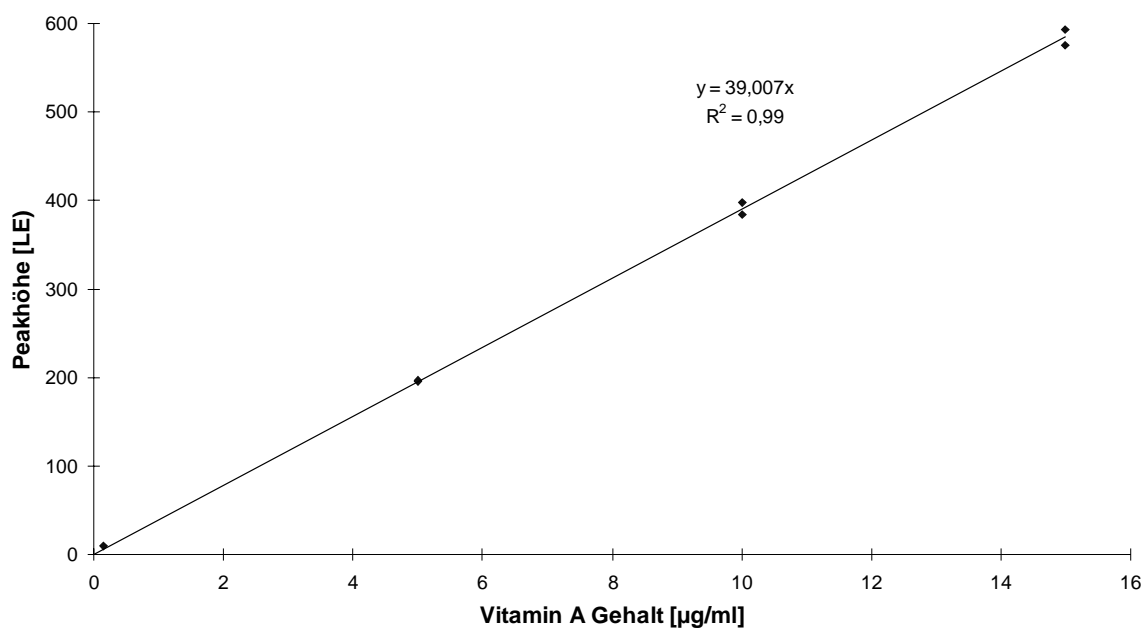


Abbildung 11 Eichgerade Vitamin A. UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 325 nm.

Aufarbeitung der Serumproben: Jeweils 400 µl der Serumprobe wurden mit 400 µl alpha-Tocopherolacetat (in 1:1000 Verdünnung) und 800 µl n-Hexan durchmischt, um darin das fettlösliche Vitamin A aufzunehmen. Diese Emulsion wurde für zwei Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert und dann von der apolaren n-Hexanphase ein Aliquot von 400 µl abgenommen. Dieses wurde in Stickstoffatmosphäre bis zur völligen Trocknung eingeengt und der Rückstand danach in 400 µl der Methanol/Wasser-Lösung eluiert. Von dieser Lösung wurden nun 100 µl in die Chromatographie-Säule injiziert.

Aufarbeitung der Leberproben:

Ein Milliliter des Leberhomogenats (2.2.3) wurde mit 1 ml des alpha-Tocopherolacetat-Standards und 2 ml n-Hexan intensiv gemischt. Diese Emulsion wurde für zwei Minuten bei 2000 Umdrehungen zentrifugiert. Wiederum wurden 400 µl der apolaren Phase in Stickstoff Atmosphäre eingengt. Nach Zusatz von 400 µl des Methanol/Wasser-Systems und intensivem Mischen wurden 100 µl dieser Probe in der HPLC-Einheit gemessen.

Verdünnungen von Vitamin A in der Leber:

-[Leberhomogenat [ml] + 1 ml SDS + 3 ml NaCl]: Leberhomogenat [ml]

-1:2 Verdünnung mit alpha-Tocopherolacetat

Gesamtverdünnung $1: \left. \frac{n+4}{n} \cdot 2 \right\}$

n: Leber [ml] bei $\rho_{\text{Rattenleber}} = 1 \text{ g/ml}$

α-Tocopherolacetat

Zur Kalibrierung der Methode wurden 0,5 g DL-alpha-Tocopherolacetat in 100 ml Puffer gelöst und 1:1000 verdünnt. Diese Stocklösung diente als interner Korrekturstandard um die Verluste in der Aufarbeitung ausgleichen zu können.

Der entsprechende Eichpeak (1,351 LE) wurde so mit dem zu erwartenden Messpeak verglichen und die daraus resultierende prozentuale Abweichung auf die Berechnung der Vitamin-A-Konzentration angewendet. Hierbei ging man von äquivalenten Verlusten bei DL-α-Tocopherolacetat und Vitamin A aus.

2.2.4.2 Berechnung von Vitamin A in Serum und Leber**I. Serum**

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

- $h_{(UV)}$ = Peakhöhe [LE] Vitamin-A-Peak aus dem Spektralphotometer Chromatogramm
 $c_{(UV)}$ = Vitamin A [µg/ml] Konzentration im Serum über Spektralphotometer berechnet
 V = eingespritztes Volumen der Probe
 d = Verdünnungsfaktor (beträgt 2)
 m = Steigung der Eichgeraden (beträgt 39,007)

Peakhöhe Vitamin-E-Acetat_(theoretisch) 1,351 [LE], der Verdünnungsfaktor beträgt 2.

II. Leber

Der Korrekturstandard über Vitamin-E-Acetat betrug hier 2,027 LE, die Gesamtverdünnung

der Proben 1: $\left. \frac{n+4}{n} \cdot 2 \right\}$.

Berechnungsgrundlage war dementsprechend:

$$c_{(UV)} = \frac{h_{(UV)}}{m} \cdot 2 \cdot \left. \frac{n+4}{n} \right\} \cdot \frac{100}{V} \cdot \frac{(Peakhöhe_{E-Acetat} \textit{theoretisch})}{(Peakhöhe_{E-Acetat} \textit{praktisch})}$$

| | | |
|------------|---|---|
| $h_{(UV)}$ | = | Peakhöhe [LE] Vitamin-A-Peak aus dem Spektralphotometer-Chromatogramm |
| $c_{(UV)}$ | = | Vitamin-A-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$] in der Leber über Fluoreszenz-Detektor berechnet |
| V | = | eingespritztes Volumen der Probe (150 μl) |
| m | = | Steigung der Eichgeraden (beträgt 39,007) |
| k | = | Korrekturfaktor |
| n | = | Leber [ml] für ρ Rattenleber = 1 g/ml |

Verdünnungsfaktor: $\left. \frac{n+4}{n} \right\} \cdot 2$

2.3 Intestinale Eisenabsorption und Ganzkörper-Retention von ^{59}Fe bei eisenüberladenen und nicht-eisenüberladenen Ratten unter akuter bzw. chronischer Ethanolexposition.

2.3.1 Versuchsaufbau

In verschiedenen Lösungen wurde eisenüberladenen und nicht-eisenüberladenen Ratten radioaktives Eisen-(II)-Sulfat ($^{59}\text{Fe(II)}$ -Sulfat + Ascorbatüberschuss) per Schlundsonde appliziert und die inkorporierte Aktivität mit Hilfe des Hamburger HAMCO (Ganzkörper-Scintillator) zum Zeitpunkt ΔT [Tage] = 0 (also direkt nach Applikation), ΔT [Tage] = 7 und ΔT [Tage] = 15 gemessen.

2.3.2 Versuchsgruppen

Die Versuchsgruppen wurden nach folgendem Schema zugeteilt:

| | appliziertes ^{59}Fe gelöst in | Eisenüberladung | n | Lebereisenkonzentration |
|-----------------|---|------------------|---|-------------------------|
| Gruppe 1 | Ethanol | mit TMH-Ferrozen | 8 | 28 mg Fe / g Leber |
| Gruppe 2 | Wasser | mit TMH-Ferrozen | 3 | 28 mg Fe / g Leber |
| Gruppe 3 | Ethanol | keine | 6 | 7 mg Fe / g Leber |
| Gruppe 4 | Wasser | keine | 4 | 7 mg Fe / g Leber |

Tabelle 2 Versuchsgruppen für die Messung der intestinalen Eisenabsorption aus einer Testdosis von 1 mg Fe. *Ersichtlich ist der Status der Eisenüberladung, die Anzahl der Versuchstiere und die Applikationsart des radioaktiv markierten Eisens.*

Die Ratten aus den Gruppen 1 und 2 waren bereits über 36 Wochen mit TMH-Ferrosen ad libitum befüttert worden und damit stark eisenüberladen. Die Tiere der Gruppen 3 und 4 waren über einen ähnlichen Zeitraum mit Normalfutter (Altromin C1000 mit geringem Eisenanteil s.o.) gefüttert worden.

Während der Zeit der Befütterung wurden die Ratten in Polyäthylenkäfigen mit Edelstahlrosten gehalten, um eine Koprophagie gering zu halten. Den Ratten aus allen vier Gruppen standen Nahrung und Trinkwasser zu jeder Zeit ad libitum zur Verfügung.

Am Messtermin wurde den Tieren aller vier Gruppen das radioaktiv markierte Eisen mittels Knopf-Schlundsonde appliziert. Um eine Störung der Eisenaufnahme durch Nahrungsbestandteile weitgehend auszuschalten, wurden die Versuchstiere vor der Applikation über 12 Stunden in Stoffwechselkäfigen auf Nulldiät gesetzt (Trinkwasser erlaubt).

2.3.3 Methoden

2.3.3.1 Herstellung der Belastungslösung

Am Tage des Tests wurde morgens die Belastungslösung frisch hergestellt. Für die Ratten der Gruppen 1 und 3 wurde eine ethanolische Lösung, für die Ratten der Gruppen 2 und 4 eine wässrige Lösung gewählt, um das Eisen zu applizieren.

Das verwendete ^{59}Fe (II) SO_4 wurde aus $^{59}\text{FeCl}_3$ synthetisiert.

a. Herstellung der ethanolischen Belastungslösung

Aus dem oben beschriebenen eisenfreien Wasser wurden 150 ml 40% Ethanol-Lösung hergestellt. In 500 μl 40 %-ige Ethanol/Wasser-Lösung wurde jeweils einzeln das ^{59}Fe (II) SO_4 mit einem Eisenanteil von 2mg/ml gelöst.

b. Herstellung der wässrigen Belastungslösung

Wiederum wurde pro Belastungslösung für die einzelne Ratte in 500 μl des oben beschriebenen Wassers das ^{59}Fe (II) SO_4 mit einem Eisenanteil von 2 mg/ml gelöst.

2.3.3.2 Vorbereitung zur Messung im Hamburger HAMCO (Human-Counter):

Beim HAMCO handelt es sich um einen Ganzkörperszintillator mit einer 4 Π -Messgeometrie. Er ist von seiner Größe her dazu geeignet, Menschen oder größere Tiere zu untersuchen. Die

Versuchstiere wurden in einen kleinen Plexiglaskäfig gesetzt, welcher im optimalen Messfeld des Ganzkörperzählers positioniert wurde. Diese Maßnahme war notwendig, um die Messgeometrie der Ratten als punktförmige Strahlungsquelle annehmen zu können.

2.3.4 Applikation der Belastungslösungen

Zum Zeitpunkt $\Delta T = 0$ Tage erfolgte die radioaktive Belastung der insgesamt 23 Ratten. Pro Ratte wurden jeweils 500 μl (102480 Bq ^{59}Fe) der oben beschriebenen Belastungslösung mittels Knopf-Schlundsonde appliziert. Im Ganzkörperzähler wurde damit ein Wirkungsgrad von durchschnittlich 45 % erreicht.

Um die Ganzkörperretention in Prozent der applizierten Strahlendosis verfolgen zu können, wurde nach einer Woche (ΔT [Tage] = 7) und nach zwei Wochen (ΔT [Tage] = 15) erneut im HAMCO gemessen.

Es erfolgte jeweils eine Messserie von 10 mal 10 Sekunden. Gezählt wurden die Counts pro Sekunde [CPS] und aus den einzelnen Messeinheiten wurde der Durchschnittswert bestimmt.

3 Ergebnisse

Über eine Versuchsdauer von 36 Wochen wurden 59 weibliche Wistarratten mit einer alkohol- und eisenhaltigen Diät gefüttert. Im Verlauf wurden etwa alle drei bis vier Wochen in Serum und Leber die Konzentrationen antioxidativer Vitamine (Ascorbinsäure, α -Tocopherol und Retinol) bestimmt, um Hinweise auf eine bestehende Lipidperoxidation zu gewinnen.

In einem zweiten Versuch wurde die Eisenaufnahme bei eisen- und nicht-eisenüberladenen Ratten mittels ^{59}Fe in Abhängigkeit von einer gleichzeitigen Ethanolexposition untersucht.

3.1 Verlauf der Lebereisenkonzentrationen

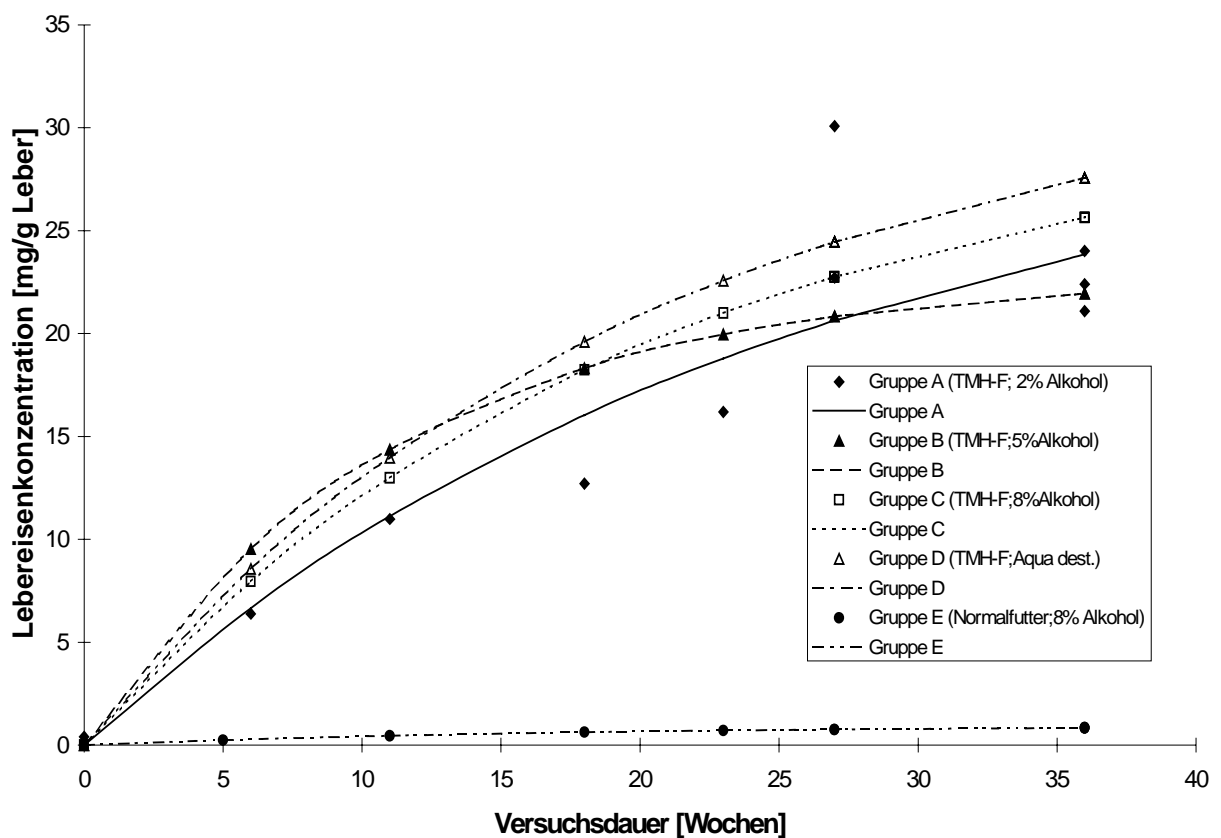


Abbildung 12 Verlauf der Lebereisenkonzentrationen über die Versuchsdauer von 36 Wochen. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) zwischen den Gruppen A, B, C und D untereinander, jedoch zwischen diesen und Gruppe E ($p < 0,05$).

