



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Einfluss einer Ernährungsintervention auf das Auftreten von Mikrokernen bei Insulinpflichtigen Typ II Diabetikern

Verfasserin

Marie Therese Bulla

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer:

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

DANKSAGUNG

Ich möchte den „Mikroskopiermädels“, Kathi, Resi, Rosi und Sonja, für die guten Gespräche und die freundschaftliche Zusammenarbeit beim Mikroskopieren danken. Ihr habt die Zeit im Labor zu einer schönen Erinnerung für mich gemacht. Für die Hilfe beim Mikroskopieren danke ich auch ganz herzlich Frau Mag. Marlies Wallner.

Meiner Kollegin Sonja möchte ganz besonders dafür danken, dass sie mich „mit ins Boot“ geholt und mit ihrem Durchblick immer bestens unterstützt hat.

Ich danke meiner Familie, meinen Freunden und Mitbewohnern und Tobias R. dafür, dass sie mich die letzten Jahren und insbesondere die letzten Monate, jeder auf seine Weise, großartig und verständnisvoll unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner danke ich für die Bereitstellung des Themas, das Vertrauen, das gute Feedback und die Korrektur.

Zu guter Letzt möchte ich von ganzem Herzen Frau Mag. Elisabeth Müllner danken. Deine Betreuung war ein Traum!
Vielen vielen Dank und alles Gute!

Vielen Dank Euch allen!

INHALTSVERZEICHNIS

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

II. TABELLENVERZEICHNIS

III: ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1	DIABETES MELLITUS (DM).....	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.....	8
2.2	THERAPIE VON DMT2.....	9
2.2.1	Orale anti-diabetische Medikamente.....	9
2.2.2	Insulin oder Insulinanaloga.....	11
2.3	DMT2 IM ZUSAMMENHANG MIT DEM KREBSRISIKO.....	11
2.3.1	Mögliche Krebsrisikofaktoren bei DMT2.....	12
2.3.2	Möglicher Einfluss von Diabetes-Therapien auf das Krebsrisiko.....	14
2.4	DER CYTOKINESIS-BLOCK MICRONUCLEUS CYTOME ASSAY (CBMN)	16
2.4.1	Mikrokerne und ihr Zusammenhang mit dem Krebsrisiko.....	18
2.4.2	DMT2 und das Auftreten von MNi.....	20
2.5	ERNÄHRUNG UND KREBSENTSTEHUNG.....	21
2.5.1	Ernährung und oxidativer Stress im Zusammenhang mit Krebs DNA-Oxidation, DNA-Reparatur, ROS und Krebsentstehung.....	22
2.5.2	Mikronährstoffmangel oder Überschuss und Krebsentstehung.....	23
2.5.3	Studien zu Ernährung und DNA-Schäden bzw. Mikrokernvorkommen.....	24
2.5.4	Vitamin B12, Folsäure und Hcy.....	28
2.5.5	Vitamin E.....	31
3	MATERIAL UND METHODEN.....	32
3.1	STUDIENDESIGN.....	32
3.1.1	Rekrutierung der Probanden.....	33
3.1.2	Interventionsphase.....	36
3.1.3	Ernährungsintervention.....	38
3.2	DER CBMN-ASSAY	40
3.2.1	Verwendete Materialien.....	40
3.2.2	Probenaufbereitung.....	41
3.2.3	Zählkriterien.....	44
3.3	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	46
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	47

4.1	LINEARE MESSWIEDERHOLUNG FÜR GRUNDGESAMTHEIT UND INSULINPFLICHTIGE DIABETIKER (IDDM)	47
4.1.1	Apoptosen	49
4.1.2	Necrosen	51
4.1.3	Diskussion zu Apoptosen und Necrosen	52
4.1.4	Mikrokerne (MNi)	55
4.1.5	Diskussion MNi	59
4.1.6	Bridges (NPBs)	61
4.1.7	Buds (NBUDs)	63
4.1.8	Diskussion NPBs und NBUDs	66
4.2	KORRELATIONEN	67
4.2.1	Apoptosen	68
4.2.2	Necrosen	69
4.2.3	Mikrokerne (MNi)	70
4.2.4	Bridges (NPBs)	71
4.2.5	Buds (NBUDs)	71
4.2.6	Diskussion Korrelationen	72
5	SCHLUSSBETRACHTUNG	78
6	ZUSAMMENFASSUNG	81
7	SUMMARY	83
8	LITERATURVERZEICHNIS	85

