



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Einfluss einer Ernährungsintervention auf prädiktive Tumormarker in Typ 2 Diabetikern

Verfasserin

Roswitha Stieglmayer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, Dezember 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer:

A.o. Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei A.o. Univ. Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner für die Bereitstellung des Themas und für die Korrektur der Diplomarbeit bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Mag. Elisabeth Müllner für ihre Hilfe und Unterstützung bedanken. Ihre Betreuung bei der statistischen Auswertung, ihre rasche Antworten auf so manche Fragen und ihre zeitliche Flexibilität waren ausschlaggebend für das Vorankommen dieser Diplomarbeit. Vielen Dank für alles!

Weiters möchte ich mich bei Sonja Adrigan und Marie Therese Bulla für die gute Zusammenarbeit im Labor, bei den Auswertungen und während des Schreibens der Diplomarbeit bedanken.

Danke meiner Schwester Irmi für das Korrekturlesen!

Ein großes Dankeschön an all meine Freunde, die mich während der Studienzeit immer wieder motiviert und unterstützt haben. Ohne euch wäre das Studium nur halb so schön und abwechslungsreich gewesen!

Abschließend möchte ich noch erwähnen, dass ohne den Erhalt des Selbsterhalterstipendiums mir es nicht möglich gewesen wäre dieses Studium zu absolvieren.

Danke an alle!

Erklärung zur gemeinsamen Bearbeitung eines Themas

Gemäß dem Universitätsgesetz §81(Abs. 3 UG) wurden die Diplomarbeiten mit dem Titel

„Unterschiede im Auftreten von Mikrokernen zwischen Gesunden und Typ 2 Diabetikern und der Einfluss der Diabetestherapie“ von Sonja Adrigan

und dem Titel

“Einfluss einer Ernährungsintervention auf das Auftreten von Mikrokernen bei Insulinpflichtigen Typ II Diabetikern“ von Marie Therese Bulla

und dem Titel

„Einfluss einer Ernährungsintervention auf prädiktive Tumormarker in Typ 2 Diabetikern“ von Roswitha Stieglmayer

im Rahmen einer Ernährungsinterventionsstudie am Institut für Ernährungswissenschaften unter der Betreuung von Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner und Frau Mag. Elisabeth Müllner an der Universität Wien gemeinsam verfasst.

Im Inhaltsverzeichnis dieser Arbeit sind die Teile der jeweiligen Verfasserinnen genau zugeordnet.

Wien, Dezember 2011

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
TABELLENVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1 DIABETES MELLITUS (DM) (von Roswitha Stieglmayer)	3
2.1.1 Pathologie	3
2.1.2 Klassifikation	3
2.1.3 Diagnostik.....	5
2.1.4 Epidemiologie.....	5
2.1.5 Spätschäden und Komplikationen	7
2.1.6 Kosten.....	9
2.2 THERAPIE VON DMT2 (von Sonja Adrigan)	10
2.2.1 Orale anti-diabetische Medikamente	10
2.2.2 Insulin oder Insulinanaloga	11
2.3 DMT2 IM ZUSAMMENHANG MIT DEM KREBSRISIKO (von Sonja Adrigan)	12
2.3.1 Mögliche Krebsrisikofaktoren bei DMT2.....	13
2.3.2 Möglicher Einfluss von Diabetes-Therapien auf das Krebsrisiko	15
2.4 DER CYTOKINESIS-BLOCK MICRONUCLEUS CYTOME ASSAY (CBMN) (von Sonja Adrigan).....	17
2.4.1 Mikrokerne und ihr Zusammenhang mit dem Krebsrisiko	19
2.4.2 DMT2 und das Auftreten von MNi.....	21
2.5 ERNÄHRUNG UND KREBSENTSTEHUNG (von Marie Therese Bulla)	22
2.5.1 Ernährung und oxidativer Stress im Zusammenhang mit Krebs DNA-Oxidation, DNA-Reparatur, ROS und Krebsentstehung.....	23
2.5.2 Mikronährstoffmangel oder -überschuss und Krebsentstehung.....	24
2.5.3 Studien zu Ernährung und DNA-Schäden bzw. Mikrokernvorkommen.....	26
2.5.4 Vitamin B12, Folsäure und Hcy	29
2.5.5 Vitamin E	32

3	MATERIAL UND METHODEN	33
3.1	STUDIENDESIGN (von Marie Therese Bulla).....	33
3.1.1	Rekrutierung der Probanden	34
3.1.2	Interventionsphase	37
3.1.3	Ernährungsintervention.....	39
3.2	CBMN-ASSAY (von Roswitha Stieglmayer)	42
3.2.1	Verwendete Materialien.....	42
3.2.2	Probenaufbereitung.....	43
3.2.3	Zählkriterien.....	46
3.3	STATISTISCHE AUSWERTUNG (von Roswitha Stieglmayer).....	47
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION (von Roswitha Stieglmayer)	49
4.1	DESKRIPTIVE STATISTIK	49
4.2	EINFLUSS DER ERNÄHRUNGSINTERVENTION AUF DIE MITTELS CBMN-ASSAY ERMITTELTEN PARAMETER.....	52
4.2.1	MNi in der Informationsgruppe.....	52
4.2.2	MNi in der Interventionsgruppe	55
4.2.3	Buds in der Informationsgruppe.....	57
4.2.4	Buds in der Interventionsgruppe	59
4.2.5	Bridges in der Informationsgruppe.....	61
4.2.6	Bridges in der Interventionsgruppe	63
4.2.7	Apoptose in der Informationsgruppe	65
4.2.8	Apoptose in der Interventionsgruppe	67
4.2.9	Nekrose in der Informationsgruppe	69
4.2.10	Vorkommen des Parameters Nekrose in der Interventionsgruppe	71
4.3	DISKUSSION DER PARAMETER MNI, BUDS, BRIDGES, APOPTOSEN UND NEKROSEN IN INFORMATIONS- UND INTERVENTIONSGRUPPE.....	73
4.3.1	Einfluss des Geschlechts auf die Parameter MNi, Buds, Bridges, Apoptosen und Nekrosen.....	73
4.3.2	Einfluss des Gesundheitszustandes auf die Parameter MNi, Buds, Bridges, Apoptosen und Nekrosen	75
4.4	EINFLUSS VON NÄHRSTOFFEN AUF DAS AUFTRETEN VON MNI, BUDS, BRIDGES, APOPTOSEN UND NEKROSEN BEI UNTER- ODER ÜBERVERSORGUNG AN FOLSÄURE, VITAMIN B12, ALPHA-CAROTIN, BETA-CAROTIN, RETINOL UND ALPHA-TOCOPHEROL.....	76
4.4.1	Versorgung mit Vitamin B12 und Einfluss auf die Parameter MNi, Buds, Bridges, Apoptosen, Nekrosen	76
4.4.2	Versorgung mit Folsäure und Einfluss auf die Parameter MNi, Buds, Bridges, Apoptosen, Nekrosen	77

4.4.3	Versorgung mit Retinol und Carotinoiden und Einfluss auf die Parameter MNI, Buds, Bridges, Apoptosen, Nekrosen	78
4.4.4	Versorgung mit alpha-Tocopherol und Einfluss auf die Parameter MNI, Buds, Bridges, Apoptosen, Nekrosen	81
4.5	DISKUSSION ÜBER DIE VERÄNDERUNG DER PARAMETER MNI, BUDS, BRIDGES, APOPTOSEN UND NEKROSEN BEI UNTER- ODER ÜBERSORGUNG AN FOLSÄURE, VITAMIN B12, ALPHA-CAROTIN, BETA-CAROTIN, RETINOL, ALPHA-TOCOPHEROL	82
4.6	KORRELATION ZWISCHEN DEN PARAMETER MNI, BUDS, BRIDGES, APOPTOSEN UND NEKROSEN UND MIKRONÄHRSTOFFEN FOLSÄURE, VITAMIN B12, ALPHA-CAROTIN, BETA-CAROTIN, RETINOL UND ALPHA-TOCOPHEROL (von Roswitha Stieglmayer)	86
4.6.1	Veränderungen der Parameter vom Zeitpunkt T2 zu T0	87
4.6.2	Veränderungen der Parameter vom Zeitpunkt T3 zu T0	88
4.7	DISKUSSION ZUR VERÄNDERUNG DER PARAMETER MNI, BUDS, BRIDGES, APOPTOSEN UND NEKROSEN DURCH MIKRONÄHRSTOFFE FOLSÄURE, VITAMIN B12, ALPHA-CAROTIN, BETA-CAROTIN, RETINOL UND ALPHA-TOCOPHEROL.....	91
5	SCHLUSSBETRACHTUNG (von Roswitha Stieglmayer).....	94
6	ZUSAMMENFASSUNG (von Roswitha Stieglmayer)	97
7	ABSTRACT (von Roswitha Stieglmayer)	99
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	101
	LEBENS LAUF	109

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Anstieg der DM-Rate in Industrieländern bis 2030 [Shaw et al., 2010]	6
Abbildung 2: Entstehung von MNi, NBUDs, NPBs, Apoptosen und Nekrosen.....	18
Abbildung 3: Prozentuale Variation der Rate des genomischen Schadens nach der Statusbestimmung von Vitamin E, Calcium, Folat, Retinol, Nicotinsäure, Beta-Carotin, Riboflavin, Pantothensäure und Biotin im mittleren und höchsten Tertil im Vergleich zum niedrigsten Tertil	24
Abbildung 4: Das Konzept der Gen-Ernährungs- und Gen-Toxin-Interaktion und deren Einfluss auf die unterschiedlichen gesundheitlichen Schäden	25
Abbildung 5: Folsäuremetabolismus	30
Abbildung 6: Studiendesign, Einteilung der Teilnehmer	35
Abbildung 7: Zeitschema der Untersuchungen	38
Abbildung 8: Anzahl an MNi in 1000 BN in der Informationsgruppe, getrennt nach dem Geschlecht.....	53
Abbildung 9: Anzahl an MNi in 1000 BN in der Informationsgruppe, getrennt nach dem Gesundheitszustand.....	54
Abbildung 10: Anzahl an MNi in 1000 BN in der Interventionsgruppe, getrennt nach dem Geschlecht.....	55
Abbildung 11: Anzahl an MNi in 1000 BN in der Interventionsgruppe, getrennt nach dem Gesundheitszustand.....	56
Abbildung 12: Anzahl an Buds in 1000 BN in der Informationsgruppe, getrennt nach dem Geschlecht.....	57
Abbildung 13: Anzahl an Buds in 1000 BN in der Informationsgruppe, getrennt nach dem Gesundheitszustand.....	58
Abbildung 14: Anzahl an Buds in 1000 BN in der Interventionsgruppe, getrennt nach dem Geschlecht.....	59
Abbildung 15: Anzahl an Buds in 1000 BN in der Interventionsgruppe, getrennt nach dem Gesundheitszustand.....	60
Abbildung 16: Anzahl an Bridges in 1000 BN in der Informationsgruppe, getrennt nach dem Geschlecht.....	61
Abbildung 17: Anzahl von Bridges in 1000 BN in der Informationsgruppe, getrennt nach dem Gesundheitszustand.....	62
Abbildung 18: Anzahl von Bridges in 1000 BN in der Interventionsgruppe, getrennt nach dem Geschlecht	63
Abbildung 19: Anzahl an Bridges in 1000 BN in der Interventionsgruppe, getrennt nach dem Gesundheitszustand.....	64
Abbildung 20: Anzahl an Apoptosen in 1000 BN in der Informationsgruppe, getrennt nach Geschlecht.	65
Abbildung 21: Anzahl an Apoptosen in 1000 BN in der Informationsgruppe, getrennt nach dem Gesundheitszustand.....	66
Abbildung 22: Anzahl an Apoptosen in 1000 BN in der Interventionsgruppe, getrennt nach Geschlecht	67

Abbildung 23: Anzahl an Apoptosen in 1000 BN in der Interventionsgruppe, getrennt nach Gesundheitsgruppen	68
Abbildung 24: Anzahl an Nekrosen in 1000 BN in der Informationsgruppe, getrennt nach Geschlecht	69
Abbildung 25: Anzahl an Nekrosen in 1000 BN in der Informationsgruppe, getrennt nach Gesundheitsgruppen	70
Abbildung 26: Anzahl an Nekrosen in 1000 BN in der Interventionsgruppe, getrennt nach Geschlecht.....	71
Abbildung 27: Anzahl an Nekrosen in 1000 BN in der Interventionsgruppe, getrennt nach Gesundheitsgruppen	72
Abbildung 28: Korrelation zwischen der Veränderung der Apoptosen-Häufigkeit und der Veränderung an Folsäure im Plasma (nmol/l) vom Zeitpunkt T2 zu T0 in der Interventionsgruppe	87
Abbildung 29: Korrelation zwischen der Veränderung der Häufigkeit von Bridges in 1000 BN und der Veränderung an alpha-Carotin (µmol/l) vom Zeitpunkt T3 zu T0 in der Informationsgruppe	88
Abbildung 30: Korrelation zwischen der Veränderung der Apoptosen-Häufigkeit und der Veränderung an Vitamin B12 (pmol/l) vom Zeitpunkt T3 zu T0 in der Interventionsgruppe	89
Abbildung 31: Korrelation zwischen der Veränderung in der Häufigkeit von Buds in 1000 BN und der Veränderung von Lycopene (µmol/l) vom Zeitpunkt T3 zu T0 in der Informationsgruppe	90
Abbildung 32: Korrelation zwischen der Veränderung in der MNI in 1000 BN und Veränderung an alpha Tocopherol (µmol/l) vom Zeitpunkt T3 zu T0 in der Interventionsgruppe	91

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Grenzwerte für IFG, IGT und HbA1c im Blut	5
Tabelle 2: Spätschäden und Komplikationen von DM.....	8
Tabelle 3: Wichtigste orale Antidiabetika bei DMT2	10
Tabelle 4: Mögliche direkte oder indirekte Krebsrisikofaktoren bei DMT2	13
Tabelle 5: Interventionsstudien, die den Mikronährstoffstatus in Relation zur MN-Häufigkeit in Lymphozyten untersuchen	28
Tabelle 6: Fettsäurezusammensetzung (%) und Tocopherolgehalt (mg/100g) des Interventionsöls	40
Tabelle 7: Tiefkühlprodukte für die Interventionsgruppe	40
Tabelle 8: Verwendete Materialien für den CBMN-Assay.....	42
Tabelle 9: Zählkriterien des CBMN-Assays	46
Tabelle 10: Ausgangswerte (T0) der mittels CBMN ermittelte Parameter der Informations-und Interventionsgruppe.	50
Tabelle 11: Mittelwerte der gemessenen Vitamine im Blut/Plasma der Probanden zum Zeitpunkt T0	51
Tabelle 12: Einfluss von Vitamin B12 auf mittels CBMN-Assay ermittelten Parameter zum Zeitpunkt T0, unterteilt in 2 Gruppen: „unterversorgt“ (<146,86 pmol/l), „ausreichend versorgt“ (>146,86 pmol/l)	76
Tabelle 13: Einfluss von Folsäure in den Erythrozyten auf mittels CBMN-Assay ermittelten Parameter zum Zeitpunkt T0, unterteilt in 2 Gruppen: „unterversorgt“ (< 272 nmol/l), „ausreichend versorgt“ (> 273 nmol/l).	77
Tabelle 14: Ausmaß an chromosomalen Schäden in den Tertilen von Folsäure im Plasma zum Zeitpunkt T0	78
Tabelle 15: Einfluss von beta-Carotin auf mittels CBMN-Assay ermittelten Parameter zum Zeitpunkt T0, unterteilt in 3 Gruppen: „unterversorgt“ ($\leq 0,13 \mu\text{mol/l}$), „ausreichend versorgt“ ($0,14\text{-}1,20 \mu\text{mol/l}$), „zuviel“ ($>1,21 \mu\text{mol/l}$)	79
Tabelle 16: Einfluss von alpha-Carotin auf mittels CBMN-Assay ermittelten Parameter zum Zeitpunkt T0, unterteilt in 3 Gruppen: „unterversorgt“ ($\leq 0,04 \mu\text{mol/l}$), „ausreichend“ ($0,04\text{-}0,34 \mu\text{mol/l}$), „zuviel versorgt“ ($>0,35 \mu\text{mol/l}$).....	80
Tabelle 17: Ausmaß an chromosomalen Schäden in den einzelnen alpha-Tocopherol-Tertilen zum Zeitpunkt T0	81

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADA	American Diabetes Association
AMPK	Adenosinmonophosphat Kinase
BMI	Body Mass Index
BNC	Binucleated Cell
BNCs	Binucleated Cells
CBMN	Cytokinesis-block micronucleus cytome assay
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DM	Diabetes Mellitus
DMT1	Diabetes Mellitus Typ 1
DMT2	Diabetes Mellitus Typ 2
DNA	Deoxyribonucleic acid (DNS, Desoxyribonucleinsäure)
dTMP	Deoxythymidinmonophosphat
dUMP	Deoxyuridinmonophosphat
FFQ	Food Frequency Questionnaire
Hcy	Homocystein
HDL	High density Lipoproteins
IDDM	Insulin-dependent Diabetes Mellitus
IDDM-T1	Insulin-dependent Diabetes Mellitus Typ 1
IDDM-T2	Insulin-dependent Diabetes Mellitus Typ 2
IDF	International Diabetes Federation
IFG	Impaired fasting Glucose
IGT	Impaired Glucose tolerance
ILGF1R	Insulin-like-growth Faktor 1
IR	Insulin Rezeptor
LDL	Low density Lipoproteins

LKB1	Serin/Threonin-Kinase
MN	Micronucleus
MNi	Micronuclei
MW ± Std	Mittelwert ± Standardabweichung
NBUDs	Nuclear Buds
NGSP	National Glycohemoglobin Standardization Program
NIDDM	Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus
NPBs	Nucleoplastic Bridges
N.S.	nicht signifikant
ÖDV	Österreichischen Diabetikervereinigung
OGTT	Orale Glukosetoleranztest
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PPARγ	Peroxisom-Proliferator-aktivierer Receptor
QLQ	Quality of Life Questionnaire
RDAs	Recommended dietary allowances
RDI	Recommended daily intake
ROS	Reactive Oxygen Spezies, reaktive Sauerstoffradikale
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
HDL	High Density Lipoprotein
LDL	Low Density Lipoprotein
TZDs	Thiazolidindione
WGKK	Wiener Gebietskrankenkasse
WHO	World Health Organisation

1 EINLEITUNG

Laut WHO steigt die Inzidenzrate für Typ 2 Diabetes (DMT2) bis 2030 rapide an. 7,7% aller erwachsenen Personen werden unter DMT2 leiden. Diese Tatsache muss für die zukünftige Planung des Budgets für die Gesundheitsvorsorge berücksichtigt werden, da die Spätfolgen und Behandlung von DMT2 zu höheren Ausgaben führen.

Auslöser für DMT2 sind mangelnde Bewegung, unausgewogene und hochkalorische Ernährung. Weiters leiden Personen mit DMT2 vermehrt an Herz-Kreislauferkrankungen und sind höherem oxidativen Stress, ausgelöst durch den gestörten Glukosestoffwechsel, ausgesetzt. Die dadurch auftretenden DNA-Schäden, die auf eine mögliche Entstehung von Krebs hinweisen, lassen sich im menschlichen Blut nachweisen. Einige Studienergebnisse führen zu der Annahme, dass DMT2-Patienten aufgrund dieser Faktoren ein höheres Krebsrisiko haben.

Der derzeit anerkannteste Marker für Chromosomenschäden in Lymphozyten ist der Cytochrome Block Micronucleus Assay (CBMN-Assay). Im Rahmen der DIAPLANT-Studie wurde das Potential einer Ernährungsintervention erstmals mit den CBMN-Assay untersucht mit dem Ziel einen mechanistischen Hinweis auf ein Krebsrisiko zu erhalten. Durch die Bestimmung von DNA-Schäden kann man auf ein mögliches Krebsrisiko schließen. Aufgrund der oben angeführten Risikofaktoren (Ungesunde Lebensgewohnheiten, gestörter Glukosestoffwechsel) wird vermutet, dass in den Lymphozyten von DMT2-Patienten eine erhöhte Konzentration an Tumormarkern zu finden ist im Gegensatz zu gesunden Personen.

Studien haben gezeigt, dass eine hochdosierte Supplementierung mit Folsäure und Vitamin B12 die Parameter des CBMN deutlich reduzieren konnten. Bisher gab es noch keine Interventionsstudie, die untersuchte, ob eine Zufuhr dieser und anderer Nährstoffe im Rahmen einer ausgewogenen Ernährung eine Reduktion der Chromosomenschäden bewirkt. Dieser Frage soll im Rahmen dieser Diplomarbeit nachgegangen werden.

Die Auswertung der Proben sowie einige Recherchearbeit und die Erstellung des Literatur-, Material und Methodenteils dieser Arbeit sind in Zusammenarbeit mit Sonja Adrigan und Marie Therese Bulla entstanden, weshalb einige Teile dieser Arbeit sich auch in den Arbeiten der Kolleginnen wiederfinden lassen. Die Abschnitte in den Kapiteln 1 bis 3 wurden im Inhaltsverzeichnis und im Text der jeweiligen Person zugeordnet.

Auf Grund der leichteren Lesbarkeit verzichte ich auf das Binnen-I. Die Abkürzungen im Text sind im Abkürzungsverzeichnis auf Seite IV aufgelistet.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 DIABETES MELLITUS (DM) (von Roswitha Stieglmayer)

2.1.1 Pathologie

DM zeichnet sich durch eine Gruppe heterogener klinischer Symptome aus. Die Krankheit resultiert in einer Störung des Glukosestoffwechsels, betrifft aber auch andere Stoffwechselvorgänge. Die Auslöser sind eine verminderte oder fehlende Insulinproduktion durch Schädigung der β -Zellen, die Synthese eines strukturell veränderten Insulins oder die Unwirksamkeit des synthetisierten und sezernierten Insulins am Zielorgan [KASPER H, 2004].

DM ist eine sehr häufig auftretende Erkrankung und geht oft mit Begleiterkrankungen wie Adipositas, Hypertonie, Hyperlipidämie und kardiovaskulären Erkrankungen einher, die zusammengefasst als metabolisches Syndrom bezeichnet werden [WALY et al., 2010].

2.1.2 Klassifikation

DM wird von der American Diabetes Association (ADA) in folgende Kategorien unterteilt:

Diabetes mellitus Typ 1 (DMT1), wurde früher als „insulin dependent diabetes mellitus“ (IDDM) bezeichnet. Diese Form der Erkrankung betrifft 5-10% der diagnostizierten Diabetiker. Auslöser ist die Zerstörung der β -Zellen durch eine Autoimmunerkrankung, die zu einem Insulinmangel führt. Hierbei liegt eine genetische Prädisposition vor, jedoch wird vermutet, dass auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen könnten. Die genaue Wirkungsweise dieser exogenen Faktoren ist bisher noch wenig bekannt [ADA, 2010].

Dem Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2), welcher früher auch als „non-insulin dependent“ (NIDDM) oder Altersdiabetes bezeichnet wurde, werden ca. 90-95% der Diabetes mellitus Erkrankten zugeordnet [ADA, 2010]. Diese Form des Diabetes zeichnet sich durch eine chronische Hyperglykämie aus. Grund für den erhöhten Blutzuckerspiegel ist ein multikausaler Insulinmangel und eine Abnahme der Insulinwirkung im Gewebe, vor allem in der Muskulatur, in der Leber und dem Fettgewebe [LÖFFLER, 2008].

Krankheitsursachen des DMT2 sind individuell verschieden und bis heute noch nicht völlig erforscht. Fakt ist, dass bei dieser Form von Diabetes mellitus die genetische Prädisposition ebenso eine entscheidende Rolle spielt, jedoch aufgrund der genetischen Komplexität noch nicht gänzlich geklärt ist. Das Risiko an dieser Form von Diabetes zu erkranken steigt mit zunehmendem Alter, Adipositas, Hypertonie, Hyperlipidämie, fettreicher und ballaststoffarmer Ernährung und mangelnder sportlicher Bewegung [ADA, 2010].

Ein Großteil der DMT2-Patienten hat Übergewicht und dadurch eine erhöhte Insulinresistenz. DMT2-Patienten mit Normalgewicht zeigen vermehrt einen erhöhten Körperfettanteil im Abdominalbereich [ADA, 2010].

Weitere Formen des DM: Zu dieser Kategorie werden genetische Defekte gezählt, die Hyperglykämie auslösen wie z.B. Defekte der β -Zellen und der Insulinwirksamkeit sowie das Down-Syndrom, das Klinefelter Syndrom und das Turner-Syndrom. Endokrine Defekte, Medikamente, Chemikalien und Infektionen sind ebenso als Initiatoren für Diabetes mellitus bekannt sowie Autoimmunerkrankungen [ADA, 2010].

Gestationsdiabetes: Diese Form des DM tritt während der Schwangerschaft auf. Nach der Geburt des Kindes kann sich die Krankheit manifestieren, wenn sie vor der Schwangerschaft nicht erkannt wurde. Normalerweise verschwindet der Gestationsdiabetes nach der Geburt. Ungefähr 7% der schwangeren Frauen weisen diese Form auf [ADA, 2010].

Für Personen, die einen erhöhten Glukosespiegel (Impaired fasting Glucose, IFG) bzw. eine erhöhte Glukosetoleranz (impaired Glucose tolerance, IGT) aufweisen, besteht ein größeres Risiko an DM zu erkranken. IFG und IGT werden auch als Pre-Diabetes

bezeichnet. Ein weiterer Parameter für eine mögliche Manifestation dieser Stoffwechselstörung bei Risikopatienten ist der HbA1c-Wert [ADA, 2010].

2.1.3 Diagnostik

Die ADA schlägt folgende Diagnosekriterien vor:

- HbA1C $\geq$ 6,5%
- Nüchternblut-Glukosekonzentration $\geq$ 126 mg/dl (7,0 mmol/l), (8 h-Nahrungskarenz)
- Blutglukosekonzentration $\geq$ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) nach oralen Glukosetoleranztest (OGTT) mit 75 g Glukose in Wasser aufgelöst
- Klassische Symptome wie Polyurie, Polydipsie, Gewichtsverlust, manchmal Polyphagie und Sehstörungen sowie eine Plasmaglukosekonzentration von $\geq$ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) gemessen zu einem willkürlichen Zeitpunkt [ADA, 2010].

Tabelle 1: Grenzwerte für IFG, IGT und HbA1c im Blut [ADA, 2010]

Grenzwerte:	
IFG	100-125 mg Glukose/dl
IGT	140-199 mg Glukose/dl
HbA1c	5,7-6,4 %

2.1.4 Epidemiologie

In einer kürzlich erschienen Studie wird davon ausgegangen, dass im Jahr 2008 etwa 347 Millionen Erwachsene weltweit an Diabetes litten [DANA EI et al., 2011]. 2004 starben geschätzte 3,4 Millionen Menschen durch die Spätschäden von Hyperglykämie. Mehr als 80% der Todesfälle durch die Spätfolgen von DM sind in Ländern mit niedrigen und mittleren Einkommen zu finden. Es wird vermutet, dass sich die Anzahl der Diabetiker zwischen 2005 und 2030 verdoppelt haben wird. Die Empfehlungen der WHO für eine gesunde Lebensweise sind eine ausgewogene

Ernährung, regelmäßige Bewegung, normales Körpergewicht und nicht zu Rauchen [WHO, 2011].

Schätzungen von 2010 deuten auf einen 20 prozentigen Anstieg der Diabetesrate in Industrieländern bis 2030 (Abbildung 1).

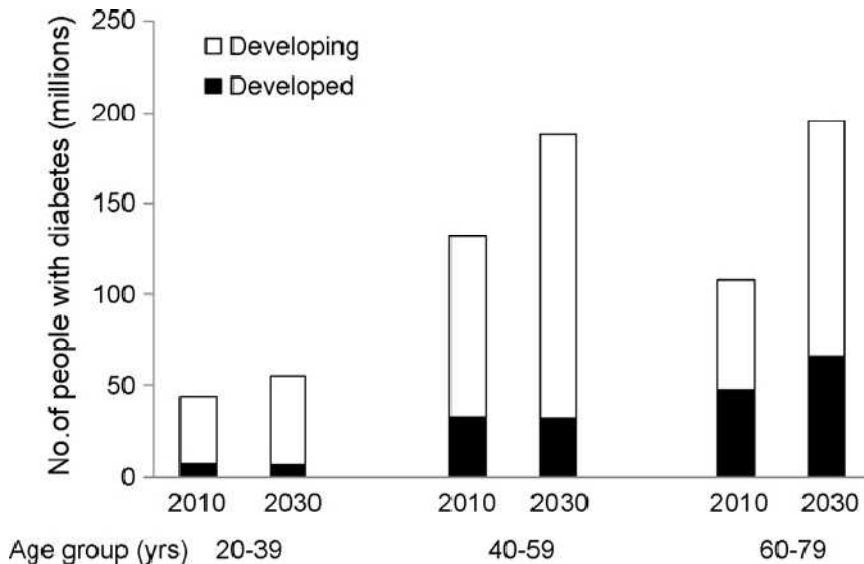


Abbildung 1: Anstieg der DM-Rate in Industrieländern bis 2030 [Shaw et al., 2010]

Andere Schätzungen gehen davon aus, dass derzeit weltweit etwa 285 Millionen Menschen (6,4% der Erwachsenen) an DM leiden. Es wird angenommen, dass die Anzahl der erkrankten Personen bis 2030 auf 430 Millionen (7,7%) der Erwachsenen ansteigt. Die größte Zahl an Neuerkrankungen wird in Nordamerika vermutet, gefolgt vom Mittleren Osten und Südasien [SHAW et al., 2010].

In Österreich sind laut Schätzungen 600.000 Personen an DM erkrankt. Hiervon sind lediglich nur 420.000 Personen diagnostiziert und befinden sich in ärztlicher Behandlung. 180.000 Personen, das entspricht etwa 30%, sind sich ihrer Erkrankung nicht bewusst [ÖGD, 2011].

Die International Diabetes Federation (IDF) gibt an, dass 11,2% der österreichischen Bevölkerung zwischen 20 und 79 Jahren an DM erkrankt ist, dies betrifft 708.400 Menschen [ZHANG et al., 2010].