(übernommen aus Doktorarbeit Ulrike Meyer)

Abbildung 12 zeigt den exponentiellen Verlauf der Lebereisenkonzentrationen der fünf Versuchsgruppen. Man erkennt die hohe Eisenüberladung der Gruppen A bis D. Eine zusätzliche Alkoholexposition bei gleichzeitiger Eisenüberladung wirkt sich nicht auf die Lebereisenkonzentration aus. Die reine Alkoholgruppe (8 % Ethanol) zeigt nur einen geringen Anstieg der Lebereisenkonzentration. Durch die TMH-Ferrosen-Diät konnten

durchschnittliche Lebereisenkonzentrationen von bis zu 28 mg Fe/g Leber erzielt werden. Die nicht eisenüberladene Gruppe hatte lediglich eine Lebereisenkonzentration von 6,7 mg Fe/g Leber. Dies war gegenüber dem Referenzbereich gering, aber signifikant verändert.

3.2 Histologie

Histologisch und histochemisch (Berliner-Blau-Reaktion) wurden nach einer Versuchsdauer von 36 Wochen die Lebern in den verschiedenen Versuchsgruppen untersucht.

Hier zeigte sich, dass alle mit TMH-Ferrosen gefütterten Tiere eine massive Eisenüberladung sowohl in den Hepatozyten als auch in den Kupffer-Zellen bzw. anderen Makrophagen in den Periportalfeldern aufwiesen. Unterschiede bestanden jedoch bezüglich der Bindegewebsvermehrung in den Gruppen mit Eisenüberladung.

Die alleinige Eisengabe führte nach 36 Wochen zur Leberzirrhose/fibrose. Unterschiedlich waren die Ergebnisse bei zusätzlicher Alkoholexposition. Bei einer solchen in geringer Konzentration (2%) kam es nur zu einer mäßigen Vermehrung von Bindegewebe ohne Zerstörung der Leberarchitektur. Eine hohe Alkohol- (8 %) zusätzlich zur Eisenbelastung verminderte hingegen nicht den massiven bindegewebigen Umbau des Organs. Alkohol allein in dieser Konzentration schädigte die Leber überhaupt nicht.

3.3 Verlauf der Gesamt- und Lebermassen

Es wurden die Körper- und Lebermassen der Versuchstiere bestimmt und in einem Graphen gegen die Versuchsdauer aufgetragen, um die Entwicklung einer unphysiologischen Massenzunahme der Lebern besser erkennbar machen zu können.

Bei Betrachtung von Abbildung 13 fällt auf, dass es bei den eisen- und alkoholexponierten Gruppen (A, B und C) und in der „reinen“ Eisengruppe (D) zu einem Anstieg des Leber-/Körpermasse-Quotienten kommt. Gruppe A zeigt eine Zunahme um 18%, Gruppe B um 3,2%, Gruppe C um 21% und Gruppe D um 22%. Deutlich hiervon hebt sich die Gruppe E ab, die eine Abnahme der Lebermassen/Körpermassen-Relation aufweist und sich im Referenzbereich bewegt. Gruppe E unterscheidet sich signifikant von den anderen Gruppen ($p < 0,05$).

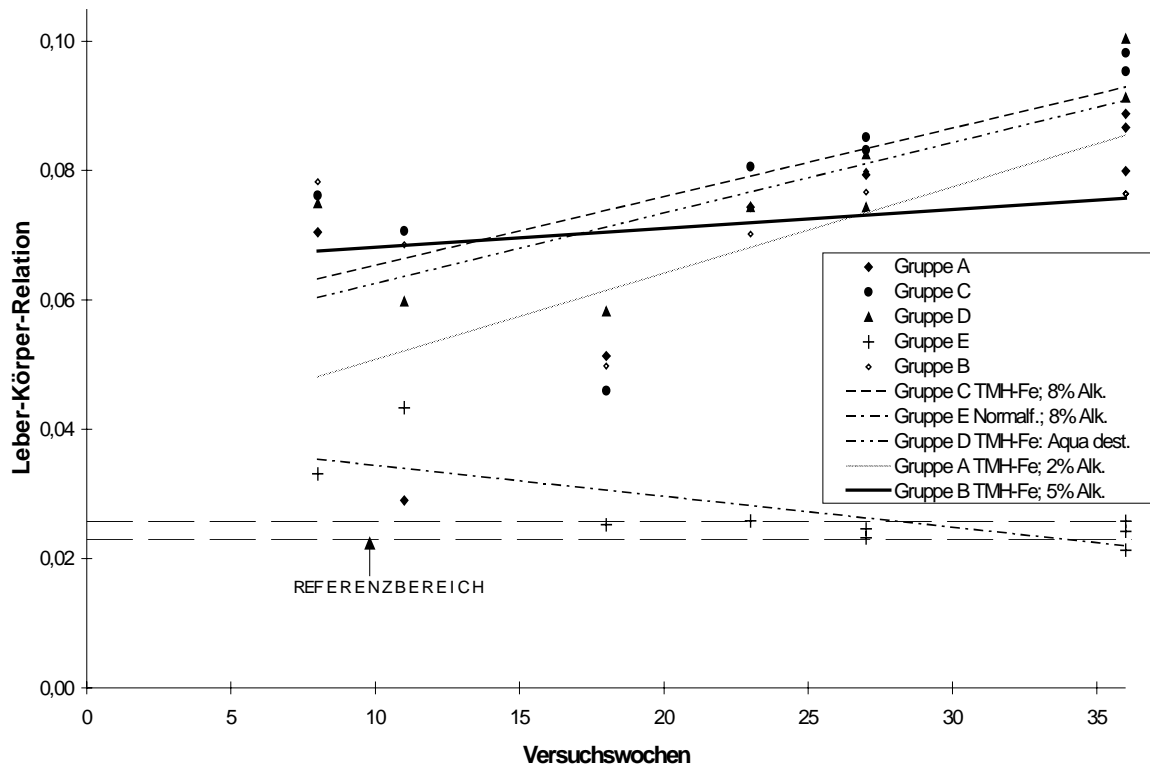


Abbildung 13 Darstellung der Lebermassenzunahme in Relation zur Körpermasse der Versuchstiere. In den Gruppen A bis D kommt es, in Abhängigkeit zur Versuchsdauer, aufgrund einer Hypertrophie der Leber zu einer, relativ zur Gewichtszunahme des Körpers, vermehrten Zunahme der Lebermassen. Lediglich die Gruppe mit ausschließlicher Ethanolexposition zeigt eine Abnahme dieses Quotienten. Referenzbereich: $0,024 \pm 0,002$.

Die anderen ersten vier Gruppen liegen bereits nach sechs Wochen deutlich oberhalb des Referenzbereiches und steigen stetig linear an. Der Referenzwert wurde als Mittelwert von 9 normalen Wistarratten angenommen und liegt bei $0,024 \pm 0,002$.

3.4 Vitamin C in Plasma und Leber

In diesem Versuch wurden die Vitamin-C-Spiegel in Plasma und Leber mittels HPLC gemessen und die erhaltenen Vitamin-C-Konzentrationen in einem Schaubild in Abhängigkeit von der Versuchsdauer dargestellt (siehe Abbildung 19).

3.4.1 Vitamin C im Plasma

I. Beispielchromatogramm

Abbildung 14 zeigt ein Beispielchromatogramm, welches über den elektrochemischen Detektor ermittelt wurde. Nach 4,61 Minuten Laufzeit stellt sich der Vitamin-C-Messpeak deutlich von der Basislinie getrennt dar.

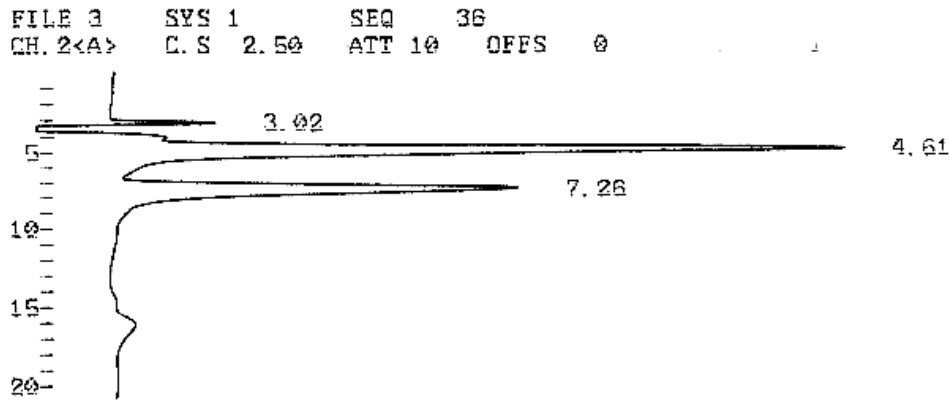


Abbildung 14 Beispielchromatogramm für die Messung von Vitamin C im Plasma mit elektrochemischer Detektion. Nach einer Retentionszeit von 4,61 Minuten stellt sich der Vitamin-C-Peak dar. Es wurde eine eisenüberladene Ratte mit 5% Ethanol im Trinkwasser gemessen (Gruppe B). Bei den Peaks nach 3,02 und 7,26 Minuten handelt es sich um Artefakte.

II. Messergebnisse

In einer Kontrollgruppe von normalen Ratten ($n = 9$) wurde eine mittlere Konzentration von $0,29 \pm 0,07 \mu\text{g}$ Vitamin C / ml Plasma als Referenzwert bestimmt.

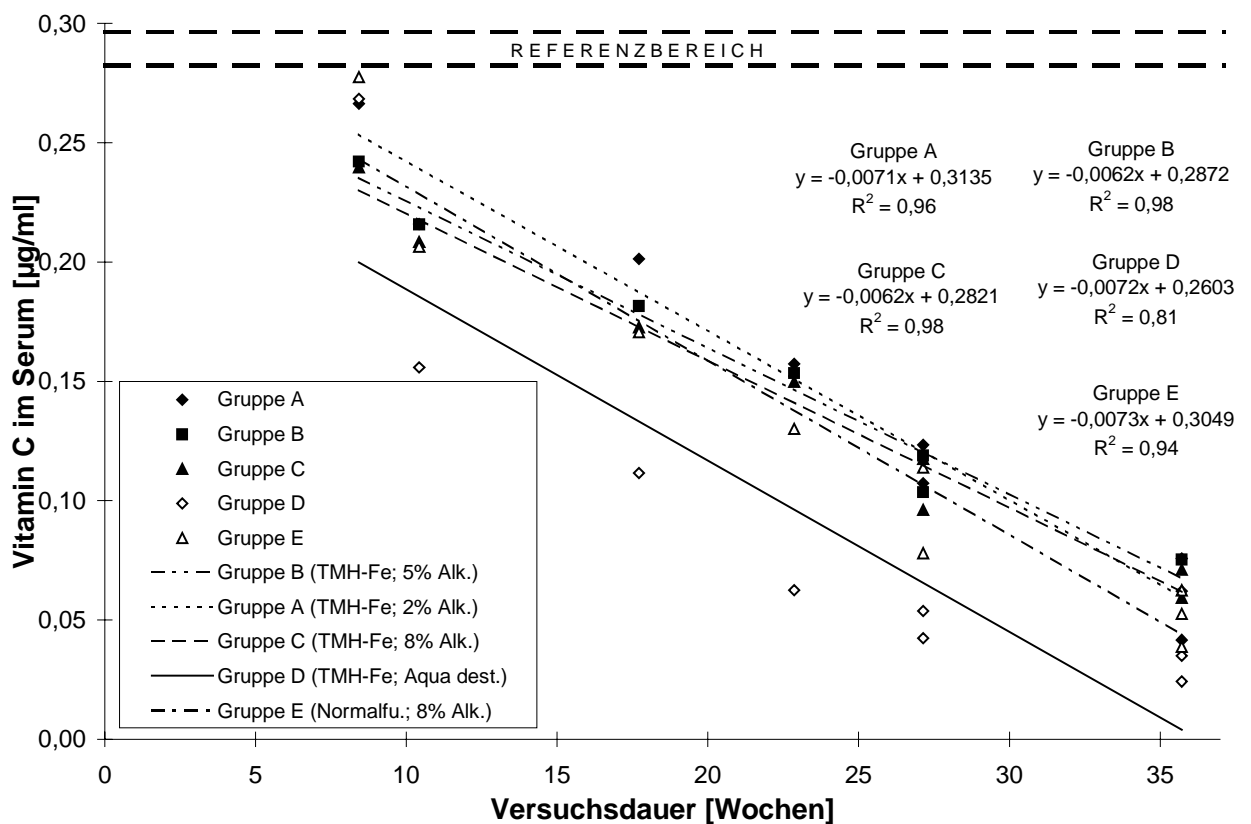


Abbildung 15 Darstellung der Vitamin-C-Konzentration im Plasma [$\mu\text{g}/\text{ml}$] in den Gruppen A - E in Abhängigkeit von der Versuchsdauer [Wochen]. Referenzbereich: $0,29 \pm 0,07 \mu\text{g}$ Vitamin C / ml Serum. Bestimmung im elektrochemischen Detektor mittels Amperometrie. Signifikante Unterschiede bestehen nur zwischen den Gruppen A, B, C und E zu Gruppe D ($p < 0,04$).

Abbildung 19 zeigt, dass bereits zum ersten Messtermin die Vitamin-C-Plasmaspiegel deutlich unter dem Referenzbereich liegen. Alle Gruppe lassen einen linearen Abfall der peripheren Vitamin-C-Konzentration erkennen. Nach 36 Wochen hat die eisenüberladene Gruppe (D) signifikant niedrigere Werte als alle anderen Gruppen ($p < 0,05$). Die Gruppen A, B, C und E weisen keine signifikanten Unterschiede untereinander auf ($p > 0,05$).

3.4.2 Vitamin C in der Leber

I. Beispielchromatogramm

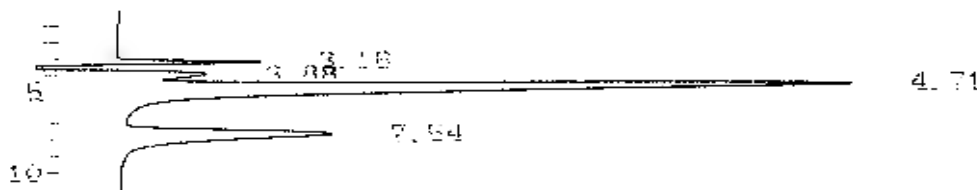


Abbildung 16 Beispielchromatogramm für die Messung von Vitamin C in der Leber mittels HPLC und elektrochemischem Detektor. Es wurde eine eisenüberladene und mit 5 % Ethanol befütterte Ratte gemessen (Gruppe B) Der Vitamin-C-Messpeak stellt sich nach 4,71 Minuten dar. Bei den andern Peaks handelt es sich um Artefakte.

II. Messergebnisse

Vitamin C in der Leber wurde mittels HPLC und elektrochemischen Detektor in verdünnten Leberhomogenaten bestimmt und der Verlauf des Vitaminspiegels in Abhängigkeit zur Versuchsdauer dargestellt. Der Referenzbereich beträgt $30,5 \pm 1,9 \mu\text{g Vitamin C / g Leber}$. Dieser wurde anhand des Mittelwertes aus neun weder eisenüberladenen noch ethanolbelasteten Wistarratten (Gruppe F) ermittelt.

In der Leber konnten bis zu Faktor 80 größere Vitamin-C-Konzentrationen als im Serum gemessen werden. Es weisen alle Gruppen einen deutlichen und linearen Abfall der Vitamin-C-Konzentration in der Leber auf. Verglichen mit dem ermittelten Referenzbereich liegen die nach vier Wochen gemessenen Werte für die Gruppen A - E bereits deutlich niedriger. Die rein eisenüberladene Gruppe weist nach 36 Wochen Versuchsdauer signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Werte als die übrigen Gruppen auf, während zwischen den Gruppen A, B, C und E untereinander keine Unterschiede bestehen ($p > 0,05$).