I. 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 [FENECH, 2006]	17
Abbildung 3: Prozentuale Variation der Rate des genomischen Schadens nach der Statusbestimmung von Vitamin E, Calcium, Folat, Retinol, Nicotinsäure, Beta-Carotin, Riboflavin, Pantothersäure und Biotin im mittleren und höchsten Tertil im Vergleich zum niedrigsten Tertil. Genomischer Schaden wurde in PBL mit CBMN assay gemessen [FENECH, 2008]	23
Abbildung 4: Das Konzept der Gen-Ernährungs- und Gen-Toxin-Interaktion und deren Einfluss auf unterschiedliche gesundheitliche Schäden [FENECH, 2002]	24
Abbildung 5: Folsäuremetabolismus. SAM (S-Adenosylmethionin), MTRR (Methionin Synthase-Reduktase), MTR (Methioninsynthase), SHMT (Serin Hydroxymethyltransferase), THF (Tetrahydrofolat), DHF (Dihydrofolat), FTL (Format-Tetrahydrofolat-Ligase), dUMP (Deoxyuridin Monophosphat), dTMP (Deoxythymidin Monophosphat), Cob(I) (reduzierte Form von Vitamin B12), Cob(III) (oxidierte Form von Vitamin B12) [THOMAS et al., 2011]	29
Abbildung 6: Studiendesign, Einteilung der Teilnehmer.	34
Abbildung 7: Zeitschema der Untersuchungen	37
Abbildung 8: Grundgesamtheit, Informationsgruppe. Apoptosenhäufigkeit bei Männern und Frauen zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). T0, T2, T3: Männer>Frauen ($p < 0,05$).	50
Abbildung 9: Grundgesamtheit, Interventionsgruppe. Necrosenhäufigkeit bei Männern und Frauen zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). T0, T2, T3: Männer > Frauen ($p < 0,05$).	52
Abbildung 10: Die unterschiedlichen Schicksale, die einer kultivierten und in der Zellteilung blockierten Zelle widerfahren, nachdem sie zytotoxischen/ genotoxischen Agentien ausgesetzt wurde. [Modifiziert nach FENECH, 2000].	53
Abbildung 11: Grundgesamtheit, Informationsgruppe. Mikrokernhäufigkeit bei Männern und Frauen zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). T0, T2, T3: Frauen > Männer ($p < 0,05$). Beide Geschlechter: Änderung MNi T0 – T3 ($p < 0,05$), T2 – T3 ($p < 0,01$).	57
Abbildung 12: Grundgesamtheit, Interventionsgruppe. Mikrokernhäufigkeit bei Männern und Frauen zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). T0, T2, T3: Frauen > Männer ($p < 0,001$).	58
Abbildung 13: IDDM, Informationsgruppe. Mikrokernhäufigkeit bei Männern und Frauen zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). Beide Geschlechter: Änderung MNi T0 – T2 ($p < 0,05$).	58
Abbildung 14: Grundgesamtheit, Interventionsgruppe. Häufigkeit der Buds in den Gruppen der unterschiedlichen Gesundheitszustände (IDDM, NIDDM, Gesund und IFG) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen).	65

Abbildung 15: Grundgesamtheit, Interventionsgruppe. Häufigkeit der Buds bei Männern und Frauen zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen).	65
Abbildung 16: Interventions- und Informationsgruppe. Korrelation zwischen Δ Necrose und Δ Apoptose	69

II. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Grenzwerte für IFG, IGT und HbA1c im Blut [ADA, 2010].	5
Tabelle 2: Spätschäden und Komplikationen von DM [RIEDER et al., 2004].	7
Tabelle 3: Wichtigste orale Antidiabetika bei DMT2 [VIGNERI et al., 2009].	9
Tabelle 4: Mögliche direkte oder indirekte Krebsrisikofaktoren bei DMT2 [VIGNERI et al., 2009].	12
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].	27
Tabelle 6: Fettsäurezusammensetzung (%) und Tocopherolgehalt (mg/100g) des Interventionsöls.	38
Tabelle 7: Tiefkühlprodukte für die Interventionsgruppe.	39
Tabelle 8: Verwendete Materialien für den CBMN-Assay.	40
Tabelle 9: Zählkriterien des CBMN-Assays.	44
Tabelle 10: Ausgangswerte (T0) des Kollektivs der Informations- und der Interventionsgruppe. Angegeben in Mittelwert ± Standardabweichung (MW ± Std.).	48
Tabelle 11: Grundgesamtheit. Gemessene Parameter (Apoposen, Necrosen, MNi, NPBs, NBUDs) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). Angegeben in Mittelwert ± Standardabweichung (MW ± Std.).	48
Tabelle 12: Alle Gesundheitsgruppen. Apoptosen zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). Angegeben in Mittelwert ± Standardabweichung (MW ± Std.).	49
Tabelle 13: Alle Gesundheitsgruppen. Necrosen zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). Angegeben in Mittelwert ± Standardabweichung (MW ± Std.).	51
Tabelle 14: Zu erwartende Ergebnisse bei dem CBMN Assay bei Durchführung nach Angaben des Protokolls und unter normalen Bedingungen. [Modifiziert nach FENECH, 2007].	54
Tabelle 15: Alle Gesundheitsgruppen. Mikrokerne zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). Angegeben in Mittelwert ± Standardabweichung (MW ± Std.). * = signifikant bei $p < 0,05$, a = Änderung zwischen T0 und T2.	55
Tabelle 16: Alle Gesundheitsgruppen. Bridges zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). Angegeben in Mittelwert ± Standardabweichung (MW ± Std.). * = signifikant bei $p < 0,05$, b = Änderung zwischen T0 und T3.	61
Tabelle 17: Alle Gesundheitsgruppen. Buds zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). Angegeben in Mittelwert ±	