Im Jahr 2002 sind in Österreich 2.038 Personen gestorben, die laut ICD-10 Kriterien (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) als Diabetiker eingestuft wurden. Das sind 2,7% von 76.131 Gesamttodesfällen. Für 50% dieser Todesfälle waren Herz-Kreislauf-erkrankungen verantwortlich [RIEDER et al., 2004].

2.1.5 Spätschäden und Komplikationen

Spätschäden von DM sind Retinopathie und ein möglicherweise daraus resultierender Verlust des Sehvermögens, Nephropathie und Nierenversagen, Neuropathie und das daraus folgende Diabetische Fußsyndrom, der Charcot-Fuß, gastrointestinale Beschwerden, Erkrankungen der Harn- und Geschlechtsorgane, sexuelle Dysfunktion und Herz-Kreislauf-erkrankungen. An Diabetes erkrankte Menschen haben ein höheres Risiko an Atherosklerose zu erkranken. Eine weitere Spätfolge ist die Beeinträchtigung des Lipoprotein-Stoffwechsels [ADA, 2010].

Tabelle 2: Spätschäden und Komplikationen von DM [RIEDER et al., 2004]

Spätkomplikation	Manifestation	Ursache(n)
MAKROANGIOPATHIE	Koronare Herzerkrankung Schlaganfall Periphere Durchblutungsstörungen Gefäßverschluss der unteren Extremitäten	Atherosklerose
MIKROANGIOPATHIEN		
Retinopathie und Makulopathie	Diffuse Augenverdickungen an Auge und Augenhintergrund, reduziertes Sehvermögen bis zur Erblindung	advanced glycosylation (end)products (z.B.) HbA1c → Schädigung extrazellulärer Proteine des Bindegewebes sowie intrazelluläre Strukturproteine (HbA1c hat größere Affinität zu O ₂ als normales Hb → reduzierte Sauerstoffabgabe ins Gewebe → Retinopathie) in Nierenglomeruli, Retina, Augenlinse und Nerven reagiert Glukose zu Sorbitol, das zu Fruktose weiterreagiert → Fruktoseakkumulation führt zu osmotischen Stress → Gewebeschädigung oxidativer Stress → Aktivierung der Proteinkinase C → Gefäßanomalien an Retina, Nieren, Herz
Nepropathie (Glomerulosklerose)	Erhöhung des intraglomerulären Filtrationsdrucks, Verdickung der Basalmembran, Mikroalbuminurie, Nephropathie mit Proteinurie, Hypertonie, Niereninsuffizienz	
NEUROPATHIE		
Sensomotorische Neuropathie	Symmetrische Missempfindungen, Taubheitsgefühle und Schmerzen in den unteren Extremitäten	
Diffuse motorische Polyneuropathie	Generalisierte Muskelatrophie und -schwäche, meist ohne Schmerzen und Sensibilitätsstörungen	
Autonome Neuropathie	Störungen der Organe, die vom autonomen Nervensystem innerviert werden: Herz, Gastrointestinaltrakt, Harnblase, männliche Geschlechtsorgane	
DIABETISCHES FUSSSYNDROM	Läsionen, Ulkusbildung, mangelndes Abheilen	Neuropathie und/oder periphere Durchblutungsstörungen

Die Akutkomplikationen, die am häufigsten vorkommen, sind das Coma diabeticum, Hypoglycämie und der hypoglykämische Schock [RIEDER et al., 2004].

2.1.6 Kosten

Die CODE-2 Studie versuchte die Kosten zu eruieren, die in Europa (8 ausgewählte Staaten) durch Diabetes mellitus anfallen. Die Ausgaben werden insgesamt auf 29 Milliarden Euro geschätzt, umgelegt auf einen einzelnen Patienten ergibt sich ein jährlicher Betrag von 2.834 Euro. Die stationäre Behandlung der Patienten stellt mit 55% den größten Anteil der Kosten dar. 27% der Kosten betreffen Medikamente während 18% der Kosten für die ambulante Behandlung verwendet werden. Erwähnenswert ist, dass für Diabetesmedikamente wie Insulin oder orale Antidiabetika nur ein Bruchteil der Kosten, nämlich 7%, ausgegeben wird. Hauptsächlich sind kardiovaskuläre und lipidsenkende Arzneimittel für den hohen Anteil an Gesundheitskosten verantwortlich [RIEDER et al., 2004].

Im Jahr 2010 gaben die Institutionen der Gesundheitsvorsorge weltweit 11,6% ihres Budgets für die Behandlung von DM aus. Die Aufwendungen der einzelnen Länder bewegen sich zwischen 5% und 13%. Nordamerika und die karibischen Staaten wenden 198 Milliarden US-Dollar - 52,7% der globalen Ausgaben - für die Behandlung von DM auf, im Gegensatz dazu geben die afrikanischen Staaten insgesamt 1,4 Milliarden US-Dollar, 0,4% der weltweiten Kosten, aus. 3/4 der geschätzten Ausgaben sind für Patienten im Alter von 50 bis 80 Jahren. Für Frauen wird in der Diabetesvorsorge mehr Geld ausgegeben als für Männer (53% vs. 47%). Bedingt durch das höhere Mortalitätsrisiko sterben mehr Frauen als Männer an Begleiterkrankungen von DM und an DM selbst [ROGLIC und UNWIN, 2010].

2.2 THERAPIE VON DMT2 (von Sonja Adrigan)

2.2.1 Orale anti-diabetische Medikamente

Die drei größten Gruppen oraler Antidiabetika sind Biguanide (Derivate), Thiazolidindione (TZDs) und Sulfonylharnstoffe [VIGNERI et al., 2009]. Diese werden entweder einzeln, in Kombination oder zusammen mit Insulin eingenommen [LUDVIK et al., 2007].

Tabelle 3: Wichtigste orale Antidiabetika bei DMT2 [VIGNERI et al., 2009]

Pharmakologische Klasse	Pharmakologische Komponenten	Wirkungsweise
Biguanide	Metformin	Insulin-Sensitizer
		(reduzieren Insulinresistenz)
Thiazolidindione	Rosiglitazone	Insulin-Sensitizer
	Pioglitazone	(reduzieren Insulinresistenz)
Sulfonylharnstoffe	Glipizide	Sekretagoga
	Gliclazide	(stimulieren Insulinsekretion)
	Glyburide	
	Gliquidone	
	Glycolypyramide	
	Glimepiride	

Metformin wird schon sehr lange in der Therapie gegen DMT2 eingesetzt und gilt als das meist verwendete Antidiabetikum bei DMT2 [GIOVANNUCCI et al., 2010; GODSLAND et al., 2010]. Die Eigenschaften des Medikaments liegen darin, den zirkulierenden Glukose- und Insulinspiegel bei Patienten mit Insulinresistenz und Hyperinsulinämie zu senken. Dies wird einerseits durch die verstärkte Aktivierung des Enzyms AMP-aktivierende Kinase (AMPK) initiiert, welches die Glukoseaufnahme in den Muskelzellen fördert, andererseits durch die Unterdrückung der hepatischen Glukoseproduktion und ebenso durch die Steigerung der peripheren Insulinsensitivität erreicht [ATTIA et al., 2009; BAUR et al., 2010; VIGNERI et al., 2009].

Thiazolidindione gelten ebenfalls als Insulin-Sensitizer und verringern die Insulinresistenz. Durch das Eingreifen dieser Stoffe in den Fettstoffwechsel wird die Insulinempfindlichkeit in den Fett- und Muskelzellen gefördert. Häufig werden sie in Kombination mit Sulfonylharnstoffen und Metformin verabreicht [LUDVIK et al., 2007].

Sulfonylharnstoffe zählen zu den Insulin-Sekretagoga. Diese binden an spezifische Zellrezeptoren und stimulieren die Insulinsekretion der β -Zellen des Pankreas. Sie sind für ihre starke Reduktion des HbA1c bekannt und stehen in Zusammenhang mit der Gewichtszunahme und der Hypoglykämie [GIOVANNUCCI et al., 2010].

Gliptine (DDP-4-Hemmer) stellen eine der neuesten Therapieformen dar. Sie sind in der Lage, die Konzentration von Inkretinen (Hormonen) zu erhöhen und deren Abbau zu verlangsamen. Inkretine sind dafür bekannt, nur dann die Ausschüttung von Insulin aus dem Pankreas zu fördern und die Glukoseabgabe aus der Leber zu reduzieren, wenn die Blutglukosewerte erhöht sind [LUDVIK et al., 2007].

2.2.2 Insulin oder Insulinanaloga

Insulin wird von jenen DMT2 benötigt, deren β -Zellen-Funktion durch jahrelange Überproduktion von Insulin, in Folge von Insulinresistenz, nachlässt [GIOVANNUCCI et al., 2010]. Der Rückgang der β -Zellen-Funktion kann jahrelang dauern und steht in Abhängigkeit von Gewichtsreduktion, Alter und Blutzuckerwerten.

Unterschieden werden kurzwirksames Insulin oder Insulinanalogon, langwirksames Insulin oder Mischinsuline aus kurz- und langwirksamen Insulinen oder Insulinanaloga. Insulin oder humanes Insulin sind dem menschlichen Insulin biotechnologisch exakt gleich hergestellt, wobei die Insulinanaloga Strukturveränderungen aufweisen und somit den Vorteil von gezielteren Wirkungsweisen mit sich bringen [LUDVIK et al., 2007].

2.3 DMT2 IM ZUSAMMENHANG MIT DEM KREBSRISIKO (von Sonja Adrigan)

Es gibt zahlreiche Studien, die sich in den letzten Jahren intensiv mit der Assoziation von DMT2 und dem Krebsrisiko beschäftigen. Die Mehrheit der Ergebnisse lässt auf einen Zusammenhang schließen, jedoch muss beachtet werden, dass DMT2 und Krebs zwei sehr komplexe Krankheiten sind, die beide in enger Beziehung in Lebensalter, Übergewicht und Adipositas [BAUR et al., 2010], genetischer Prädisposition, aber auch Lebensstil- und Umweltfaktoren stehen [VIGNERI et al., 2009].

Die Ergebnisse mehrerer Studien und Metaanalysen zeigen eine starke Prävalenz von Leber-, Pankreas- und Gebärmutterkrebs sowie erhöhte Risiken von Dickdarm-, Harnblasen- und Brustkrebs bei DMT2 [BAUR et al., 2010; VIGNERI et al., 2009; GIOVANNUCCI et al., 2010].

Der enge Zusammenhang zwischen Leberkarzinomen und DMT2 wird einerseits durch die hohe Konzentration an endogenem Insulin, dem die Leberzellen ausgesetzt sind, und andererseits durch diabetes-spezifische Leberkrankheiten, die als Risikofaktoren für hepatozelluläre Karzinome bekannt sind, vermutet [VIGNERI et al., 2009].

Hyperinsulinämie als Auslöser von Pankreaskrebs bei DMT2 zu bestimmen, wird kritisch betrachtet, da diese Hypothese nicht das gehäufte Auftreten von Krebs bei IDDM-T1 Patienten, deren Pankreaszellen keiner erhöhten Konzentration von Insulin ausgesetzt sind, berücksichtigt [VIGNERI et al., 2009].

Die langsamere Transitzeit des Darms sowie die vermehrte Produktion von Insulin und Gallensäuren [COUGHLIN et al., 2004] sowie erhöhter oxidativer Stress bei DMT2 wird mit dem gesteigerten Auftreten von Kolonkarzinomen assoziiert [KEJARIWAL et al., 2008].

Nur Prostatakrebs wird bei DM mit einem geringeren Risiko in Verbindung gebracht [CURRIE et al., 2009; VIGNERI et al., 2009]. Als mögliche Gründe werden hier die niedrigeren Testosteronwerte, veränderte Insulin- und Leptinkonzentrationen, antidiabetische Therapie sowie der Lebensstil angesprochen [VIGNERI et al., 2009].

2.3.1 Mögliche Krebsrisikofaktoren bei DMT2

Tabelle 4: Mögliche direkte oder indirekte Krebsrisikofaktoren bei DMT2 [VIGNERI et al., 2009]

Direkte Risikofaktoren	Indirekte Risikofaktoren
Hyperinsulinämie	Adipositas
Hyperglykämie	Alter
Insulinresistenz	Geschlecht
↑ Oxidativer Stress	Ernährungsweise
↑ Chronische Entzündungen	Bewegungsmangel
↑ Fettsäuresynthese Expression	Rauchen
Antidiabetika	Alkohol

DMT2 haben ein höheres Krebsrisiko. Bis jetzt ist noch unklar, ob es eine Kausalität zwischen diesen Krankheiten gibt [GIOVANNUCCI et al., 2010].

Hyperinsulinämie tritt im Zusammenhang mit Insulinresistenz bei DMT2 auf und spielt möglicherweise bei der Krebsentstehung eine bedeutende Rolle [BAUR et al., 2010; GODSLAND, 2010; VIGNERI et al., 2009]. Grund dafür könnte der mitogene Effekt von Insulin sein. Steigt die Insulinkonzentration an, ist Insulin imstande sich an den Insulin-like-growth Faktor 1 Rezeptor (IGF1R) zu binden, welcher dem Insulin Rezeptor (IR) zu 80% homolog ist und aktiviert diesen. Im Vergleich zum IR weist der IGF1R einen erhöhten mitogenen Effekt sowie eine erhöhte Transformationsaktivität auf und verursacht über mehrere Phosphorylierungskaskaden die Aktivierung oder die Deaktivierung verschiedener Proteine und beeinflusst dadurch die Zellteilung, das Zellwachstum, das Überleben der Zelle und den Lipid- und Kohlenhydratmetabolismus [GODSLAND, 2010].

Weiters wird vermutet, dass Insulin die Konzentration von IGF 1-bindenden Proteinen senkt, welche anti-tumorgenetische und möglicherweise auch apoptotische Eigenschaften besitzen [GODSLAND, 2010; VIGNERI et al., 2009].

Häufig tritt Hyperinsulinämie im Zusammenhang mit Hyperglykämie auf. Es ist jedoch schwierig zu erkennen, von welcher der beiden Ursachen ein höheres Krebsrisiko ausgeht. Bisher ist bekannt, dass erhöhte Blutzuckerwerte und eine gestörte IFG stark mit dem Krebsrisiko assoziiert sind. In einem Artikel von Vigneri et al. werden die Beeinträchtigung der Ascorbinsäure und die Reduktion der Effektivität des Immunsystems im Zusammenhang mit erhöhten Glukosewerten als mögliche Auslöser für ein erhöhtes Krebsrisiko genannt [VIGNERI et al., 2009].

Übergewicht steht ebenso im engen Zusammenhang mit einem erhöhten Krebsrisiko. Es wird vermutet, dass die Ursachen wie Hyperinsulinämie bei abdominaler Fettverteilung, hohe Kalorienaufnahme und hormonelle Veränderungen für die Förderung des Krebsrisikos verantwortlich sind [GODSLAND, 2010; VIGNERI et al., 2009]. Die Tatsache, dass über 80% der DMT2 übergewichtig sind, erschwert die Unterscheidung, ob das Krebsrisiko bei DMT2 durch die Folgen des Diabetes oder durch Adipositas erhöht ist.

Vermeehrt auftretende chronische Entzündungen und oxidativer Stress, die hauptsächlich bei schlechter metabolischer Kontrolle vorkommen, reduzieren die intrazelluläre antioxidative Kapazität und führen zu einem Anstieg der reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS), die die DNA schädigen und/oder mit der DNA-Reparatur interferieren [VIGNERI et al., 2009].

Die erhöhte Fettsäure-Synthese-Expression und Fettsäure Produktion bei DMT2 stehen ebenfalls unter Verdacht, die Tumorentstehung zu fördern [VIGNERI et al., 2009].

Krebs und DMT2 sind Krankheiten, die mit zunehmendem Lebensalter steigen und somit auch hier die Ursachenerkennung der Karzinogenese bei Diabetikern erschweren [GIOVANNUCCI et al., 2010].

Daten über die Krebsmortalität sind bis jetzt noch sehr widersprüchlich. Vereinzelte Studien zeigten eine mögliche erhöhte Krebssterblichkeitsrate durch Leber-, Pankreas- [COUGHLIN et al., 2004], Kolon- und Brustkrebs bei DM im Vergleich zu

Krebspatienten, die nicht zusätzlich mit DM belastet sind. Als wahrscheinlicher Grund werden Hyperinsulinämie, der schlechtere Gesundheitszustand oder beide Faktoren in Betracht gezogen [VIGNERI et al., 2009].

2.3.2 Möglicher Einfluss von Diabetes-Therapien auf das Krebsrisiko

Bis dato ist noch ungeklärt, ob es einen kausalen Zusammenhang zwischen den Therapeutika für DMT2 und dem Krebsrisiko gibt. Die bisherigen Studien sind kontrovers. Die Interpretation dieser Daten wird zusätzlich durch die unterschiedlichen Medikamente und Dosierungsformen im Laufe der Erkrankung erschwert [VIGNERI et al., 2009].

Einige Studien belegen, dass DMT2-Patienten, die mit Metformin behandelt werden, im Vergleich zu Diabetikern, die unter einer anderen anti-diabetischen Behandlungsmethode stehen, ein geringeres Krebsrisiko und eine niedrigere Krebsmortalität aufweisen. Es wird angenommen, dass möglicherweise die insulinsenkenden Eigenschaften, die Inhibition der Zellproliferation und der Glukose- und Lipidsynthese, die Förderung des Serin/Threonin-Kinase (LKB1)-Regulators, ein Tumorsuppressorprotein und die Reduktion von freien Radikalen hierfür verantwortlich sind [CURRIE et al., 2009; GODSLAND, 2010; LANDMAN, et al., 2010; VIGNERI et al., 2009; GIOVANNUCCI et al., 2010].

Die Auswirkungen von Thiazolidindionen auf das Krebsrisiko sind relativ widersprüchlich. In-vitro-Studien sagen dem Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor(PPAR γ)-Agonist auf Grund von Inhibition des Zellwachstums, der Initiierung von Apoptose und Zell-Differenzierung anti-krebsfördernde Eigenschaften nach. Forschungen an Nagetieren wiederum gehen von einer tumorfördernden Wirkung des PPAR γ -Agonisten aus. Epidemiologische Studien und Metaanalysen, die ein erhöhtes Krebsrisiko aufweisen, sind aufgrund der kurzen Behandlungszeiten kritisch zu betrachten. Laut einem Artikel von Giovannucci et al. konnten einige wenige Studien keine krebsfördernde Wirkung von Thiazolidindione feststellen [GIOVANNUCCI et al., 2010].

Orale Sulfonylharnstoffe stimulieren die endogene Insulinsekretion und könnten durch die gesteigerte Hyperinsulinämie das Krebsrisiko steigern. Die Daten von einigen wenigen Studien, die eine erhöhte Krebsrate im Vergleich zu Patienten mit Metformin-Behandlung aufzeigen, sind ebenfalls widersprüchlich. Grund dafür sind die fehlenden Informationen über Dauer und Dosis der Sulfonylharnstoff Aufnahme [GIOVANNUCCI et al., 2010; VIGNERI et al., 2009].

Bei präklinischen Tierversuchen mit Gliptinen (DDP-4-Hemmer) kann man zwar eine leichte Steigerung des Krebsrisikos beobachten, jedoch kann dieses Ergebnis mit Humanstudien nicht bestätigt werden. Die Aussagekraft der Ergebnisse ist schwierig zu interpretieren, da diese Substanzen noch nicht lange in der Diabetestherapie eingesetzt werden und noch zuwenige Patienten das Präparat einnehmen [GIOVANNUCCI et al., 2010].

Insulin und Insulinanaloga werden in vielen epidemiologischen Studien mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert. Wie bereits oben erwähnt, wird die Hyperinsulinämie als ein möglicher Riskikofaktor angenommen. Im Vergleich zur endogenen Insulinsekretion zirkuliert bei IDDM eine signifikant höhere Konzentration von Insulin im Körper. Diese Ergebnisse dieser epidemiologischen Studien sind umstritten, da mögliche Confounder wie BMI, Insulinmenge, glykämische Kontrolle oder die Dauer der Krankheit zum Teil nicht berücksichtigt wurden. Bis heute ist nicht geklärt, ob Insulin oder Insulinanaloga über mögliche direkte oder indirekte Mechanismen Krebs hervorrufen [GIOVANNUCCI et al., 2010].

Eine weltweite Querschnittsstudie mit über 7.000 Probanden zeigt, dass IDDMT2-Patienten die gleiche Prävalenz von bösartigen Tumoren, aber eine erhöhte Krebsmortalität im Vergleich zu Nicht-Diabetikern aufweisen. Dies führt zur Annahme, dass Hyperinsulinämie nicht das Krebsrisiko erhöht, sondern bei einer Krebserkrankung das Krebswachstum möglicherweise stimuliert und dadurch beschleunigt [BAUR et al., 2010].

2.4 DER CYTOKINESIS-BLOCK MICRONUCLEUS CYTOME ASSAY (CBMN) (von Sonja Adrigan)

Der CBMN-Assay wurde von Fenech und Morley entwickelt und ist eine geeignete Methode um Chromosomen-Schäden, Zytostase und Zytotoxizität zu messen. Durch seine Reliabilität und die gute Reproduzierbarkeit wird er erfolgreich für Tests zur Bestimmung der Genotoxizität sowie zur Bestimmung der Strahlungsempfindlichkeit von Geweben eingesetzt [FENECH, 2007].

Der CBMN-Assay ist ebenso eine geeignete Methode um DNA-Schäden zu messen, die im Zusammenhang mit dem Mikronährstoffstatus stehen. Studien, die auf dieser Technik beruhen, zeigen, dass die Menge der Mikronährstoffaufnahme (Supplementation von Folsäure, Vitamin A, C, E) sowie der Mikronährstoffstatus (Folsäure und Vitamin B12) die Häufigkeit von Mikrokernen (MNI) beeinflussen [LAL und AMES, 2011].

Das Prinzip des CBMN-Assay basiert auf den „einmalig geteilten Zellen“, die als Zweikernzellen (BNCs) nach Inhibition der Zytokinese durch Cytochalasin B aufscheinen. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass sie in einem Verfahren Informationen über zytotoxische (Verhältnis von Apoptose und Nekrose), zytostatische (Verhältnis von Einkernzelle, Zweikernzelle, Mehrkernzelle) und genotoxische (Anzahl von MNI, Nuclear Buds (NBUDs), Nucleoplasmic Bridges (NPBs)) Vorkommnisse liefert [FENECH, 2007].

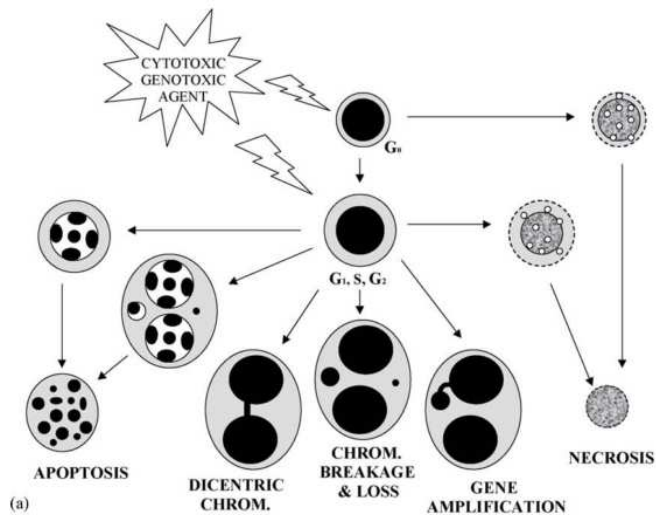


Abbildung 2: Entstehung von MNi, NBUDs, NPBs, Apoptosen und Nekrosen [FENECH, 2006]

MNi weisen auf Chromosomenbrüche und/oder ganze Chromosomenverluste hin und dienen somit als günstiger Biomarker für DNA-Schäden. Sie entstehen während der Zellteilung aus azentrischen chromosomalen Fragmenten oder ganzen Chromosomen, die während der Anaphase zurückbleiben. Da MNi in BNCs entstehen können, liefert der CBMN-Assay eine perfekte in-vitro-Methode, um sie in Lymphozyten von Menschen und Säugetieren nachzuweisen [FENECH, 2007]. Um die verschiedenen Effekte von ungünstigen Zellteilungsabläufen auszuschalten, werden MNi nur in BNCs gemessen [FENECH, 2006].

NBUDs besitzen die gleiche Morphologie wie MNi, jedoch mit dem Unterschied, dass sie mit dem Zellkern über eine Engstelle oder einen „Stiel“ verbunden sind. Sie entstehen durch Genamplifikation und werden als Indikatoren für den Verlust von amplifizierter DNA und/oder den Verlust von DNA-Reparatur-Mechanismen verwendet [FENECH, 2007].

NPBs werden für die Messung von Chromosomenveränderungen herangezogen. Sie entstehen in der Anaphase, wenn die Zentromere von dizentrischen Chromosomen auf die gegenüberliegenden Spindelpole gezogen werden, wodurch es zu Fusionen von Bruchstücken oder Verkürzungen der Chromosomen kommen kann [FENECH, 2007].

Apoptotische Zellen entstehen durch den programmierten Zelltod. Die Apoptose dient im Körper zur feinen Regulation der Proliferation sowie der gezielten Zerstörung von Zellen. Die Zelle beginnt zu schrumpfen und durch die Auflösung der Zellmembran bilden sich apoptotische Vesikel, in denen die DNA als Fragmente vorliegen. Hauptauslöser der mitochondrialen Kaskade durch Cytochrom C sind vor allem DNA-Schäden und zellulärer Stress [LÖFFLER, 2008].

Nekrotische Zellen werden aufgrund externer Einflussfaktoren wie z.B. Virusbefall, Gifte, physikalische Schäden u.a. hervorgerufen und treten im Vergleich zu apoptotischen Zellen in Zusammenhang mit Entzündungen auf [LÖFFLER, 2008].

2.4.1 Mikrokerne und ihr Zusammenhang mit dem Krebsrisiko

Schäden des Genoms sind maßgeblich an der Entstehung von Krankheiten wie Krebs beteiligt [THOMAS et al., 2011]. Im Artikel von Bonassi et al. wird erwähnt, dass einige Publikationen den Zusammenhang von erhöhten DNA-Schäden und genetischer Instabilität mit Krebs bestätigen. Diese Ergebnisse führen zur Annahme, dass chromosomale Schäden und Karzinogenese im kausalen Zusammenhang stehen [BONASSI et al., 2011]. Aufgrund der Tatsache, dass MNi in den peripheren Blutlymphozyten (PBL) einen wichtigen Indikator für genetische Instabilität und DNA-Schäden darstellen [CEPPI et al., 2011] wurde in den letzten Jahren vermehrt an ihrer Bedeutung in der Krebsentstehung geforscht. Die im folgenden Text genannten Beobachtungen unterstützen die Annahme einer Assoziation zwischen der MN-Anzahl und einem erhöhten Krebsrisiko [BONASSI et al., 2007].

Beobachtungen, die auf einen Zusammenhang schließen lassen:

- signifikante Anstiege von Krebserkrankungen bei Personen mit erhöhter MN-Anzahl in PBL
- erhöhte MN-Anzahl bei unbehandelten Krebspatienten
- Blutkonzentrationen und/oder Supplementationen von Mikronährstoffen, die mit einem reduzierten Krebsrisiko assoziiert sind, wie z.B. Folsäure, Kalzium, Vitamin E und Nikotinsäure, stehen in Korrelation mit der MN-Häufigkeit
- chromosomalen Anomalien und MN-Anzahl
- Korrelation von genotoxischen MN-induzierenden Stoffen und Karzinogenese [BONASSI et al., 2007].

Um die MN-Häufigkeit als eindeutigen Biomarker für das Krebsrisiko heranziehen zu können, müssen noch weitere prospektive Studien durchgeführt werden, die den genauen Mechanismus und die Assoziationsstärke feststellen [BONASSI et al., 2011; FENECH et al., 2011]. MNi stellen aber auch nur einen Teil von chromosomalen Schäden in den Lymphozyten dar und sind deshalb als alleiniger Indikator unzureichend [BONASSI et al., 2007].

Der CBMN-Assay ist in der Lage durch die Messung von NBUDs und NPB zusätzliche Schäden an den Chromosomen zu erkennen, dadurch kann das Krebsrisiko besser eingeschätzt werden. Diese Annahme wird durch das vermehrte Auftreten von NBUDs und NPB bei Lungenkrebspatienten im Vergleich zu Gesunden verstärkt [BONASSI et al., 2011].

Weitere Studienergebnisse zeigen ebenfalls eine Korrelation zwischen der MN-Häufigkeit und den gewebsspezifischen Krebsentstehungen. Die Studie von Bonassi et al. stellt signifikante Zusammenhänge zwischen MNi und gastrointestinalen und urogenitalen Krebserkrankungen und ebenso ein erhöhtes Erkrankungsrisiko von Magen-, Intestinal- und Brustkrebs fest [BONASSI et al., 2007]. Überdies weisen

Krebspatienten mit überdurchschnittlich hohen Chromosomenschäden eine erhöhte Mortalitätsrate auf [EL-ZEIN et al., 2011].

2.4.2 DMT2 und das Auftreten von MNi

Bis heute sind noch wenige Daten über den Zusammenhang von DMT2 mit der MN-Häufigkeit vorhanden. Studien belegen jedoch eine signifikant erhöhte Anzahl von MNi bei DMT2-Patienten im Vergleich zu Gesunden [MARTÍNEZ-PÉREZ et al., 2007; ZÚÑIGA-GONZÁLEZ et al., 2007]. Typ 2 Diabetiker mit geringer glykämischer Kontrolle zeigen ein höheres MN-Vorkommen, wodurch eine positive Korrelation von Serumglukosekonzentrationen und gehäuften Chromosomen-Schäden belegt wird [MARTÍNEZ-PÉREZ et al., 2007].

Laut dem heutigen Stand der Wissenschaft wird angenommen, dass die höheren chromosomalen Schäden bei DMT2-Patienten durch vermehrten oxidativen Stress, verminderte Glutathion-Synthese oder durch die Einnahme von Medikamenten, die den Vitamin-B12-Gehalt senken und die Homocystein (Hcy) Konzentration erhöhen, entstehen [MARTÍNEZ-PÉREZ et al., 2007].