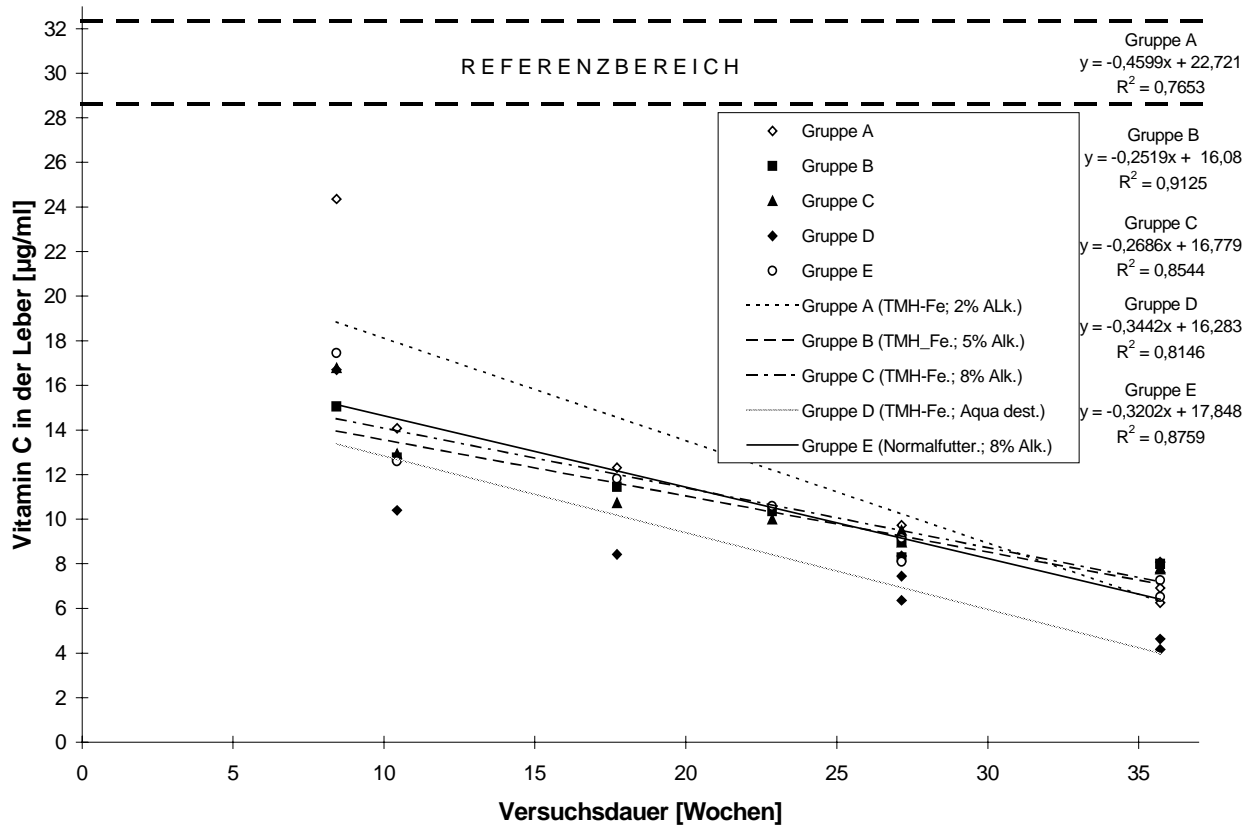


Abbildung 17 Darstellung der Vitamin-C-Konzentration in der Leber bei den Gruppen A - E im zeitlichen Verlauf. Referenzbereich: $30,5 \pm 1,9 \mu\text{g Vitamin C} / \text{g Leber}$. Bestimmung im elektrochemischen Detektor mittels Amperometrie. Signifikante Unterschiede bestehen am Versuchsende nur zwischen den Gruppen A, B, C und E zu Gruppe D ($p < 0,04$).

3.5 Vitamin E

3.5.1 Vitamin E im Serum

I. Beispielchromatogramm

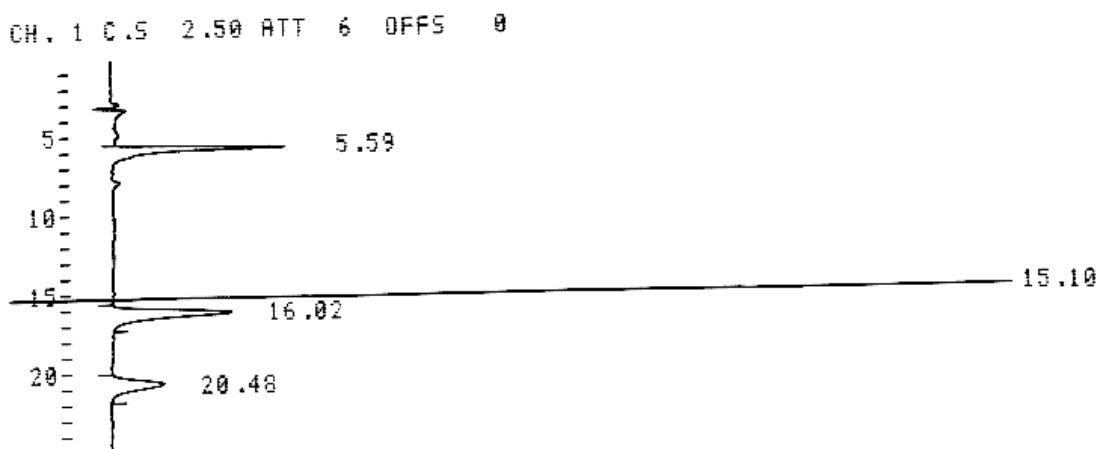


Abbildung 18 Beispielchromatogramm für die Bestimmung von Vitamin-E-Acetat und Vitamin A im Serum. Detektionsmethode: UV-Detektion. Dargestellt ist der Messpeak einer eisenüberladenen und mit 5% Alkohol befütterten Ratte. Nach einer Retentionszeit von 5.59 min stellen sich der Messpeak für Retinol, nach 15.10 min der Umschaltpeak (siehe Material und Methoden), nach 16.02 Minuten der α -Tocopherolpeak und nach 20.48 min der Kontrollpeak für Tocopherolacetat dar.

Die Vitamine E, A und Vitamin-E-Acetat wurden in einer gemeinsamen HPLC-Anordnung simultan bestimmt. Hierzu war es aufgrund der verschiedenen Absorptionsmaxima von Vitamin A (325 nm) und Vitamin-E-Acetat nötig, nach Erscheinen des Vitamin-A-Peaks die Wellenlänge des UV-Detektors auf das Absorptionmaximum von Vitamin-E-Acetat (275 nm) umzuschalten. Der Umschaltpeak zeigt sich im Abbildung 22 nach 15.10 Minuten.

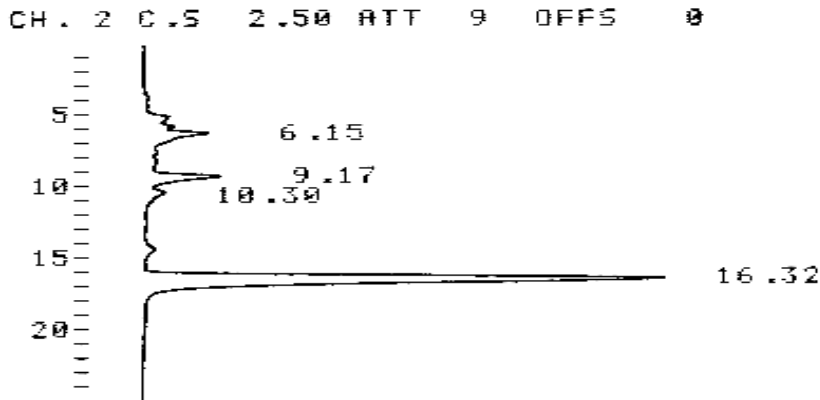


Abbildung 19 Beispielchromatogramm für Vitamin E im Serum mittels HPLC. Dargestellt ist das Ausgangssignal des Fluoreszenzdetektors. Dargestellt ist der Messpeak einer eisenüberladenen und mit 5% Ethanol befütterten Ratte. Nach einer Retentionszeit von 16.32 min stellt sich der Messpeak für Vitamin E dar. Bei den vorangehenden Peaks handelt es sich um Artefakte.

Vitamin E wurde im Fluoreszenzdetektor dargestellt (siehe Abbildung 23).

II. Messergebnisse

Abbildung 24 stellt Vitamin E im Serum in Abhängigkeit von der Versuchsdauer dar bei den Gruppen A – E dar. Auf der Abszisse des Graphen ist die Zeit aufgetragen, auf der Ordinate der Vitamin-E-Serumspiegel.

Zu Beginn des Versuchs liegen alle Gruppen deutlich oberhalb des Referenzbereiches. Bereits hier sind die Vitamin-E-Spiegel der Gruppe E (nur 8 % Ethanol) signifikant niedriger ($p < 0,05$) als in allen anderen Gruppen. In allen anderen Gruppen kann eine lineare Abnahme ($R^2 > 0,9$) der Vitamin-E-Konzentration festgestellt werden. Zum Versuchsende hin gleichen sich alle Gruppen einander an, die anfänglich signifikanten Unterschiede heben sich auf. Keine der Gruppen unterschreitet während der Versuchsdauer den Referenzbereich ($0,33 \pm 0,09 \mu\text{g}$ Vitamin E / ml Serum, $n = 9$). Als Referenzbereich wurde der Mittelwert der Vitamin-E-Konzentrationen aus neun normalen Ratten eingesetzt.

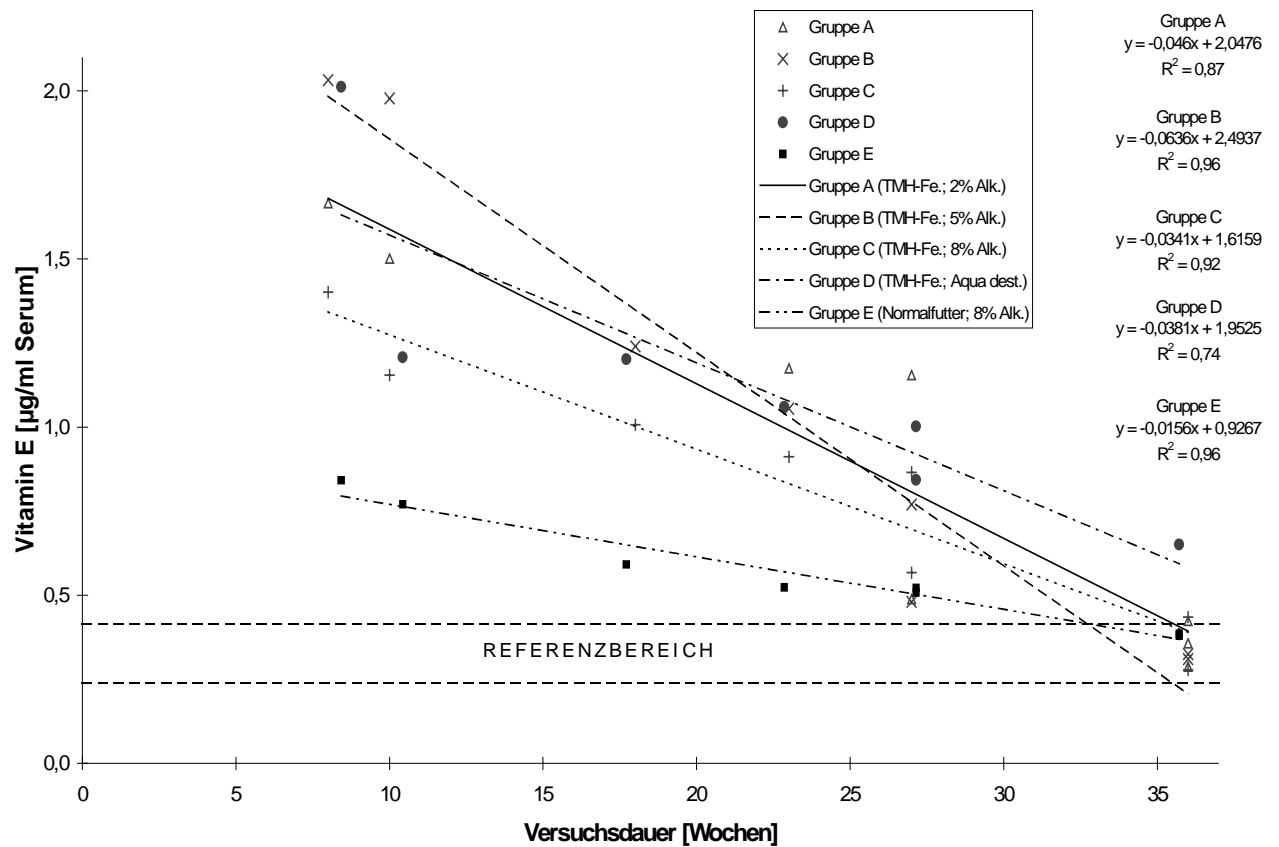


Abbildung 20 Übersicht Vitamin E im Serum [$\mu\text{g/ml}$] in den verschiedenen Gruppen in Abhängigkeit von der Versuchsdauer [Wochen]. Referenzbereich $0,33 \pm 0,09 \mu\text{g Vitamin E / ml Serum}$.

3.5.2 Vitamin E in der Leber

I. Beispielchromatogramm

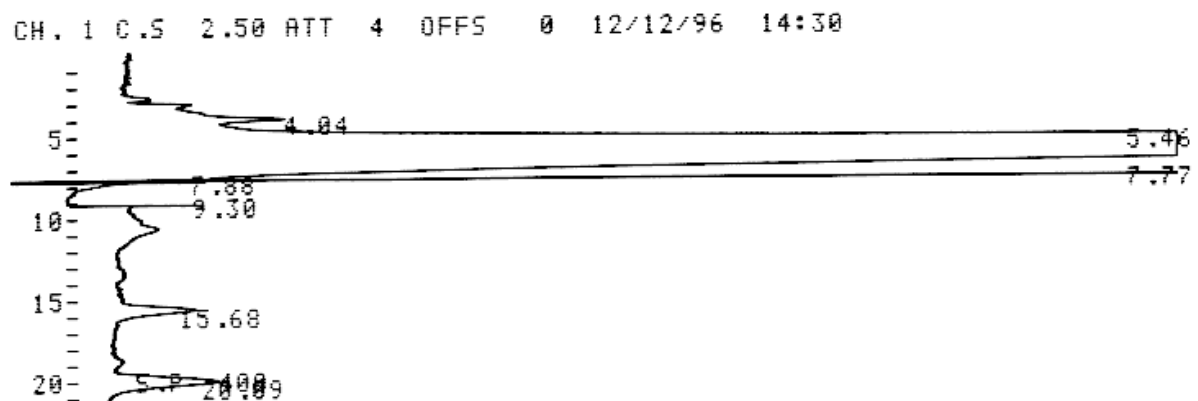


Abbildung 21 Beispielchromatogramm für Vitamin-E-Acetat in der Leber mittels HPLC. Dargestellt ist das Ausgangssignal des UV-Detektors (275 nm). Der Vitamin-E-Messpeak einer eisenüberladenen und mit 5% Ethanol befütterten Ratte (Gruppe C) zeigt sich nach 18.68 min. Nach 20.09 Minuten zeichnet sich der Vitamin-E-Acetat-Peak ab.

Wie auch bei der Bestimmung von Vitamin-E-Acetat und Vitamin A im Serum wird eine HPLC-Anordnung verwendet, die eine simultane Messung von Vitamin E, Vitamin-E-Acetat und Vitamin A zulässt. Abbildung 25 zeigt nach einer Retentionszeit von 5.46 Minuten den Vitamin-A-Peak, nach 7.77 Minuten den Umschaltpeak, nach 15,68 Minuten den Vitamin-E-Peak und nach 20.09 Minuten Laufzeit den Vitamin-E-Acetat-Peak. Abbildung 26 zeigt die Bestimmung von Vitamin E in der Leber mittels Fluoreszenzdetektor (siehe hierzu auch 3.5.1).