Standardabweichung (MW $\pm$ Std.). * = signifikant bei $p < 0,05$, a = Änderung zwischen T0 und T2.	63
Tabelle 18: Informationsgruppe, Korrelationen zwischen Δ Apoptosen und möglichen Einflussfaktoren. *Signifikant bei $p < 0,05$	68
Tabelle 19: Interventionsgruppe, Korrelationen zwischen Δ Apoptosen und möglichen Einflussfaktoren. *Signifikant bei $p < 0,05$	68
Tabelle 20: Informationsgruppe, Korrelationen zwischen Δ Mikrokernen und möglichen Einflussfaktoren. *Signifikant bei $p < 0,05$	70
Tabelle 21: Interventionsgruppe, Korrelationen zwischen Δ Mikrokernen und möglichen Einflussfaktoren. *Signifikant bei $p < 0,05$	70
Tabelle 22: Informationsgruppe, Korrelationen zwischen NPBs und möglichen Einflussfaktoren. *Signifikant bei $p < 0,05$	71
Tabelle 23: Informationsgruppe, Korrelationen zwischen NBUDs und möglichen Einflussfaktoren. *Signifikant bei $p < 0,05$	71

III. 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
ÖDV	Österreichischen Diabetikervereinigung
OGTT	Orale Glukosetoleranztest
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PPAR_γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierer Rezeptor
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

Da sitzende Tätigkeiten die körperliche Bewegung sowohl in der Arbeitswelt als auch in der Freizeit zunehmend verdrängen und eine hochkalorische und zum Teil unausgewogene Ernährung sich immer mehr durchsetzt, ist eine beunruhigend hohe Inzidenzrate an Diabetes Mellitus (DM), und davon größtenteils Typ 2 Diabetes (DMT2), ein Phänomen, das sich nicht nur in den westlichen Gesellschaften, sondern zunehmend auch in Schwellen- und Entwicklungsländern ausbreitet.

Viele Auslöser für DMT2, wie ein erhöhter BMI, oftmals fortgeschrittenes Alter und ungesunde Ernährung sowie mangelnde Bewegung können unter anderem die Entstehung unterschiedlicher Krebserkrankungen begünstigen.

Hinzu kommt, dass der gestörte Glukosestoffwechsel bei DM eine erhöhte Anfälligkeit für oxidative DNA-Schäden mit sich bringt, was zu einem erhöhten Risiko für Herz-Kreislauferkrankungen und Krebs bei Diabetikern beiträgt.

Mit dem Cytochrome Block Micronucleus Assay (CBMN Assay) ist es möglich, chromosomale Schäden anhand unterschiedlicher Parameter, darunter auch Mikrokerne (MNI), zu bestimmen und zu bewerten.

Verschiedene Studien konnten einen positiven Zusammenhang zwischen dem Krebsrisiko und einem erhöhten Mikrokernvorkommen (MN) in menschlichen peripheren Blutlymphozyten (PBL) feststellen.

Die erhöhte Empfindlichkeit für oxidative, chromosomale Schäden bei Diabetikern lässt folglich ein erhöhtes MN-Auftreten erwarten.