Bis zu diesem Zeitpunkt liegen noch keine wissenschaftlichen Daten vor, die den Einfluss der Therapieformen von DMT2 im Zusammenhang mit den Parametern des CBMN-Assay untersuchen.

2.5 ERNÄHRUNG UND KREBSENTSTEHUNG (von Marie Therese Bulla)

Die Verbindung von Ernährung und damit einhergehender Krebsinzidenz wird weitestgehend anerkannt. In einigen epidemiologischen Studien werden bereits die protektiven Effekte einer obst- und gemüsereichen Diät auf einige Krebsarten beschrieben [LOFT et al., 2008]. Der Einfluss der Ernährung auf die Krebsentstehung wird bei ca. 30% aller Krebserkrankungen in westlichen Ländern und bei 20% in Entwicklungsländern angesetzt. In den letzten Jahren findet jedoch ein Wandel statt, indem der hohe Stellenwert der Ernährung in der Krebsentstehung von multiplen anderen Faktoren verdrängt wird. 2004 finden sich nur mehr wenige Daten, die diese Erkenntnisse signifikant unterstützen. Der Nahrungsaufnahme von Obst und Gemüse werden dennoch protektive Effekte zugesprochen. Zur Krebsprävention wird unter anderem die Nahrungsaufnahme von mindestens 400 g Obst und Gemüse pro Tag empfohlen. Lebensstilfaktoren wie Ernährung und Bewegung spielen eine wichtige Rolle bei Krebsentstehung. Es gibt überzeugende Ergebnisse, die belegen, dass Übergewicht und Adipositas die Entstehung von Oesophagus-, Kolorektal-, Gebärmutterhals-, Nierenkrebs und Brustkrebs bei Frauen in der postmenopausalen Phase fördert und dass sportliche Betätigung das Risiko bei der Entstehung von Kolon- und Brustkrebs vermindern kann [KEY et al., 2004]. Die Wirkmechanismen der Mikronährstoffe sind jedoch komplex und weitgehend noch nicht erforscht [LOFT et al., 2008].

Die Herausforderung liegt darin, die Komponenten der Lebensmittel, die für krebsprotektive Effekte verantwortlich sind, zu identifizieren, ihre Wirkmechanismen zu verstehen und die diätetische Menge dieser Wirkstoffe zu ermitteln, die eine optimale Leistung für die Gesundheit erbringen. Der Focus ist auf Verbindungen in Lebensmitteln gerichtet, die über eine antioxidative Kapazität verfügen. Es ist bewiesen, dass oxidative Schäden an Zellkomponenten eine zentrale Rolle in vielen degenerativen Prozessen spielen. Man geht davon aus, dass natürliche Antioxidantien helfen, eine Anhäufung solcher Schäden zu begrenzen und dadurch einen bestimmten

Grad an Schutz liefern [ASTLEY et al., 2004]. In einem Bericht von Møller et al. wird darauf hingewiesen, dass epidemiologische Studien niedrigere Krebsrisiken bei Menschen mit einem hohen Nahrungsanteil an Obst und Gemüse, die viele Antioxidantien enthalten, bezeugen. Dies gilt vor allem für Krebserkrankungen in den Atemwegen und im oberen Gastrointestinaltrakt [MØLLER et al., 2004].

2.5.1 Ernährung und oxidativer Stress im Zusammenhang mit Krebs DNA-Oxidation, DNA-Reparatur, ROS und Krebsentstehung

Freie Radikale resultieren unter anderem aus normalen metabolischen Prozessen wie z.B. der Zellatmung. Wenn aber der Wert der freien Radikale die normale Ausgleichskapazität der Zelle übersteigt, kommt es zu oxidativem Stress, der zu Zell- und Genomschäden führen kann. Schäden am Genom, einschließlich DNA-Strangbrüche, Änderungen in den Chromosomen, Chromosomenaberration oder Änderungen in Methylierungsprozessen, die anschließend zu einer veränderten Anzahl an Genen und Genexpression führen, werden als wesentlich für die Entwicklung von Krankheiten wie Krebs identifiziert [THOMAS et al., 2011]. DNA-Reparaturmechanismen sind entscheidend dafür, ob ein durchgehend niedriges Ausmaß an DNA-Schäden beibehalten und dadurch einen Schutz vor Krebs gewährleistet werden kann [COLLINS et al., 2002]. Man kann annehmen, dass Substanzen, die oxidative Schäden der DNA vermindern, auch das Risiko einer Krebsentwicklung herabsetzen [LOFT et al., 2008].

Obwohl nicht direkt durch Kohortenstudien fundiert bewiesen, wird angenommen, dass oxidativer Stress viele Krankheiten wie Krebs, Diabetes und koronare Herzkrankheiten auslösen oder deren Verlauf erschweren kann [MØLLER et al., 2006]. Diabetiker, deren Zellen aufgrund von hohen Glukose- und HbA1C-Konzentrationen unter erhöhtem oxidativen Stress leiden, könnten von einer Supplementation mit Antioxidantien profitieren [MØLLER et al., 2004].

2.5.2 Mikronährstoffmangel oder -überschuss und Krebsentstehung

Epidemiologische Studien lassen eine starke Assoziation zwischen Mikronährstoffmangel und der Entwicklung von Krebskrankheiten erkennen [LAL et al., 2011]. Zellen sind einer konstanten Oxidation durch metabolische und biochemische Reaktionen sowie durch externe Faktoren ausgesetzt. Dadurch liegt es nahe, dass DNA-Reparatursysteme und Antioxidantien in Nahrungsmitteln wichtige Einflussgrößen für geringere Werte an DNA-Schäden und ein vermindertes Krebsrisiko darstellen [MØLLER et al., 2004].

Der Mikronährstoffstatus spielt eine wichtige Rolle im Schutz gegen Schäden am Genom. Die Nährstoffe stellen Cofaktoren bereit, die für die einwandfreie Funktion von Enzymen erforderlich sind. Diese Enzyme sind in der DNA-Reparatur, Entgiftung oder Erhaltung von Methylierungsprozessen des Genoms involviert [THOMAS et al., 2011]. Es wurde gezeigt, dass beides, ein Mikronährstoffmangel und/oder ein Überschuss zu Schäden am Genom führen können [THOMAS et al., 2011]. Humanstudien zeigen, dass die MN-Häufigkeit in PBL signifikant mit der Aufnahmehöhe oder mit der Plasmakonzentration von Folat, Vitamin B12, Riboflavin, Biotin, Pantothenat, beta-Carotin, Vitamin E, Retinol und Calcium assoziiert werden (Abbildung 3) [FENECH et al., 2011].

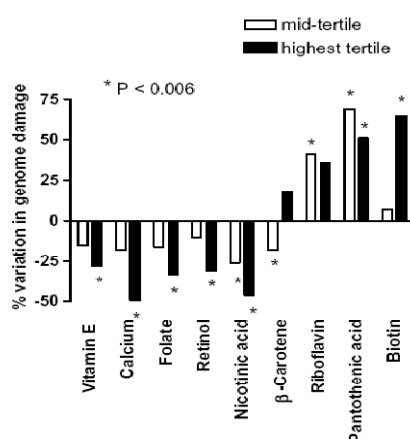


Abbildung 3: Prozentuale Variation der Rate des genomischen Schadens nach der Statusbestimmung von Vitamin E, Calcium, Folat, Retinol, Nicotinsäure, Beta-Carotin, Riboflavin, Pantothensäure und Biotin im mittleren und höchsten Tertil im Vergleich zum niedrigsten Tertil. Genomische Schäden wurden in PBL mit CBMN Assay gemessen [FENECH, 2008]

Andere Studien dokumentieren DNA-Schäden bei Menschen, die moderat unterversorgt an Eisen, Zink, Folat und Vitamin B12 oder Cholin waren [LAL et al., 2011]. Schäden am Genom, die durch moderaten Mikronährstoffmangel verursacht werden, gleich den Schäden, die durch Umweltgifte wie z.B. chemische Karzinogene, ultraviolette Strahlung und ionisierende Strahlung, entsprechen (Abbildung 4) [FENECH, 2008].

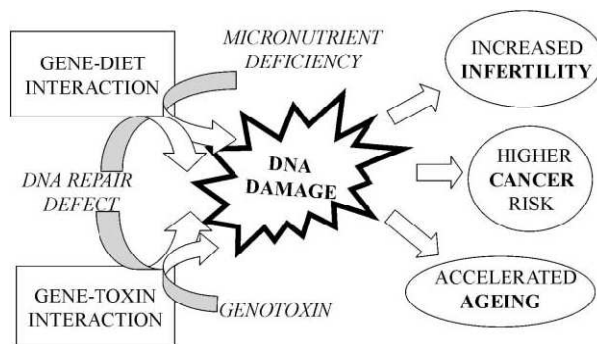


Abbildung 4: Das Konzept der Gen-Ernährungs- und Gen-Toxin-Interaktion und deren Einfluss auf die unterschiedlichen gesundheitlichen Schäden [FENECH, 2002]

Es gibt ein starkes internationales Bewusstsein dafür, die empfohlene Tagesdosis an Mikronährstoffen zur Prävention degenerativer Krankheiten (wie z.B. Krebs, kardiovaskuläre Krankheiten und Alzheimer) neu zu definieren um die Morbidität bei älteren Personen zu senken [FENECH, 2002].

Die optimale Mikronährstoffaufnahme zur langfristigen Gesundheitserhaltung ist jedoch äußerst schwierig zu bestimmen und kann über den aktuellen Aufnahmerempfehlungen liegen [LAL et al., 2011].

2.5.3 Studien zu Ernährung und DNA-Schäden bzw. Mikrokernvorkommen

Von diätetischen Antioxidantien wird angenommen, dass sie Angriffe der freien Radikale auf die DNA herabsetzen und folglich vor Krebs verursachenden Mutationen, schützen. Jedoch beruht diese Annahme vorerst nur auf Vermutungen [ŞARDAŞ et al., 2001].

Thomas et al. beschreibt den Effekt von einer Ernährungsinterventionen auf das Auftreten von Mikrokernen in menschlichen Lymphozyten und Mundschleimhautzellen. Die Mehrheit der Ergebnisse zeigt, dass eine Supplementation mit antioxidativen Vitaminen und bestimmten B-Vitaminen zu einer wesentlichen Reduktion der MN-Häufigkeit führt [THOMAS et al., 2011]. Møller et al. geben an, dass sich in der Literatur sehr viele Interventionsstudien finden lassen, die die Effekte von Antioxidantien auf oxidativ geschädigte DNA in Geweben, weiße Blutkörperchen/Blutzellen oder im menschlichem Urin untersuchen [MØLLER et al., 2006]. Interventionsstudien, bei denen Supplemente mit Antioxidantien verabreicht wurden, sind daran gescheitert ist zu beweisen, dass die Aufnahme von antioxidativen wirkenden Vitaminen das Krebsrisiko vermindert. Im Review von Bjelkavoic et al. geht hervor, dass beta-Carotin, Vitamin A und Vitamin E die Mortalität erhöhen [BJELAKOVIC et al., 2007]. Ein Drittel der Interventionsstudien, die die Wirkung von Antioxidantien untersuchen, zeigen einen schützenden Effekt gegen oxidative DNA-Schäden in weißen Blutzellen [LOFT et al., 2008].

Abhängig von den verabreichten Konzentrationen wurde ein Rückgang der MN-Häufigkeit bei der Supplementierung von Folsäure und Vitamin B12, Coenzym Q10, Vitamin C, Kombination von Vitamin E, beta-Carotin, Vitamin C und Selen beobachtet. Die Reduktion der MNi durch Folsäure, Vitamin C, Vitamin E und Selen ist nicht signifikant (Tabelle 5) [THOMAS et al, 2011]. Ein Review von Møller et al. zu Interventionen, die Auswirkungen von Antioxidantien auf DNA-Schäden untersuchen, zeigt, dass einige Studien darauf hinweisen, dass Probanden, die höhere Werte an

oxidativen Stress aufweisen, von einer Einnahme von Antioxidantien profitieren. Diese Probanden weisen eine geringere Anzahl von Strangbrüchen auf. Studien mit Diabetikern zeigen, dass jene Probanden mit ähnlichen Ausgangswerten an Strangbrüchen wie gesunde Probanden, keinen Nutzen durch antioxidative Supplemente zeigen, wobei Diabetiker mit höheren Ausgangswerten an Strangbrüchen verminderte Strangbrüche nach einer Supplementation aufweisen. Diese Daten über Diabetiker lassen vermuten, dass bereits die Ausgangswerte an oxidativen DNA-Schäden hoch sein müssen um positive Effekte erzielen zu können [MØLLER et al., 2004]. Es ist zu berücksichtigen, dass ein Großteil der Studien gesunde Individuen untersuchte. Probanden, die höheren oxidativen Stress ausgesetzt sind, profitieren mehr von antioxidativen Supplementen als Probanden, die geringeren oxidativen Stress ausgesetzt sind [LOFT et al., 2008].

In der folgenden Tabelle sind unterschiedliche Studien zur Effektivität verschiedener Supplemente auf DNA-Schäden bzw. MN-Häufigkeit in Lymphozyten zusammengefasst.

Tabelle 5: Interventionsstudien, die den Mikronährstoffstatus in Relation zur MN-Häufigkeit in Lymphozyten untersuchen. RDI = „Recommended daily intake“: Folsäure 400 µg, Vitamin B12 6 µg, Vitamin C 75 mg, Vitamin E/Tocopherol 10 mg, Selen 35 µg, Coenzym Q10 30-200 mg, Beta-Carotin 10 mg, Zink 15 mg, Rutin 1000-3000 mg [THOMAS et al., 2011]. D-A-CH-Referenzwerte der DGE,ÖGE,SGE/SVE: Folsäure 400 µg/d, Vitamin B12 3 µg/d, Vitamin C 100 mg/d, Vitamin E 12-15 mg Tocopheroläquivalent/d, Selen 30-70 µg/d, Beta-Carotin 6 mg/d, Zink 10 mg [D-A-CH, 2008]

Mikronährstoff	Supplement/ Darreichungsform	Effekt auf MN-Häufigkeit	Autor, Jahr
B-Vitamine	Folsäure (0,7 mg/d, 2 Monate; 2,0 mg/d, 2 Monate)	Kein signifikanter Unterschied	Fenech et al., 1997 (A)
	Folsäure und Vitamin B12 (700 µg Folsäure, 7 µg B12/40 g Cerealien (3.5 x RDI), 3 Monate; 2000 µg Folsäure, 20 µg B12 (10 x RDI), 3 Monate)	Signifikante Reduktion (15.3%, P < 0.03 in behandelter Gruppe; 25.4%, P < 0.01 bei Personen in behandelter Gruppe mit Ausgangshäufigkeit MN über Durchschnitt)	Fenech et al., 1998
	Folsäure (15 mg dreimal pro Woche) und Vitamin B12 (1000 µg/Woche)	Signifikante Reduktion (59%, P = 0,001)	Stopper et al., 2008
Einzelne Antioxidantien	Vitamin C (2g Supplement)	Kein signifikanter Effekt	Crott et al., 1999
	Beta-Carotin (30 mg/d), Vitamin C (300 mg/d)	Signifikant inverse Korrelation mit Plasma-Beta-Carotin (P < 0,001) (Effekt an strahlungsinduzierter MN-Häufigkeit)	Umegaki et al., 1994
	Vitamin E (50 mg, 8 Wochen; 500 IU, 8 Wochen)	Keine signifikante Reduktion	Fenech et al., 1997 (B)
	Selen (75, 150, 225 µg/d, 8 Wochen mit jeder Konzentration)	Keine signifikante Reduktion	Wu et al., 2009
	Coenzym Q10 (100 mg/d)	Signifikante Reduktion (38%, P < 0,05)	Migliore et al., 2004
Duale Antioxidantien	Vitamin C (1000 mg/d, 7 Tage), Vitamin C (1000 mg/d) und Vitamin E (335 mg/d, 7 Tage)	Signifikante Reduktion (49%, P < 0,05)	Schneider et al., 2001
Mikronährstoff	Supplement/ Darreichungsform	Effekt auf MN-Häufigkeit	Autor, Jahr
Multiple Antioxidantien	Alpha-Tocopherol (100 mg/d), Beta-Carotin (6 mg/d), Vitamin C (100 mg/d), Selen (50 µg/d)	Signifikante Reduktion (39%, P = 0,015)	Smolkova et al., 2004
	Beta-Carotin (18 mg/d), Ascorbinsäure (900 mg/d), D-Alpha-Tocopherolsuccinat (250 mg/d), Zink (12 mg/d)	Signifikante Reduktion (25%, P < 0,05)	Fenech et al., 2005
	Beta-Carotin (15 mg/d), Rutin (75 mg/d), Retinolacetat (3 mg/d), Alpha-Tocopherol (30 mg/d), Ascorbinsäure (150 mg/d), Folsäure (0.2 mg/d)	Signifikante Reduktion (24,7%, P < 0,05) (Effekt an strahlungsinduzierter MN-Häufigkeit)	Gaziev et al., 1996

2.5.4 Vitamin B12, Folsäure und Hcy

Die Ernährungsfaktoren, die die MN-Häufigkeit am deutlichsten beeinflussen, sind Vitamin B12 und Hcy, sofern kein Folsäuremangel vorliegt. Folat und Vitamin B12 bilden eine wichtige Funktion, indem sie Methylgruppen, die für den DNA-Metabolismus und für die Erhaltung der DNA essentiell sind, zur Verfügung stellen (Abbildung 5) [THOMAS et al., 2011].

Folatmangel hat einen destabilisierenden Effekt auf das Genom [LAL et al., 2011]. Im Falle eines Folatmangels akkumuliert Deoxyuridinmonophosphat (dUMP), was dazu führt, dass Uracil anstelle von Thymin in die DNA eingebaut wird. Die exzessive Eingliederung von Uracil führt nicht nur zu Punktmutationen sondern auch zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA, zu Chromosomenbrüchen und zu MN-Bildung. Ähnlich verursacht Vitamin B12-Mangel hohe Uracil-Einlagerungen, indem es die Synthese von 5,10 Methylentetrahydrofolat verhindert, das zur dTMP-Synthese (Deoxythymidinmonophosphat) nötig ist, was wiederum zu einer erhöhten Rate an Chromosomenbrüchen führt. Folat und Vitamin B12 werden zur Synthese von Methionin durch Remethylierung von Homocystein benötigt [THOMAS et al., 2011]. Interventionsstudien mit Folat- und/oder Vitamin B12-Supplementen zeigen, dass die DNA-Hypomethylierung, die Chromosomenbrüche, die Fehlfunktion bei Einbau von Uracil und die Bildung von Mikrokernen nach der Aufnahme minimiert sind. Folsäure und Vitamin B12 wurden in Dosen eingenommen, die über den derzeitigen gültigen Zufuhrempfehlungen liegen (Folsäure: über 400 mg/d, Vitamin B12: über 2 mg/d) [FENECH, 2002].

empfohlene Tagesdosis liegt bei 400 µg Folsäure und mehr als 2 µg Vitamin B12 [FENECH, 2002].

Eine Studie mit Männern im Alter von 50 und 70 Jahren zeigt eine signifikant erhöhte MN-Häufigkeit bei Individuen mit suboptimalen Serumspiegeln an Folat (<6,8 nmol/l), Vitamin B12 (<150 pmol/l) und Hcy (>10 µmol/l) im Vergleich zu Individuen mit höheren Serumwerten. Probanden mit einem Homocysteinspiegel über 10 µmol/l und einem normalen Vitamin B12- und Folsäurestatus weisen höhere MN-Werte als jene, mit einem Homocysteinspiegel unter 10 µmol/l, einem Vitamin B12-Status >150 pmol/l und Folsäurespiegel >6,8 nmol/l. Diese Beobachtung führt zu der Erkenntnis, dass ein erhöhter Homocysteinspiegel, unabhängig von Vitamin B12- oder Folsäurekonzentrationen, ein wichtiger Faktor für chromosomale Schäden darstellt [FENECH et al. 1997 (A)].

Probanden mit Folsäurewerten im Normalbereich hatten eine um 39% niedrigere MN-Anzahl als Probanden mit niedrigen Folsäurewerten. Bei Probanden mit niedrigen Folsäurewerten gibt es eine signifikante Korrelation zwischen Folsäure und Hcy. Das führt zu der Annahme, dass ein Folsäuremangel Risikofaktoren wie einen erhöhten Hcy-Spiegel verstärken kann [SMOLKOVA et al, 2004].

Wenn Folat bei Personen mit Folatmangel wieder aufgefüllt wird, wird die Bildung von MN reduziert, jedoch zeigt eine Supplementierung keinen Effekt auf die MN-Häufigkeit bei normalem Folatstatus [LAL et al., 2011]. Folsäure- und Vitamin B12-Supplemente reduzieren die MN-Häufigkeit in Individuen, die an Nierenversagen im Endstadium litten [STOPPER et al., 2008]. Bei sogenannten Nierenpatienten ist sowohl die Krebsinzidenz als auch die MN-Häufigkeit erhöht [STOPPER et al., 1999]. Eine Studie mit Probanden, die eine Nierenerkrankung haben, zeigt nach einer Supplementation mit Folsäure und/oder Vitamin B12 eine Reduktion des MN-Index sowie des Plasma-Hcy-Levels in der Folsäuregruppe um 28% bzw. 32% und in der Kohorte, die die Kombination aus Folsäure und B12 erhielt, um 41% bzw. 47% [STOPPER et al., 2008].

Eine kontrollierte Interventionsstudie ermittelt die MN-Häufigkeit in den Mundschleimhautzellen von diagnostizierten DM-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. DM-Patienten, die Folsäure einnehmen, zeigen eine signifikante Verminderung der MN-Häufigkeit nach den 30 Tagen der Supplementation im Vergleich zu ihren Ausgangswerten [ZUNIGA-GONZALEZ et al., 2007].

2.5.5 Vitamin E

In der Natur wird Vitamin E nur von Pflanzen synthetisiert. Die reichsten diätetischen Quellen für Vitamin E sind pflanzliche Speiseöle und Nüsse.

Vitamin E (alpha-Tocopherol) schützt vor der Bildung von ROS bei der Oxidation von Fett [THOMAS et al., 2011].

Eine frühere Studie zeigt, dass sich die MN-Häufigkeit in der Mucosa nach einer Intervention (24 Wochen, zweimal täglich 400 U Vitamin E) mit Vitamin E zur Chemoprävention bei oraler Leukoplakie reduziert [BENNER et al., 1994].

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 STUDIENDESIGN (von Marie Therese Bulla)

Die in dieser Diplomarbeit besprochene Auswertung entspricht einem Teilbereich der DIAPLANT-Studie.

Die DIAPLANT-Studie ist eine epidemiologische, randomisierte, prospektive Interventionsstudie. Im Zuge der DIAPLANT-Studie wurden mehrere Einflussgrößen gemessen, die nicht alle in dieser Diplomarbeit berücksichtigt werden.

In der hier vorliegenden Arbeit wird die MN-Häufigkeit anhand der CBMN-Methode gemessen.

Alle Probanden wurden basierend auf ihrem Gesundheitszustand (IDDM, NIDDM, Gesund, IFG) einer Gruppe zugeteilt. Ursprünglich war die Einteilung in die ersten drei genannten Gruppen geplant. In Folge der Untersuchungen hat sich jedoch herausgestellt, dass einige der vermeintlich gesunden Probanden erhöhte Nüchtern glukosewerte (NBZ) aufwiesen. Somit entstand die vierte Gruppe der IFG.

Alle Interessenten wurden eingeladen, Informationsveranstaltungen zu besuchen. Hierbei wurde über den gesundheitlichen Nutzen einer gemüsereichen Ernährung sowie über den Verlauf der Studie aufgeklärt.

Nachdem die Teilnehmer sich nach dem Vortrag zur Mitarbeit an der Studie bereit erklärt hatten, wurden sie randomisiert in die Interventions- oder Kontrollgruppe eingeteilt.

Die Interventionsgruppe wurde auf einer Informationsveranstaltung über den Vorteil gesunder Ernährung aufgeklärt und erhielt daraufhin acht Wochen lang eine tägliche Ration diverser Tiefkühlgemüse sowie Pflanzenöl.

Die Kontrollgruppe zeichnet sich durch die Teilnahme an der Informationsveranstaltung aus. Diese Probanden erhielten jedoch weder Gemüse noch Öl.

Die Genehmigung zur Durchführung der Studie wurde durch die Ethikkommission der Stadt Wien erteilt.

3.1.1 Rekrutierung der Probanden

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte durch:

- Ärzte im Gesundheitszentrum Wien Süd der Wiener Gebietskrankenkasse (WGKK)
- Eine Beilage in der Zeitschrift „Diabetes-Info“ der Österreichischen Diabetikervereinigung (ÖDV)
- Einen Vortrag beim 7. Wiener Diabetes Tag am 28. April 2010

Rekrutierung durch die Ärzte: Die Ärzte des Gesundheitszentrums Wien Süd luden entsprechend den Ein- und Ausschlusskriterien geeignete und interessierte Patienten zu einer der Informationsveranstaltungen ein.

Rekrutierung durch eine Beilage in der Zeitschrift „Diabetes-Info“ und durch den Vortrag beim „Diabetes Tag“: Die Diabetiker wurden auf die Studie aufmerksam gemacht und zu einer der Informationsveranstaltungen eingeladen. Zuvor wurden die Ein- und Ausschlusskriterien überprüft.

Es gab:

- 10 Informationsveranstaltungen im Gesundheitszentrum Wien Süd der WGKK
- 2 Informationsvorträge bei der ÖDV
- Die Informationsvorträge wurden von 130 Personen besucht, zusätzlich wurden 21 Personen telefonisch informiert.

Die Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie unterschrieben 120 Personen, davon starteten 111 Personen die Teilnahme an der Studie und 99 Personen beendeten die Studie. Das entspricht einem Anteil von 89,2 % (Abbildung 6). Von diesen 99 Teilnehmern wurden bei der Auswertung von chromosomalen DNA-Schäden drei Teilnehmer ausgeschlossen, da die Auswertung einiger Werte durch Probleme bei der Isolierung von Lymphozyten nicht möglich war.

Alle drei Teilnehmer waren weiblich und gehörten der Interventionsgruppe an. Zwei von ihnen waren aus der Gruppe NIDDM und eine aus der IDMM-Gruppe.

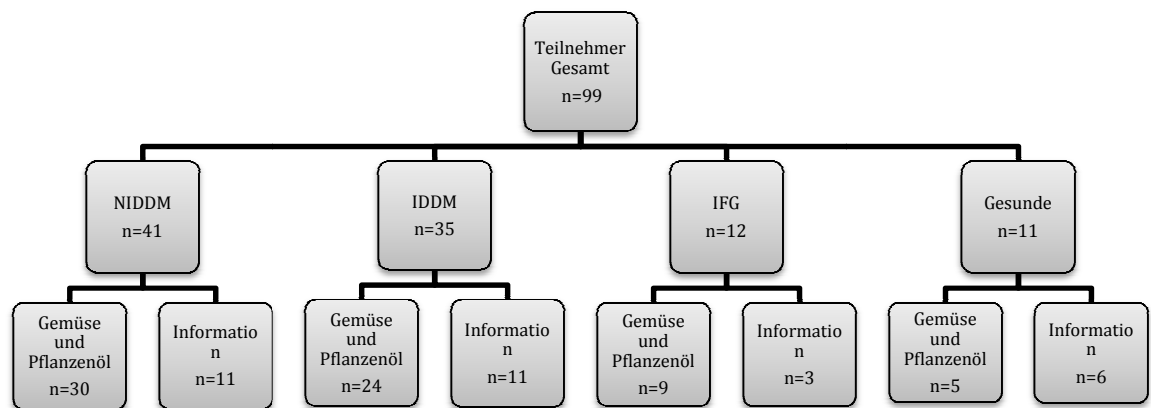


Abbildung 6: Studiendesign, Einteilung der Teilnehmer

Nach folgenden Kriterien erfolgte die Rekrutierung der Teilnehmer.

Einschlusskriterien:

- Männer und Frauen mit Typ II Diabetes
 - o 40 – 85 Jahre
 - o Behandlung mit oralen Antidiabetika oder Insulin
- seit mind. 4 Wochen vor Studienbeginn:
 - o gleichbleibende Medikation betreffend Glucose-, Fett- und Harnsäure-Stoffwechsel
 - o gleichbleibende Essgewohnheiten und körperliche Betätigung
 - o konstantes Körpergewicht
 - o $HbA1c \leq 9,5 \%$ (Schwankungen $< 10 \%$)
 - o Gesamtcholesterin < 300 mg/dl (mit oder ohne Medikation)
 - o Serum-Triglyceride < 500 mg/dl (mit oder ohne Medikation)
 - o Kreatinin $< 2,5$ mg/dl
 - o Medikation der Nicht-Insulin Gruppe: Metformin, DPP-4-Hemmer, Sulfonylharnstoffe, GLP-1 Mimetika
 - o Medikation der Insulin Gruppe: Insulin oder Insulin + Metformin

Ausschlusskriterien:

- Typ-I-Diabetiker
- Patienten jünger als 40 und älter als 85 Jahre
- Raucher
- Schwangere und stillende Frauen
- Teilnahme an anderen klinischen Studien
- neue Medikation oder Änderung der Medikation bzgl. Glucose-, Fett- und Harnsäure-Stoffwechsel vier Wochen vor Studienbeginn
- Einnahme von Fischölkapseln und anderen Fettsäuren

- Während oder vor Beginn der Studie Absichten zur Änderung
 - o der Ernährungsgewohnheiten
 - o der körperlichen Aktivität
 - o des Körpergewichts
- Kardiovaskuläre Erkrankungen, definiert nach NYHA-Klassifikation $\geq$ III
- Lebererkrankungen (Transaminase-Grenzwert $\geq$ 2,5-fach erhöht)
- Chronische Niereninsuffizienz (Dialysepatient oder Kreatinin $>2,5$ mg/dl)
- Organtransplantationen
- Gastrointestinale Malabsorption (Pankreasinsuffizienz, Steatorrhoe, Kurzdarmsyndrom)
- systemische Steroide
- Drogen- und Alkoholmissbrauch (≥ 80 g/d); Methadoneinnahme während der letzten 2 Jahre
- Krebs, HIV
- Glitazon-Einnahme

3.1.2 Interventionsphase

Die aktive Phase der Studie, die Interventionsphase, dauerte acht Wochen. Daraufhin folgte noch eine sogenannte Wash-out Phase, die ebenfalls acht Wochen dauerte.