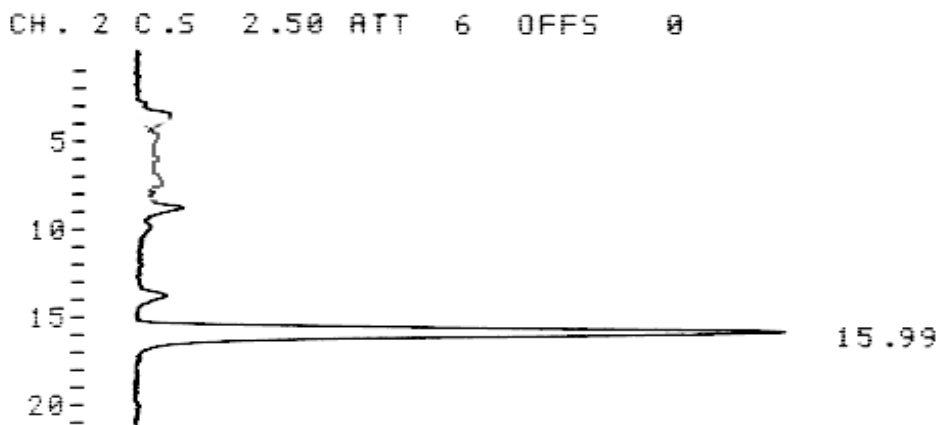


Abbildung 22 Beispielchromatogramm für Vitamin E in der Leber mittels HPLC. Dargestellt ist das Ausgangssignal des Fluoreszenzdetektors. Der Messpeak für Vitamin E erscheint nach 15.99 Minuten.

II. Messergebnisse

Es wurden in den jeweiligen Versuchsgruppen A - E und der Referenzgruppe die Konzentration von Vitamin E in der Leber im zeitlichen Verlauf mittels HPLC bestimmt. Der Referenzwert beträgt hier $15,63 \pm 3,2 \mu\text{g Vitamin E / g Leber}$. Dieser wurde aus einer Gruppe aus neun weder eisenüberladenen noch ethanolexponierten Wistar-Ratten als Durchschnittswert ermittelt.

Nach Auftragen der gemessenen Werte in Abbildung 27 fällt auf, dass alle Versuchsgruppen wiederum eine ähnliche Kinetik aufweisen wie die Serumwerte. Der Referenzbereich ist zu Beginn der Versuche deutlich überschritten (Faktor 1,5 – 2), um dann zwischen Woche 30 und 36 unter den Referenzbereich abzufallen. Alle Gruppen zeigen einen linearen Abfall der Vitamin-E-Werte. Gegen Versuchsende bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vitamin-E-Werten der verschiedenen Gruppen.

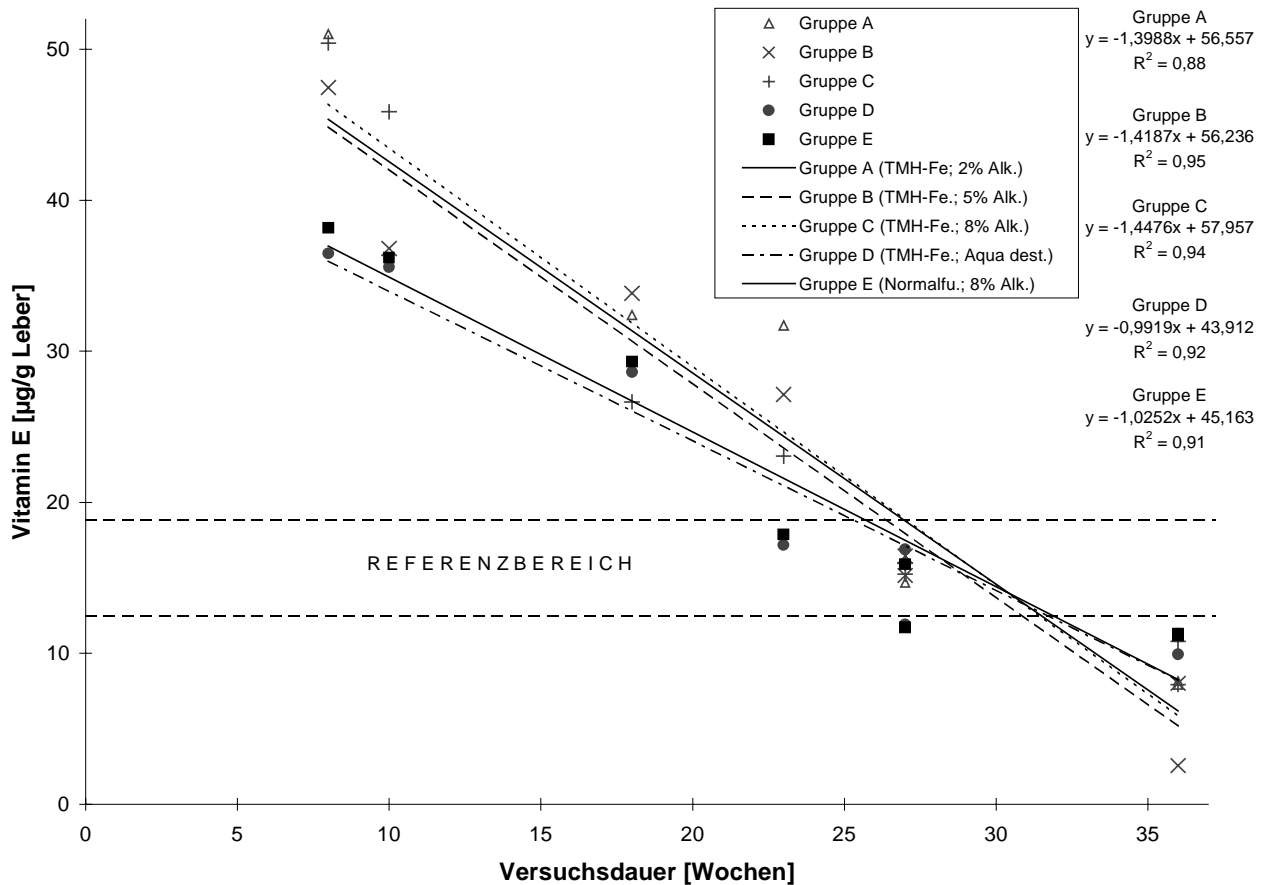


Abbildung 23 Vitamin E in der Leber [$\mu\text{g} / \text{g}$ Leber (Nassgewicht)] in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Referenzbereich $15,63 \pm 3,2 \mu\text{g}$ Vitamin E / g Leber.

3.6 Vitamin A

3.6.1 Vitamin A im Serum

I. Beispielchromatogramm

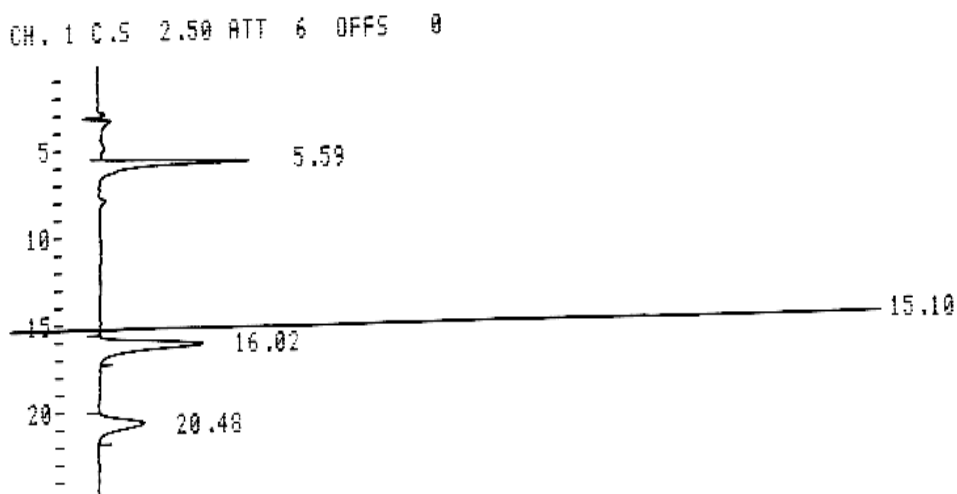


Abbildung 24 Beispielchromatogramm für die Bestimmung von Vitamin A im Rattenserum: UV-Detektion bei 325 nm Wellenlänge. Dargestellt ist der Messpeak einer eisenüberladenen und mit 5 % Alkohol befütterten Ratte. Nach einer Retentionszeit von 5.59 min stellen sich der Messpeak für Retinol, nach 15.10 min der

Umschaltpeak (siehe Material und Methoden), nach 16.02 min der α -Tocopherolpeak und nach 20.48 min der Kontrollpeak für Tocopherolacetat dar.

Diese HPLC-Anordnung gestattete eine simultane Messung von Vitamin E, Vitamin-E-Acetat und Vitamin A. Ein Beispielchromatogramm hierzu zeigt Abbildung 28. Siehe hierzu auch 3.5.1.

II. Messergebnisse

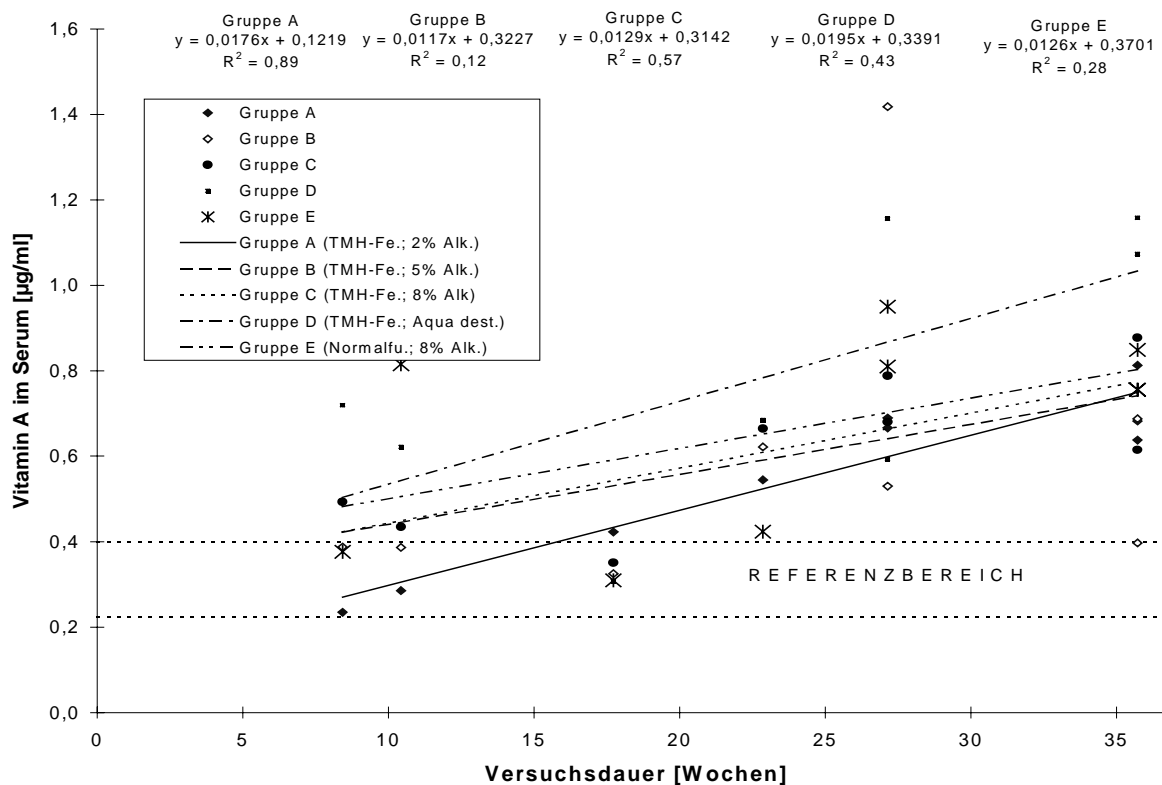


Abbildung 25 Vitamin A im Serum [$\mu\text{g/ml}$] in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Referenzbereich $0,31 \pm 0,09 \mu\text{g Vitamin A /ml Serum}$.

Abbildung 29 zeigt den Verlauf der Vitamin-A-Konzentrationen im Serum der Gruppen A bis E. Alle fünf Gruppen weisen einen linearen Anstieg der Vitamin-A-Konzentrationen auf. Zu Beginn liegen die gemessenen Werte im Referenzbereich. Nach 36 Wochen Versuchsdauer bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

3.6.2 Vitamin A in der Leber

I. Beispielchromatogramm

Zur Verdeutlichung wird in Abbildung 30 ein repräsentatives Messchromatogramm abgedruckt. Aufgrund der relativ hohen Konzentrationen von Retinol stellen sich die Messpeaks für Vitamin E und Vitamin-E-Acetat sehr klein dar.

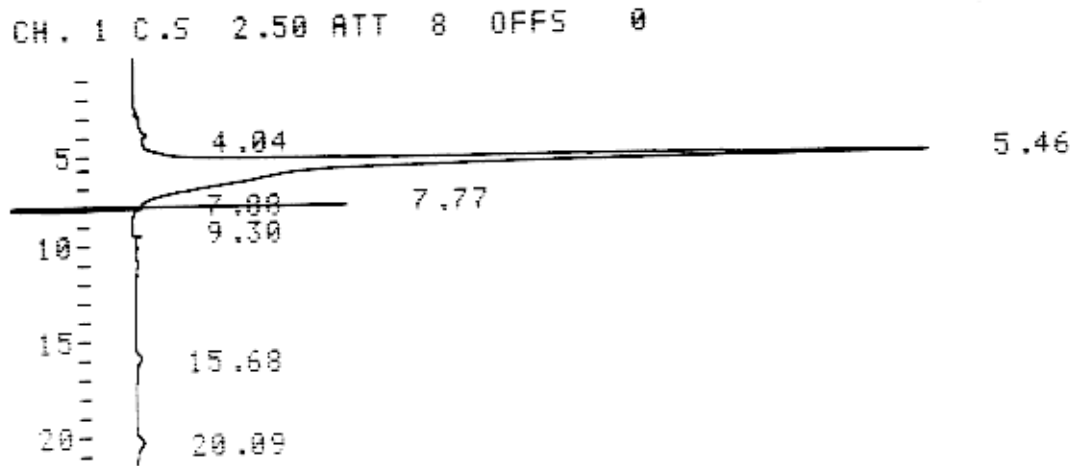


Abbildung 26 Beispielchromatogramm für die Bestimmung von Vitamin A in der Leber mittels HPLC. Dargestellt ist das Ausgangssignal des UV-Detektors (Wellenlänge: 325 nm). Nach einer Retentionszeit von 5.46 Minuten stellt sich der Messpeak von Retinol dar. Nach 15.68 Minuten zeigen der Messpeak von Vitamin E und nach 20.09 Minuten der von Vitamin-E-Acetat.

II. Messergebnisse

Für Vitamin A in der Leber zeigen alle Gruppe einen exponentiellen Verlauf der Vitamin-Konzentrationen und nähern sich asymptotisch gegen Null (siehe Abbildung 31). Die einzelnen Gruppen unterscheiden sich untereinander nicht signifikant ($p > 0,05$). Nach etwa 15 Wochen Versuchsdauer wird der Referenzbereich von allen Gruppen unterschritten. Als Referenzbereich wird der Mittelwert der Vitamin-A-Konzentrationen von neun weder eisenüberladenen noch ethanolexponierten Ratten angenommen.