Unterschiedliche Studien zeigen eine Schutzwirkung vor oxidativen Schäden der DNA und diabetischen Folgeschäden durch unterschiedliche diätetische Antioxidantien und Mikronährstoffe. Eine Supplementierung mit Vitamin E, Folsäure oder Vitamin B12 zeigte die interessantesten Ergebnisse auf diesem Gebiet. Zusätzlich korrelieren Folsäure und Vitamin B12 negativ mit Homocystein (Hcy), welches bei erhöhter Konzentration das Risiko für Herz-Kreislauferkrankungen begünstigt.

Zu einem Zusammenhang zwischen gemüsericher Ernährung und diabetischen Folgeschäden sind bis dato wenig Informationen vorhanden.

Diese Arbeit ist im Zuge der DIAPLANT-Studie entstanden. Die DIAPLANT-Studie ist ein EU-gefördertes, grenzüberschreitendes Projekt der medizinischen Universität Bratislava, Slowakei und dem Institut für Ernährungswissenschaften der Universität Wien, Österreich. Die Studie geht der Fragestellung nach, ob eine moderate Aufnahme von Pflanzenöl, kombiniert mit gemüsereicher Ernährung, die Entstehung von diabetischen Folgeschäden positiv beeinflussen kann. Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien wurde hier nicht mit Mikronährstoffen supplementiert, sondern mit vollwertigen Lebensmitteln interveniert.

Zu dem Zeitpunkt der Studie gab es erst eine vergleichbare Studie, die die Mikrokernanzahl einer Studienpopulation von Typ 2 Diabetikern und einer gesunden Kontrollpopulation beobachtete [MARTÍNEZ-PÉREZ et al., 2007]. Diese Studie wurde jedoch mit einer sehr geringen Fallzahl durchgeführt, was ihre Validität stark beeinträchtigt. Außerdem handelte es sich bei dieser Studie nicht um eine Ernährungsintervention. Eine weitere Besonderheit der vorliegenden Studie ist die Unterteilung der Studienpopulation in folgende Gruppen: 1. Gesunde, 2. Erhöhte Nüchternglukose (IFG), 3. Typ 2 Diabetiker mit Insulinbehandlung („insulin dependent diabetes mellitus“, IDDM), 4. Typ 2 Diabetiker mit medikamentöser Behandlung („non insulin dependent diabetes mellitus“, NIDDM).

Schwerpunkt dieser Arbeit war es, den Effekt der Ernährungsintervention auf Parameter des CBMN Assay zu evaluieren. Insbesondere wird ein Vergleich der Gesundheitsgruppe der IDDM mit den anderen Gesundheitsgruppen angestrebt. Die bewerteten Parameter waren Apoptosen und Necrosen, als Biomarker für die Lebensfähigkeit der Zelle, MNi, „nucleoplasmic Bridges“ (NPBs) und nucleoplasmic Buds (NBUDs), als Biomarker für chromosomale Schäden oder Instabilität.

Die Auswertung der Proben sowie einige Recherchearbeit und die Erstellung des Literatur- und Material und Methodenteils dieser Arbeit sind in Zusammenarbeit mit Sonja Adrigan und Roswitha Stiglmayer entstanden, weshalb einige Teile meiner Arbeit sich auch in den Arbeiten der Kolleginnen wiederfinden lassen.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 DIABETES MELLITUS (DM)

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 der Muskulatur, Leber und 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 sehr 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, Klinefelter Syndrom und 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. 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

Laut World Health Organisation (WHO) leiden mehr als 220 Millionen Menschen weltweit an der Stoffwechselkrankheit DM. 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 lauten 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**).

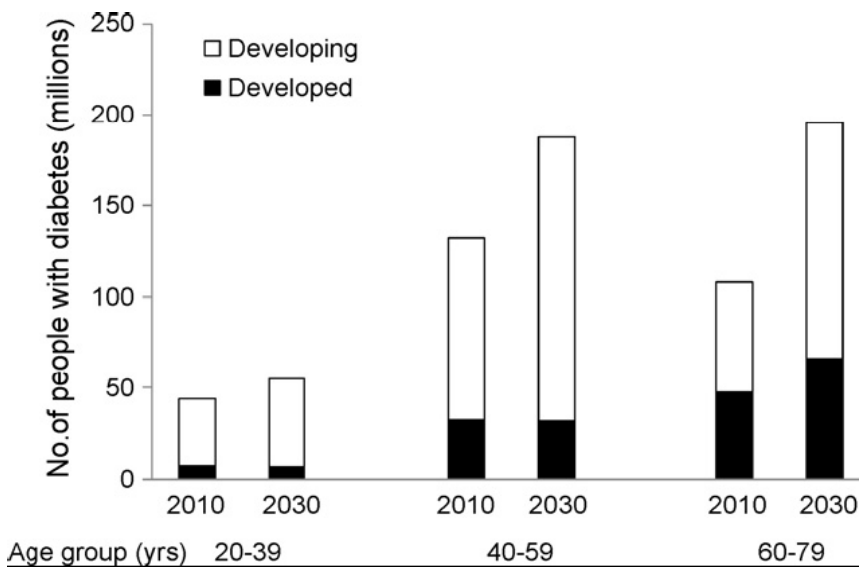


Abbildung 1: Anstieg der DM-Rate in Industrieländern bis 2030 [Shaw et al., 2010]

Andere Schätzungen gehen davon aus, dass 2010 weltweit 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 [IDF, 2009].