Die aktive Phase zeichnet sich durch die Einnahme des Gemüses und des Pflanzenöls aus. Die Wash-out Phase bezeichnet den Zeitraum nach der Intervention, hier wurden keine Interventionslebensmittel mehr ausgegeben.

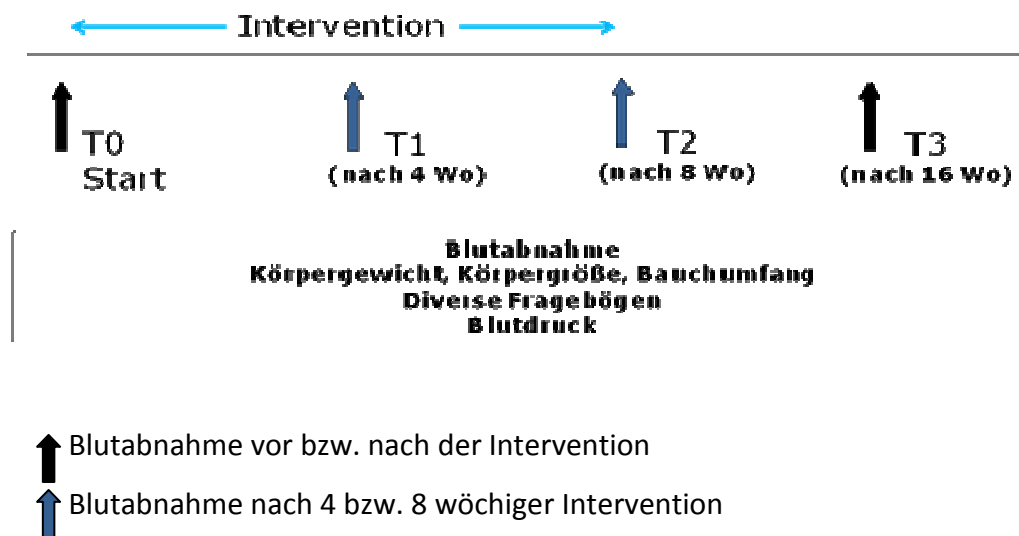


Abbildung 7: Zeitschema der Untersuchungen

Der zeitliche Verlauf der Studie wurde durch vier Blutabnahmetermine bestimmt. Die Probanden erschienen nüchtern und bei jedem Teilnehmer wurde der Blutdruck gemessen, der Urin gesammelt, ein Mundschleimhautabstrich und eine anthropometrische Messung (Gewicht, Bauchumfang) durchgeführt. Zusätzlich gab es zu jedem Termin Fragebögen zum Ausfüllen.

Direkt vor Beginn der aktiven Phase fand der erste Untersuchungstermin statt. Neben den oben genannten Untersuchungen wurde beim ersten Untersuchungstermin zusätzlich die Körpergröße gemessen, um den BMI der Probanden zu bestimmen.

Die Daten des ersten Termins (T0) dienten zur Erfassung der Ausgangswerte. Die Untersuchungen wurden nach vier Wochen (T1) und acht Wochen (T2) der Intervention wiederholt.

Bei den Terminen T0 und T1 erhielten die Probanden jeweils ausreichend Gemüse und Pflanzenöl für vier Wochen. Somit wurde direkt nach dem ersten Untersuchungstermin mit der Intervention begonnen.

Die Kontrollgruppe erhielt keine Intervention, wurde jedoch nach der Informationsveranstaltung in gleichen zeitlichen Abständen denselben Untersuchungen unterzogen wie die Interventionsgruppe.

Die letzte Untersuchung fand acht Wochen nach Ende der aktiven Phase statt (T3) (Abbildung 7).

Es handelte sich bei den Fragebögen um:

- ein 24-h Protokoll, dass einen Tag vor der Blutabnahme ausgefüllt wurde
- ein Quality-of-LifeQuestionnaire (QLQ), zur Bestimmung des Wohlbefindens der Probandent
- ein Food Frequency Questionnaire (FFQ) zu den Terminen T0 und T3.

Die Diabetiker wurden zusätzlich gebeten, ein Blutzuckerprofil abzugeben und ein Insulinprotokoll und Spritzschema, falls Insulin gespritzt wurde. Alle, die an der Intervention teilnahmen, wurden gebeten, ein Ernährungstagebuch zu führen und mitzubringen.

3.1.3 Ernährungsintervention

Die Teilnehmer der Interventionsgruppe erhielten tiefgekühltes Gemüse (300 g) und Pflanzenöl (25 ml) zur täglichen Aufnahme. Das Interventionsöl war ein Walnussöl (Tabelle 6). Das Interventionsgemüse stellte die Firma IGLO zur Verfügung (Tabelle 7).

Tabelle 6: Fettsäurezusammensetzung (%) und Tocopherolgehalt (mg/100g) des Interventionsöls

Gesamtgehalt der Fettsäuren (%)	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung
C16:0	7,28 $\pm$ 0,09
C18:0	2,06 $\pm$ 0,07
C18:1n9c	16,40 $\pm$ 0,99
c18:1n7c	0,95 $\pm$ 0,03
c18:2n6c	61,76 $\pm$ 1,00
c18:3n3	11,49 $\pm$ 0,43
Tocopherolgehalt (mg/100 g Öl)	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung
γ -Tocopherol	32,98 $\pm$ 1,82
α -Tocopherol	2,67 $\pm$ 0,14

Tabelle 7: Tiefkühlprodukte für die Interventionsgruppe

Spinat passiert	Karfiol Broccoli DUO
Blattspinat Zwuschgerl	Buntes Gemüse Trio
Junge Fisolen	Junges Sommergemüse
Kochsalat mit Erbsen	Cremespinat mit Mini-Röst
Junge Erbsen	Zarte Mischung
Broccoli	Suppengemüse
Kohlsprossen	Röstgemüse Korsika
Zarte Sojabohnen	Röstgemüse Gärtnerin

Bei den Gemüsemischungen wurden Broccoli, Karotten (orange und gelb) Erdäpfel, Kohlrabi, Porree, Erbsen, Fisolen, Karfiol, Zucchini und Kohlsprossen verwendet.

Die korrekte Einnahme des Öls wurde während der Informationsveranstaltung erklärt. Es war zu beachten, dass das Öl nicht erhitzt wird und gemeinsam mit einem anderen Lebensmittel aufgenommen wird. Als Beispiel wurden warme und kalte Speisen genannt, in die das Öl eingerührt werden kann.

Die Zubereitung der Speisen sollte durch ein mitgeliefertes Rezeptheft erleichtert werden. Auch die richtige Handhabung des Öls ist in dieser Broschüre nochmals beschrieben. Zusätzlich wird in dem Rezeptheft noch einmal auf einen bewussten Einsatz von Fett im täglichen Speiseplan eingegangen. Das bedeutet den Verzicht von Speisen mit hohem Anteil an gesättigten Fettsäuren.

Vorteilhaft für die Teilnehmer war auch, dass die einzelnen Rezepte im „Gemüsekochbuch“ nach Menge des aufgenommenen Gemüses gekennzeichnet sind und einen Hinweis geben, wie viel Gemüse an diesem Tag noch fehlt um eine Aufnahme von mindestens 300 Gramm zu gewährleisten. Um diese Angaben nicht zu verfälschen war es wichtig, dass die Probanden ihre Gemüserationen für sich alleine zubereiteten und sie nicht mit anderen Personen im Haushalt teilten.

3.2 CBMN-ASSAY (von Roswitha Stieglmayer)

3.2.1 Verwendete Materialien

Tabelle 8: Verwendete Materialien für den CBMN-Assay

Name	Einheit	Produzent
RPMI 1640 without L-Glutamin	500 ml	PAA
Dulbecco's phosphate puffered saline, steril filtered	500 ml	SIGMA
Sodium pyruvate, sterile filtered		SIGMA
L-Glutamine, sterile filtered	200 µM	SIGMA
Fetal Bovine Serum	500 ml	PAA
Phytohaemagglutinin	10 ml	PAA
Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckel, steril	15 ml	VWR
Freestanding centrifuge tubes	50 ml	VWR
Polystyrene Round-Bottom Tube	5 ml	Becton Dickinson
Countess cell counting chamber slides		Invitrogen
Trypan blue stain		SIGMA
Cytochalasin B		SIGMA
Cell Preparation Tube with Sodium Citrate		Becton, Dickinson
DMSO		SIGMA
Diff-Quick Staining Set		Medion Diagnostics
Entellan		Merck
Spritze 20 ml		VWR
Steriler Filter		VWR
Objektträger und Deckgläser		VWR
1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen		Star Lab

3.2.2 Probenaufbereitung

Die Aufbereitung der Proben wird im Doppelansatz durchgeführt.

Arbeitsanleitung Medium

Das Medium wird unter sterilen Bedingungen vorbereitet. Die Chemikalien werden im Wasserbad (ca. 37°C) gewärmt.

30 ml RPMI + 3,3 ml FBS + 330 µl Sodium-L-Pyruvate + 330 µl L-Glutamine werden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vereint. Das RPMI wird noch zusätzlich mit einem sterilen Filter filtriert.

Arbeitsanleitung Lymphozytenisolation

Die Lymphozyten werden unter sterilen Bedingungen isoliert.

Es werden 10 ml Blut über Venenpunktur in CPT-Heparin Röhrchen abgenommen und 8x kopfüber geschwenkt. Unmittelbar vor dem Zentrifugieren (1729 rcf=3100 rpm, 25min, 22°C) werden die Röhrchen 5x kopfüber geschwenkt.

Die Lymphozyten (Schicht zwischen Plasma und Gel) werden mittels Pasteurpipette in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Die Röhrchen werden mit PSB auf 15 ml aufgefüllt, um die Lymphozyten zu waschen.

Die Röhrchen werden wieder zentrifugiert (304 rcf=1300 rpm, 15 min, 4°C).

Nach dem Zentrifugieren wird das PSB abgesaugt, die Lymphozyten bleiben im Röhrchen zurück.

Für den weiteren Waschvorgang wird mit PSB auf 10 ml aufgefüllt und das Röhrchen geschwenkt, um das Pellet vom Boden zu lösen.

Die Röhrchen werden wiederum mit folgender Einstellung zentrifugiert: 304 rcf=1300 rpm, 10 min, 4°C.

Das PSB wird erneut abgesaugt und in 1 ml PSB resuspendiert.

Zellzahlbestimmung (Countess)

Zur Bestimmung der Zellzahl werden 20 µl Zellsuspension in ein Cup mit 60 µl PBS überführt. Davon werden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Tryptanblau gemischt und in die Neubauer Zählkammer gefüllt. Mittels Countess wird die Zellzahl (lebende Zellen/ml) bestimmt. Abhängig von der Menge an lebenden Zellen werden Zellen mit dem Medium vermischt. Es werden 750 µl Zell-Medium-Suspension in einer Konzentration von 1×10^6 benötigt.

Inkubation

Pro Proband werden 2 Röhrchen mit je 750 µl Medium und Zellsuspension angesetzt. 15 µl PHA werden zugesetzt, um die Zellteilung zu starten. Die exakte Zeit der Zugabe wird notiert.

Die Falconröhrchen werden bei 5% CO₂, 37°C für genau 44 h inkubiert werden.

Achtung: Der Deckel wird locker aufgelegt, um einen Gasaustausch zu ermöglichen.

Zugabe von Cytochalasin B nach genau 44 h

Die Cytochalasin B-Stocklösung hat eine Konzentration von 600 µg/ml.

Da eine Konzentration von 60 µg/ml benötigt wird, wird Cytochalasin B Stock mit RPMI im Verhältnis 1:10 gemischt. Von dieser Mischung werden 56,2 µl entnommen und in jedes Falconröhrchen pipettiert. Die Röhrchen inkubieren weitere 28 h (insgesamt 72 h) bei 37°C, 5% CO₂.

Nach genau 72 h Inkubation (nicht steril)

Vor dem Zentrifugieren werden die Objektträger beschriftet. Pro Röhrchen werden zwei Objektträger vorbereitet und mit Filterpapier und Trichter versehen.

200 µl vom Überstand werden aus jedem Falcon entnommen ohne dabei die Zellen zu schädigen und verworfen.

46 µl DMSO werden zu jedem Röhrchen hinzugegeben.

Die Zellsuspension wird leicht durch „Fingerklopfen“ gemischt.

Es werden 120 µl der Probe in die Öffnung des Trichters (Doppelansatz) pipettiert.

Die Objektträger werden mit einer speziellen Zentrifuge (Cytospin) zentrifugiert (5 min, 600 RPM, ACCEL high). Nach Entfernung des Trichters und des Filters werden die Objektträger für 10 min waagrecht getrocknet.

Färbung

Es werden drei Färbewannen mit Deckel und den jeweiligen Lösungen (Fixative, Diff-Quick 1, Diff-Quick 2) vorbereitet und beschriftet.

Die Objektträger werden nach der Trockenzeit in die Färbehalterung geschichtet. (Rücken an Rücken) und für 10 Minuten in die Fixative-Wanne gestellt.

Anschließend werden die Objektträger 10 x in Diff-Quick 1 getaucht.

Die Objektträgerhalterung wird abgetupft, um Diff-Quick 2 nicht zu verunreinigen.

Die Objektträger werden 8 x in Diff-Quick 2 getaucht.

Die Objektträger werden zuerst unter der Wasserleitung, dann mit destilliertem Wasser abgespült.

Die Objektträger werden mit dem Spot nach unten auf einer Küchenrolle ca. 3 min getrocknet und danach gewendet. Bevor ein Deckglas auf den Spot gelegt wird, muss der Objektträger völlig trocken sein.

Eindeckeln

Es werden jeweils 3 Tropfen Entellan pro Objektträger aufgetragen und ein Deckglas über den Spot gelebt. Die Objektträger trocknen über Nacht.

3.2.3 Zählkriterien

Tabelle 9: Zählkriterien des CBMN-Assays [FENECH 2007]

Ein-, Zwei-, Mehrkernzellen	lebende Zellen
	intaktes Cytoplasma
	normales Aussehen des Zellkerns
	ein oder mehrere Zellkerne
Zweikernzelle (BNC)	lebende Zelle
	zwei Kerne
	intakte Membran
	intaktes Cytoplasma, deutlich von anderen Zellen getrennt
	ähnliche Größe, Färbung und Intensität
	können sich berühren, dürfen aber nicht überlappen
Mikrokerne (MNi)	intakte Membran
	ähnliche Färbung und Intensität wie der Zellkern
	kleiner als der Zellkern
	der Durchmesser des MNi liegt zwischen 1/16 und 1/3 vom Durchmessers des Zellkerns
	die Größe des MNi variiert zwischen 1/256 und 1/9 der Größe des Zellkerns
	klar abgegrenzt von anderen Zellbestandteilen
	verbunden oder abgegrenzt vom Hauptkern
	überlappen nicht mit dem Hauptkern
Bridges (NPBs)	Länge ist variabel, nicht länger als $\frac{1}{4}$ des Durchmessers vom Zellkern
	ähnliche Färbung wie der Zellkern
	möglicherweise mehr als eine Brücke (selten)
	Mikrokerne können vorkommen
Buds (NBUDs)	Verbindung zum Zellkern
	dünnere Brücke
	können sich in einer Vakuole befinden

Apoptosen	nichtlebende Zellen
	frühapoptotische Zellen:
	zeigen eine Chromatinkondensation innerhalb des Zellkerns intaktes Cytoplasma intakte Membran
	spätapoptotische Zellen:
	Kernfragmente „Apoptotic bodies“ intakte Cytoplasmamembran Farbintensität ist größer als bei lebenden Zellen
Nekrosen	nichtlebende Zellen
	frühnekrotische Zellen:
	blasses Cytoplasma zerstörte Cytoplasmamembran nicht intakter Zellkern mehrere Vakuolen
	spätnekrotische Zellen:
	Cytoplasma ist nicht mehr vorhanden, „fließt“ aus dem Cytoplasma zerstörte Zellkernmembran Partikel des Kerns sind noch vorhanden

3.3 STATISTISCHE AUSWERTUNG (von Roswitha Stieglmayer)

Für die Auswertung der Daten wurde die Statistiksoftware SPSS 17.0. für Windows verwendet. Die Daten wurden von Ausreißern bereinigt und mit dem Komogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft.

Für die Mittelwertvergleiche der Parameter MNi, Buds, Bridges, Apoptosen und Nekrosen wurde die deskriptive Statistik verwendet.

Für Mittelwertvergleiche der Vitamine, eingeteilt in Tertilen, wurden die einfaktorielle ANOVA bei Normalverteilung, der Kruskal-Wallis H-Test bei Nichtnormalverteilung und der t-Test für unabhängige Stichproben verwendet.

Für eine bivariate Korrelation wurden die Korrelation nach Pearson bei Normalverteilung bzw. Korrelation nach Spearman bei Nichtnormalverteilung angewandt.

Die Signifikanzniveaus liegen bei 5%, 1%, 0,1% Irrtumswahrscheinlichkeit und wurden wie folgt dargestellt: * $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant, *** $p < 0,001$ höchst signifikant. Nichtsignifikante Ergebnisse wurden mit (n.s.) gekennzeichnet.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION (von Roswitha Stieglmayer)

4.1 DESKRIPTIVE STATISTIK

In dieser Diplomarbeit werden verschiedene Biomarker, die ein mögliches Krebsrisiko beschreiben können und mittels CBMN-Assay erhoben wurden, ausgewertet. Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss einer Ernährungsintervention, die sich durch tägliche Gemüse- und Ölzufuhr auszeichnete, durch verschiedene Parameter des CBMN-Assay zu bewerten.

Tabelle 10 zeigt die mittels CBMN-Assay erhobenen Parameter zu Beginn der Intervention (T0). Die Ergebnisse sind getrennt nach Geschlecht dargestellt, da dieses einen signifikanten Einfluss auf die Mikrokernentstehung hat. Weiters sind die von Fenech definierte Erwartungswerte (bei gesunden Lymphozytenkulturen und unter optimalen Bedingungen) angegeben[FENECH 2007].

Tabelle 10: Ausgangswerte (T0) der mittels CBMN ermittelte Parameter der Informations- und Interventionsgruppe. (MW±Std, getrennt nach Geschlecht, erwartete Werte lt. FENECH 2007)

		Informationsgruppe		Interventionsgruppe	
	Erwartete Werte	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Anzahl		12	19	29	36
Alter (Jahren)		61,7±7,1	61,6±6,6	67,0±8,0	64,6±6,9
MNi (in 1000 BN)	0-30	21,8±5,5	30,0±9,7*	19,5±7,2	28,1±10,2*
Bridges (in 1000 BN)	0-10	1,8±1,4	1,8±1,3	1,7±1,5	1,6±1,1
Buds (in 1000 BN)	0-5	4,1±2,9	4,7±3,0	4,2±2,5	4,6±3,2
Apoptosen (in %)	0-7	1,6±0,8	1,2±0,5	1,3±0,6	1,3±0,5
Nekrosen (in %)	0-9	1,3±0,6	1,1±0,8	1,6±0,8	1,3±0,6*

*p<0,05, signifikant unterschiedlich zwischen Männern und Frauen innerhalb einer Gruppe

Tabelle 11: Mittelwerte der gemessenen Vitamine im Blut/Plasma der Probanden zum Zeitpunkt T0. (MW±Std, getrennt nach Geschlecht)

	Informationsgruppe		Interventionsgruppe	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Vitamin B12 (in pmol/l)	325,1±130,4	345,5±162,9	319,1±154,0	338,9±144,7
Folsäure im Plasma (in nmol/l)	16,5±6,1	19,0±9,5	20,8±8,1	20,6±9,6
Folsäure in Erythrozyten (nmol/l)	361,4±216,6	289,3±140,0	351,7±305,7	330,6±154,2
Homocystein (µmol/l)	13,1±3,0	13,5±3,5	13,5±2,6*	11,4±2,6
Retinol (µmol/l)	3,7±0,9	3,4±1,0	3,4±1,0	3,4±1,0
Lycopren (µmol/l)	0,1±0,0	0,1±0,1	0,1±0,0	0,1±0,1
alpha-Carotin (µmol/l)	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0
beta-Carotin (µmol/l)	0,2±0,1	0,3±0,2	0,2±0,2	0,3±0,3
alpha-Tocopherol (µmol/l)	33,4±9,6	37,8±15,4	30,1±8,3	36,2±10,1*

*p<0,05, signifikant unterschiedlich zwischen Männern und Frauen innerhalb einer Gruppe

In der Interventionsgruppe konnte zwischen Männern und Frauen bei alpha-Tocopherol und Homocystein zum Zeitpunkt T0 ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der Einfluss von diesen beiden Nährstoffen auf die Entstehung von Biomarker wurde bereits in Kapitel 2.5.4 und 2.5.5 diskutiert. Yvonne Millner und Daniela Toferer untersuchten in ihren Diplomarbeiten den Einfluss dieser Vitamine im Rahmen einer Ernährungsintervention auf DMT2.

Vitamin B12, Folsäure, Carotin und Tocopherol können das Entstehen von Mikrokernen und in weiterer Folge von Krebs erheblich beeinflussen (Tabelle 11). Dieser Effekt wurde bereits in mehreren Reviews und Studien nachgewiesen [THOMAS et al, 2011; FENECH et al, 2005; BULL et al., 2011].

4.2 EINFLUSS DER ERNÄHRUNGSINTERVENTION AUF DIE MITTELS CBMN-ASSAY ERMITTELTEN PARAMETER

4.2.1 MNi in der Informationsgruppe

Die Anzahl der MNi erhöhte sich signifikant während der Studie bei den Frauen in der Informationsgruppe ($p=0,003$). Die signifikanten Änderungen wurden von T0 auf T3 ($p=0,023$) und von T2 auf T3 ($p=0,009$) beobachtet. Frauen hatten zu jedem Messzeitpunkt eine höhere Anzahl an MNi ($p=0,016$). Männer zeigten während der Studie keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 8). Während der Interventionsphase von T0 auf T2 wurden weder bei Männern noch bei Frauen signifikante Veränderungen beobachtet.

Während der gesamten Studie änderte sich die Anzahl der MNi bei den Männern nur gering. Der Mittelwert sank (n.s.) um 1,8% von T0 auf T2. Von T0 auf T3 stieg (n.s.) der Mittelwert um 7,3%. In der Gruppe der Frauen sank (n.s.) der Mittelwert um 1% von T0 auf T2. Von T0 auf T3 stieg der Mittelwert signifikant um 21,1% (Abbildung 8).

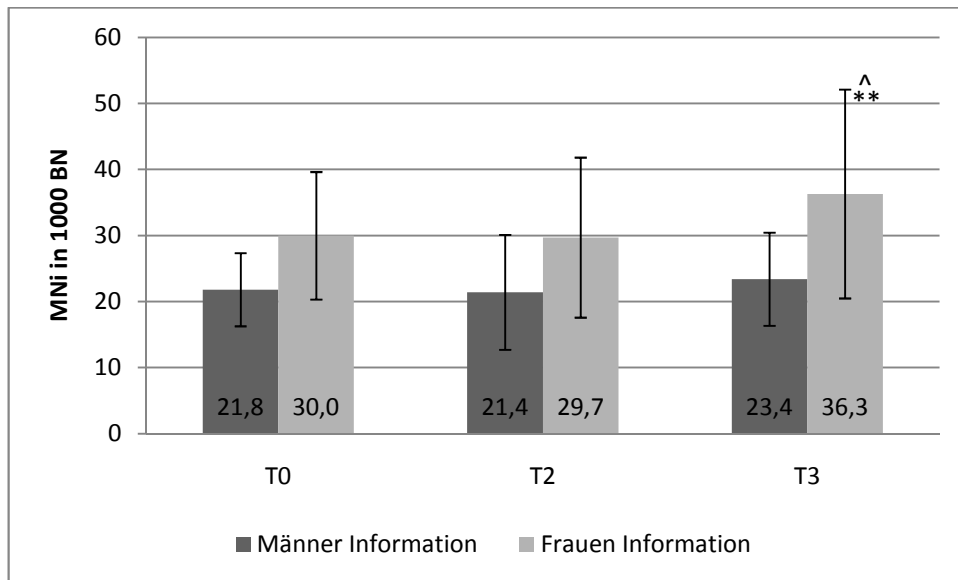


Abbildung 8: Anzahl an MNi in 1000 BN in der Informationsgruppe, getrennt nach dem Geschlecht, signifikanter Unterschied zwischen Männer und Frauen von T0 auf T3 ($^{\wedge}p=0,023$) und von T2 auf T3 ($^{**}p=0,009$)

Beurteilt man die Probanden der Informationsgruppe basierend auf ihren Gesundheitszustand, ist zu erkennen, dass bei der IDDM-Gruppe die Anzahl an MNi leicht, aber nicht signifikant anstieg, während bei den NIDDM, IFG und gesunden Studienteilnehmern die MN-Häufigkeit von T0 auf T2 sank (n.s.) und von T2 zu T3 stieg (n.s.). Der Gesundheitszustand hatte somit keinen signifikanten Einfluss auf die MN-Häufigkeit (Abbildung 9).

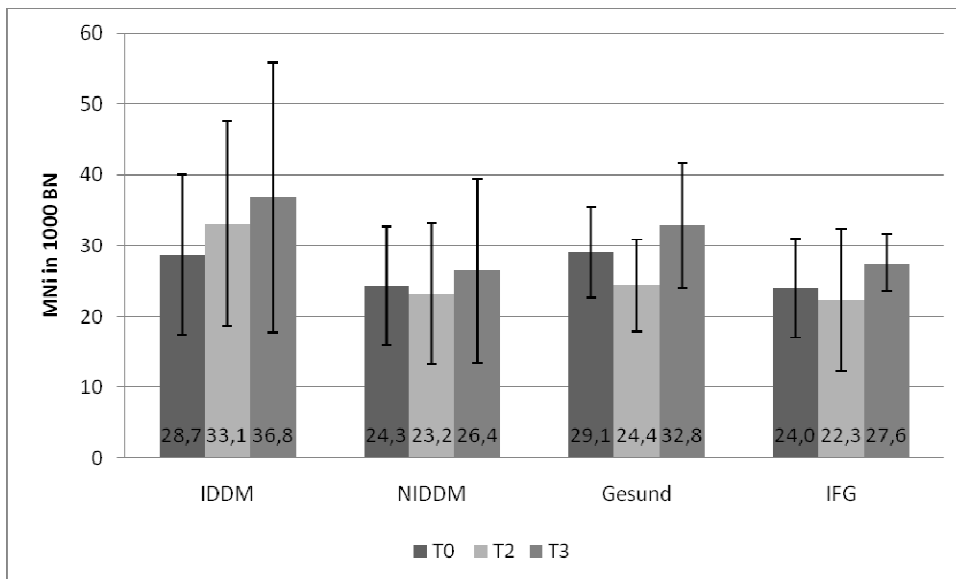


Abbildung 9: Anzahl an MNi in 1000 BN in der Informationsgruppe, getrennt nach dem Gesundheitszustand

4.2.2 MNi in der Interventionsgruppe

In der Interventionsgruppe konnte während der Studie keine signifikante Änderung der Anzahl an MNi festgestellt werden. Wie auch in der Informationsgruppe hatte das Geschlecht einen signifikanten Einfluss ($p=0,001$) auf die MN-Häufigkeit. Frauen hatten zu jedem Messzeitpunkt eine höhere Anzahl an MNi (Abbildung 10).

In der Gruppe der Männer ist zu erkennen, dass sich die Anzahl an MNi kaum änderte. Der Mittelwert stieg (n.s.) um 6,1% von T0 auf T2. Von T0 auf T3 stieg (n.s.) der Mittelwert um 10%. In der Gruppe der Frauen stieg (n.s.) der Mittelwert um 8,8% von T0 auf T2. Von T0 auf T3 stieg (n.s.) der Mittelwert um 7,6% (Abbildung 10).

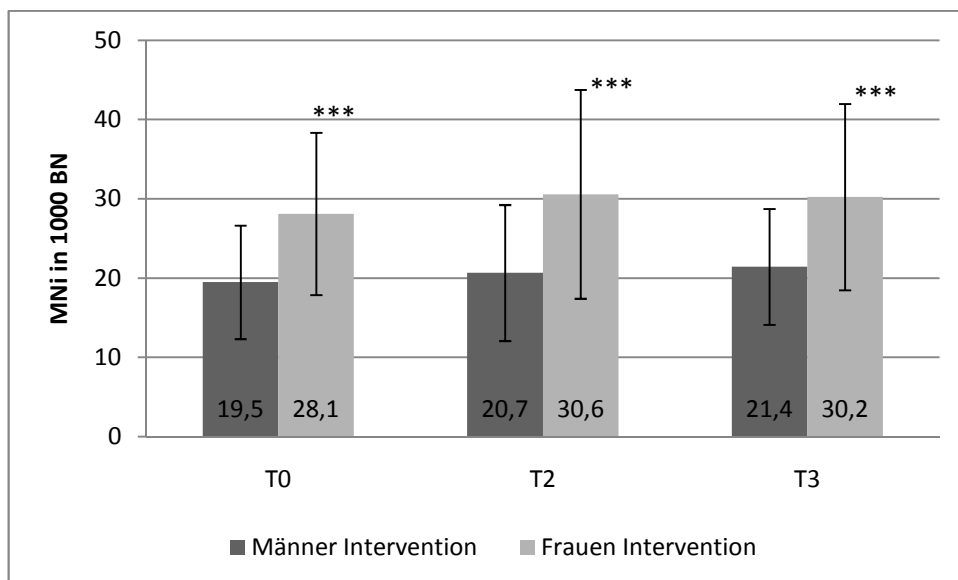


Abbildung 10: Anzahl an MNi in 1000 BN in der Interventionsgruppe, getrennt nach dem Geschlecht, *** $p<0,001$ höchst signifikanter Unterschied zwischen Männer und Frauen zu T0, T2,T3

In Abbildung 11 ist die Veränderung der Anzahl an MNi während der Studie in den einzelnen Gruppen mit unterschiedlichem Gesundheitszustand dargestellt. Die Gruppen IDDM und NIDDM zeigten einen Anstieg (n.s.) von T0 auf T2 und von T2 auf T3. Bei den gesunden Probanden sanken (n.s.) die MNi von T0 auf T2 und stiegen (n.s.) von T2 auf T3. Die Gruppe der IFG zeigte eine minimale Erhöhung (n.s.) von T0 auf T2 und eine Reduktion (n.s.) von T2 auf T3. Der Gesundheitszustand hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Auftreten von MNi. Auch der Verlauf der MNi-Häufigkeit während der Studie wurde davon nicht signifikant beeinflusst.