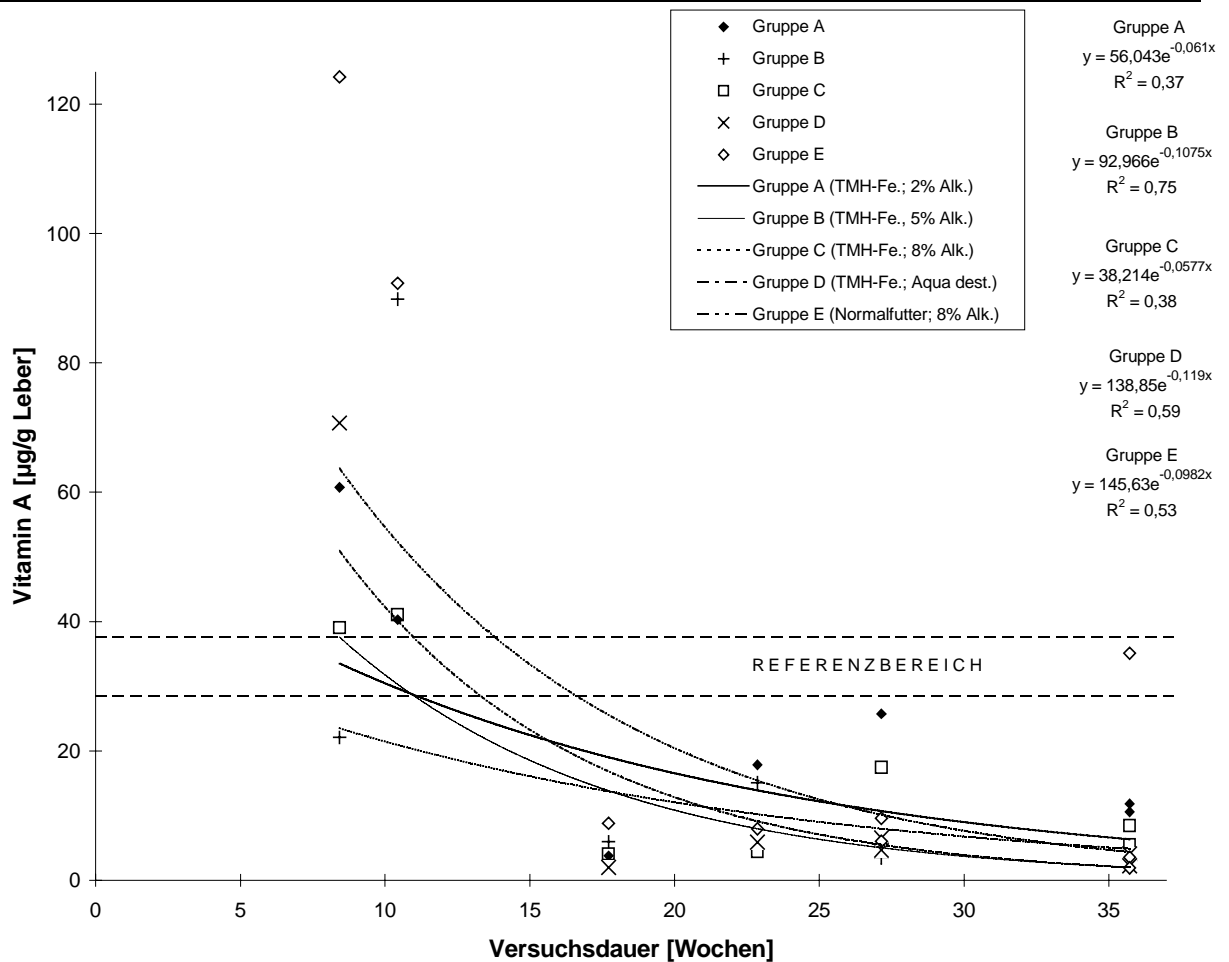


Abbildung 27 Übersicht Vitamin A in der Leber [$\mu\text{g/ml}$] in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Referenzbereich $33,0 \pm 4,31 \mu\text{g Vitamin A /g Leber}$. Zu Beginn liegen die gemessenen Werte teilweise über dem Referenzbereich, jedoch nach 15 Versuchswochen haben diesen alle Gruppen unterschritten. Zwischen den Versuchsgruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

3.7 Intestinale Eisenabsorption einer Testdosis $^{59}\text{Fe(II)}$ Sulfat bei Ratten mit normalen bzw. überladenen Eisenspeichern. Einfluss von Ethanol im Applikationsmedium.

In diesem Versuch wurde die intestinale Eisenabsorption von $^{59}\text{Fe(II)}$ Sulfat (1 mg Fe) untersucht. Die Testdosis mit dem radioaktive Eisen wurde per Schlundsonde bei Ratten mit und ohne Eisenüberladung appliziert und die Ganzkörperretention im Hamburger Counter (HAMCO) nach 0, 7 und 14 Tagen gemessen. Als Lösungsmedium diente Wasser oder eine ethanolsche Lösung (40 Vol.-%).

Abbildung 32 zeigt die Unterschiede in der Ganzkörperretention bei den verschiedenen Gruppen.

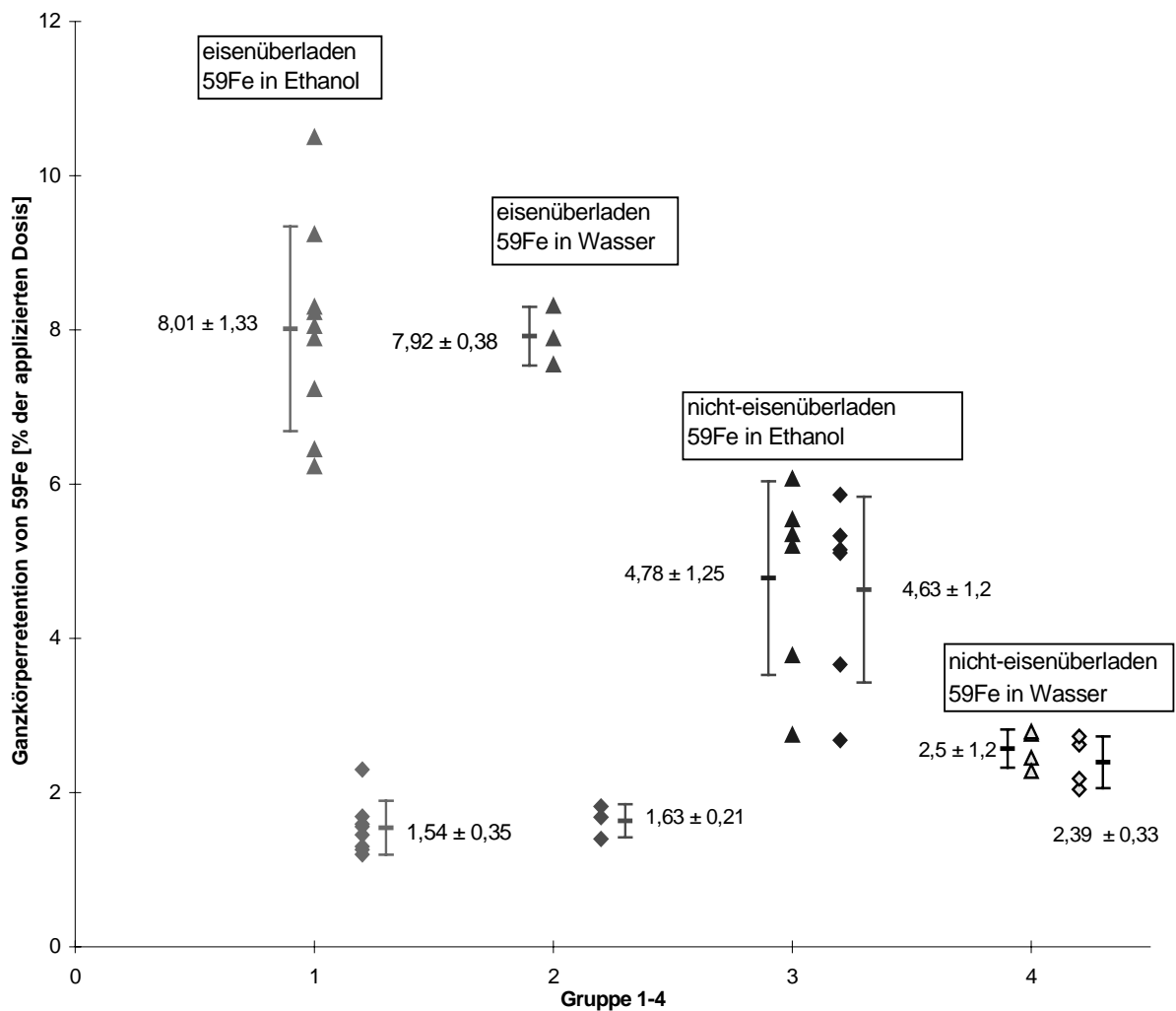


Abbildung 28 Darstellung der prozentualen Retentionen der Versuchsgruppen 1 bis 4. Links sind jeweils die Werte aus der ersten Rückmessung ($\Delta T = 7$ Tage), rechts die der zweiten Rückmessung ($\Delta T = 15$ Tage) aufgetragen.

Einfluss der Eisenreserven auf die intestinale Eisenabsorption

Als Maß für die Eisenabsorption kann in diesem Versuch aufgrund der intestinalen Verluste innerhalb der ersten 7 Tage nur die 15 Tage-Retention herangezogen werden. Hierbei ergibt sich im Vergleich eine signifikant höhere Eisenabsorption bei den Ratten mit normalen Eisenreserven gegenüber den eisenüberladenen Ratten ($p < 0.05$). Dies dokumentiert die bekannte Herabregulation der intestinalen Absorption für ionisches Eisen im Zustand der gefüllten Eisenreserven.

Auffällig ist der große Unterschied zwischen der 7- und der 15-Tage-Retention bei den eisenüberladenen Ratten. Der „Uptake“ von Eisen aus der Testdosis in die Mukosazellen des oberen Darmtraktes (Duodenum und teilweise Jejunum) ist viel größer (ca. 8 % aus der

Testdosis) als die letztendlich im Ganzkörper retinierte Dosis (ca. 1.5 %) Dieses Ergebnis belegt den relativ niedrigen „Mukosa-Plasma-Transfer“ bei den eisenüberladenen, genetisch normalen Ratten. Ein großer Anteil des aufgenommenen Eisens wird in der Mukosazelle gespeichert und nicht ins Plasma weitergegeben. Bei Abschilferung dieser Darmzellen nach wenigen Tage geht dieser Anteil der Testdosis über das Darmlumen verloren und wird fäkal ausgeschieden. Interessanterweise ist der Uptake von Eisen in die Mukosazelle bei eisenüberladenen Ratten relativ größer als bei normalen Ratten.

Einfluss des Lösungsmediums (Wasser, ethanolische Lösung) auf die intestinale Eisenabsorption

Ethanol in der Applikationslösung erhöht deutlich die intestinale Eisenabsorption bei Ratten mit normalen Eisenspeichern (15-Tageretention 4.6 % vs. 2.4 %, $p < 0,02$). Dieser Effekt ist bei den eisenüberladenen Ratten nicht mehr sichtbar, bzw. bei der Herunterregulation der Eisenabsorption geht dieser Effekt verloren. Dieser Alkoholeffekt scheint also mehr bei der Uptakephase als beim Mukosa-Plasma-Transfer eine Rolle zu spielen.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand des Ferrozen-Eisenüberladungsmodelles an Ratten [Düllmann J et al (1992), Nielsen P et al. (1993,)] der zusätzliche Effekt einer chronischen Ethanolexposition auf die Lipidperoxidation bei gleichzeitiger Eisenüberladung untersucht. Die Ausprägung der Lipidperoxidation wurde anhand des Antioxidantienstatus (Vitamine A, C und E) indirekt bestimmt und mit der Leberhistologie verglichen. Außerdem wurden die Auswirkungen einer akuten Ethanolexposition auf die intestinale Eisenabsorption bei eisenüberladenen und nicht-eisenüberladenen Ratten eruiert

4.1 Vitamine und Lipidperoxidation

4.1.1 Vitamin C in Serum und Leber

Vitamin C werden anti-lipidperoxidative Eigenschaften zugewiesen. Im Zustand einer gesteigerten Lipidperoxidation kommt es zu einem Verbrauch dieses Vitamins.

Alle Versuchsgruppen zeigten eine lineare Abnahme des Vitamin-C-Spiegels im Plasma. Bereits zum ersten Messtermin nach sechs Wochen lagen die Vitamin-C-Konzentrationen im Plasma aller Gruppen unterhalb des Referenzbereichs. Die „reine“ Eisengruppe wies signifikant niedrigere Vitamin-C-Werte als die kombinierten Gruppen (Ethanolexposition mit Eisenüberladung) bzw. die reine Ethanolgruppe auf. Auch in der Leber zeigten alle Versuchsgruppen einen linearen Abfall des Vitamin-C-Spiegels. Im Vergleich zum Plasma waren die gemessenen Konzentrationen etwa um den Faktor 80 höher. Von allen Gruppen wurde der Referenzbereich bereits nach sechs Wochen deutlich unterschritten. Die rein eisenüberladene Gruppe unterschied sich nach 36 Wochen Versuchszeit durch signifikant niedrigere Werte von den anderen vier Gruppen. Die übrigen Versuchsgruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede untereinander auf.

Die gesteigerte Lipidperoxidation führte in allen Versuchsgruppen zu einer Abnahme der Vitamin-C-Konzentrationen in Plasma und Leber. Dieser Effekt war besonders unter der reinen Eisendiät zu beobachten, wo es zu den höchsten Vitamin-C-Verlusten kam. Bei einer zur Eisenüberladung zusätzlichen Ethanolzufuhr schwächte sich der Vitamin-C-Verbrauch ab und es bestanden keine Unterschiede zwischen einer reinen Ethanolexposition oder der kombinierten Gabe von Ethanol und Eisen. Eine Verstärkung oder sogar Potenzierung des Vitamin-C-Verbrauchs durch die zusätzliche Ethanolapplikation war in allen Gruppen (2-8 %

Ethanol im Trinkwasser) also definitiv auszuschließen. Somit zeigt eine Ethanolexposition in den hier verwendeten Konzentrationen bei gleichzeitiger Eisenüberladung eher antioxidative, protektive Eigenschaften.

Der Effekt einer kombinierten Gabe von Ethanol und Eisen auf den Antioxidantienstatus wurde bisher nur selten untersucht. Die meisten Arbeiten beziehen sich jeweils entweder auf eine alleinige Ethanolexposition oder eine alleinige Eisenüberladung. Ein protektiver Effekt von Ethanol auf die Lipidperoxidation bei bestehender Eisenüberladung konnte noch nicht nachgewiesen werden. In zahlreichen Versuchen konnte jedoch der protektive Effekt von Vitamin C auf die Lipidperoxidation belegt werden. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Literaturstellen.

| Autor | Jahr | Versuch | Ergebnisse |
|-------------------|-------------|--|--|
| Videla et al. | 1984 | Sauerstoffverbrauch von Hepatozyten | Absinken des Sauerstoffverbrauchs in mit Fe und Ethanol belasteten Rattenlebern |
| Houglum KP et al. | 1991 | Malondialdehyd-Methode | Steigerung der Lipidperoxidation durch Vit C, dieser Effekt kann durch Vit E aufgehoben werden |
| Dabbagh et al. | 1994 | Ratten: Leber und Plasma | Eisenüberladung verursachte massive Verluste an Vit E, C und A in Serum und Leber |
| Berger TM et al. | 1997 | Vit C im Plasma eisenüberladener Menschen, F2-Isoprostane als Marker der Lipidperoxidation | Vit C wirkt sowohl anti- als auch prooxidativ in Abhängigkeit von redox-aktiven Metallionen; antioxidativer Effekt von Vit C in Gegenwart von Eisen besonders gut. |

Tabelle 3 Übersicht über die Literatur bezüglich der Auswirkungen von Ethanol und Eisen auf die Lipidperoxidation.

Dass eine Eisenüberladung zu einem ausgeprägten Vitamin-C-Verbrauch führen kann, wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt. Ähnlich wie in der hier vorliegenden Arbeit kam es in Versuchen mit Ratten mit bestehender Eisenüberladung zu einem starken Absinken des Vitamin-C-Spiegels in Serum und Leber. Die Eisenüberladung wurde für das Ausmaß des peroxidativen Schaden verantwortlich gemacht [Dabbagh AJ (1994)]. Ähnliche Ergebnisse konnten auch Dillard und Mitarbeiter zeigen. Sie wiesen einen direkten Zusammenhang zwischen einer Eisenüberladung in-vivo und der Lipidperoxidation nach und konnten den Einfluss von Antioxidantien auf die Stärke der Lipidperoxidation bei eisenüberladenen Ratten aufzeigen. Folgende Ergebnisse wurden beschrieben: 1. Es bestand ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Lipidperoxidation und einer Eisenüberladung 2. Ratten mit niedriger Vitamin-C-Diät zeigten eine signifikant gesteigerte Lipidperoxidation. 3. Eine bestehende gesteigerte Lipidperoxidation konnte durch Zugabe von Vitamin C

vermindert werden. Vitamin C konnte somit vor einer gesteigerten Lipidperoxidation schützen. [Dillard CJ (1984)].