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 [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 folgenden Diabetische Fußsyndrom, Charcot-Fuß, gastrointestinale Beschwerden, Erkrankungen der Harn- und Geschlechtsorgane, sexuelle Dysfunktion und Herz-Kreislaufkrankheiten. 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
Nephropathie (Glomerulosklerose)	Erhöhung des intraglomerulären Filtrationsdrucks, Verdickung	

	der Basalmembran, Mikroalbuminurie, Nephropathie mit Proteinurie, Hypertonie, Niereninsuffizienz	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
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 Kosten 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 ist mit 55% der größte Anteil. 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 Diabetes mellitus 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%). Es sterben mehr Frauen als Männer durch Begleiterkrankungen von DM und durch DM selbst. Die Ursache ist das höhere Mortalitätsrisiko bei Frauen mit DM [ROGLIC und UNWIN, 2010].

2.2 THERAPIE VON DMT2

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 im Zusammenhang mit Gewichtszunahme und 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 IDDM-T2 Diabetikern 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 ist nach 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

Es gibt zahlreiche Studien, die sich in den letzten Jahren intensiv mit der Assoziation von DMT2 und Krebsrisiko beschäftigten. 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 mit Lebensalter, Übergewicht und Adipositas [BAUR et al., 2010], genetischer Prädisposition, aber auch Lebensstil- und Umweltfaktoren stehen [VIGNERI et al., 2009].

Die Ergebnisse mehrere 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, müsste kritisch betrachtet werden, da diese Hypothese nicht das gehäufte Auftreten bei IDDM-T1 Patienten, deren Pankreaszellen keiner erhöhten Konzentration von Insulin ausgesetzt sind, berücksichtigt [VIGNERI et al., 2009].

Langsamere Transitzeit des Darmes 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 bei Prostatakrebs wird 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

Bis jetzt ist noch völlig ungewiss, ob Diabetiker über direkte oder eher über indirekt veränderbare und nicht veränderbare Risikofaktoren, die gemeinsam mit Krebs und DM auftreten, ein erhöhtes Krebsrisiko aufweisen [GIOVANNUCCI et al., 2010].

Hyperinsulinämie tritt im Zusammenhang mit Insulinresistenz bei DM2 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 in der Lage, an den Insulin-like-growth Faktor 1 Rezeptor (IGF1R) zu binden, welcher dem Insulin Rezeptor (IR) zu 80% homolog ist und kann diesen somit aktivieren. Im Vergleich zum IR weist der IGF1R einen erhöhten mitogenen Effekt sowie eine erhöhte Transformationsaktivität auf und verursacht über mehrere Phosphorylierungskaskaden die Aktivierung oder Deaktivierung verschiedener Proteine und beeinflussen 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 abdominalen

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 Typ 2 Diabetikern durch die Folgen des Diabetes oder durch Adipositas erhöht ist.

Vermeehrt auftretende **chronische Entzündungen und oxidativer Stress**, die hauptsächlich bei schlechter metabolischer Kontrolle auftreten, 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-Synthase-Expression** und **Fettsäure Produktion** bei DMT2 stehen ebenfalls unter Verdacht, die Tumorentstehung zu fördern [VIGNERI et al., 2009].

Krebs und DMT2 sind beides 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 waren. 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

Der Zusammenhang zwischen therapeutischen Medikamenten für DMT2 und dem Krebsrisiko ist bis heute noch relativ ungeklärt. Die Interpretationen werden 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, sowie 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 noch relativ widersprüchlich. In vitro Studien sagen dem Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor (PPAR γ) Agonisten auf Grund von Inhibition des Zellwachstums und Initiierung von Apoptose und Zell-Differenzierung anti-krebs fördernde Eigenschaften nach. Forschungen an Nagetieren wiederum gehen von einer tumorfördernden Wirkung von PPAR γ Agonisten aus. Epidemiologischen Studien und Metaanalysen über ein erhöhtes Krebsrisiko sind aufgrund der kurzen Behandlungszeiten kritisch zu betrachten. Laut einem Artikel von Giovannucci et al. konnten auch 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 wenigen Studien, die eine erhöhte Krebsrate im Vergleich zu Patienten mit Metformin Behandlung aufzeigten, sind ebenfalls sehr widersprüchlich. Grund dafür sind die fehlenden Informationen von Dauer und Dosis der Sulfonylharnstoff Aufnahme [GIOVANNUCCI et al., 2010; VIGNERI et al., 2009].