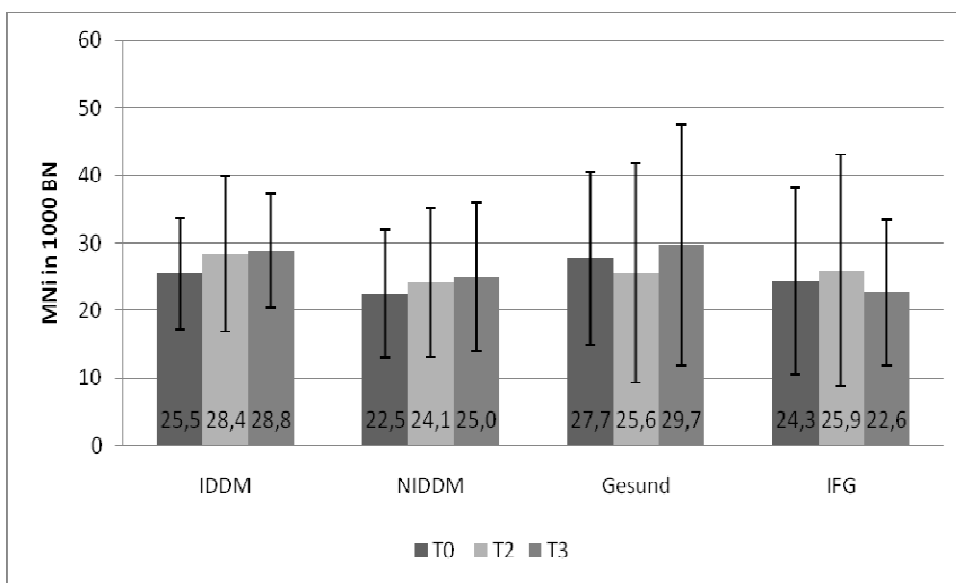


Abbildung 11: Anzahl an MNi in 1000 BN in der Interventionsgruppe, getrennt nach dem Gesundheitszustand

4.2.3 Buds in der Informationsgruppe

In der Informationsgruppe wurde kein signifikanter Unterschied zu den verschiedenen Messzeitpunkten (T0, T2, T3) beobachtet. Auch das Geschlecht zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Häufigkeit von Buds. Im Verlauf der Studie kam es zu keinen signifikanten Veränderungen (Abbildung 12).

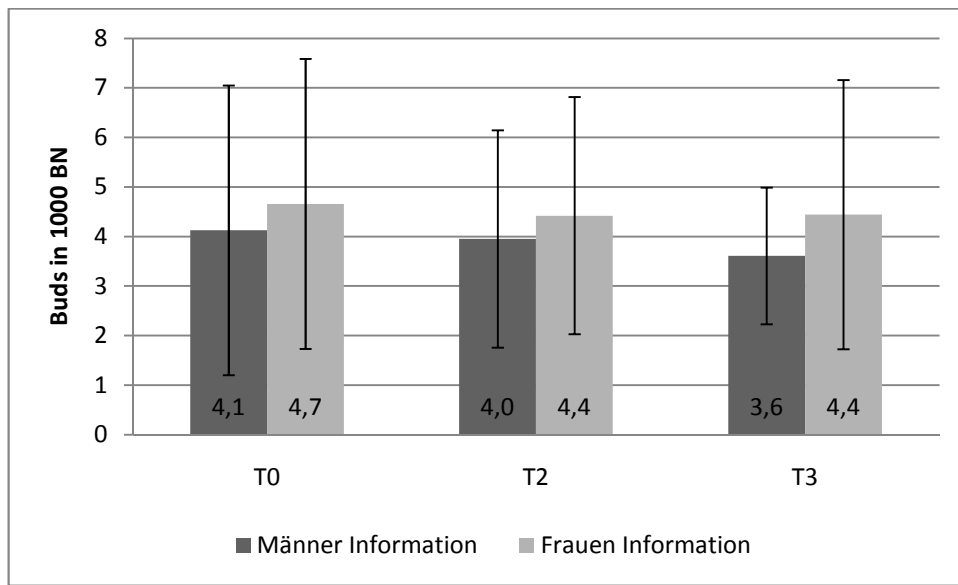


Abbildung 12: Anzahl an Buds in 1000 BN in der Informationsgruppe, getrennt nach dem Geschlecht

Abbildung 13 zeigt das Vorkommen von Buds in den unterschiedlichen Gesundheitsgruppen. Die Gruppe der IDDM wiesen eine Reduktion (n.s.) von T0 auf T2 auf und eine Erhöhung (n.s.) von T2 auf T3, während sich die Gruppe der NIDDM gegensätzlich verhielt. Die gesunden Probanden zeigten kaum eine Veränderung. In der Gruppe der IFG kam es zu einer Erhöhung (n.s.) von T0 auf T2 und einer Reduktion (n.s.) von T2 auf T3. Der Gesundheitszustand der Probanden hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl von Buds, obwohl in der Gruppe der gesunden Probanden eine nicht signifikant geringere Anzahl von Buds gefunden wurde. Im Verlauf der Studie konnte keine signifikante Änderung der Häufigkeit von Buds beobachtet werden (Abbildung 13).

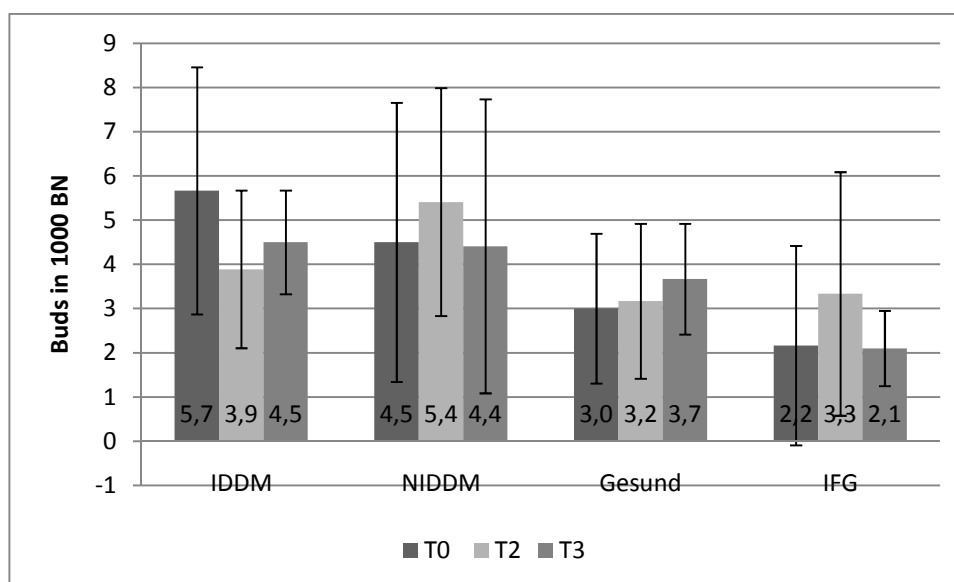


Abbildung 13: Anzahl an Buds in 1000 BN in der Informationsgruppe, getrennt nach dem Gesundheitszustand

4.2.4 Buds in der Interventionsgruppe

Zu den verschiedenen Messzeitpunkten (T0, T2, T3) kam es zu keinen signifikanten Änderungen in der Anzahl von Buds. Das Geschlecht hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Häufigkeit von Buds. Zum Zeitpunkt T0 hatten Frauen ähnliche Werte wie Männer, zu T2 und T3 zeigten sich jedoch Unterschiede ($p < 0,1$). Frauen wiesen um 1,8 Buds (45%) bzw. 1,3 Buds (30%) mehr auf als Männer. Die Anzahl der Buds änderte sich im Verlauf tendenziell unterschiedlich zwischen den Geschlechtern ($p = 0,117$) (Abbildung 14).

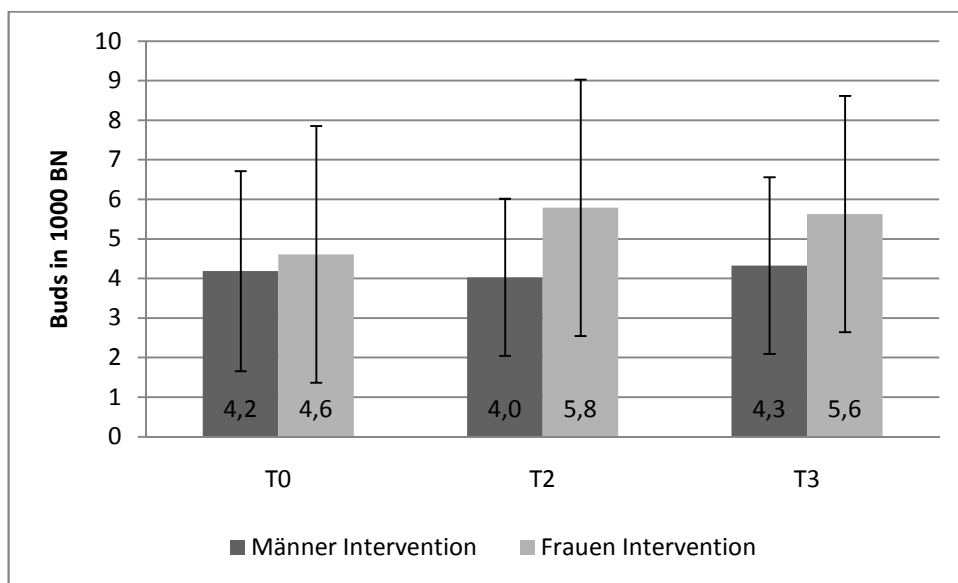


Abbildung 14: Anzahl an Buds in 1000 BN in der Interventionsgruppe, getrennt nach dem Geschlecht. Tendenzielle ($p = 0,117$) unterschiedliche Entwicklung zwischen den Geschlechtern zu T0, T2, T3.

In der Interventionsgruppe kam es in den Gruppen der verschiedenen Gesundheitszustände zu unterschiedlichen Entwicklungen. Die Gruppen der IDDM und NIDDM zeigten einen kontinuierlichen Anstieg (n.s.) von Buds von T0 auf T3. Die Gruppe der gesunden Probanden und die Gruppe der IFG zeigten eine Reduktion (n.s.) der Häufigkeit von Buds zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Die einzelnen Gesundheitszustände haben keinen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von Buds. Die Anzahl der Buds änderte sich signifikant ($p \leq 0,001$) unterschiedlich während des Verlaufs (Abbildung 15). Die Gruppe der IDDM und NIDDM zeigten einen kontinuierlichen Anstieg in der Anzahl von Buds, wobei die Gruppe der IDDM den höchsten Anstieg von 56,3% aufwies. Die Gruppe der Gesunden und der IFG wiesen eine Reduktion von Buds auf. Bei den Gesunden reduzierten sich die Buds um etwa ein Drittel (31,3 %).

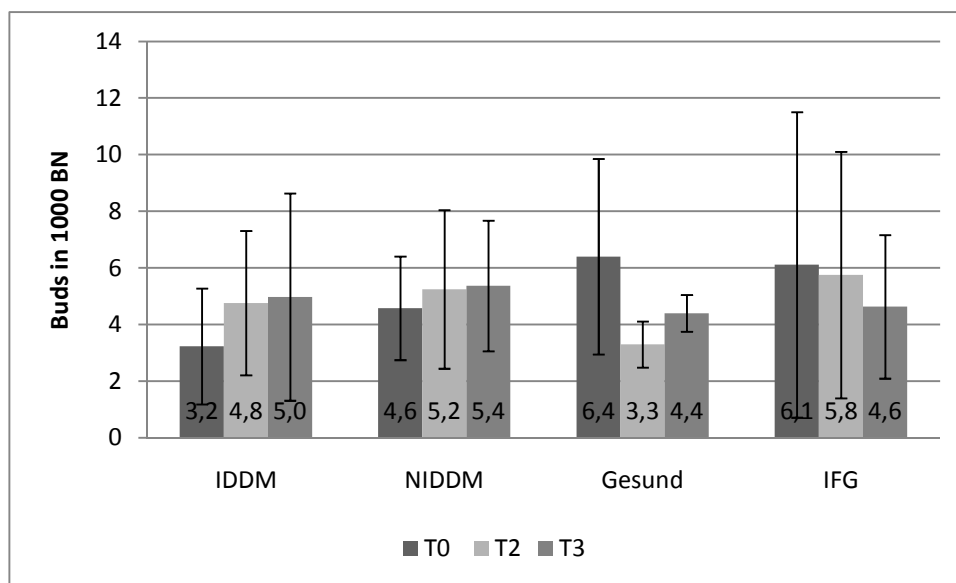


Abbildung 15: Anzahl an Buds in 1000 BN in der Interventionsgruppe, getrennt nach dem Gesundheitszustand (signifikante unterschiedliche Entwicklung der Buds während der Studie ($p \leq 0,001$))

4.2.5 Bridges in der Informationsgruppe

Während der Studie kam es zu keiner signifikanten Änderung hinsichtlich des Auftretens von Bridges. Ebenso zeigte das Geschlecht keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl von Bridges. Zu den verschiedenen Messzeitpunkten (T0, T2, T3) kam es zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den Geschlechtern (Abbildung 16).

In der Gruppe der Männer blieb die Anzahl an Bridges während der Studie konstant. Der Mittelwert stieg um 2,6% von T0 auf T2. Von T0 auf T3 kam es zu keinen Änderungen. In der Gruppe der Frauen sankt der Mittelwert um 27,8% von T0 auf T2. Von T0 auf T3 stieg der Mittelwert um 51,9% (Abbildung 16).

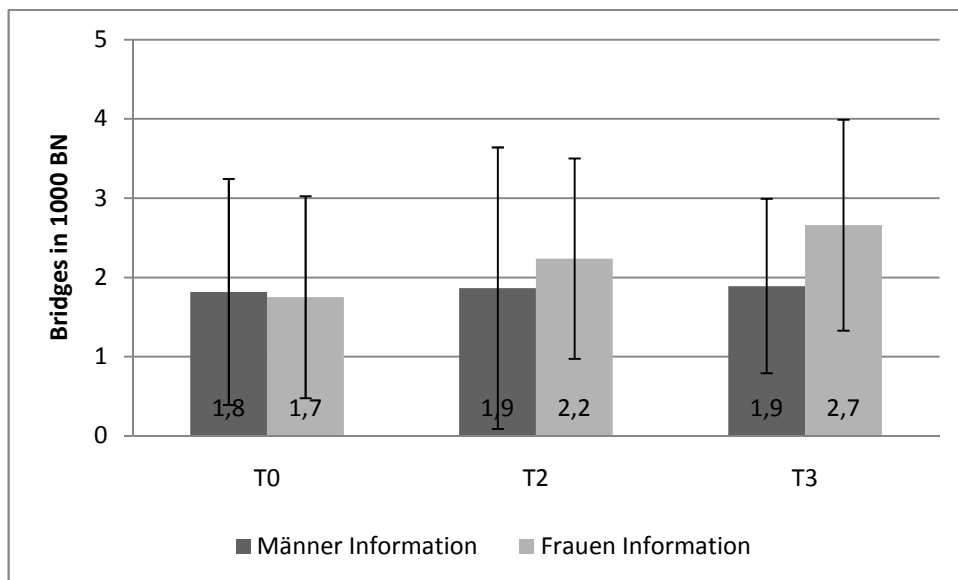


Abbildung 16: Anzahl an Bridges in 1000 BN in der Informationsgruppe, getrennt nach dem Geschlecht

In Abbildung 17 ist die Häufigkeit von Bridges in den verschiedenen Gesundheitsgruppen dargestellt. Der Gesundheitszustand zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung von Bridges. Auch zu den verschiedenen Messzeitpunkten (T0, T2, T3) konnte kein signifikanter Einfluss des Gesundheitszustandes beobachtet werden.

Die Gruppe der IDDM und der gesunden Probanden zeigten einen Anstieg (n.s.) in der Anzahl von Bridges von T0 zu T2 und von T0 zu T3. In der Gruppe der NIDDM blieben die Werte konstant, während in der Gruppe der IFG ein Anstieg (n.s.) von Bridges von T0 zu T2 und von T2 zu T3 eine Reduktion (n.s.) zu beobachten war. Jedoch wurde kein signifikanter Einfluss des Gesundheitszustandes auf die Veränderung der Anzahl an Buds während der Studie beobachtet (Abbildung 17).

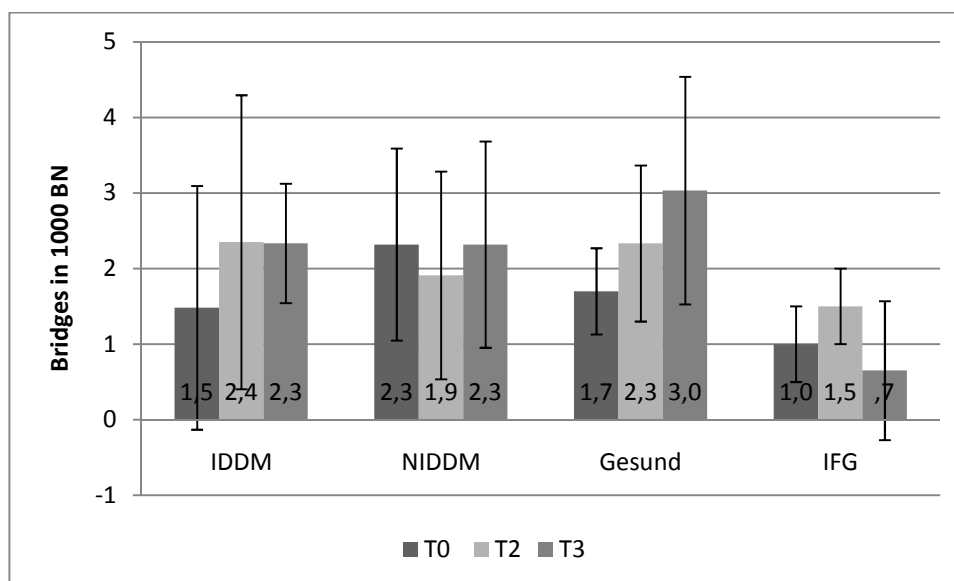


Abbildung 17: Anzahl von Bridges in 1000 BN in der Informationsgruppe, getrennt nach dem Gesundheitszustand

4.2.6 Bridges in der Interventionsgruppe

Zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (T0, T2, T3) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Das Geschlecht hat keinen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von Bridges. Auch auf den Verlauf während der Studie konnte kein signifikanter Einfluss des Geschlechts festgestellt werden (Abbildung 18).

Der Mittelwert in der Gruppe der Männer stieg (n.s.) um 1,0% von T0 auf T2. Von T0 auf T3 stieg (n.s.) der Mittelwert um 18,8%. In der Gruppe der Frauen stieg (n.s.) der Mittelwert um 29,0% von T0 auf T2. Von T0 auf T3 stieg (n.s.) der Mittelwert um 34,2% (Abbildung 18).

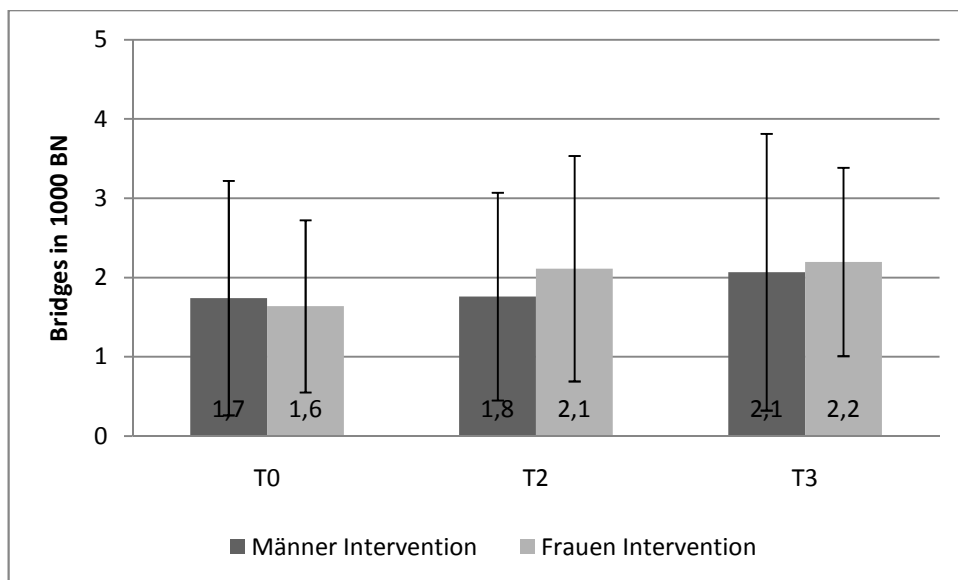


Abbildung 18: Anzahl von Bridges in 1000 BN in der Interventionsgruppe, getrennt nach dem Geschlecht

Der Gesundheitszustand der Probanden hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Häufigkeit von Bridges. Die Anzahl an Bridges blieb in den Gruppen der NIDDM und IFG während der Studie konstant. Die Gruppe der IDDM zeigte eine geringe Steigerung (n.s.) von T0 zu T2 und von T0 zu T3. Die Gruppe der Gesunden zeigte eine Steigerung (n.s.) an Bridges von T0 zu T2 und eine Reduktion (n.s.) von T2 zu T3. Trotz der unterschiedlichen Entwicklungen in den Gruppen zeigte der Gesundheitszustand keinen Einfluss auf die Entstehung von Bridges während der Studie (Abbildung 19).

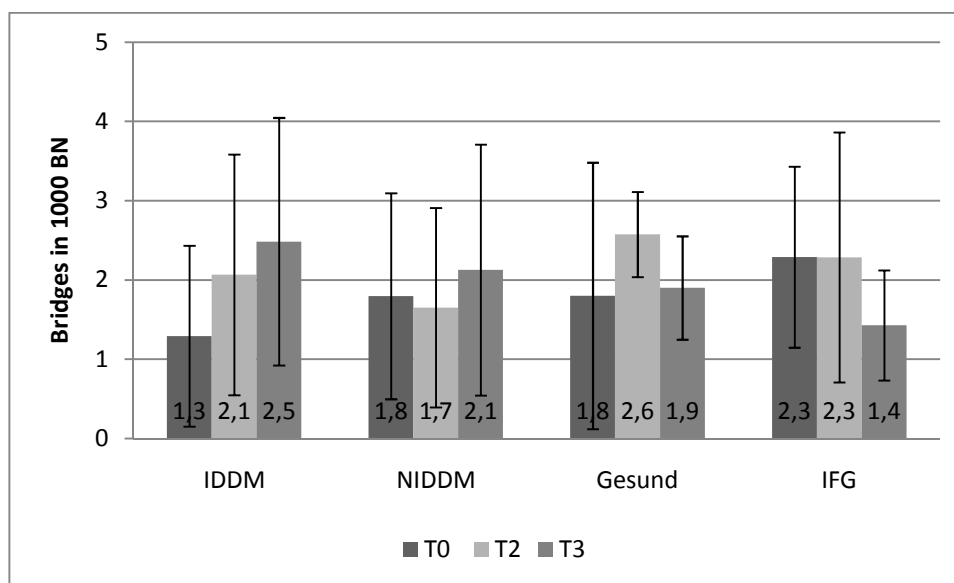


Abbildung 19: Anzahl an Bridges in 1000 BN in der Interventionsgruppe, getrennt nach dem Gesundheitszustand

4.2.7 Apoptose in der Informationsgruppe

In der Informationsgruppe zeigte sich zu den verschiedenen Messzeitpunkten kein signifikanter Unterschied, auch das Geschlecht beeinflusste die Entstehung von Apoptosen nicht. Zu den verschiedenen Messzeitpunkten (T0, T2, T3) konnte kein Einfluss des Geschlechtes auf die Häufigkeit von Apoptosen beobachtet werden (Abbildung 20).

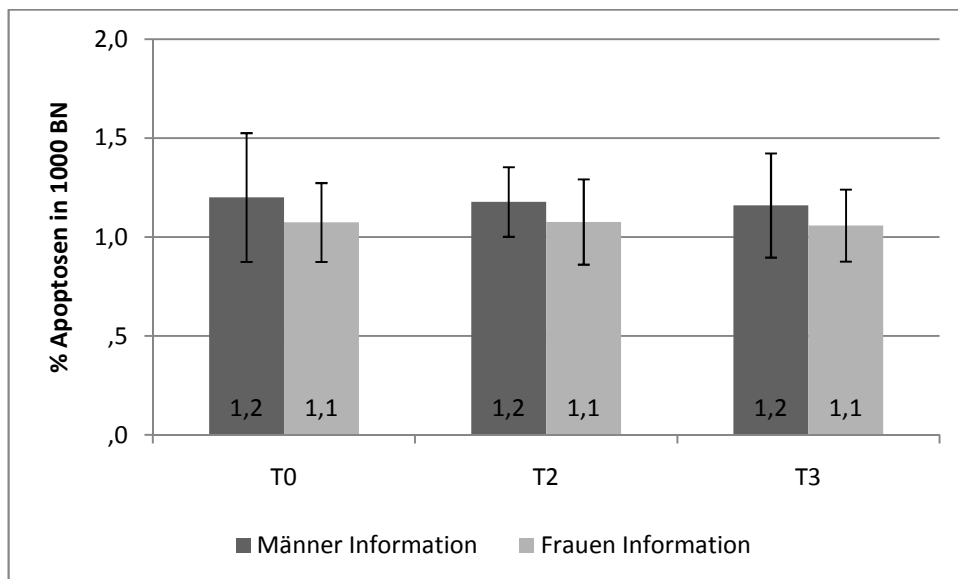


Abbildung 20: Anzahl an Apoptosen in 1000 BN in der Informationsgruppe, getrennt nach Geschlecht.

Der Gesundheitszustand der Probanden zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von Apoptosen. Auch während der Studie wurde keine unterschiedliche Entwicklung zwischen diesen Gruppen beobachtet. (Abbildung 21).

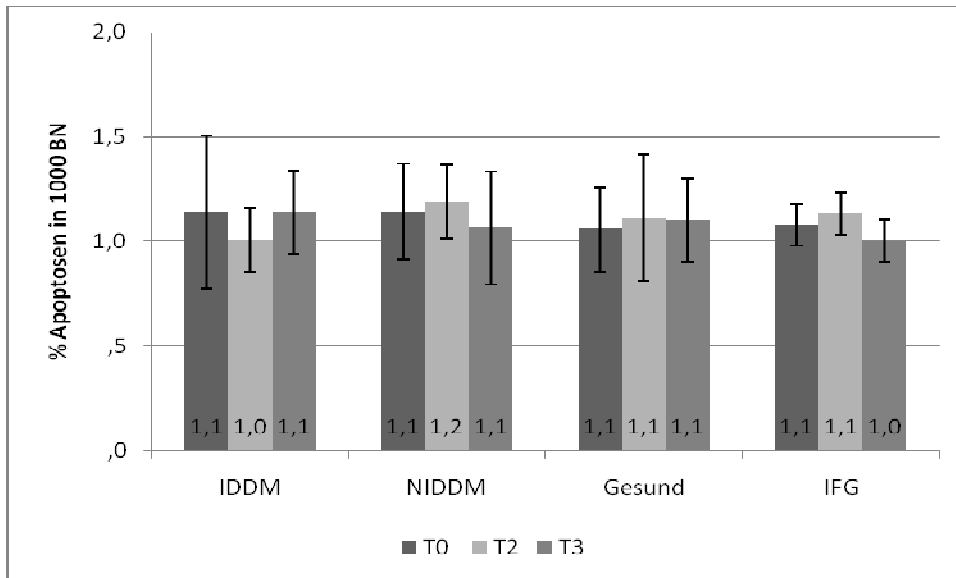


Abbildung 21: Anzahl an Apoptosen in 1000 BN in der Informationsgruppe, getrennt nach dem Gesundheitszustand

4.2.8 Apoptose in der Interventionsgruppe

Zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (T0, T2, T3) zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit von Apoptosen. Das Geschlecht hat keinen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von Apoptosen. Auch während der Studie wurde keine signifikant unterschiedliche Entwicklung zwischen Männern und Frauen festgestellt (Abbildung 22).

Bei den Männern kam es zu einer geringfügigen Veränderung des Mittelwertes um 9,8% von T0 auf T2. In der Gruppe der Frauen stieg der Mittelwert ebenfalls um 7,1% von T0 auf T2 (Abbildung 22).