Videla et al. führten 1984 Versuche durch, in welchen Rattenlebern mit ethanol- oder eisenhaltigen Lösungen perfundiert wurden. Als Marker für die Lipidperoxidation wurde der Sauerstoffverbrauch des untersuchten Gewebes gemessen. Dieser Sauerstoff wird zu Ein-Elektronen-Transfers im Zuge der Lipidperoxidation benötigt. Somit sollte der gesteigerte Sauerstoffbedarf eine gesteigerte Lipidperoxidation anzeigen. Ein Zusatz von Ascorbinsäure in den Perfusionslösungen zeigte ein Absinken des Sauerstoffverbrauchs der Hepatozyten. Eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs war sogar proportional zur Eisen- bzw. Alkoholkonzentration der Perfusionslösung. [Videla LA (1984)].

Berger et al. konnten in ihrer 1997 veröffentlichten Studie über die antioxidative Wirkung von Vitamin C im Plasma eisenüberladener Patienten demonstrieren, dass Vitamin C als antioxidatives Agens auch am Menschen wirksam ist. Besonders in der Gegenwart von redoxaktiven Metallionen konnte Ascorbinsäure eine Steigerung der Lipidperoxidation verhindern. Somit wirkt Vitamin C antioxidativ in Gegenwart von Eisenionen. Setzte man im gleichen Versuch dem Plasma in-vitro noch Eisen hinzu, stieg die Lipidperoxidation stark an, und es kam zu einem Verbrauch von Vitamin C. Eine wichtige Beobachtung bei diesen Versuchen war, dass eine gesteigerte Lipidperoxidation nur bei sehr niedrigen Vitamin-C-Spiegel (< zehn Prozent der Ausgangskonzentration) vorlag [Berger TM (1997)]. Dies deutet evtl. auf eine Schwellenkonzentration von Vitamin C hin, oberhalb der Vitamin C auch in-vivo antioxidativ wirksam sein könnte.

4.1.2 Vitamin E in Serum und Leber

Referenzbereich für Vitamin E

Die physiologischen Vitamin-E-Speicher in der Leber sind ca. 50-100-fach höher als die im Plasma zirkulierende Vitamin E-Menge. Der hier gemessene Referenzwert für Vitamin E im Serum ($0,33 \pm 0,09 \mu\text{g Vitamin E / ml}$) für weibliche Wistar-Ratten wurde am Ende einer 36-wöchigen Fütterung (Lebensalter zu diesem Zeitpunkt ca. 10 Monate) von Altromin C1000 (164 mg/kg Vitamin E) ermittelt. In der Literatur wird ein leicht höherer Wert angegeben (1,11 $\mu\text{g/ml Serum}$). Hierbei wurde jedoch eine andere Rattenspezies und eine andere Extraktionstechnik [Lang JK (1987)] verwendet, was diese Differenz erklären kann.

Der ermittelte Referenzwert für die Leber Vitamin-E-Konzentration beträgt $15,63 \mu\text{g Vitamin E / g Leber}$. In der Literatur wird ein deutlich niedrigerer Wert von $2,64 \mu\text{g } \alpha\text{-Tocopherol/g}$

Leber (n = 8) angegeben [Friedrich W (1987)]. In der zitierten Arbeitsgruppe wurden zur Extraktion des Vitamin E aus dem Homogenat lediglich 30 Sekunden aufgewendet, während in unserem Fall die Fettphase zwei Minuten lang extrahiert wurde, was durchaus ein Grund für die Abweichung darstellen kann.

Die Leber ist das Hauptspeicherorgan für Vitamin E. Bei erhöhtem Bedarf im Rahmen einer gesteigerten Lipidperoxidation kommt es zu einem Freisetzen von Vitamin E aus den Speichern, um so möglichst hohe Konzentrationen am Schädigungsort aufbauen zu können.

Bei den Messungen von Vitamin E in Serum und Leber zeigte sich generell eine lineare Abnahme dieses Parameters während des gesamten Versuches, wobei Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nur im Anfangsbereich der Messungen sichtbar wurden (und zwar deutlicher im Serum als in der Leber). Die ausschließlich mit Alkohol befütterte Gruppe wies dabei jeweils die niedrigsten Vitamin-E-Werte auf.

Zu Beginn der Vitamin-E-Messungen (8. Woche) lagen die Werte aller Gruppen signifikant über dem Referenzbereich. Die eindeutige Erklärung dieses Effektes ist schwierig, weil leider kein entsprechendes Probenmaterial von den Versuchstieren vor Versuchsbeginn (am Tag Null) zur Verfügung stand. Außerdem wurde der Referenzbereich in Tieren unter Normalfutter am Ende des Versuches bestimmt. Es könnte also sein, dass Vitamin E im Serum und teilweise auch in der Leber von Ratten im wesentlichen altersabhängig abfällt. Dieser Effekt könnte den eiseninduzierten Verbrauch von Vitamin E überlagern. Denkbar ist auch, in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus der Literatur, dass Vitamin E aus der Leber ins Plasma freigesetzt wird und dass damit zu Beginn einer signifikanten Lipidperoxidation sogar erhöhte Serum-Vitamin-E-Spiegel vorliegen könnten [Kawase T (1989)].

Insgesamt ist damit fraglich, ob das Heranziehen von Vitamin E als indirekten Marker für oxidativen Stress unter diesen Versuchsbedingungen Sinn macht. Man kann höchstens über einen absinkenden Vitamin-E-Spiegel auf ein lipidperoxidatives Geschehen Rückschlüsse ziehen. Da jedoch der Vitamin-E-Serum-Spiegel von so vielen verschiedenen Faktoren abhängt (so z.B. Nahrung mit täglichen Schwankungen und auch sich ändernde Spiegel der Blutlipidzusammensetzung), können einmalige Bestimmungen von Vitamin E in keinem Fall als hinreichend gelten. In einer verbesserten Versuchsanordnung müsste man wohl auch auf eine Vitamin E arme Diät übergehen, um die ständige effektive Nachlieferung von Vitamin E aus dem Futter zu begrenzen.

Die Auswirkungen einer Kombination einer Alkohol- und Eisenüberladung auf den Vitamin-E-Stoffwechsel bei Ratten wurde bisher nur unzureichend untersucht. Die meisten Literaturangaben beziehen sich auf die einzelne Noxe, also entweder Alkohol oder Eisen (siehe Tabelle 4).

Dass eine gesteigerte Lipidperoxidation durch eine chronische Eisenüberladung und Befütterung von Ratten mit Ethanol zu einem starken Abfall von α -Tocopherol führt, konnten auch Wisniewska-Knypl und Wronska-Nofer 1994 zeigen. Ratten wurden 15 Monate lang mit Ethanol und eisenhaltigem Futter gefüttert; in dieser Zeit kam es zu einer deutlichen Steigerung der Lipidperoxidation. Der oxidative Stress zeigte sich in einem Absinken der Konzentration von Vitamin E. Wisniewska-Knypl empfiehlt daher auch, den Vitamin-E-Spiegel (neben anderen) im Serum als direkten Marker für das Ausmaß des oxidativen Stresses heranzuziehen. In dieser Studie wurde angegeben, dass der prooxidative Effekt von Ethanol durch die vorbestehende Eisenüberladung verstärkt wird. Das Absinken der Vitamin-E-Spiegel im Serum wird neben Malondialdehyd als geeigneter Parameter angesehen, um Rückschlüsse auf die Lipidperoxidation ziehen zu können [Wisniewska-Knypl JM (1994)]. Diese Arbeitsgruppe verwendete einen ähnlichen Versuchsaufbau wie in vorliegender Arbeit. Die unter diesen Bedingungen gewonnenen Ergebnisse waren jedoch unterschiedlich. In der vorliegenden Arbeit konnte bei Eisenüberladung keine weitere Schädigung durch eine Ethanolexposition ausgelöst werden.

Kawase et al. fanden 1989, dass es bei gleichzeitiger Gabe von Ethanol und einer niedrig-dosierten Vitamin-E-Diät zu verminderten Vitamin-E-Spiegeln in der Leber kam. Gleichzeitig wurden erhöhte Serum-Konzentrationen für Vitamin E beobachtet. Dieses wurde hier durch die erhöhten Plasma-Lipide erklärt. Die Kombination von Ethanol und Eisen hatte die stärkste Auswirkung auf das Abfallen der Vitamin-E-Konzentration in der Leber [Kawase T (1989)].

Ähnliche Ergebnisse konnten auch Dabagh et al. (1994) zeigen. Sie wiesen bei einer bestehenden Eisenüberladung nach, dass es im Zuge einer gesteigerten Lipidperoxidation im Plasma zu einem starken Absinken des Vitamin-E-Spiegels kam. Zusätzlich kam es zu den bereits beschriebenen Veränderungen im Lipidhaushalt der Ratten: Hypercholesterinämie und Hyperlipidämie. In der Leber konnte jedoch kein signifikantes Absinken der Konzentration von Vitamin E gezeigt werden [Dabagh AJ (1994)]. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Bacon et al. [Bacon BR (1986)]. Im Unterschied zu der hier vorliegenden Arbeit mit Leber-Eisenkonzentrationen von 20-30 mg/g war allerdings der Schweregrad der Lebersiderose bei

den Versuchstieren in diesen beiden Arbeiten sehr viel geringer, wodurch ein eindeutiger Verbrauch von Leber-Vitamin-E bei den TMH-Ferrozen-Ratten erklärt werden könnte.

Bei Ratten mit Eisenüberladung unter Vitamin-E-armer Diät kann eine bestehende, gesteigerte Lipidperoxidation durch Zugabe von α -Tocopherol vermindert werden [Dillard CJ (1984)].

Objektive Befunde, dass dieser Schutzeffekt von Vitamin E gegenüber einer gesteigerten Lipidperoxidation auch beim Mensch gilt, liegen z.Zt. noch nicht vor. Entsprechende Therapieversuche wären allerdings naheliegend, da bekannt ist, dass bei Patienten mit einer langjährig bestehenden Hämochromatose teilweise deutlich verminderte Serumspiegel der antioxidativ wirkenden Vitamine C, E und A vorliegen [Young IS (1994)].

| Autor | Jahr | Versuch | Ergebnisse |
|-------------------------|------|--|--|
| Dillard CJ et al. | 1984 | Pentanabatmung bei eisen überladenen Ratten | Eisenüberladene Ratten atmen deutlich mehr Pentan ab, als Normalratten. Lipidperoxidation ist unter niedrig dosierter Vitamin E Diät gesteigert. |
| Bacon BR et al. | 1986 | MDA, Mitochondrien aus Rattenlebern; eiseninduzierte Lipidperoxidation | Antioxidantien konnten die Bildung von Malondialdehyd verhindern und die mitochondriale Funktion konnte aufrecht erhalten werden. |
| Kawase T et al. | 1989 | Wirkung von Alkohol auf hep. Lipidperoxidation Unter-suchung von Vit C und E | Chronische Befütterung mit Alkohol steigert Lipidperoxidation. Hohe Vit E Serumspiegel bei gesteigerter Lipidperoxidation |
| Dabagh AJ et al. | 1994 | eisenüberladenen Ratten Vit E, C und A in Leber | Unter gesteigerter Lipidperoxidation kommt es zum Absinken der Vit E, C und A Spiegel in der Leber. Peroxidativer Schaden steht in direktem Zusammenhang mit Eisenüberladung |
| Young IS et al. | 1994 | Vit A, C und E im Serum eisenüberladener Patienten (Hämochromatose) | Beziehen des Vit E Spiegels auf das Serum Cholesterin -> Verbesserte Abschätzung |
| Wisniewska-Knypl et al. | 1994 | Vit E im Serum | Ethanol bewirkt oxidativen Stress, dies äußert sich in einem Absinken der Vit E Konzentration im Serum Stimulierung der Lipidperoxidation durch Vit C in Abwesenheit von Ethanol |

Tabelle 4 Übersicht über die wichtigsten Literaturstellen bezüglich Vitamin E, Lipidperoxidation, Eisenüberladung und Ethanolexposition.

4.1.3 Vitamin A

Bei der Messung von Vitamin A im Serum ergaben sich wie bei Vitamin E im Serum keine spezifischen Entwicklungen. Im Serum stiegen die Werte aller Gruppen über die gesamte Versuchszeit deutlich an, wobei zwischen den fünf Gruppen keine signifikanten Unterschiede bestanden ($p > 0,05$). Zu Beginn der Messungen in Woche 8 waren noch fast alle Messwerte im Referenzbereich ($0,31 \pm 0,09 \mu\text{g Vitamin A / ml}$) und stiegen danach auf das 2-4-fache an.

In der Leber zeigten die gemessenen Vitamin-A-Konzentrationen einen starken Abfall und gingen fast asymptotisch gegen null, was einen eindeutigen Vitamin-A-Verbrauch anzeigt. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den fünf Gruppen ($p > 0,05$).

Das Speicherorgan für Vitamin A ist die Leber. Die Leberkonzentration liegen um den Faktor 100 höher als im Plasma. Im Zuge einer eiseninduzierten, generellen Membranschädigung kam es offenbar zu einer bedarfsorientierten Freisetzung von Vitamin A aus der Leber ins Plasma, um die Radikale im Serum abzufangen. Diese Modell würde den Verlauf von Vitamin A in Plasma und Leber erklären.

Die Kombination von Ethanol und Eisen zeigte in der vorliegenden Studie keinen zusätzlichen Effekt auf das Ausmaß der Lipidperoxidation.

Den Zusammenhang zwischen erhöhtem Serum-Vitamin-A-Spiegel und erniedrigtem Leber-Vitamin-A-Spiegel zeigte bereits die Studien von Sato und Lieber an Ratten 1982. Hier kam es nach akuter Ethanolexposition zu einem Absinken des Vitamin-A-Gehalts in der Leber innerhalb eines Tages. Gleichzeitig wurde ein Anstieg dieses Parameters im Serum gefunden. Einerseits werden hierfür der gesteigerte periphere Bedarf an Vitamin A, welcher eine vermehrte Freisetzung dieses Vitamins aus der Leber bewirkt, andererseits eine verminderte Aufnahme von Retinylestern in die Leber verantwortlich gemacht [Sato M (1982)]. Vitamin A ist daher als äußerst stark antilipidperoxidativ wirkendes Vitamin einzustufen.

Wang et al. zeigten 1998, dass eine chronische Alkoholgabe die Vitamin-A-Konzentrationen in Rattenlebern im Vergleich zur Referenzgruppe drastisch vermindern kann; als möglicher Mechanismus wird eine gestörte Vitamin-A-Aufnahme diskutiert [Wang XD (1998)]. Ähnliche Ergebnisse konnten auch bereits 1986 von Mobarhan et al. bei chronisch mit niedrig-dosiertem Ethanol befütterten Ratten gefunden werden. Hier kam es sowohl im Leber- als auch im Ösophagusgewebe zu reduzierten Vitamin-A-Konzentrationen. Während in der Leber die Vitamin-A-Konzentration bereits unter den Referenzbereich gesunken war, zeigten sich im Serum immer noch weiter über den Referenzbereich steigende Vitamin-A-Werte [Mobarhan S (1986)]. Dieses Ergebnis konnte in vorliegendem Versuch sowohl bei rein eisenüberladenen als auch bei ausschließlich ethanolexponierten Tieren und bei der Kombination aus diesen beiden Noxen gefunden werden.

Als äußerst sensibler indirekter Parameter für die Lipidperoxidation hat sich das Vitamin A in der Leber herausgestellt. In allen fünf Gruppen zeigten sich stark abfallende Serum- und Leberwerte dieses Vitamins. Erhöhte Vitamin-A-Spiegel in Serum oder in der Leber können

jedoch nur begrenzt in der Lage sein, eine gesteigerte Lipidperoxidation anzuzeigen, denn in vorliegender Arbeit konnten keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gefunden werden. Entscheidend ist hier die Tendenz über eine längere Zeit. Ein Kurvenverlauf kann dabei den Vitaminverbrauch deutlich anzeigen.