Bei präklinischen Tierversuchen mit **Gliptinen (DDP-4-Hemmer)** konnte man zwar eine leichte Steigerung des Krebsrisikos beobachten, jedoch konnte diese Annahme anhand von Humanstudien nicht bestätigt werden. Die Aussagekraft der Ergebnisse ist schwierig zu interpretieren, da diese Substanzen noch nicht lange in der Diabetes-

Therapie eingesetzt und zudem von zu wenigen Patienten eingenommen werden [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 zirkulieren bei IDDM signifikant höhere Konzentrationen von Insulin im Körper. Diese Ergebnisse werden jedoch heftig diskutiert, 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 die Krebsentstehung beeinflussen können [GIOVANNUCCI et al., 2010].

Eine weltweite Querschnittsstudie mit über 7.000 Probanden zeigte, dass IDDM-T2 die gleiche Prävalenz von bösartigen Tumoren, aber eine erhöhte Krebsmortalität im Vergleich zu Nicht-Diabetikern aufwiesen. Dies führt zu der Annahme, dass Hyperinsulinämie nicht das Krebsrisiko erhöht, sondern möglicherweise das Krebswachstum stimuliert und dadurch beschleunigt [BAUR et al., 2010].

2.4 DER CYTOKINESIS-BLOCK MICRONUCLEUS CYTOME ASSAY (CBMN)

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 gute Reproduzierbarkeit wird er erfolgreich für Tests zur Bestimmung der Genotoxizität, sowie der Strahlungsempfindlichkeit von Geweben eingesetzt [FENECH, 2007].

Der CBMN-Assay ist ebenso eine geeignete Methode um DNA-Schäden im Zusammenhang mit dem Mikronährstoffstatus zu messen. Studien, die diese Technik verwendeten, 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].

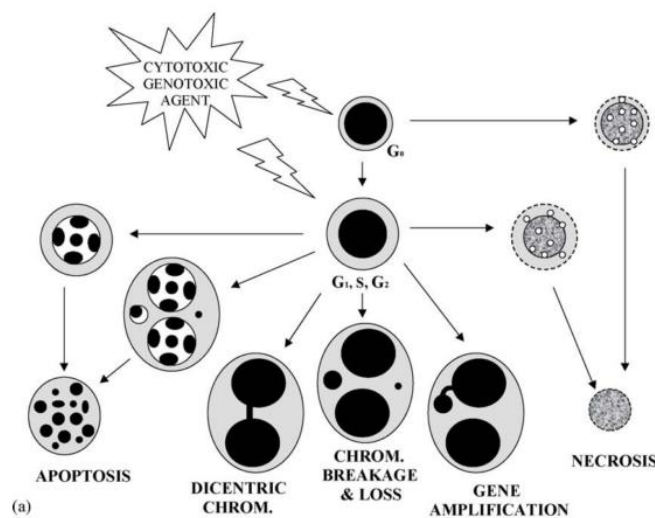


Abbildung 2: Entstehung von MNi, NBUDs, NPBs, Apoptosen und Nekrosen [FENECH, 2006]

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 zurück bleiben. 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 Indikator 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 Auflösung der Zellmembran bilden sich apoptotische Vesikel, in denen die DNA als Fragmente vorliegt. 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 im 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 zu der verstärkten Annahme, dass chromosomale Schäden eine kausale Rolle bei der Karzinogenese spielen [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

Rolle bei der Krebsentstehung geforscht. Die im folgenden Text genannten Beobachtungen unterstützen die Annahme einer Assoziation zwischen der Mikrokern (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
- Zusammenhänge mit 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 heran ziehen 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. Dieser Zusammenhang 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. konnte signifikante Zusammenhänge zwischen MNi und gastrointestinalen und urogenitalen Krebserkrankungen und ebenso ein erhöhtes Erkrankungsrisiko von Magen-, Intestinal- und Brustkrebs beobachten [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 belegten 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 zeigten ein höheres MN-Vorkommen, wodurch eine positive Korrelation von Serumglukose-Konzentrationen und gehäuften Chromosomen-Schäden festgestellt wurde [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 ihre Medikamente, 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 wissenschaftliche Daten vor, die den Einfluss der Therapieformen von DMT2 im Zusammenhang mit den Parametern des CBMN-Assay untersuchten.