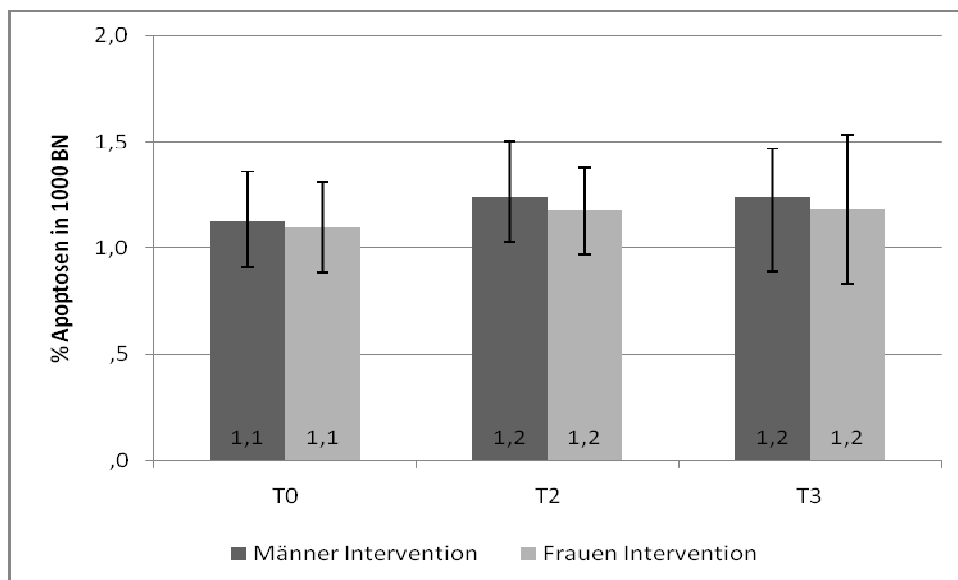


Abbildung 22: Anzahl an Apoptosen in 1000 BN in der Interventionsgruppe, getrennt nach Geschlecht

Die Häufigkeit der Apoptosen war zwischen den verschiedenen Gesundheitsgruppen nicht signifikant unterschiedlich. IDDM-, NIDDM-, IFG und gesunde Probanden zeigten keine signifikant unterschiedliche Entwicklung der Apoptosenrate während der Studie (Abbildung 23).

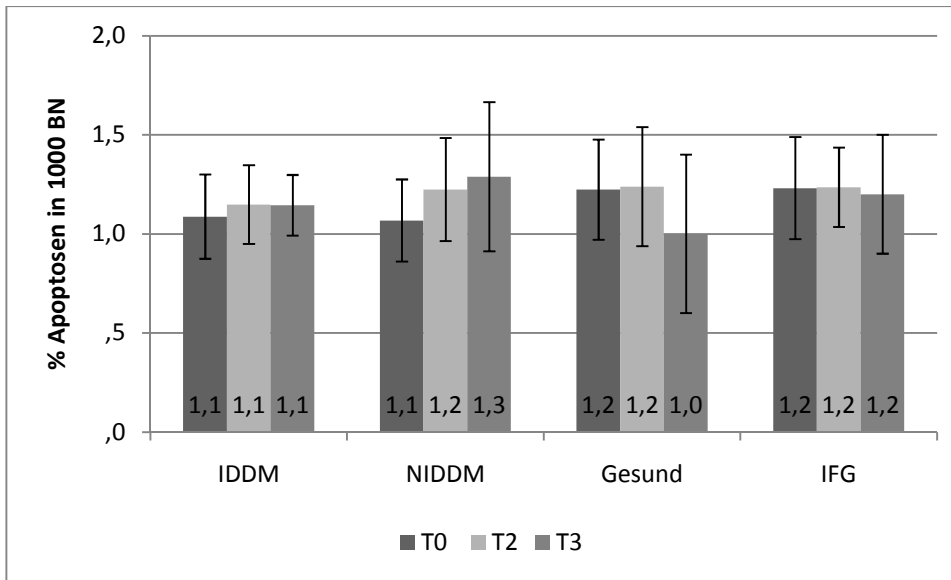


Abbildung 23: Anzahl an Apoptosen in 1000 BN in der Interventionsgruppe, getrennt nach Gesundheitsgruppen

4.2.9 Nekrose in der Informationsgruppe

Die Anzahl der Nekrosen änderte sich nicht signifikant während der Studie. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen Männern und Frauen. Der Zeitverlauf wurde vom Geschlecht nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 24).

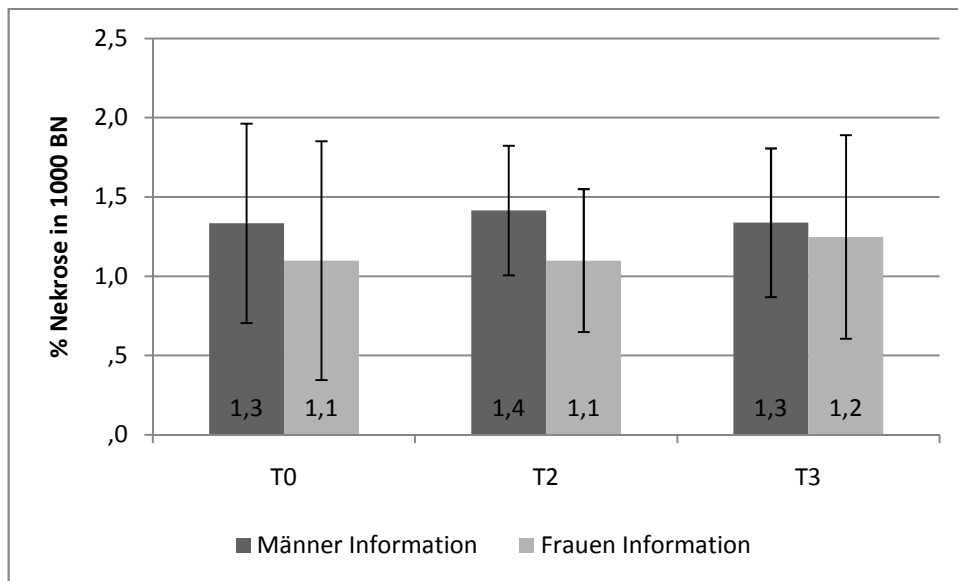


Abbildung 24: Anzahl an Nekrosen in 1000 BN in der Informationsgruppe, getrennt nach Geschlecht

Die Probanden der unterschiedlichen Gesundheitsgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede, auch im Zeitverlauf hat der Gesundheitszustand keinen signifikanten Einfluss auf die Nekrosenhäufigkeit (Abbildung 25).

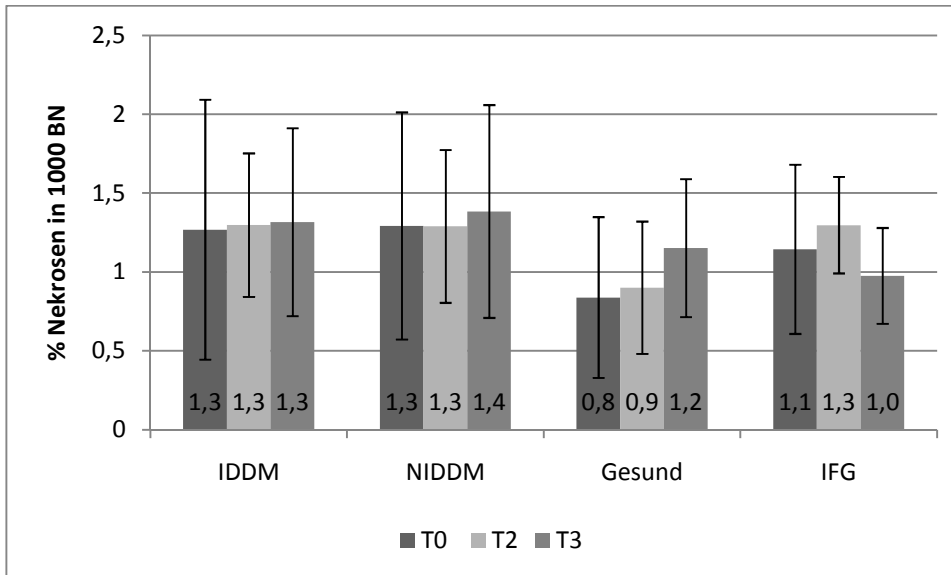


Abbildung 25: Anzahl an Nekrosen in 1000 BN in der Informationsgruppe, getrennt nach Gesundheitsgruppen

4.2.10 Vorkommen des Parameters Nekrose in der Interventionsgruppe

Zu den verschiedenen Messzeitpunkten (T0, T2, T3) zeigte die Nekrosenhäufigkeit keine signifikanten Unterschiede. Zwischen den Geschlechtern konnte zu T0 eine signifikant ($p=0,030$) höhere Anzahl an Nekrosen bei Männern festgestellt werden. Während des Verlaufs der Studie konnte keine signifikante Veränderung zwischen den Geschlechtern beobachtet werden, die Entwicklung im Laufe der Studie war zwischen Männern und Frauen sehr ähnlich (Abbildung 26). Die Häufigkeit zwischen Männern und Frauen gleicht sich im Verlauf der Studie an.

Der Mittelwert sank (n.s.) von T0 auf T2 um 6,7%. In der Gruppe der Frauen blieb der Mittelwert von T0 auf T2 konstant. Von T0 auf T3 stieg er um 10,6% (Abbildung 26).

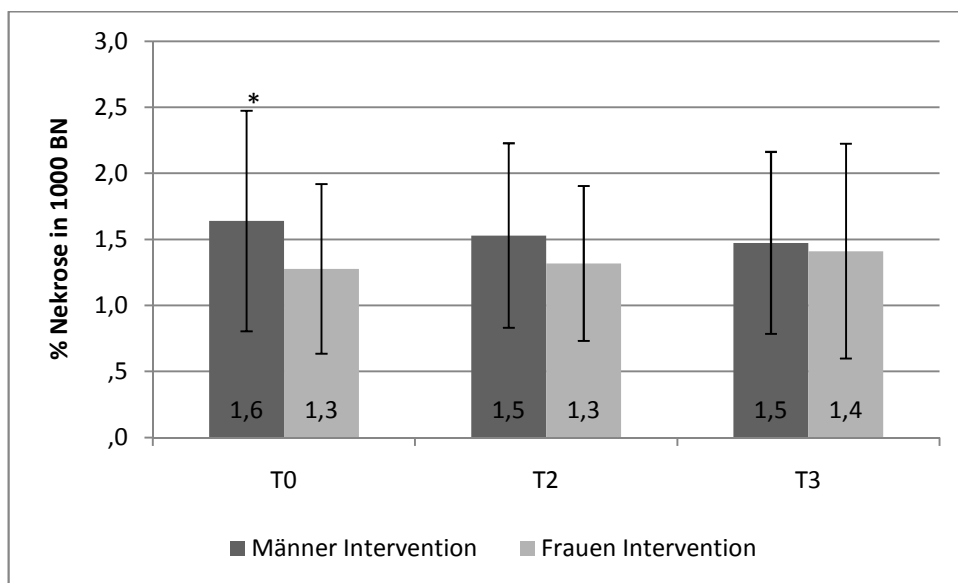


Abbildung 26: Anzahl an Nekrosen in 1000 BN in der Interventionsgruppe, getrennt nach Geschlecht. Signifikanter ($p=0,030$) Unterschied zwischen Männern und Frauen zu T0.

Der Gesundheitszustand hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von Nekrosen.

Die Werte in den vier Gesundheitsgruppen zeigten nur wenige Veränderungen zu den verschiedenen Messzeitpunkten und blieben mit Ausnahme der IFG und gesunden Probanden konstant (Abbildung 27).

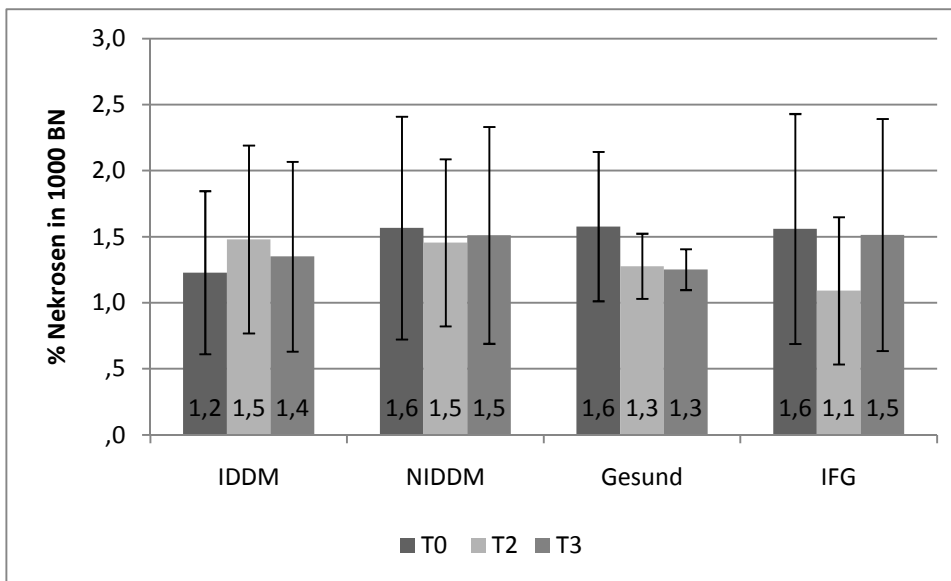


Abbildung 27: Anzahl an Nekrosen in 1000 BN in der Interventionsgruppe, getrennt nach Gesundheitsgruppen

4.3 DISKUSSION DER PARAMETER MNi, BUDS, BRIDGES, APOPTOSEN UND NEKROSEN IN INFORMATIONS- UND INTERVENTIONSGRUPPE

4.3.1 Einfluss des Geschlechts auf die Parameter MNi, Buds, Bridges, Apoptosen und Nekrosen

Bereits 1985 wurde von Fenech und Morley das erste Mal nachgewiesen, dass das Geschlecht einen Einfluss auf die MN-Häufigkeit hat [FENECH und MORLEY; 1985]. Dieses Ergebnis wurde seither in weiteren Studien immer wieder bestätigt [FENECH et al., 1998; FENECH et al., 2005; FENECH 2007]. Die Vermutung geht dahingehend, dass das X-Chromosom dafür hauptverantwortlich ist, da es eine höhere Tendenz als ein Y-Chromosom hat als ein MN verloren zugehen. Da Frauen zwei X-Chromosomen besitzen, weisen sie daher auch mehr MNi als Männer auf. [FENECH und BONASSI, 2011]. Frauen weisen, abhängig vom Alter, um den Faktor 1,2 – 1,6 mehr MN auf als Männer, haben dadurch aber kein größeres Krebsrisiko [THOMAS et al., 2011].

Auch Wojda et al. kamen zum Schluss, dass Alter und Geschlecht einen wesentlichen Einfluss auf die Anzahl der MNi haben. Sie geben an, dass die Zahl an MNi bis zum 70. Lebensjahr ansteigt und sich danach kaum noch verändert. Frauen haben generell höhere MNi-Werte als Männer, wobei sie die Phase der Stagnation früher erreichen [WOJDA et al., 2007].

In dieser Diplomarbeit konnte bestätigt werden, dass Frauen signifikant eine höhere Anzahl an MNi in den Lymphozyten aufwiesen als Männer. In der Informations ($p=0,016$)- und Interventionsgruppe ($p=0,001$) wurde zu Beginn der Studie ein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern beobachtet (Abbildung 8, Abbildung 10).

Bei Frauen konnte eine um den Faktor 1,37 (Informationsgruppe) bzw. 1,44 (Interventionsgruppe) höhere Anzahl an MNi in Lymphozyten festgestellt werden.

Die MNi-Werte der Männer zum Zeitpunkt T0 bewegten sich im mittleren Bereich, der laut Fenech [FENECH 2007] zu erwartenden Mittelwerte, Frauen hingegen waren am oberen Ende des Referenzbereiches angesiedelt (Tabelle 10). Die zu erwarteten Werte

beziehen sich allerdings auf gesunde Probanden, deren Lymphozyten untersucht wurden, Erfahrungswerte für Diabetiker liegen bis dato noch nicht vor. Dennoch sieht man, dass Personen mit DMT2 im Bereich von gesunden Personen einzuordnen sind.

Im Rahmen der Studie, änderte sich die Anzahl der MNi während der Studie signifikant bei den Probanden der Informationsgruppe ($p=0,003$). Die signifikanten Erhöhungen wurden von T0 auf T3 ($p=0,023$) und von T2 auf T3 ($p=0,009$) in der Gruppe der Frauen beobachtet. Frauen hatten zu jedem Messzeitpunkt eine höhere Anzahl an MNi ($p=0,016$). Die MNi in der Gruppe der Männer änderten sich im Verlauf der Studie kaum (Abbildung 8). Ein möglicher Erklärungsansatz für das signifikante Ergebnis ist die unterschiedliche Fallzahl von Männern (12 Probanden) und Frauen (19 Probanden) in der Informationsgruppe. Weiters hatte man keinen Einfluss auf den Lebensstil der Probanden in dieser Gruppe.

In dieser Diplomarbeit zeigte sich auch, dass das Geschlecht einen Einfluss auf das Auftreten von Nekrosen hat. Männer, die in die Interventionsgruppe randomisiert wurden, hatten eine signifikant ($p=0,030$) höhere Anzahl an Nekrosen zum Zeitpunkt T0 als Frauen in dieser Gruppe. Der Unterschied betrug absolut gesehen lediglich 0,3% Nekrosen in 1000 BN (Männer: 1,6 % Nekrosen vs. Frauen: 1,3 % Nekrosen). Während der Studie zeigten die Nekrosen keine signifikante Änderung zwischen Männer und Frauen, die Mittelwerte gleichen sich im Lauf der Studie an. In den bisherigen Studien wurde nur auf den Unterschied bei MNi zwischen den Geschlechtern eingegangen. Bei Nekrosen wurde dieser Aspekt bisher noch nicht untersucht, daher liegen keine Vergleichsdaten vor. Die fehlenden Daten und der geringe Unterschied in absoluten Zahlen erschweren eine Interpretation des Ergebnisses. Zu diesem Aspekt sind weitere wissenschaftliche Untersuchungen notwendig.

Für die Parameter Buds und Bridges konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern zum Zeitpunkt T0 festgestellt werden. Diese Werte lagen in dem von Fenech [FENECH 2007] definierten Bereich der zu erwarteten Werte (Tabelle 10). In der Interventionsgruppe konnte zum Zeitpunkt T2 und T3 ein tendenzieller Unterschied ($p\leq 0,1$) zwischen Männern und Frauen in der Anzahl an Buds aufgezeigt

werden. Frauen hatten zum Zeitpunkt T2 um 1,8 Buds (45%) bzw. zum Zeitpunkt T3 um 1,6 Buds (30%) mehr als Männer. Es wurde auch eine tendenzielle ($p=0,117$) unterschiedliche Änderung in der Anzahl von Buds bei Männern und Frauen während der Studie beobachtet (Abbildung 14).

In keiner der bis dato veröffentlichten Studien konnte ein Hinweis auf geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Entstehung von Nekrosen, Buds und Bridges beobachtet werden, wobei jedoch der Großteil der Studien nur das Auftreten von MNi untersuchte.

4.3.2 Einfluss des Gesundheitszustandes auf die Parameter MNi, Buds, Bridges, Apoptosen und Nekrosen

Vor Beginn der Intervention (T0) konnte kein signifikanter Einfluss des Gesundheitszustandes festgestellt werden (Abbildung 9, Abbildung 11).

Auch der Effekt der Intervention wurde durch den Gesundheitszustand der Probanden kaum beeinflusst. Lediglich in der Interventionsgruppe wurde eine signifikant ($p=0,001$) unterschiedliche Entwicklung von Buds bei Probanden der Gesundheitsgruppen beobachtet (Abbildung 15). Die Buds in der Gruppe der IDDM stiegen kontinuierlich von T0 auf T3. Die Probanden der Gruppe der NIDDM zeigten keine Veränderung in der Anzahl der Buds. Bei den IFG- und den gesunden Probanden sanken die Buds zu T2 und T3. Der Gesundheitszustand der Probanden in der Informationsgruppe hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Entstehung und die Veränderung Buds im Laufe der Studie (Abbildung 13).

DMT2-Patienten weisen laut Andreassi et al. ein höheres Aufkommen an MNi auf als Nicht-Diabetiker. Sie vermuten, dass vermehrter oxidativer Stress und erhöhter Glukoselevel dafür verantwortlich sind [ANDREASSI et al., 2011]. Zuniga-Gonzalez et al. stellten fest, dass DMT2 und DMT1-Probanden um 2fach höhere Werte an MNi in der Mundschleimhaut aufwiesen als gesunde Probanden. Das Alter der Probanden lag bei $35,16 \pm 13,48$ Jahren [ZUNIGA-GONZALEZ et al., 2007]. Weitere Studien, die den

Zusammenhang zwischen DMT2 und die Anzahl von MNi untersuchen, liegen nicht vor. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet sind daher dringend notwendig.

4.4 EINFLUSS VON NÄHRSTOFFEN AUF DAS AUFTRETEN VON MNi, BUDS, BRIDGES, APOPTOSEN UND NEKROSEN BEI UNTER- ODER ÜBERVERSORGUNG AN FOLSÄURE, VITAMIN B12, ALPHA-CAROTIN, BETA-CAROTIN, RETINOL UND ALPHA-TOCOPHEROL

Im folgenden Kapitel wird die Versorgung der Probanden mit Antioxidantien und Vitaminen und deren Einfluss auf die Parameter MNi, Bridges, Buds, Apoptosen und Nekrosen untersucht. Die Werte wurden am Beginn der Studie (T0) ermittelt.

4.4.1 Versorgung mit Vitamin B12 und Einfluss auf die Parameter MNi, Buds, Bridges, Apoptosen, Nekrosen

Fast alle Probanden waren vor Beginn der Intervention (T0) ausreichend mit Vitamin B12 versorgt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Probanden, die unterversorgt und ausreichend versorgt waren, im Auftreten von MNi, Buds, Bridges, Apoptosen und Nekrosen festgestellt werden (Tabelle 12).

Tabelle 12: Einfluss von Vitamin B12 auf mittels CBMN-Assay ermittelten Parameter zum Zeitpunkt T0, unterteilt in 2 Gruppen: „unterversorgt“ (<147 pmol/l), „ausreichend versorgt“ (>147 pmol/l), Werte: Labor-WGKK (147-520 pmol/l)

	Unterversorgt	% Probanden	Ausreichend versorgt	% Probanden	P-Wert
MNi (in 1000 BN)	18,7±8,1	3	25,5±9,9	97	0,241
Bridges (in 1000 BN)	1,0±1,3	3	1,8±1,3	97	0,273
Buds (in 1000 BN)	5,7±3,5	3	4,3±2,9	97	0,438
Apoptosen (in %)	1,1±0,6	3	1,3±0,6	97	0,812
Nekrosen (in %)	1,9±1,1	3	1,3±0,7	97	0,170

Angabe in MW±Std

Bei Einteilung der gemessenen Werte von Vitamin B12 (T0) der Probanden in Tertilen wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen Anzahl der untersuchten Parameter und den 3 unterschiedlichen Konzentrationsbereichen (129 pmol/l – 224 pmol/l; 225 pmol/l – 398 pmol/l; 399 pmol/l – 716 pmol/l) von Vitamin B12 festgestellt.

4.4.2 Versorgung mit Folsäure und Einfluss auf die Parameter MNi, Buds, Bridges, Apoptosen, Nekrosen

Folsäure hat wie Vitamin B12 einen wesentlichen Einfluss auf die Entstehung von DNA-Schäden.

Die Plasma-Konzentration von Folsäure war bei allen Probanden, bis auf einen, zufriedenstellend. Es wurden dafür die Laborwerte der WGKK verwendet (6,35 nmol/l – 30,59 nmol/l). Die Folsäurekonzentration in den Erythrozyten, welche die Langzeitversorgung der vergangenen Monate mit Folsäure widerspiegelt [McNULTY und SCOTT, 2008], war bei 39 Probanden unter den Empfehlungen. Probanden, die mit Folsäure unterversorgt waren, wiesen signifikant mehr Bridges und Apoptosen auf als jene mit ausreichender Versorgung (Tabelle 13).

Tabelle 13: Einfluss von Folsäure in den Erythrozyten auf mittels CBMN-Assay ermittelten Parameter zum Zeitpunkt T0, unterteilt in 2 Gruppen: „unterversorgt“ (< 272 nmol/l), „ausreichend versorgt“ (> 273 nmol/l). Werte: SimulTrac-Broschüre (unterversorgt: < 272 nmol/l).

	Unterversorgt	% Probanden	Ausreichend versorgt	% Probanden	P-Wert
MNi (in 1000 BN)	24,8±8,8	39	24,8±10,4	43	0,994
Bridges (in 1000 BN)	2,1±1,3	39	1,4±1,0	43	0,011*
Buds (in 1000 BN)	4,3±2,6	38	4,4±3,3	42	0,860
Apoptosen (in %)	1,5±0,7	38	1,2±0,4	43	0,039*
Nekrosen (in %)	1,3±0,8	38	1,3±0,7	43	0,893

Angabe in MW±Std

In Tabelle 14 wurden die gemessenen Konzentrationen der Folsäure in Erythrozyten der Probanden in 3 Bereiche eingeteilt. Keiner der 3 unterschiedlichen Bereiche wies einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der Parameter auf. Weder Apoptosen und Bridges zeigten ein signifikantes Ergebnis (Tabelle 14). Die Unterteilung der Plasma-Folsäurekonzentrationen in Tertilen (91,8 – 215,50 nmol/l, 215,51 – 335,37 nmol/l, 335,38 – 1654,0 nmol/l) führte zu dem gleichen Ergebnis.

Tabelle 14: Ausmaß an chromosomalen Schäden in den Tertilen von Plasmafolat zum Zeitpunkt T0

	1. Tertile	2. Tertile	3. Tertile	p-Wert
Folsäure im Plasma (nmol/l)	91,8 – 215,50	215,51 – 335,37	335,38 – 1654,0	
MNi (in 1000 BN)	24,04 ± 7,9	24,85 ± 10,56	25,5 ± 10,47	0,856
Bridges (in 1000 BN)	1,91 ± 1,16	1,89 ± 1,41	1,31 ± 1,07	0,133
Buds (in 1000 BN)	4,3 ± 2,49	4,41 ± 3,79	4,47 ± 2,58	0,977
Apoptose (in %)	1,45 ± 0,62	1,34 ± 0,64	1,22 ± 0,39	0,322
Nekrose (in %)	1,38 ± 0,85	1,34 ± 0,83	1,28 ± 0,58	0,875

Angabe in MW±Std

4.4.3 Versorgung mit Retinol und Carotinoiden und Einfluss auf die Parameter MNi, Buds, Bridges, Apoptosen, Nekrosen

Zum Zeitpunkt (T0) waren alle Probanden ausreichend mit Retinol versorgt (>0,7µmol/l). Sauberlich et al. gibt an, dass bei einem Wert von >0,7µmol/l im Plasma die Retinolversorgung ausreichend ist.

Die Tertilen der Retinkonzentration (0,73 – 3,05 µmol/l, 3,06 – 3,63 µmol/l, 3,64 – 7,17 µmol/l) zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Entstehung der mittels CBMN-Assay ermittelten Parameter.

Die gemessenen Plasmawerte beta-Carotin wurden in unterversorgt“ (≤ 0,13 µmol/l), „ausreichend versorgt“ (0,14-1,20 µmol/l) und „zuviel“ (>1,21 µmol/l) eingeteilt. Die Bereiche wurden von D’Odorico et al. übernommen [D’ODORICO et al., 2000]. Die

Plasmakonzentration an beta-Carotin war beim Großteil der Probanden zufriedenstellend. 35 Probanden wiesen beta-Konzentrationen unter den Empfehlungen ($\leq 0,13 \mu\text{mol/l}$) auf und 4 Probanden überschritten den Bereich der empfohlenen Plasmakonzentrationen. Die Plasmakonzentration an beta-Carotin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die mittels CBMN-Assay erhobenen Parameter, wobei bei Probanden mit einem hohem beta-Carotin Spiegel zwar nicht signifikant, aber dennoch 23,4% mehr MNi gezählt wurden als bei jenen Personen, die ausreichend ($0,14\text{-}1,20 \mu\text{mol/l}$) mit beta-Carotin versorgt waren (Tabelle 15).

Tabelle 15: Einfluss von beta-Carotin auf mittels CBMN-Assay ermittelten Parameter zum Zeitpunkt T0, unterteilt in 3 Gruppen: „unterversorgt“ ($\leq 0,13 \mu\text{mol/l}$), „ausreichend versorgt“ ($0,14\text{-}1,20 \mu\text{mol/l}$), „zuviel“ ($>1,21 \mu\text{mol/l}$)

	Unterversorgt	%	Ausreichend versorgt	%	Zuviel	%	P-Wert
MNi (in 1000 BN)	23,4±9,6	37	25,6±9,7	59	31,6±9,3	4	0,219
Bridges (in 1000 BN)	1,7±1,3	37	1,7±1,3	59	1,8±0,8	4	0,985
Buds (in 1000 BN)	4,2±2,4	37	4,7±3,2	59	2,1±0,5	4	0,195
Apoptosen (in %)	1,3±0,6	37	1,3±0,5	59	1,3±0,9	4	0,864
Nekrosen (in %)	1,3±0,6	37	1,5±0,8	59	1,0±0,5	4	0,262

Angabe in MW±Std

Die erhobenen Plasmakonzentrationen an alpha-Carotin wurden in „unterversorgt“ ($\leq 0,04 \mu\text{mol/l}$), „ausreichend“ ($0,04\text{-}0,34 \mu\text{mol/l}$), „zuviel versorgt“ ($>0,35 \mu\text{mol/l}$) eingeteilt. Die Bereiche wurden von D’Odorico et al. übernommen [D’ODORICO et al., 2000]. Fast alle Probanden ($n=89$) waren ausreichend mit alpha-Carotin versorgt. Zwischen den Probanden, deren alpha-Carotin Spiegel zu niedrig und zufriedenstellend war, konnte kein signifikanter Unterschied im Auftreten von MNi, Bridges, Buds, Apoptosen und Nekrosen festgestellt werden (Tabelle 16).

Tabelle 16: Einfluss von alpha-Carotin auf mittels CBMN-Assay ermittelten Parameter zum Zeitpunkt T0, unterteilt in 3 Gruppen: „unterversorgt“ ($\leq 0,04 \mu\text{mol/l}$), „ausreichend“ ($0,04\text{-}0,34 \mu\text{mol/l}$), „zuviel versorgt“ ($>0,35 \mu\text{mol/l}$).