Weitere Literaturstellen werden in Tabelle 5 dargelegt.

| Autor | Jahr | Versuch | Ergebnisse |
|--------------------|------|---|--|
| Dabagh AJ et al. | 1994 | eisenüberladenen Ratten Vit E, C und A in Leber | Unter gesteigerter Lipidperoxidation kommt es zum Absinken der Vit E, C und A Spiegel in der Leber. Peroxidativer Schaden steht in direktem Zusammenhang mit Eisenüberladung |
| Young IS et al. | 1994 | Vit A, C und E im Serum eisenüberladener Patienten (Hämochromatose) | Beziehen des Vit E Spiegels auf das Serum Cholesterin -> Verbesserte Abschätzung |
| Teare JP et al. | 1994 | MDA, Vit E und A im Serum | Chronische Befütterung mit Alkohol steigert Lipidperoxidation. Hohe Vit E und MDA Serumspiegel |
| Antebi H et al. | 1995 | Lipoproteine bei eisenüberladenen Ratten | Veränderung der Zusammensetzung der Lipoproteine; Widerstand gegenüber oxidativen Prozessen hängt vom Vorhandensein von Antioxidantien ab. |
| Whittaker P et al. | 1996 | eisenüberladene Ratten, Vit E | Vit E und A haben hemmenden Einfluss auf eiseninduzierte Lipidperoxidation; Anstieg von Vit E und A in Leber bei Lipidperoxidation. |
| Augustin W et al. | 1997 | Glutathion, Mitochondrien Tocopherol; | extramitochondriale protektive Systeme: haupts. Vit C, mitochondriale Systeme: haupts. Vit E und Vit A |

Tabelle 5 Übersicht über die Literatur bezüglich Vitamin A, Lipidperoxidation, Ethanol und Eisen.

4.2 Intestinale Eisenabsorption einer Testdosis $^{59}\text{Fe(II)}$ Sulfat bei Ratten mit normalen bzw. überladenen Eisenspeichern. Einfluss von Ethanol im Applikationsmedium.

In diesem Versuch wurden die Versuchstiere in vier Gruppen eingeteilt. Jeweils zwei dieser Gruppen setzten sich aus eisenüberladenen, die anderen aus nicht-eisenüberladenen Tieren zusammen. Den Versuchstieren aller vier Gruppen wurden zum Zeitpunkt $\Delta T = 0$ Tage eine mit ^{59}Fe radioaktiv markierte Eisendosis (1 mg Fe) oral appliziert und die von den Tieren aufgenommene Eisenmenge mittels eines Ganzkörperszintillators quantifiziert. Jeweils eine Gruppe der eisen- und der nicht eisenüberladenen Tiere erhielten ihre Eisendosis in ethanolischer, die anderen beiden Gruppen in wässriger Lösungsgrundlage. Nach $\Delta T = 7$ Tagen und nach $\Delta T = 15$ Tagen wurden Rückmessungen durchgeführt. Der 15-Tage-Wert beschreibt die endgültige Aufnahme von intestinal absorbiertem Eisens in den Organismus durch die Blut-Darm-Schranke hindurch. Der 7-Tage-Retentionswert enthält daneben auch

noch einen Anteil von ^{59}Fe , der nur in die Darmmukosa aufgenommen wird (Mukosa-uptake).

Bei eisenüberladenen Tieren konnten zwischen einer Gabe des Eisens in Ethanol oder in Wasser keine Unterschiede festgestellt werden. Demgegenüber konnte bei nicht-eisenüberladenen Ratten die mukosale Eisenaufnahme durch eine Applikation der Eisendosis in Ethanol signifikant gesteigert werden. Eisenüberladene Tiere nehmen demnach vermehrt Eisen in die Enterozyten auf, können dieses Eisen jedoch nicht an das Blut weitergeben. Dieses in den Enterozyten gespeicherte Eisen geht durch die physiologische Zellabschilferung wieder verloren – ein für sekundäre Eisenüberladung typischer Befund. Im Zuge der Eisenüberladung kommt es hier also zu einer Herunterregulation der intestinalen Eisenabsorption durch die vergrößerten Eisenspeicher.

Eine starke Eisenspeicherung beim Menschen in Verbindung mit Alkohol wurde 1964 erstmals bei einem afrikanischen Stamme (Bantu) festgestellt. Bei den Bantu wurde Bier in großen Eisenkesseln gebraut. Bei diesem Prozess wurden beträchtliche Eisenmengen in einem alkoholischen Getränk gelöst (ca. 100 mg/l) [Bothwell TH (1966) und Seftel HC (1966)]. Die untersuchten Stammesmitglieder, die regelmäßig dieses Getränk zu sich nahmen, wiesen maximale Lebereisenkonzentrationen von ca. 20 mg/g Leber (Nassgewicht) auf [Powell L (1981)]. Hier wird deutlich, dass es zu einer verstärkten Eisenaufnahme in Verbindung mit Ethanol kam, wie es sich auch in vorliegender Arbeit bei den nicht-eisenüberladenen Tieren zeigte. Gründe für die gesteigerte Eisenaufnahme unter dem Alkoholeinfluss konnten bisher noch nicht gefunden werden. Ein Erklärungsversuch ist, dass es unter der Applikation von Alkohol zu einer gesteigerten Magensaftsekretion und einer verstärkten Bildung von Salzsäure kommt. Eine vermehrte Bildung von Salzsäure kann nachweislich die Aufnahme von Fe(III)-Ionen im proximalen Duodenum verbessern [Cook JD (1964)]. Eine andere Theorie geht hier von veränderten Magen- oder Pankreassekretionsprodukten aus, welche diesen steigernden Effekt haben könnten [Grace ND (1974)].

Duane et al. konnten demonstrieren, dass bei chronischen Alkoholikern die intestinale Eisenaufnahme um ein Mehrfaches gegenüber einer Kontrollgruppe gesteigert ist. In der gleichen Studie durchgeführte Versuche mit Mukosa-Biopsaten ergaben, dass bei diesen chronischen Alkoholikern ein nicht steuerbarer, parazellulärer Eisenaufnahmeprozess zur Eisenüberladung führte [Duane P (1993)]. Dieser parazelluläre Transportmechanismus könnte auch im Zuge einer akuten Eisenaufnahme gesteigert sein. Dieser könnte durch eine Ethanolapplikation direkt ansprechbar sein und so für die erhöhte Eisenaufnahme sorgen.

Dieser evtl. vorhandene Effekt tritt allerdings bei dem TMH-Ferrosen-Eisenüberladungsmodell nicht erkennbar in Erscheinung, weil es hierbei schon nach kurzer Versuchsdauer zu einer exzessiven Eiseneinlagerung in den Versuchstieren kommt. Für zukünftige Versuche in dieser Richtung sollte deshalb besser eine weniger potentes Modell (z.B. Carbonyl-Eisen) mit einer schwächeren Eisenaufnahme herangezogen werden.

Andere Arbeitsgruppen konnten in ihren Untersuchungen keine Veränderung am Eisenaufnahmeprozess durch eine Alkoholgabe erkennen: So wurde in einer 1993 von Batey und Johnston veröffentlichten Arbeit diskutiert, ob Alkoholkonsum, Leberverfettung bzw. Leberzirrhose für ein Ansteigen der intestinalen Eisenabsorption oder der Eisenaufnahme in die Leber (im Rattenmodell) verantwortlich sind [Batey RG (1993)]. Dieses Ergebnis konnte in vorliegender Arbeit bei den eisenüberladenen, nicht jedoch bei den nicht-eisenüberladenen Tieren bestätigt werden. Beim Menschen scheinen möglicherweise andere Effekte eine Rolle zu spielen. So konnten Celada et al. 1977 in einem Versuch zeigen, dass eine definierte Testdosis Eisen in Verbindung mit Whiskey sogar weniger gut aufgenommen wurde als ohne. Nach Dealkoholisierung des Whiskeys kam es allerdings auch zu den gleichen Ergebnissen [Celada A (1977)].

Welchen Einfluss Ethanol auf molekularer Ebene auf Eisenuptake und Transfer hat, ist bisher nicht bekannt. 1997 wurde ein protonengekoppelter Metall-Ionen Transporter (DCT1=DMT1) charakterisiert, der wahrscheinlich für den Eisenuptake der ^{59}Fe -Testdosis direkt verantwortlich ist. Hierbei handelt es sich um einen Transporter mit einem ungewöhnlich großen Substratspektrum (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+}) [Gunshin H (1997)]. DMT1 vermittelt einen aktiven, membranpotentialabhängigen, protonengekoppelten Metallionentransport im Darm; sein hauptsächliches Vorkommen ist im proximalen Duodenum. Ein DMT1-Analog gilt heute allgemein als wichtigster Aufnahmemechanismus für ionisches Eisen wahrscheinlich auch beim Menschen. Im Zustand des Eisenmangels kommt es nachweislich zu einer Hochregulation des DCT1, im Zustand der Eisenüberladung zu einer zu einer Herunterregulation

Die Hochregulation von DCT1 scheint so eine verstärkte orale Eisenaufnahme im Zustand eines Eisenmangels zu bewirken. Eine Alkoholapplikation könnte diesen Metallionen-Aufnahme-Mechanismus direkt oder indirekt beeinflussen. Experimentelle Befunde darüber sind bis heute nicht bekannt.

Über die molekulare Basis des Eisen-Transportes durch die Basalmembran ist noch wenig bekannt, über einen möglichen Alkoholeffekt kann nur spekuliert werden.

| Autor | Jahr | Versuch | Ergebnisse |
|-------------------|------|--|---|
| Cook JD et al. | 1964 | Wirkung von HCl auf Eisenaufnahme | HCl kann Eisenaufnahme steigern |
| Celada A et al. | 1977 | Wirkung von Whisky auf die Fe Aufnahme | Verminderte intestinale Fe-Aufnahme unter Whiskyexposition |
| Celada A et al. | 1978 | Ganzkörperszintillator | Stimulation der Dünndarmmukosa zur vermehrten Eisenaufnahme und erhöhter Plasma-Eisen-Turnover im Zustand des Folsäuremangels |
| Powell L et al. | 1981 | Fe Bestimmung in der Leber | Bantu-Siderose, starke orale Eisenaufnahme zusammen mit Ethanol führt zu Eisenüberladung |
| Mazzanti R et al. | 1987 | Effekt von chronischen Ethanolgaben auf Eisenabsorption | Verminderung des allgemeinen Umsatzes der Darmmukosazellen; weniger Fe kann abgegeben werden |
| Duane P et al. | 1992 | Untersuchung von Alkoholikern bzgl. Eisenaufnahme | Eisenaufnahme ist bei Alkoholikern gegenüber Kontrollgruppe um ein Vielfaches gesteigert; Postulat eines parazellulären Aufnahmemechanismus |
| Batey RG et al. | 1993 | Untersuchung der Fe Aufnahme am Rattenmodell | Alkohol führt nicht zu einer gesteigerten intestinalen Fe-Absorption oder Eisenaufnahme in der Leber |
| Zhang H et al. | 1993 | Lebereisenstatus und Lebereisenaufnahme unter chronischem Ethanoleinfluss an der Ratte | Alkohol steigert die hepatische Ferritinaufnahme signifikant unter Ethanoleinfluss. |
| Gunshin H et al. | 1997 | Western-Blot, DCT1 | Aufdecken eines protonengekoppelten Kationentransporters in der Duodenalschleimhaut |

Tabelle 6 Übersicht über die Literatur bezüglich Eisenabsorption unter dem Einfluss einer Ethanolexposition.

Die hier vorliegenden Ergebnisse deuten daraufhin, dass Ethanol möglicherweise bei Ratten mit normalen Eisenreserven einen stimulierenden Einfluss auf den intestinalen Eisenuptake hat, d.h. evtl. direkt auf DMT1 einwirkt. Der Transport durch die Basalmembran scheint unter diesen Bedingungen keine limitierende Rolle zu spielen; denn alles Eisen wird weiter ins Plasma transportiert, so dass auch die Ganzkörperretention letztendlich bei gleichzeitiger Gabe von Ethanol ansteigt.

Bei eisenüberladenen Tieren ist zwar der Mukosa-uptake auch deutlich höher als die Ganzkörper-Retention nach 15 Tagen, aber dies gilt auch für die Gruppe ohne Alkohol, so dass dies keinen Alkoholeffekt widerspiegeln muss. Wohl auch unabhängig vom Ethanol wird bei den eisenüberladenen Tieren der Transport der aufgenommenen Eisenmenge ins Plasma stark herunterreguliert, die letztendlich retinierte Menge Eisen im Ganzkörper ist in jedem Fall relativ niedrig

5 Zusammenfassung

Hintergrund der hier dargestellten Versuche ist die in der Literatur häufig geführte Diskussion, ob und inwieweit eine zusätzliche Alkoholzufuhr die eiseninduzierten Zell- und Organschäden bei Eisenüberladungserkrankungen (Hämochromatose, Posttransfusions-siderose) beeinflusst. Als wesentlicher Mechanismus der Organschädigung bei Eisenüberladung wird die Lipidperoxidation angesehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden weibliche Wistar-Ratten (n = 59) untersucht, die nutritiv mit Eisen überladen und zusätzlich alkoholexponiert wurden. Die Eisenüberladung wurde durch Fütterung einer mit Trimethylhexanoyl-Ferrosen (TMH-Ferrosen) angereicherten Diät erreicht (0.5 % im Futter über eine maximal 36-wöchige Versuchsdauer). Diese Eisenzufuhr führt bekanntermaßen zu einer schnellen, progressiven und schweren Siderose, die mit einer hepatozellulären Eisenspeicherung beginnt. In frühen Stadien ist die histologische Eisenverteilung damit mit der erblichen Eisenspeicherkrankheit (hereditäre Hämochromatose) beim Menschen vergleichbar.

Mittels verschiedener HPLC-Methoden wurde die Lipidperoxidation durch den Verbrauch der antioxidativ wirkenden Vitaminen C, E, und A in Serum und Leberhomogenaten der Versuchstiere nachgewiesen. Das Ausmaß der Lipidperoxidation wurde mit lichtmikroskopischen Befunden zur Frage nach dem Vorhandensein von Leberläsionen verglichen. In einem weiteren Experiment wurde die intestinale Eisenabsorption bei normalen und eisenüberladenen Ratten unter dem Einfluss von Alkohol gemessen.

Vitamin C: Unabhängig davon, ob Alkohol oder Eisen als schädigende Noxe eingesetzt wurde, kam es in Serum und Leber zu einer linearen Abnahme der Vitamin C-Konzentration. Eine Abhängigkeit der Reduktion von Vitamin C von der zugeführten Ethanolmenge war nicht ersichtlich. Eine Eisenüberladung allein bewirkte den stärksten Vitamin-C-Verbrauch. Insbesondere besteht kein additiver Effekt von Eisen und Alkohol bei gleichzeitiger Applikation, vielmehr kann eine zusätzliche Alkoholapplikation in niedriger Konzentration den durch Eisen hervorgerufenen Vitamin-C-Verbrauch und damit evtl. auch eine Leberschädigung signifikant vermindern.

Vitamin E: Vom Zeitpunkt der ersten Messung (Versuchswoche 8) bis zum Ende des Versuchs (Versuchswoche 36) fielen die Vitamin-E-Konzentrationen in Serum und Leber ständig ab. Im Serum zeigten sich größere Vitamin-E-Konzentrationen bei gleichzeitiger Gabe

von Ethanol und Eisen als bei einer reinen Alkoholdiät. In der Leber beeinflusst Alkohol die Vitamin-E-Konzentration trotz bestehender Eisenüberladung nicht signifikant.