2.5 ERNÄHRUNG UND KREBSENTSTEHUNG

Die Verbindung Diät und Krebsinzidenz wird weitestgehend anerkannt. In einigen epidemiologischen Studien wurde bereits die protektiven Effekte einer obst- und gemüsereichen Diät auf einige Krebsarten beschrieben [LOFT et al., 2008].

Der Einfluss der Ernährung auf die Krebsentstehung wurde früher bei ca. 30% aller Krebserkrankungen in westlichen Länder und bei 20% in Entwicklungsländern angesetzt.

In den letzten Jahren fand jedoch ein Wandel statt, indem der hohe Stellenwert der Ernährung in der Krebsentstehung von multiplen anderen Faktoren verdrängt wurde. 2004 fanden sich nur mehr wenige Daten, die diese Erkenntnisse signifikant unterstützen konnten. Der Aufnahme von Obst und Gemüse werden dennoch protektive Effekte zugesprochen. Zur Krebsprävention wird unter anderem eine Aufnahme von Minimum 400 g Obst und Gemüse pro Tag empfohlen.

Im weitesten Sinne spielen Lebensstilfaktoren wie Ernährung und Bewegung eine wichtige Rolle in der Krebsentstehung, da es überzeugende Ergebnisse gibt, die belegen, dass Übergewicht und Adipositas die Entstehung von Oesophagus-, Kolorektal-, Gebärmutterhals-, Nierenkrebs und Brustkrebs bei postmenopausalen Frauen fördert und dass sportliche Betätigung das Risiko der Entstehung von Kolon- und Brustkrebs vermindern kann [KEY et al., 2004].

Die Wirkmechanismen der Mikronährstoffe sind jedoch komplex und weit davon entfernt, vollständig verstanden zu werden [LOFT et al., 2008].

Die wirkliche 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, da bewiesen ist, dass oxidative Schäden an Zellkomponenten eine zentrale Rolle in vielen degenerativen Prozessen spielen und man davon ausgeht, dass natürliche

Antioxidantien dabei 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 einer hohen Aufnahme an Obst und Gemüse, die viele Antioxidantien enthalten, bezeugen. Dies gilt vor allem 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, wurden als wesentlich für die Entwicklung von Krankheiten wie Krebs identifiziert [THOMAS et al., 2011].

DNA-Reparaturmechanismen sind entscheidend dafür, inwiefern 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 sollten [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, die 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 externe Faktoren ausgesetzt, weshalb es nahe liegt, dass DNA-Reparatursysteme und Antioxidantien der Ernährung 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, indem Cofaktoren bereit gestellt werden, die für die einwandfreie Funktion von Enzymen erforderlich sind, die in die DNA-Reparatur, Entgiftung oder Erhaltung von Methylierungsprozessen des Genoms involviert sind [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 zeigten, dass die MN-Häufigkeit in PBL entweder signifikant mit der Aufnahmemenge oder der Plasmakonzentration von Folat, Vitamin B12, Riboflavin, Biotin, Pantothenat, beta-Carotin, Vitamin E, Retinol und Calcium assoziiert wird (**Abbildung 3**) [FENECH et al., 2011].

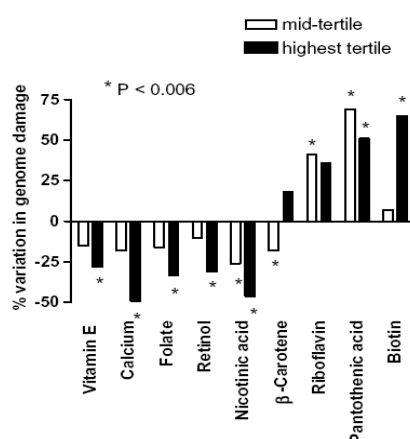


Abbildung 3: Prozentuale Variation der Rate des genomischen Schadens nach der Statusbestimmung von Vitamin E, Calcium, Folat, Retinol, Nicotinsäure, Beta-Carotin, Riboflavin, Pantothensäure und Biotin im mittleren und höchsten Tertil im Vergleich zum niedrigsten Tertil. Genomischer Schaden wurde in PBL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

Andere Studien konnten DNA-Schäden in Menschen dokumentieren, die moderat unterversorgt an Eisen, Zink, Folat und B12 oder Cholin waren [LAL et al., 2011].