	Unterversorgt	%	Ausreichend versorgt	%	P-Wert
MNi (in 1000 BN)	25,5 $\pm$ 7,8	6	25,0 $\pm$ 9,8	94	0,902
Bridges (in 1000 BN)	1,9 $\pm$ 1,4	6	1,7 $\pm$ 1,3	94	0,690
Buds (in 1000 BN)	4,4 $\pm$ 2,6	6	4,4 $\pm$ 2,9	94	0,989
Apoptosen (in %)	1,5 $\pm$ 0,6	6	1,3 $\pm$ 0,6	94	0,487
Nekrosen (in %)	1,3 $\pm$ 0,7	6	1,4 $\pm$ 0,8	94	0,929

Angabe in MW $\pm$ Std

Weder zeigte die unterschiedlichen Konzentrationen der Tertilen von beta-Carotin ($0,00 - 0,11 \mu\text{mol/l}$, $0,12 - 0,26 \mu\text{mol/l}$, $0,27 - 1,45 \mu\text{mol/l}$) noch von alpha-Carotin ($0,03 - 0,06 \mu\text{mol/l}$, $0,061 - 0,09 \mu\text{mol/l}$, $0,091 - 0,22 \mu\text{mol/l}$) einen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von Chromosomenschäden.

4.4.4 Versorgung mit alpha-Tocopherol und Einfluss auf die Parameter MNi, Buds, Bridges, Apoptosen, Nekrosen

Nur jeweils 1 Proband war mit alpha-Tocopherol unterversorgt ($\leq 11,5 \mu\text{mol/l}$) beziehungsweise marginal ($11,6-16,1 \mu\text{mol/l}$) versorgt. Die restlichen Probanden ($n=92$) waren optimal mit alpha-Tocopherol ($\geq 16,2 \mu\text{mol/l}$) versorgt. Die Grenzwerte wurden von Sauberlich et al. übernommen [SAUBERLICH et al., 1999].

Die Einteilung der gemessenen Werte an alpha-Tocopherol in Tertilen zeigte zwei signifikante Werte für den Parameter MNi. Die Anzahl der MNi der 1. Tertile ist geringer als in der 3. Tertile zum Zeitpunkt T0 ($p=0,019$). Die Werte der MNi der 2. und 3. Tertile zum Zeitpunkt T0 wiesen ebenso einen signifikanten ($p=0,047$) Unterschied auf. Auch hier zeigte sich, dass das Tertil mit der höchsten Konzentration an alpha-Tocopherol die meisten MNi aufwies. (Tabelle 17).

Tabelle 17: Ausmaß an chromosomalen Schäden in den einzelnen alpha-Tocopherol-Tertilen zum Zeitpunkt T0

	1. Tertile	2. Tertile	3. Tertile	p-Wert
α-Tocopherol ($\mu\text{mol/l}$)	8.46 - 29.26	29.27 - 36.29	36.30 - 92.69	
MNi (in 1000 BN)	22.54 $\pm$ 9.28	23.36 $\pm$ 6.64°	29.11 $\pm$ 11.44*	0.012
Bridges (in 1000 BN)	1.91 $\pm$ 1.5	1.39 $\pm$ 1.14	1.86 $\pm$ 1.15	0.210
Buds (in 1000 BN)	4.28 $\pm$ 2.77	3.89 $\pm$ 2.42	5.1 $\pm$ 3.39	0.240
Apoptose (in %)	1.26 $\pm$ 0.69	1.26 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.47	0.535
Nekrose (in %)	1.37 $\pm$ 0.76	1.4 $\pm$ 0.85	1.31 $\pm$ 0.63	0.877

* signifikant unterschiedlich von 1. zur 3. Tertile, $p=0,019$, Angabe in MW $\pm$ Std, $p<0,05$,

° signifikant unterschiedlich von 2. zur 3. Tertile, $p=0,047$, Angabe in MW $\pm$ Std, $p<0,05$

4.5 DISKUSSION ÜBER DIE VERÄNDERUNG DER PARAMETER MNI, BUDS, BRIDGES, APOPTOSEN UND NEKROSEN BEI UNTER- ODER ÜBERSORGUNG AN FOLSÄURE, VITAMIN B12, ALPHA-CAROTIN, BETA-CAROTIN, RETINOL, ALPHA-TOCOPHEROL

Vitamin B12 und Folsäure spielen eine wichtige Rolle für den DNA Metabolismus. Folsäure wird für die Synthese von dTMP zu dUMP benötigt. Bei Folsäuremangel akkumuliert dUMP und Uracil wird statt Thymin in die DNA eingebaut. Dieser Prozess kann zu Punktmutationen, DNA- und Chromosomenschäden führen. In weiterer Folge können MNI gebildet werden [FENECH 2001]. Vitamin B12 Mangel führt zu vermehrtem Einbau von Uracil in die DNA durch die reduzierte Synthese von 5,10 Methylentetrahydrofolat, welches für die dTMP-Synthese benötigt wird. Beide Vitamine werden für die Synthese von Methionin durch die Remethylierung von Homocystein und S-Adenosylmethionin (SAM) verwendet. Bei Unterversorgung kommt es zu einer Reduktion dieser Synthesen, somit wird wieder verstärkt Uracil in die DNA eingebaut, was zu oben genannten Schäden führen kann [THOMAS et al., 2011]. Ein Mangel an beiden Vitaminen und der dadurch gestörten Synthesen führt zu einem erhöhten Homocysteinspiegel, der wiederum einen Risikofaktor für kardiovasukläre Erkrankungen darstellt [FENECH 2001].

Bis jetzt wurde die Wirkung von Folsäure und Selen auf DNA-Schäden ausreichend untersucht. Die Wirkweise von anderen Nährstoffen bei Menschen mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund ist noch Thema aktueller Forschungen [BULL et al., 2011].

Folsäure und Vitamin B12 schützen vor Anämien und Hyperhomocysteinämie. Diese Schutzfunktion ist wissenschaftlich bewiesen. Die Menge um vor DNA-Schäden zu schützen ist bisher noch nicht bekannt [FENECH 1999]. Die empfohlene Aufnahmemenge für oben angeführte Vitamine beträgt für Folsäure 400 µg/d und für Vitamin B12 3 µg/d. Diese Werte gelten für Jugendliche und Erwachsene [DACH-Referenzwerte, 2008].

Folsäure gemessen in Erythrozyten ist ein geeigneter Parameter um den längerfristigen Status zu messen. Folsäure im Plasma zeigt die kurzfristige Versorgung [McNULTY and SCOTT, 2008].

Eine Supplementierung mit Vitamine B12 und Folsäure führte zu einer Reduktion von MNi. In einer 6-monatigen Studie wurde Folsäure und Vitamin B12 3 Monate lang in 3,5facher Menge des RDI verabreicht, weitere 3 Monate die 10fache Menge des RDI. Es zeigte sich, dass die MNi Anzahl signifikant bei den Probanden reduziert wurde, die schon zu Beginn der Studie erhöhte MNi Werte aufwiesen (über der 50. Perzentile). Probanden unter der 50. Perzentile zeigten keine Veränderung. Vitamin B12 korrelierte signifikant mit der Reduktion der MNi ($R=-0,49$, $p<0,005$) und Homocystein ($R=0,39$, $p<0,006$). Es konnte kein Zusammenhang mit Folsäure in den Erythrozyten festgestellt werden. FENECH et al. schlussfolgern, dass MNi reduziert werden, wenn der Homocysteinspiegel unter $7,5\mu\text{mol/l}$ und Vitamin B12 über 300pmol/l ist. Diese Werte werden durch die Zufuhr von $700\mu\text{g}$ Folsäure und $7\mu\text{g}$ Vitamin B12 pro Tag erreicht. Die Probanden dieser Studie waren 18 - 32 Jahre alt [FENECH et al., 1998].

In einer anderen 4-monatigen Studie mit 64 älteren Männern (50-70 Jahre), die teilweise einen Mangel an Folsäure im Plasma ($<6,8\text{ nmol/l}$), in Erythrozyten ($< 317\text{ nmol/l}$) und einen Mangel an Vitamin B12 ($< 150\text{ pmol/l}$) aufwiesen, wurden den Probanden Folsäure ($0,7\text{mg}$, 3,5-fache des RDI in Australien zum damaligen Zeitpunkt) in Form von angereicherten Weizenflocken bzw. Folsäure ($2,0\text{mg}$, 10-fache des RDI in Australien zum Studienzeitpunkt) in Tablettenform verabreicht. Fenech et al. kommen zum Schluss, dass ein niedriger Vitamin B12 Status und ein erhöhter Homocysteinspiegel zur Entwicklung von Chromosomenschäden beitragen. In dieser Studie zeigt Folsäure im Plasma und in den Erythrozyten keinen direkten Zusammenhang mit der Entstehung von DNA-Schäden, aber einen positiven Einfluss auf die Reduktion des Homocysteinspiegels [FENECH et al., 1997].

Im Jahr 2005 wurde der RDI in Australien für Vitamin B12 und Folsäure erhöht. Die aktuellen empfohlenen Aufnahmemengen für Vitamin B12 liegen bei $2,4\mu\text{g/d}$ und für Folsäure bei $400\mu\text{g/d}$ [NUTRIENT REFERENCES VALUES FOR AUSTRALIA AND NEW

ZEALAND, 2005]. Obwohl der RDI für Folsäure erhöht wurde, liegt die Dosierung der Supplemente deutlich über der derzeitigen empfohlenen Aufnahmemenge von 400 µg/d, das entspricht dem 5fachen des RDI in Australien.

Bei den Probanden dieser Studie wurde eine durchschnittliche Folsäurekonzentration im Plasma von $19,8 \pm 8,8$ nmol/l und in den Erythrozyten von $332,1 \pm 213,0$ nmol/l gemessen. Diese Werte liegen deutlich unter dem Wert, den Bull et al., Crott et al. und Fenech angeben, um die Entstehung von MNi zu verhindern [BULL et al., 2011; CROTT et al., 2001; FENECH 2002]. Die Vitamin B12 Konzentration von $332,8 \pm 148,0$ pmol/l liegt im wirksamen Bereich laut Fenech [FENECH 2002].

Bei Vitamin B12 und Folsäure im Plasma war bei der vorliegenden Studie keine mangelnde Versorgung der Probanden zu erkennen, da bis auf 3 bzw. 1 Proband, alle ausreichend versorgt waren. Bei Folsäure in den Erythrozyten war zu erkennen, dass 39 der Probanden unterversorgt (< 272 nmol/l) waren (Tabelle 13). In dieser Studie konnte bei der Messung der Folsäure in Erythrozyten bei zwei Parametern ein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden (Tabelle 13). Probanden, die zum Zeitpunkt T0 ausreichend mit Folsäure in den Erythrozyten versorgt waren, hatten signifikant weniger Bridges in 1000 BN ($p=0,011$) und Apoptosen in % ($p=0,039$) als jene Probanden, die mit Folsäure unterversorgt waren. Bezüglich Vitamin B12 konnte kein signifikanter Zusammenhang mit dem Vorkommen der Parameter beobachtet werden.

In einer Interventionsstudie von Fenech et al. zeigt sich bereits beim Vergleich der Daten zu Beginn der Studie, dass Vitamin E, Retinol und beta-Carotin einen Einfluss auf DNA-Schäden haben. Eine Supplementierung mit Vitamin E und Retinol zeigt einen signifikanten Zusammenhang mit dem Entstehen von MNi, wenn sich die verabreichte Menge der Vitamine im höchsten Tertil befand. Beta-Carotin hat einen signifikant positiven Einfluss, wenn sich die aufgenommene Dosis im mittleren Tertil befand. Beta-Carotin im höchsten und niedrigsten Tertil scheint eine negative Wirkung auf MNi zu haben. Alpha-Tocopherol, Vitamin C und beta-Carotin zeigt keinen direkten Einfluss auf die Entstehung von MNi, dennoch kommt es zu einer Reduktion von 25% in der

Interventionsgruppe. Für beta-Carotin wird angenommen, dass bei einer Aufnahme zwischen 4000 µg und 6000 µg der wirksamste Effekt auf die Entstehung von MNi erreicht wird [FENECH et al., 2005].

Bei den Carotinoiden, alle eingeteilt in Tertilen, konnte kein signifikanter Einfluss der unterschiedlichen Konzentrationsbereiche auf die verschiedenen Parameter festgestellt werden. Dennoch wurden bei den Probanden, die mit beta-Carotin überversorgt ($> 1,2 \mu\text{mol/l}$) waren um 23,4% mehr MNi nachgewiesen.

In einer Studie von Fenech et al. wurde nachgewiesen, dass erhöhte beta-Carotin Werte mit einer nicht signifikanten Steigerung von 18% der MNi verbunden war [FENECH et al., 2005].

Bisher liegen noch keine Daten vor, die den Einfluss von alpha-Carotin auf die Entwicklung der mittels CBMN-Assay ermittelten Parameter untersuchten. In dieser Studie konnte kein signifikanter Einfluss beobachtet werden.

Während der Studie wurde ein signifikanter Einfluss von alpha-Tocopherol auf die Anzahl von MNi zum Zeitpunkt T0 beobachtet. Das Tertil mit der höchsten alpha-Tocopherolkonzentration unterschied sich signifikant ($p=0,019$) von dem Tertil mit der niedrigsten alpha-Tocopherolkonzentration in der Anzahl von MNi ($22,54 \pm 9,28$ vs. $29,11 \pm 11,44$). Das mittlere Tertil verglichen mit dem höchsten Tertil zeigte einen weiteren signifikanten ($p=0,047$) Unterschied im Vorkommen der MNi ($23,36 \pm 6,64$ vs. $29,11 \pm 11,44$) (Tabelle 17). Dieses Ergebnis ist widersprüchlich zu der Studie von Fenech et al. vom Jahr 2005. In dieser Studie wurde gezeigt, dass alpha-Tocopherol reduzierend auf die Anzahl von MNi wirkt. Es wurde kein signifikantes Ergebnis nachgewiesen, aber es kam zu einer Senkung von 25% von der Anzahl an MNi [FENECH et al., 2005]

Die widersprüchlichen Ergebnisse von beta-Carotin und alpha-Tocopherol zu der Studie von Fenech et al. sind möglicherweise auf die Kombination der Supplemente zurückzuführen. In dieser Studie wurde 18 mg beta-Carotin, 900 mg Vitamin C, 250 mg alpha-Tocopherol und 12 mg Zink in Tablettenform verabreicht. Die

Interventionsphase der Studie dauerte 6 Monate im Gegensatz zur 2-monatigen Interventionsphase der DIAPLANT-Studie.

4.6 KORRELATION ZWISCHEN DEN PARAMETER MNI, BUDS, BRIDGES, APOPTOSEN UND NEKROSEN UND MIKRONÄHRSTOFFEN FOLSÄURE, VITAMIN B12, ALPHA-CAROTIN, BETA-CAROTIN, RETINOL UND ALPHA-TOCOPHEROL (von Roswitha Stieglmayer)

Während der 8-wöchigen Intervention mit 300 g Gemüse und 25 ml Pflanzenöl kam es zu signifikanten Veränderungen von Vitaminen und Nährstoffen, die das Auftreten von dem mittels CBMN-Assay ermittelten Parameter beeinflussen können.

Um Zusammenhänge zwischen Veränderungen an Vitaminkonzentrationen und mittels CBMN-Assay erhobenen Parameter während der Intervention festzustellen, wurden Korrelationen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Differenzen der Häufigkeiten der Parameter für Chromosomenschäden und die Veränderung der Konzentrationen der Vitamine vom Zeitpunkt T2 zu T0 und Zeitpunkt T3 und T0 berechnet.

4.6.1 Veränderungen der Parameter vom Zeitpunkt T2 zu T0

Bei den erhobenen Parametern kam es in der Informations- und Interventionsgruppe zu keinen signifikanten Veränderungen vom Zeitpunkt T0 zu T2.

Im Kapitel 4.4.2 wurde gezeigt, dass Folsäure, gemessen in den Erythrozyten, einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl von Bridges ($p=0,011$) und Apoptosen ($p=0,039$) zum Zeitpunkt T0 hat. In der Gruppe der schlechtversorgten Probanden waren diese beiden Parameter signifikant erhöht.

In der Interventionsgruppe zeigte sich eine schwache Korrelation mit geringer Aussagekraft zwischen der Konzentration an Folsäure ($T2 - T0$) und Veränderung der Apoptosenhäufigkeit ($T2 - T0$). Bei steigender Folsäurekonzentration im Plasma stieg die Häufigkeit der Apoptosen ($p=0,036$, $r=0,289$) (Abbildung 28).

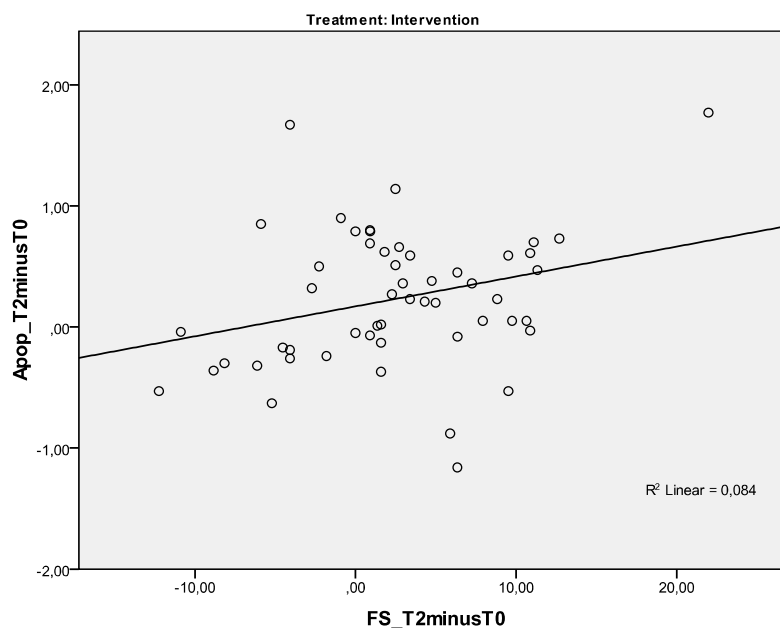


Abbildung 28: Korrelation zwischen der Veränderung der Apoptosen-Häufigkeit und der Veränderung an Folsäure im Plasma (nmol/l) vom Zeitpunkt T2 zu T0 in der Interventionsgruppe, $p=0,036$, $r=0,289$

Es wurde während der Studie keine weiteren Korrelationen zwischen Veränderungen in der Häufigkeit der Parameter und Veränderungen der Konzentration an Vitaminen während der Interventionsphase vom Zeitpunkt T2 zu T0 beobachtet.

4.6.2 Veränderungen der Parameter vom Zeitpunkt T3 zu T0

Die nachfolgenden Korrelationen sind von geringerer Aussagekraft, da zum Zeitpunkt T3 die Gabe der Interventionslebensmittel (300 g Gemüse, 25 ml Pflanzenöl) bereits seit 8 Wochen beendet war. Die Probanden kehrten in dieser Zeit wieder zu ihren gewohnten Ernährungsgewohnheiten zurück.

Während der Studie kam es bei den Frauen in der Informationsgruppe zu einer signifikanten Erhöhung der MNI vom Zeitpunkt T0 zu T3 ($p=0,023$) (Abbildung 8). In der Interventionsgruppe konnten keine Veränderungen beobachtet werden.

Abbildung 29 zeigt eine signifikante starke Korrelation ($p=0,035$, $r=0,415$) zwischen der Veränderungen an Bridges und alpha-Carotin in der Informationsgruppe. Aus dieser Korrelation ist ersichtlich, dass die Häufigkeit der Bridges steigt, wenn die Konzentration an alpha-Carotin steigt.

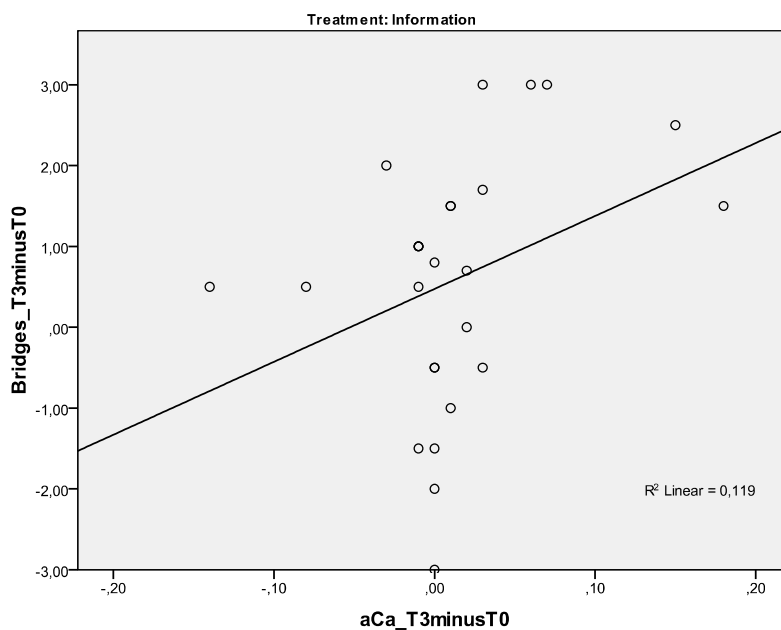


Abbildung 29: Korrelation zwischen der Veränderung der Häufigkeit von Bridges in 1000 BN und der Veränderung an alpha-Carotin ($\mu\text{mol/l}$) vom Zeitpunkt T3 zu T0 in der Informationsgruppe, $p=0,035$, $r=0,415$

Es besteht eine schwache Korrelation ($p=0,044$, $r=0,286$) zwischen der Veränderung der Apoptosen-Häufigkeit und der Konzentrationsveränderung von Vitamin B12 vom Zeitpunkt T3 zu T0 (Abbildung 30). Die Anzahl der Apoptosen steigt mit steigender Konzentration von Vitamin B12.

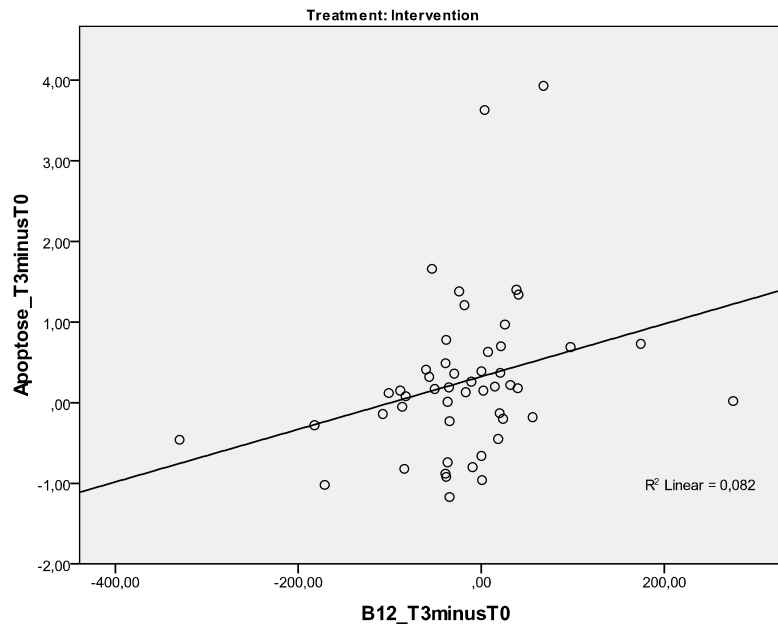


Abbildung 30: Korrelation zwischen der Veränderung der Apoptosen-Häufigkeit und der Veränderung an Vitamin B12 (pmol/l) vom Zeitpunkt T3 zu T0 in der Interventionsgruppe, $p=0,044$, $r=0,286$

In Abbildung 31 wird eine schwache Korrelation ($p=0,04$, $r=0,286$) zwischen der Veränderung der Häufigkeiten von Buds und der Konzentrationsveränderung von Lycoplen vom Zeitpunkt T3 zu T0 in der Informationsgruppe dargestellt. Die Häufigkeiten von Buds sinkt, wenn die Konzentration von Lycoplen steigt.

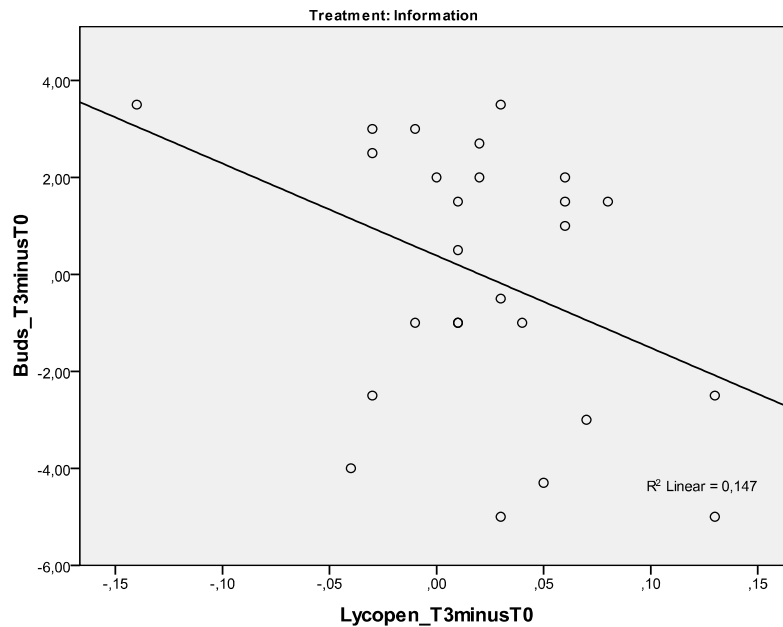


Abbildung 31: Korrelation zwischen der Veränderung in der Häufigkeit von Buds in 1000 BN und der Veränderung von Lycoplen ($\mu\text{mol/l}$) vom Zeitpunkt T3 zu T0 in der Informationsgruppe, $p=0,04$, $r=0,286$

Eine negative schwache Korrelation wurde zwischen der Anzahl der MNi und alpha-Tocopherol in der Interventionsgruppe beobachtet. Es zeigte sich, dass die Anzahl der MNi gesenkt wird, wenn der Gehalt an alpha-Tocopherol steigt ($p=0,023$, $r=0,301$) (Abbildung 32).

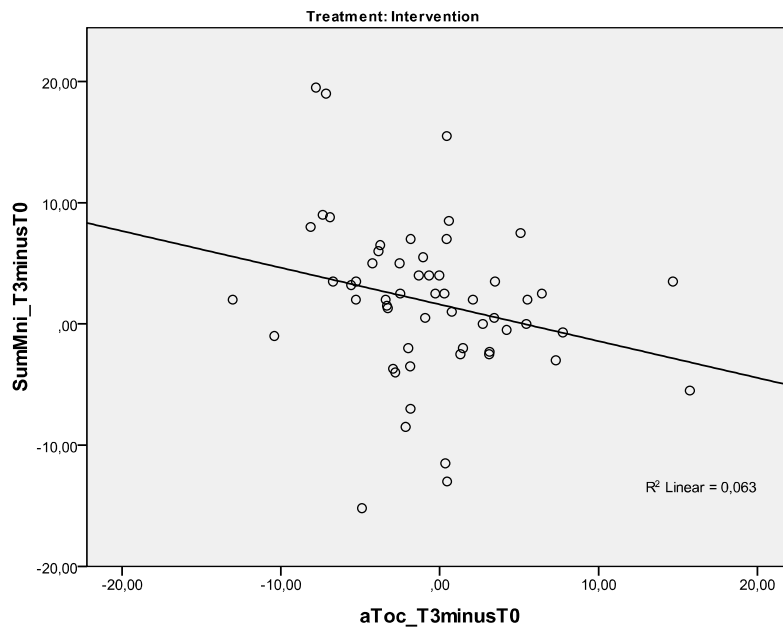


Abbildung 32: Korrelation zwischen der Veränderung in der MNi in 1000 BN und Veränderung an alpha Tocopherol ($\mu\text{mol/l}$) vom Zeitpunkt T3 zu T0 in der Interventionsgruppe, $p=0,023$, $r=0,301$

4.7 DISKUSSION ZUR VERÄNDERUNG DER PARAMETER MNI, BUDS, BRIDGES, APOPTOSEN UND NEKROSEN DURCH MIKRONÄHRSTOFFE FOLSÄURE, VITAMIN B12, ALPHA-CAROTIN, BETA-CAROTIN, RETINOL UND ALPHA-TOCOPHEROL

Wie in Kapitel 4.5 bereits ausführlich behandelt wurde, haben gewisse Mikronährstoffe einen Einfluss auf die Entstehung von Chromosomenschäden. In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass Folsäure in den Erythrozyten einen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von Bridges ($p=0,011$) und Apoptosen ($p=0,039$) hat (Tabelle 13). Hohe alpha-Tocopherolkonzentrationen zeigten einen negativen Effekt ($p=0,012$) auf die Häufigkeiten von MNi (Tabelle 17).

In einer Studie von CROTT et al. wurde nachgewiesen, dass Buds und Bridges Biomarker für Folsäuremangel und genetische Schäden sind. Die Studie wurde in-vitro mit menschlichen Lymphozyten mit unterschiedlichen Folsäurekonzentrationen im Bereich von 12-120nM für die Dauer von 9 Tagen durchgeführt. Es wird gezeigt, dass es eine signifikant negative Korrelation zwischen Folsäure und Chromosomenschäden gibt. Bei Konzentrationen von 60 bis 120 nM zeigt sich eine Reduktion aller Marker für Chromosomenschäden. Hingegen bei einer Konzentration von 24 mM wird eine 2-5fache Erhöhung der Parameter für Chromosomenschäden nachgewiesen. Buds korrelieren mit der Folsäurekonzentration. Die Autoren empfehlen, dass beide Parameter, Buds und Bridges beim Zählen berücksichtigt werden, weil es eine streng positive Korrelation zwischen Bridges und MNi gibt und eine negative Korrelation mit Folsäure [CROTT et al, 2001 A].

Bridges sind ein Hinweis auf DNA-Schäden. Die Berücksichtigung von Bridges erhöht die Aussagekraft des CBMN-Assays als genotoxischen Test [THOMAS et al., 2003].

Die Beobachtung von Crott et al. bezüglich Folsäure und der Reduktion von Apoptose konnte im Rahmen der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Am Ende der Interventionsphase zeigte sich eine schwache ($r=0,286$) Korrelation zwischen Folsäure und Apoptosen. Je höher die Konzentration der Folsäure im Plasma, desto mehr stieg die Anzahl der Apoptosen (Abbildung 28). In der Literatur konnte kein Hinweis gefunden werden, dass sich Folsäure im Plasma auf die Häufigkeit von Apoptosen auswirkt.