Vitamin A: Im Serum stiegen in den einzelnen Versuchsgruppen die Vitamin-A-Spiegel an, während in der Leber ein exponentieller Abfall der Vitamin-A-Konzentrationen eintrat. Bei der Gabe von Alkohol und Eisen lagen die Serumspiegel von Vitamin A niedriger als bei der alleinigen Gabe von Eisen. Diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

Vergleich mit der Histologie: Alle eisenüberladenen Tiere zeigten massive Eisenablagerungen zunächst in den Hepatozyten, in der Folge dann aber auch verstärkt in den Kupffer-Zellen. Unterschiede bestanden jedoch bezüglich der Ausbildung einer Leberfibrose/zirrhose in Abhängigkeit vom Ausmaß der gleichzeitigen Ethanolexposition.

Die alleinige Eisengabe führte nach 36 Wochen zur Leberzirrhose/fibrose. Bei geringer Alkoholexposition (2 %) zusätzlich zur Eisenbelastung, kam es nur zu einer mäßigen Vermehrung von Bindegewebe ohne Zerstörung der Leberarchitektur, so dass Alkohol in dieser niedrigen Menge für die Leber einen protektiven Effekt hatte. Eine hohe Alkoholzusätzlich zur Eisenbelastung (8 %) verminderte hingegen nicht den massiven bindegewebigen Umbau des Organs. Alkohol allein in dieser Konzentration schädigte die Leber überhaupt nicht.

Intestinale Eisenabsorption: Die intestinale Eisenabsorption war bei eisenüberladenen Ratten niedriger als bei Ratten mit normalen Eisenspeichern, was einer physiologischen Herabregulation der Eisenabsorption bei überfüllten Speichern entspricht (reduzierter Mukosa-Plasma-Transfer). Ethanol konnte bei eisenexponierten Tieren die Eisenabsorption nicht steigern, bei nicht-eisenüberladenen Tieren jedoch zu einer fast um den Faktor 2 gesteigerten Eisenaufnahme führen.

Insgesamt gibt die vorliegende Untersuchung an Ratten im TMH-Ferrosenmodell Anhaltspunkte dafür, dass eine geringe Menge Alkohol im Trinkwasser die Lipidperoxidation eher hemmt. Dieser biochemische Befund korreliert gut mit den morphologischen Ergebnissen.

6 Literaturnachweis

- Aisen P, Cohen G, Kang JO (1990) Iron toxicosis. *Int Rev Exper Pathol* 31:1-46
- Antebi H, Pages N, Zimmermann L, Bourcier C, Flechet B, Alciner LG (1995) Resistance to oxidation of lipoproteins and erythrocyte membrane lipids in rats with iron overload. *Ann Nutr Metab* 39(1):63-68
- Arad ID, Forman HJ, Fischer AB (1980) Ascorbate efflux from guinea pig and rat lungs. Effect of starvation and O₂ exposure. *J Lab Clin Med.*; 96(4): 673-681
- Augustin W, Wiswedel I, Noack H, Reinhekel T, Reichelt O (1997) Role of endogenous and exogenous antioxidants in the defence against functional damage and lipid peroxidation in rat liver mitochondria. *Mol Cell Biochem* 17 (1-2):199-205
- Bacon BR, O'Neil R, Park CH (1986) Iron-induced peroxidative injury to isolated rat hepatic mitochondria. *J Free Radic Biol Med*, 2 (5-6):339-347
- Bassett M, Halliday JW, Powell LW (1986) Value of hepatic iron measurements in early haemochromatosis and determination of the critical iron level associated with fibrosis. *Hepatology* 6:24-29
- Batey RG, Johnston R (1993) Effects of alcohol, carbon tetrachloride, and choline deficiency on iron metabolism in the rat. *Alcohol Clin Exp Res* 17(5):931-934
- Bendich A, Langseth L. The health effects of vitamin C supplementation (1995) *J Am Coll Nutr* 14(2):124-36
- Berger TM, Polidori MC, Dabagh A, Evans PJ, Halliwell B, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Frei B (1997) Antioxidant activity of vitamin C in iron-overloaded human plasma. *J Biol Chem* 272 25:15656-15660
- Bomford A, Williams R (1976) Long term results of venesection therapy in idiopathic hemochromatosis. *Q J Med* 45:611-623
- Bradbear RA, Bain C, Siskind V, Schofield FD, Webb S, Axelsen EM, Halliday JW, Bassett ML, Powell LW (1985) Cohort study of internal malignancy in genetic hemochromatosis and other chronic nonalcoholic liver diseases. *J Natl Cancer Inst*: 75:81-84
- Buchanan WM (1969) Aetiology of extrahepatic epithelial iron deposits in siderosis in Bantu. *J Clin Pathol* 22(3):296-300
- Catangnani GL (1986) An HPLC method for the simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in plasma and serum. *Methods in Enzymology* 123: 215-219
- Celada A, Rudolf H, Donath A (1977) Effect of alcohol on iron absorption; *Schweizer Med Wochenschrift*; 107(41):1471
- Celada A, Rudolf H, Herreros V, Donath A (1978) Inorganic iron absorption in subjects with iron deficiency anemia, achylia gastrica and alcoholic cirrhosis using a whole-body counter. *Acta Haematol* 60(3):182-192
- Cook JD, Brown GM, Valberg LS (1964) The effect of achylia gastrica on iron absorption. *Journal of Clinical Investigation* 43:1185-1191
- Dabagh AJ, Mannion T, Lynch SM, Frei B (1994) The effect of iron overload on rat plasma and liver oxidant status in vivo. *Biochem J* 300 (Pt 3):799-803
- Deugnier YM, Loreal O, Turlin B, Guyader D, Jouanolle H, Moirand R, Jacquelinet C, Brissot P (1992) Liver pathology in genetic hemochromatosis: a review of 135 homozygous cases and their bioclinical correlations. *Gastroenterology* 102(6):2050-2059

Dillard CJ, Downey JE, Tappel AL (1984) Effect of antioxidants on lipid peroxidation in iron-loaded rats. *Lipids* 19(2):127-132

Dresow B, Albert C, Zimmermann I, Nielsen P (1995) Ethane Exhalation and Vitamin E/Ubiquinol Status as Markers of Lipid Peroxidation in Ferrocene-Iron-Loaded Rats. *Hepatology* 21(4):1099-1105

Duane P, Raja KB, Simpson RJ, Peters TJ (1992) Intestinal iron absorption in chronic alcoholics. *Alcohol Alcohol* 27(5):539-544

Düllmann J, Wulfhekel U, Nielsen P, Heinrich HC (1992) Iron overload of the liver by trimethylhexanoyl-Ferrocene in rats. *Acta Anatomica* 143:96-108

Friedrich W, *Handbuch der Vitamine* (1987), U&S, Kapitel Vitamin A, S. 45 ff., Kapitel Vitamin C, S. 596 ff., Kapitel Vitamin E, S. 145 ff., S.620 ff

Glover J (1983) Factors affecting vitamin A transport in animals and man. *Proc Nutr Soc* 42(1):19-30

Gordeuk V, Mukiiibi J, Hasstedt SJ, Samowitz W, Edwards CQ, West G, Ndambire S, Emmanuel J, Nkanza N, Chapanduka Z (1992) Iron overload in Africa: Interaction between a gene and a dietary content. *N Eng J Med* 326:95-100

Grace ND, Powell LW (1974) Iron storage disorders of the liver. *Gastroenterology* 64:1257-1283

Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388(6641):482-488

Houglum KP, Brenner DA, Chojkier M (1991) Ascorbic Acid stimulation of collagen biosynthesis independent of hydroxylation. *Am J Clin Nutr* 54 (6 Suppl):1141S-1143S

Kawase T, Kato S, Lieber CS (1989) Lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat liver after chronic ethanol feeding. *Hepatology* 10(5):815-821

Kon'illa, Gorgoshidze LSh, Vasil'eva ON, Kulakova SN (1986) Vitamin A and lipid peroxidation: effect of retinol deficiency. *Biokhimiia* 51(1):70-76

Lang JK, Packer L (1987) Quantitative determination of vitamin E and oxidized and reduced coenzyme Q by high-performance liquid chromatography with in-line ultraviolet and electrochemical detection. *Journal of Chromatography* 385:109-117

Lawrence GD, Cohen G (1984) Concentrating ethane from breath to monitor lipid peroxidation in vivo. *Methods Enzymol* 105:305-311

Longueville A, Critchton RR (1986) An animal model of iron overload and its application to study hepatic ferritin mobilisation by chelators. *Biochem Pharmacol* 35:3669-3678

Lynch SR, Berelowitz I, Seftel HC, Miller GB, Krawitz P, Charlton RW, Bothwell TH (1967) Osteoporosis in Johannesburg Bantu males. Its relationship to siderosis and ascorbic acid deficiency. *Am J Clin Nutr* 20(8):799-807

Lynch SR, Seftel HC, Torrance JD, Charlton RW, Bothwell TH (1967) Accelerated oxidative catabolism of ascorbic acid in siderotic Bantu. *Am J Clin Nutr* 20(6):641-7

Mazzanti R, Srai KS, Debnam ES, Boss AM, Gentilini P (1987) The effect of chronic ethanol consumption on iron absorption in rats. *Alcohol Alcohol* 22(1): 47-52

Mobarhan S, Layden TJ, Friedmann H, Kunigk A, Donahue P (1986) Depletion of liver and esophageal epithelium vitamin A after chronic moderate ethanol consumption in rats: inverse relation to zinc nutriture. *Hepatology* 6(4):615-21

Myers BM, Prendergast FG, Holmann R, Kuntz SM, LaRusso NF (1991) Alterations in the structure, physicochemical properties and pH of hepatocyte lysosomes in experimental iron overload. *J Clin Invest* 88:1207-1215

- Niederau C, Fischer R, Sonnenberg A, Stremmel W, Trampisch HJ, Strohmeyer G (1985) Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis. *N Engl J Med* 313:1256-1262
- Nielsen P, Heinelt S, Düllmann J (1993) Chronic feeding of carbonyl-iron and TMH-Ferrosen in rats. Comparison of two iron-overload models with different iron absorption. *Comp Biochem Physiol C* 106 (2):429-436
- Nielsen P, Heinrich HC (1993) Metabolism of iron from (3,5,5-Trimethylhexanoyl)Ferrosen in rats. A dietary model for severe iron overload. *Biochem Pharmacol* 45(2):385-391
- Niki E, Saito T, Kamiya Y (1984) Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *J Biol Chem* 259(7):4177-4182
- Nordmann R, Ribiere C, Rouach H (1990) Ethanol-induces lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. *Alcohol Alcohol* 25(2-3):231-237
- O'Connell M, Ward RJ, Baum H, Peters TJ (1985) The role of iron in ferritin and hemosiderin-mediated lipid peroxidation in lysosomes. *Biochem J* 229:135-139
- Powell L, Halliday J (1981) Iron absorption and iron overload. *Clin Gastroenterol* 10(3):707-735
- Powell LW, Bassett ML, Halliday JW (1980) Hemochromatosis: Update 1980, *Gastroenterology* 78:374-381
- Sato M, Lieber CS (1982) Changes in vitamin A status after acute ethanol administration in the rat. *J Nutr* 112(6):1188-96
- Scarpa M, Stevanato R, Viglino P, Rigo A (1983) Superoxide ion as active intermediate in the autoxidation of ascorbate by molecular oxygen. Effect of superoxide dismutase. *J Biol Chem* 258(11):6695-6697
- Seftel HC, Malkin C, Schmaman A, Abrahams C, Lynch SR, Charlton RW, Bothwell TH (1966) Osteoporosis, scurvy, and siderosis in Johannesburg bantu. *Br Med J* 12;5488:642-6
- Senba M, Nakamura T, Itakura H (1989) Relationships among iron accumulation, cirrhosis, and hepatitis B virus infection in Bantu siderosis. *Ann Soc Belg Med Trop* 69(1):77-8
- Tavill AS, Bacon BR (1986), Hemochromatosis: How much iron is too much? *Hepatology* 6:142-145
- Teare JP, Greenfield SM, Watson D, Punched NA, Miller N, Rice-Evans CA, Thompson RP (1994) Lipid peroxidation in rats chronically fed ethanol. *Gut* 35(11):1644-1647
- Videla LA (1984) Hepatic antioxidant-sensitive respiration. Effect of ethanol, iron and mitochondrial uncoupling. *Biochem J* 223(3):885-891
- Wang XD, Liu C, Chung J, Stickel F, Seitz HK, Russel RM (1998) Chronic ethanol intake reduces retinoic acid concentration and enhances AP-1 (c-Jun and c-Fos) expression in rat liver. *Hepatology* 28(3):744-50
- Wapnick AA, Lynch SR, Seftel HC, Charlton RW, Bothwell TH, Jowsey J (1971) The effect of siderosis and ascorbic acid depletion on bone metabolism, with special reference to osteoporosis in the Bantu. *Br J Nutr* 25(3):367-76
- Ward RJ, Florence AL, Baldwin D (1991) Biochemical and biophysical investigations of the Ferrosen-loaded rat. An animal model of primary hemochromatosis; *Eur J Biochem* 202:405-410
- Whittaker P, Wamer WG, Chandebhan RF, Dunkel VC (1996) Effects of alpha-tocopherol and beta-carotene on hepatic lipid peroxidation and blood lipids in rats with dietary iron overload. *Nutr Cancer*, 25 (2):119-128

Wisniewska-Knypl JM, Wrinska-Nofer T (1994) Biological markers of oxidative stress induced by ethanol and iron overload in rat. *Int J Occup Med Environ Health* 7(4):355-363

Young IS, Trouton TG, Torney JJ, McMaster D, Callender ME, Trimble ER (1994) Antioxidant status and lipid peroxidation in hereditary hemochromatosis. *Free Radic Biol Med* 16 (3):393-397

Zhang H, Loney LA, Potter BJ (1993) Effect of chronic ethanol feeding on hepatic iron status and ferritin uptake by rat hepatocytes. *Alcohol Clin Exp Res* 17(2):394-400

DANKSAGUNG

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Zellbiologie am Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf für die ausgezeichnete Betreuung während der Ausarbeitung dieser Dissertation. Insbesondere gilt mein Dank Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. Peter Nielsen für die Überlassung des Themas, die vielen Anregungen und seine kritische Auseinandersetzung mit der Problematik.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. med. E. Gabbe, Herrn Dr. rer. nat. Bernd Dresow, Herrn Dr. rer. nat. Rainer Engelhardt, Herrn Dr. rer.nat. Roland Fischer und Frau Dipl.-Ing. Inge Zimmermann; sie standen mir besonders in der „heißen Phase“ der Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite.

Ferner danke ich Frau U. Meyer und Frau Dr. med. M. Aalamian für die Überlassung ihrer Ergebnisse der Lebereisenkonzentrationen bzw. zur Morphologie der Leber.

Lebenslauf

Geboren 18. Januar 1974 in Karlsruhe

Eltern: Gerhard und Ingrid Beutelspacher, geb. Uebber

Schule:

Grundschule Langensteinbach von 1980 - 1984

Eichendorff-Gymnasium Ettlingen von 1984 - 1993

1993 Abitur am Eichendorff-Gymnasium Ettlingen

Studium:

1993 Aufnahme des Medizinstudiums an der Universität Hamburg

1997 Auslandssemester an der Universität Wien

1999 Abschluss des Medizinstudiums an der Universität Hamburg am 24.11.1999

Examina:

Ärztliche Vorprüfung im Sommersemester 1995

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Sommersemester 1996

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Sommersemester 1998

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestanden am 24.11.1999

Wissenschaftliche Tätigkeit:

Studienbegleitend während des Praktischen Jahres wissenschaftlicher Mitarbeiter am Allgemeinen Krankenhaus der Stadt Wien, Universitätsklinik für Herz-Thorax-Chirurgie in der Arbeitsgruppe Transmyokardiale Laserrevaskularisation und Gentherapie (Univ.-Prof. Dr. med.-univ. R. Seitelberger und Dr. med.-univ. T. Wild)

Seit 15.01.2000 Arzt im Praktikum an der Universitätsklinik für Chirurgie, Abteilung für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie am Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf (Direktor: Dr. med. N. Tsilimingas, Prof. Dr. Dr. med. V. Döring).

Seit 15.05.2000 Arzt im Praktikum an der Abteilung für Augenheilkunde am Allgemeinen Krankenhaus Hamburg-Barmbek (Direktor: Prof. Dr. med. D. von Domarus)

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten 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 der Promotion beworben habe.