Die weiteren mittels CBMN-Assay ermittelten Parameter zeigten keine signifikante Korrelation zwischen den veränderten Häufigkeiten und den unterschiedlichen Konzentrationen der Mikronährstoffe am Ende der Interventionsphase zum Zeitpunkt T2 zu T0.

Weitere Korrelationen gab es zum Zeitpunkt T3 zu T0. In der Informationsgruppe zeigte sich, dass die Veränderung der Anzahl von Bridges und die Änderung in der Konzentration von alpha-Carotin korrelieren ($p=0,035$, $r=0,415$) (Abbildung 29). Die Änderung der Konzentration an Lycopon wirkte sich in der Informationsgruppe auf die

Anzahl von Buds aus ($p=0,04$, $r=0,286$), was sich in einer schwachen Korrelation zeigte (Abbildung 31). Zwei weitere schwache Korrelationen wurden bei den Probanden der Intervention beobachtet. In der Interventionsgruppe wurden die Apoptosen-Häufigkeit von der Konzentration an Vitamin B12 signifikant ($p=0,044$, $r=0,286$) beeinflusst (Abbildung 30). Die Veränderung in der Interventionsgruppe in der Häufigkeit von MNi wurde durch die Veränderung der Konzentration von alpha-Tocopherol von T3 zu T0 signifikant ($p=0,023$, $r=0,301$) beeinflusst (Abbildung 32). Da es sich jedoch dabei um eine schwache Korrelation handelt, hat dieses Ergebnis eine geringe Aussagekraft. Der Vergleich der Anzahl der MNi zu der Konzentration von alpha-Tocopherol im Plasma (Tabelle 17) zum Zeitpunkt T0 ist zu dieser Korrelation (Abbildung 32) widersprüchlich. Aus dieser Tabelle geht hervor, dass in der 3. Tertile mit der höchsten alpha-Tocopherol Konzentration signifikant mehr MNi gezählt wurden.

Die Korrelationen von T3 zu T0 haben eine geringere Bedeutung, da die Werte am Anfang der Studie und am Ende der wash-out Phase verglichen wurden. Zu diesem Zeitpunkt war die Ernährungsintervention bereits seit 8 Wochen beendet. Ein möglicher Grund für die Veränderungen in der Informations- und Interventionsgruppe könnte die Jahreszeit gewesen sein, in der die Intervention stattgefunden hat. Der Start der verschiedenen Interventionsgruppen war von Februar bis November 2010. Aufgrund der saisonalen Unterschiede veränderte sich das verfügbare Obst- und Gemüseangebot. Möglicherweise nahmen die Probanden in den Sommermonaten mehr Obst und Gemüse auf, da es keine Begrenzung hinsichtlich des Obst- und Gemüsekonsums gab. Die zusätzliche Aufnahme könnte einen Einfluss auf die Plasma-Konzentration der Carotinoide haben.

5 SCHLUSSBETRACHTUNG (von Roswitha Stieglmayer)

Im Rahmen der DIAPLANT Studie konnte das Ergebnis bestätigt werden, dass das Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von MNi in Lymphozyten hat. Frauen wiesen zu Beginn der Studie eine signifikant höhere Anzahl an MNi auf als Männer. Dieses Ergebnis wurde bereits in vergangenen Studien beobachtet und konnte bestätigt werden. Frauen hatten zu jedem Messzeitpunkt signifikant mehr MNi (Informationsgruppe: $p=0,016$, Interventionsgruppe: $p=0,001$) als Männer. Die Geschlechter unterschieden sich um den Faktor 1,37 in der Informations-, und um den Faktor 1,44 in der Interventionsgruppe.

Die Probanden dieser Studie waren zum Großteil gut mit Vitaminen und Antioxidantien versorgt, nur bei Folsäure in den Erythrozyten und beta-Carotin im Plasma konnte eine Unterversorgung einiger Probanden festgestellt werden. 48% der Probanden hatten weniger als 272 nmol/l Folsäure in den Erythrozyten und 37% der Probanden hatten weniger als 13 $\mu\text{mol/l}$ beta-Carotin im Plasma zum Zeitpunkt T0.

Im Rahmen der Intervention mit Gemüse und Öl konnte kein signifikanter Einfluss auf die Anzahl der MNi nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich, dass Folsäure, in den Erythrozyten, einen positiven Einfluss auf die Entwicklung der Parameter Buds und Apoptosen hatte. Probanden, die zu Beginn der Studie nicht ausreichend mit Folsäure versorgt waren, wiesen signifikant mehr Buds und Apoptosen auf, als jene die gut versorgt waren.

Hohe alpha-Tocopherolausgangskonzentrationen zeigten in dieser Studie einen signifikant negativen Effekt auf die Häufigkeit von MNi. Im höchsten Tertil der gemessenen Konzentration wurde auch die höchste Anzahl von MNi beobachtet. Die Veränderung der Konzentration von alpha-Tocopherol von T0 zu T3 korrelierte negativ mit der Änderung der Häufigkeit der MNi in der Interventionsgruppe. Eine weitere Korrelation in der Interventionsgruppe wurde zwischen der veränderten Häufigkeit von Apoptosen und der geänderten Konzentration von Vitamin B12 von T0 auf T3

beobachtet. Die Apoptosen stiegen an, wenn sich die Konzentration von Vitamin B12 erhöhte.

Auch in der Informationsgruppe wurden Korrelationen bei den Carotinoiden beobachtet. Es zeigte sich, dass die veränderte Anzahl von Bridges mit der geänderten Konzentration von alpha-Carotin korrelierte. Die Bridges stiegen mit steigender alpha-Carotinkonzentration. Lycoplen hingegen korrelierte negativ mit den Buds. Je höher die gemessene Konzentration von Lycoplen, desto niedriger war die Häufigkeit an Buds. Diese Korrelationen vom Zeitpunkt T3 zu T0 haben allerdings eine geringe Aussagekraft, da zu diesem Zeitpunkt die Intervention bereits seit 8 Wochen zu Ende war und es sich dabei hauptsächlich um schwache Zusammenhänge handelt.

Bei den Studien, bei denen es zu einer signifikanten Änderung der MNI kam, wurde mit einem mehrfachen des empfohlenen RDI supplementiert. Auch der Beobachtungszeitraum war um ein Vielfaches länger. Durch die sehr hohe Zufuhr von Folsäure und Vitamin B12 zeigten sich deutliche Ergebnisse. Diese hohen Mengen sind im Rahmen einer ausgewogenen Ernährung ohne Supplemente nicht zu erreichen.

In einigen Nationen gibt es die Vermutung, dass es notwendig ist die RDA's neu zu definieren um die Morbidiät im Alter zu reduzieren und die Bevölkerung vor degenerativen Krankheiten wie z.B. Krebs, kardiovaskuläre Krankheiten und Alzheimer zu schützen. Das bisher erworbene Wissen über die optimale Zufuhr von Mikronährstoffen als Schutz der DNA ist noch unzureichend. Eine Mikronährstoffzufuhr über den gültigen Empfehlungen ist möglicherweise Personen zu empfehlen, die extreme Defizite in ihrer Versorgung aufweisen und für Vitamine deren Aufnahme im Alter eingeschränkt ist [FENECH, 2002].

Bisher fehlen noch weitere Studien, die die Wirkungsweise von einzelnen Mikronährstoffen und Kombinationsmöglichkeiten erforscht haben [FENECH et al., 2005; FENECH et al., 2008]. Ernährung hat einen Einfluss auf das Krebsrisiko und DNA-Schäden. Eine zu geringe oder zu hohe Zufuhr von Mikronährstoffen kann das Krebsrisiko beeinflussen [FENECH et al., 2005].

Abschließend kann man sagen, dass der Einfluss der Ernährungsintervention schwer nachzuweisen war, da die Probanden sehr gut mit den gemessenen Nährstoffen versorgt waren. Nur bei zwei gemessenen Vitaminen (Folsäure in Erythrozyten und beta-Carotin im Plasma) konnte eine Unterversorgung nachgewiesen werden. Weiters werden durch eine ausgewogene Ernährung nie Mengen erreicht, die bei einer Intervention mit Supplementen möglich sind. Nur Dosierungen, die die empfohlene tägliche Aufnahmemenge deutlich überschritten, führten in den bisher durchgeführten Studien zu einer signifikanten Reduktion von MNI.

Eine weitere Erklärung für die Ergebnisse könnte sein, dass die Probanden in den Sommermonaten zusätzlich Obst und Gemüse konsumiert haben, da zu diesem Zeitpunkt das Warenangebot gewöhnlich vielfältiger als im Frühling und Winter ist.

6 ZUSAMMENFASSUNG (von Roswitha Stieglmayer)

Diabetes Mellitus Typ 2 ist eine der häufigst auftretenden Stoffwechselerkrankungen unserer Zeit. Die Schätzungen der WHO gehen davon aus, dass weltweit bis 2030 etwa 7,7% der Erwachsenen an DMT2 erkrankt sein werden. Dieser Umstand bedeutet, dass die Gesundheitskosten rapide ansteigen und die Staaten mit enormen Kosten konfrontiert werden. Zudem weisen Daten, die auf erhöhten oxidativen Stress, ein erhöhtes Krebsrisiko und ein vermehrtes Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen bei DMT2 Patienten hinweisen.

Diese Diplomarbeit ist ein Teil der DIAPLANT-Studie, in der die Wirkung einer Ernährungsintervention mit 300 g Gemüse und 25 ml Öl auf prädiktive Biomarker für ein Krebsrisiko untersucht wurde. Die eingesetzten Marker mittels CBMN-Assay (MNI, NBUDs, NPBs, Apoptosen und Nekrosen) wurden in den Lymphozyten ausgewertet. Die DIAPLANT-Studie war eine epidemiologische, randomisierte, prospektive Interventionsstudie. Die Probanden wurden nach ihren Gesundheitszustand verschiedenen Gruppen zugeordnet (Insulin-dependent diabetes mellitus, non-insulin dependent diabetes mellitus, Gesund, Impaired fasting Glucose).

Weiters wurde in dieser Arbeit die mögliche Verbindung von Folsäure, Vitamin B12, alpha-Tocopherol und Carotinoiden und dem Auftreten von den genannten Markern des CBMN-Assay untersucht.

Es zeigte sich, dass die Ernährungsintervention keinen Einfluss auf die Entstehung von MNI hatte, aber dennoch beobachtet werden konnte, dass Folsäure in den Erythrozyten einen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von Bridges und Apoptosen hat. Probanden, die zum Beginn der Studie mit Folsäure unterversorgt waren, hatten signifikant mehr Briges und Apoptosen als jene Probanden, die ausreichend mit Folsäure versorgt waren. Weiters konnte bestätigt werden, dass es einen geschlechtlichen Unterschied in der Anzahl von MNI gibt. Frauen hatten zu jedem Messzeitpunkt eine höhere Anzahl an MNI und unterschieden sich am Beginn der Studie (T0) signifikant zu den Männern.

Beta-Carotin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von MNi. Es zeigte sich jedoch, dass Probanden die eine gemessene Plasmakonzentration von beta-Carotin höher als 1,21 $\mu\text{mol/l}$ hatten, um 23,4% mehr MNi aufwiesen als jene Probanden, die ausreichend (0,14 – 1,20 $\mu\text{mol/l}$) mit beta-Carotin im Plasma versorgt waren. Alpha-Carotin zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von Chromosomenschäden.

Alpha-Tocopherol hatte einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl an MNi zum Zeitpunkt T0. In der 2. und 3. Tertile der alpha-Tocopherol-Konzentration konnten signifikant mehr MNi nachgewiesen werden verglichen mit der niedrigsten Tertile der alpha-Tocopherol-Konzentration. 8 Wochen nach Ende Intervention zeigte sich eine negativ schwache Korrelation hinsichtlich der Veränderung der Konzentration von alpha-Tocopherol (T3-T0) und der Anzahl der MNi (T3-T0).

Da die Probanden einen sehr guten Ernährungsstatus hinsichtlich der gemessenen Vitamine und Antioxidantien aufwiesen, war der Einfluss der Ernährungsintervention hinsichtlich Chromosomenschäden nur schwer nachzuweisen.

Abschließend ist zu sagen, dass der Einfluss der Ernährung, die Wirkungsweise und die tägliche Aufnahmemenge von Vitaminen und Nährstoffen auf prädiktive Biomarker für eine Krebsentstehung noch nicht restlos geklärt ist. Aus diesem Grund sind noch weitere Studien hinsichtlich dieser Fragestellung notwendig.

7 ABSTRACT (von Roswitha Stieglmayer)

Diabetes Mellitus Typ 2 is one of the most common chronic metabolic diseases. The WHO estimates that about 7.7% of the adult population worldwide will suffer from DMT2 by 2030. Due to this fact the expenditures of health insurance companies will increase rapidly and state governments will be confronted with enormous health care costs. Furthermore, other studies indicate increased oxidative stress, an increased risk of cancer and a high risk of cardiovascular diseases in DMT2 patients.

This master thesis is part of the DIAPLANT study. The aim of this study was to investigate the effects of a nutritional intervention with 300 g vegetables and 25 ml plant oil on predictive biomarker of DMT2 patients. Biomarkers for increased cancer risk were measured in lymphocytes by CBMN-Assay (MNI, Buds, Bridges, Apoptosis, and Nekroses). The DIAPLANT study was an epidemiologic, randomized, prospective intervention study. DMT2 patients were divided according to their health condition into the following four groups: Insulin-dependent diabetes mellitus, non-insulin dependent diabetes mellitus, healthy, Impaired fasting Glucose.

Furthermore, the influence of folic acid, vitamin B12, alpha-Tocopherol and carotenoids on the incidence of the CBMN-biomarkers was observed.

There was no significant impact of the nutritional intervention on the numbers of MNI, however there was a significant impact of folic acid in red blood cells on the numbers of Bridges and Apoptosis. Subjects with low folic acid in red blood cells at base line had significant more bridges and apoptosis. It was confirmed that women have significantly more MNI than men.

Beta-carotene had no significant impact on the numbers of MNI but subjects with higher plasma concentration of beta-carotene ($<1,21 \mu\text{mol/l}$) had 23,4 % more MNI. Alpha-carotene has no significant impact on DNA-damages.

At base-line alpha-tocopherol showed a significant impact on the numbers of MNI. Subjects with higher concentration of alpha-tocopherol also had significant more MNI

compared to the lowest concentration of alpha-tocopherol. At the end of the study, 8 weeks after the nutritional intervention, there was a negative weak correlation. Higher concentration of alpha-tocopherol reduced the numbers of MNI.

An important fact is that the study group was very well supplied with the measured vitamins and antioxidants.

It is not proved so far which dietary factors really reduce the cancer risk. Due to this fact further studies are necessary.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 2010; 33: 62-69.
- ANDREASSI MG, BARALE R, IOZZO P, PICANO E. The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. Mutagenesis 2011, 26(1), S 77-83.
- ASTLEY S, ELLIOT R, ARCHER D, SOUTHON S. Evidence that dietary supplementation with carotenoids and carotenoid-rich foods modulates the DNA damage: repair balance in human lymphocytes. British Journal of Nutrition 2004; 91: 63-72.
- ATTIA M, HELAL GK, ALHAIDER AA. Assessment of genomic instability in normal and diabetic rats treated with metformin. Chemico-Biological Interactions 2009, 189, S 296-304
- BAUR D, KLOTSCHED J, HAMNVIK O, SIEVERSG C, PIEPERD L, WITTCHEHD H, STALLA G, SCHMID R, KALES S, MANTZOROS C. Type 2 diabetes mellitus and medications for type 2 diabetes mellitus are associated with risk for and mortality from cancer in a German primary care cohort. Metabolism clinical and experimental 2010;
- BENNER S E, WARGOVICH M J, LIPPMAN S M, FISHER R, VELASCO M, WINN R J, HONG W K. Reduction in oral mucosa micronuclei frequency following alpha-tocopherol treatment of oral leukoplakia. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 1994; 3: 73–76.
- BJELAKOVIC G, NIKOLOVA D, GLUUD LL, SIMONETTI RG, GLUUD C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. JAMA 2007; 297: 842-857.
- BONASSI S, EL-ZEIN R, BOLOGNESI C, FENECH M. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. Mutagenesis 2011; vol. 26 no. 1: 93-100.

BONASSI S, ZNAOR A, CEPPI M, LANDO C, CHANG W P, HOLLAND N, KIRSCH-VOLDERS M, ZEIGER E, BAN S, BARALE R, BIGATTI M P, BOLOGNESI C, CEBULSKA-WASILEWSKA A, FABIANOVA E, FUCIC A, HAGMAR L, JOKSIC G, MARTELLI A, MIGLIORE L, MIRKOVA E, SCARFI M R, ZIJNO A, NORPPA H, FENECH M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2007; vol. 28 no. 3: 625-631.

BULL C, BEETSTRA-HILL S, BENASSI-EVANS BJ, CROTT JW, KIMURA M, TEO T.

Application and adaptation of the in vitro micronucleus assay for the assessment of nutritional requirements of cells for DNA damage prevention. *Mutagenesis* 2011, 26(1), S 193-197.

CEPPI M, GALLO F AND BONASSI S. Study design and statistical analysis of data in human population studies with the micronucleus assay. *Mutagenesis* 2011; vol. 26 no. 1: 247-252.

COLLINS A, HARRINGTON V. Repair of oxidative DNA damage: assessing its contribution to cancer prevention. *Mutagenesis* 2002; vol. 17 no. 6: 489-493.

COUGHLIN S S, CALLE E E, TERAS L R, PETRELLI J, THUN M J. Diabetes mellitus as a predictor of cancer mortality in a large cohort of US adults. *American Journal of Epidemiology* 2004; 156: 1160-1167.

CROTT JW, MASHIYAMA ST, AMES BN, FENECH M. The Effect of Folic Acid Deficiency and MTHFR C677T Polymorphism on Chromosome Damage in Human Lymphocytes in Vitro. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2001: 10. S 1089-1096

CURRIE CJ, POOLE C D, GALE EAM. The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2009; 52: 1766-1777.

DANEI G, FINUCANE MM, LU Y, SINGH GM, COWAN MJ, PACIOREK CJ, LIN JK, FARZADFAR F, KHANG YH, STEVENS GA, RAOM, ALI MK, RILEY LM, ROBINSON CA,

EZAATI M. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. The lancet, 2011; vol. 378 no. 9785, 31-40.

DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG, ÖSTERREICHISCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG, SCHWEIZERISCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNGSFORSCHUNG, SCHWEIZERISCHE VEREINIGUNG FÜR ERNÄHRUNG. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr 1. Auflage. In: Organische Bestandteile, Anorganische Bestandteile (Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. (DGE) et al.). Umschau Braus GmbH, Verlagsgesellschaft. Frankfurt am Main, 2008; 23 – 209.

D'ODORICO A, MARTINES D, KIECHL S, EGGER G, OBERHOLLENZER F, BONVINCI P, STURNIOLO GC, NACCARATO R, WILLEIT J. High plasma levels of α - and β -carotene are associated with a lower risk of atherosclerosis – results from the Bruneck study. Atherosclerosis 2000; 153: 231-239.

ELMADAFI I, LEITZMANN C. Ernährung des Menschen. Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co. 380-397.

EL-ZEIN R, VRAL A, ETZEL C J. Cytokinesis-blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. Mutagenesis 2011; vol. 26. no. 1: 101-106.

FENECH M, BONASSI S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. Mutagenesis 2011, vol. 26 no. 1: 43-49.

FENECH M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nature Protocols, vol. 2 no.5, 2007, S 1084-1104

FENECH M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. Mutation Research 475, 2001, S 57-67

FENECH M, BAGHURST P, LUDERER W, TURNER J, RECORD S, CEPPI M, BONASSI S. Low intake of calcium folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, β -carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability – results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. *Carcinogenesis* vol.26. no.5 2005: 991-999

FENECH M. Genome health nutrigenomics and nutrigenetics – diagnosis and nutritional treatment of genome damage on an individual basis. *Food and Chemical Toxicology* 46, 2008, S 1365-1370

FENECH M (B). Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs). *Food and Chemical Toxicology* 40, 2002, S 113-1117

FENECH M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a „cytome“ assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research* 2006; 600: 58 – 66.

FENECH M, MORLEY AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research* Feb-Apr; 147 (1-2) (1985), 29-36.

FENECH M, AITKEN C, RINALDI J. Folate, Vitamin B12, homocystein status and DNA damage in young Australian adults. *Carcinogenesis* vol. 19 no.7, 1998, S 1163-1171

FENECH M, DREOSTI IE, RINALDI J. Folate, Vitamin B12, homocysteine status and chromosome damage rate in lymphocytes of older men. *Carcinogenesis* vol 18 no.7, 1997, S 1329-1336

GIOVANNUCCI E, HARLAN D M, ARCHER M C, BERGENSTAL R M, GAPSTUR S M. Diabetes and Cancer. *Diabetes Care* 2010; 33: 1674-1685.

- GODSLAND I. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer. *Clinical Science* 2010; 118: 315-332.
- KASPER H. Diabetes mellitus. In: *Ernährungsmedizin und Diätetik*, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München. 2004, 277-299.
- KEJARIWAL D, STEPIEN KM, SMITH T, KENNEDY H, HUGHES DA, SAMPSON MJ. Lack of association of colonic epithelium telomere length and oxidative DNA damage in Type 2 diabetes under good metabolic control. *BMC Endocrine Disorders* 2008, 8:12. S 1-5.
- KEY T J, SCHATZKIN A, WILLETT W C, ALLEN N E, SPENCER E A, TRAVIS R C. Diet , nutrition and the prevention of cancer. *Public Health* 2004; 7: 187-200.
- LAL A and AMES B N. Association of chromosome damage detected as micronuclei with hematological diseases and micronutrient status. *Mutagenesis* 2011; vol. 26 no. 1: 57-62.
- LANDMAN GWD, KLEEFSTRA N, VAN HATEREN KJJ, GROENIER KH, GANS ROB, BILO HJG. Metformin Associated With Lower Cancer Mortality in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2010, 33. S 322-326.
- LÖFFLER G. Regulation des Intermediärstoffwechsels. In: *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Springer Verlag, Heidelberg, 2008; 348-355.
- LOFT S, MØLLER P, COOKE M, ROZALSKI R, OLINSKI R. Antioxidant vitamins and cancer risk: is oxidative damage to DNA a relevant biomarker?. *European Journal of Nutrition* 2008; vol. 47, suppl. 2: 19-28.
- LUDVIK B, FASCHING P, LECHLEITNER M, ELCIC-MIHALJEVIC K, PRAGER R, REICHENBERGER R, WEITGASSER R, Therapie von Diabetes Mellitus, Diabetes und seine Folgen verstehen, (MedMedia Verlags- und Mediaserive GesmbH), Maierhofer Wolfgang, Wien 2007; 44-54.

MARTÍNEZ-PÉREZ L M, CERDA-FLORES R M, GALLEGOS-CABRIALES E C, DÁVILA-RODRÍGUEZ M I, IBARRA-COSTILLA E, CORTÉS-GUTIÉRREZ E I. Frequency of micronuclei in Mexicans with type 2 diabetes mellitus. Prague Medical Report 2007; vol. 108 no.3: 248-255.

McNULTY H., SCOTT JM. Intake and status of folate and related B-Vitamins: considerations and challenges in achieving optimal status. British Journal of Nutrition, 99, Suppl. 3, S48-S54, 2008

MØLLER P, LOFT S. Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damaged DNA (Review Article). Free Radical Biology & Medicine 2006; 41: 388-415.

MØLLER P, LOFT S. Interventions with antioxidants and nutrients in relation to oxidative DNA damage and repair (Review). Mutation Research 2004; 551: 79-89.

NG J M, VRIELING H, SUGASAWA K, OOMS M P, GROOTEGOED J A, VREEBURG J T, VISSER P, BEEMS R B, GORGELS T G, HANAOKA F, HOEIJMAKERS J H, VAN DER HORST G T. Developmental defects and male sterility in mice lacking the ubiquitin-like DNA repair gene mHR23B. Mol. Cell. Biol. 2002; 22 (4): 1233–1245.

AUSTRALIAN GOVERNMENT, DEPARTMENT OF HEALTH AND AGEING, NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient references values for Australia and New Zealand, including recommended dietary intakes. 9. September 2005.

ÖSTERREICHISCHE GESELLSCHAFT FÜR DIABETES. Diabetes Dunkelziffer von 30% verursacht unnötiges Leid und Kosten. Presseaussendung, 2011.

RIEDER A, RATHMANNER T, KIEFER I, DORNER T, KUNZE M. Österreichischer Diabetesbericht 2004. Daten, Fakten, Strategien. i.A.d. Bundesministerium für Gesundheit und Frauen.

- ROGLIC G, UNWIN N. Mortality Attributable to Diabetes: Estimates for the Year 2010. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas 4th edition 2010; 1-28.
- ŞARDAŞ S, YILMAZ M, ÖZTOK U, ÇAKIR N, KARAKAYA A E. Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation. Mutation Research 2001; 490: 123-129.
- SAUBERLICH H E. Laboratory tests for the assessment of nutritional status. 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., 1999.
- SHAW J E, SICREE R A, ZIMMET P Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes Research and clinical practice, 2010; 87: 4-14.
- SMOLKOVA B, DUSINSKA M, RASLOVA K, BARANCOKOVA M, KAZIMIROVA A, HORSKA A, SPUSTOVA V, COLLINS A. Folate levels determine effect of antioxidant supplementation on micronuclei in subjects with cardiovascular risk. Mutagenesis 2004; 19: 469–476.
- STOPPER H, MEYSEN T, BOCKENFORDE A, BAHNER U, HEIDLAND A, VAMVAKAS S. Increased genomic damage in lymphocytes of patients before and after long-term maintenance hemodialysis therapy. Am. J. Kidney Dis. 1999; 34: 433–437.
- STOPPER H, TREUTLEIN A T, BAHNER U, SCHUPP N, SCHMID U, BRINK A, PERNA A, HEIDLAND A. Reduction of the genomic damage level in haemodialysis patients by folic acid and vitamin B12 supplementation. Nephrol. Dial. Transplant. 2008; 23: 3272–3279.
- THOMAS P, WU J, DHILLON V, FENECH M. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. Mutagenesis 2011, 26(1), S 69-76.

- THOMAS P, UMEGAKI K, FENECH M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis* 2003, 18(2), S 187-194
- VIGNERI P, FRASCA F, SCIACCA L, PANDINI G, VIGNERI R. Diabetes and Cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2009; 16: 1103-1123.
- WALY M, ESSA MM, ALI A, AL-SHUAIBI Y, AL-FARSI YM. The global burden of Type 2 diabetes: A Review. *International Journal of Biological & Medical Research* 2010; 1(4): 326-329
- WOJDA A, ZIETKIEWICZ E, WITT M. Effects of age and gender on micronucleus and chromosome nondisjunction frequencies in centenarians and younger subjects. *Mutagenesis* 2007, 22 (3), S 195–200.
- WORLD HEALTH ORGANISATION (2011): Diabetes Fact sheet N°312, URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>.
Zugriff: 13.02.2011
- ZHANG P, ZHANG X, BETZ BROWN J, VISTISEN D, SICREE R A, SHAW J, NICHOLS G A. Economic impacts of Diabetes. *International Diabetes Federation*, 2010, 4, 1-28
- ZUNIGA-GONZALEZ GM, BATISTA-GONZALEZ CM, GOMEZ-MEDA BC, RAMOS-IBARRA ML, ZAMORA-PEREZ AL, MUNOZ-MAGALLANES TM, RAMOS-WADES C, GALLEGOS-ARREOLA MP. Micronuclei in diabetes: Folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model. *Mutation Research* 634 (2007), 126-134

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben:

Name: Stieglmayer Roswitha
Geboren: 6. April 1978, Ried/Innkreis, Oberösterreich

Ausbildung:

10/2004 – 12/2011 Studium Ernährungswissenschaften,
Universität Wien
Wahlschwerpunkt: Ernährung und Umwelt

Juni 1998 Matura, Handelsakademie, Ried im Innkreis

Berufliche Erfahrung:

seit 03/2011 **Wiener Gesundheitsförderung**
Betreuung des Ernährungsmoduls

06/2010 – 09/2010 **Hotel Alpha**, Nachtrezeptionistin
Gästebetreuung
Tagesabschluss

08/2009 **JUFA**, Betreuerin, Gesundheitsferien „I feel good“
08/2008 Betreuung von Jugendlichen
Ernährungsberatung
Programmdurchführung und -gestaltung

06/2009 – 09/2009 **Org. Wiener Stegreifbühne**, Buffetkraft
06/2008 – 09/2008 div. Buffetvorbereitungen

06/2008 – 05/2009 **SGS Austria Controll-Co. Ges.m.b.H.**,
Freie Mitarbeiterin
Administration von Biokontrollen

04/2005 – 11/2007 **Biomarkt Maran GmbH**, Angestellte
Kassentätigkeit
Kundenberatung
Regalbetreuung

07/2005 **Institut für Sozialmedizin**, Praktikantin
Dateneingabe von Ernährungsprotokollen

10/2003 – 09/2004	Helmut Krumböck GmbH & Co KG, kaufm. Angestellte Beratung und Abwicklung von Ferienhausbuchungen Verkauf und Beratung in der Spezialitätenabteilung
07/2002 – 06/2003	Aupair, Italien Kinderbetreuung
08/2001 – 05/2002 05/2000 – 05/2001	Hotel Happy Stubai, Rezeptionistin Reservierungsannahme und –bearbeitung Check-in/Check-out Gästebetreuung
10/1999 – 04/2000 10/1998 – 05/1999	Stubai Bergbahnen KG, Buffetkraft mit Inkasso selbstständiges Arbeiten an Außenstellen Kassiertätigkeit Vorbereitung und Ausgabe der Speisen

Kompetenzen:

Sprachen	Englisch: Maturaniveau Italienisch: Grundkenntnisse
EDV	MS Office (Word, Excel, Outlook),
Führerschein	A1, B

Wien, Dezember 2011