Ein wichtiger Punkt ist, dass Schäden am Genom, die durch moderaten Mikronährstoffmangel verursacht werden, dem gleichen Ausmaß einer Exposition mit signifikanten Dosen an Genotoxinen aus der Umwelt, wie z.B. chemische Karzinogene, ultraviolette Strahlung und ionisierende Strahlung, entsprechen (**Abbildung 4**) [FENECH, 2008].

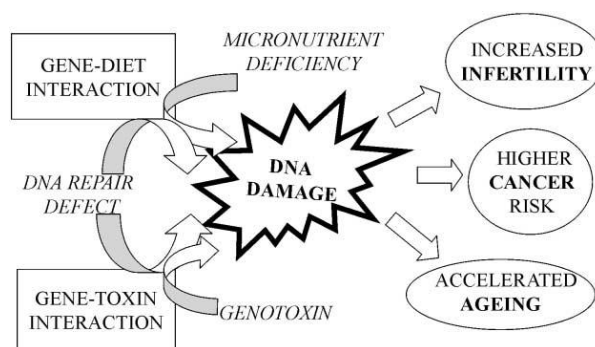


Abbildung 4: Das Konzept der Gen-Ernährungs- und Gen-Toxin-Interaktion und deren Einfluss auf unterschiedliche gesundheitliche Schäden [FENECH, 2002]

Es gibt ein starkes internationales Bewusstsein dafür, dass es wichtig ist, die empfohlene Tagesdosis an Mikronährstoffen zur Prävention degenerativer Krankheiten (wie z.B. Krebs, kardiovaskuläre Krankheiten und Alzheimer) neu zu definieren um den Zeitraum der Morbidität im Alter zu verkürzen [FENECH, 2002].

Die optimale Mikronährstoffaufnahme, um die Gesundheit langfristig zu erhalten, ist jedoch äußerst schwierig zu bestimmen und könnte über den aktuellen Empfehlungen liegen [LAL et al., 2011].

2.5.3 Studien zu Ernährung und DNA-Schäden bzw.

Mikrokernvorkommen

Von diätetischen Antioxidantien wird angenommen, dass sie Angriffe von freien Radikalen auf die DNA herabsetzen und folglich vor Krebs verursachenden Mutationen,

schützen. Jedoch beruht diese kausale Beziehung beruht vorerst nur auf Vermutungen [ŞARDAŞ et al., 2001].

Einem Artikel von Thomas et al. zufolge, welcher 2011 den Effekt diätetischer Interventionen auf das Auftreten von Mikrokernen in menschlichen Lymphozyten und Wangenschleimhautzellen verglich, wurde gezeigt, dass die Mehrheit der Ergebnisse darauf schließen lassen, dass eine Supplementation mit antioxidativen Vitaminen und bestimmten B-Vitaminen zu einer wesentlichen Reduktion der MN-Häufigkeit führen kann [THOMAS et al., 2011].

Møller et al. geben in einem Review von 2006 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 menschlichem Urin untersuchen [MØLLER et al., 2006].

Trotzdem zeigt eine Metaanalyse und ein Review randomisierter Studien antioxidativer Supplemente zur primären und sekundären Prävention von Bjelakovic et al. 2007, dass eine große Anzahl weit angelegter Interventionsstudien daran gescheitert ist zu beweisen, dass die Aufnahme an antioxidativen Vitaminen das Krebsrisiko vermindere während die Metaanalysen sogar ein erhöhtes Mortalitätsrisiko zeigen [BJELAKOVIC et al., 2007].

Ein Überblick über Interventionsstudien mit Antioxidantien aus Supplementen oder Nahrungsmitteln besagt, dass ungefähr ein Drittel der Studien von einem schützenden Effekt gegen oxidative DNA-Schäden in weißen Blutzellen berichteten [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 wobei die Reduktion bei Folsäure, Vitamin C, Vitamin E und Selen nicht signifikant war (**Tabelle 5**) [THOMAS et al, 2011].

Ein Review von Møller et al. 2004 über Interventionen mit Antioxidantien bezüglich oxidativer DNA-Schäden zeigt außerdem, dass einige Studien mit Probanden, die vermutlich erhöhte Werte an oxidativem Stress aufweisen, eher Effekte bezüglich erniedrigter Strangbruchlevel durch Interventionen ergeben. Des weiteren zeigen Ergebnisse mit Diabetikern, dass diejenigen Probanden mit ähnlichen Ausgangswerten an Strangbrüchen wie die gesunden Probanden, keinen Nutzen durch antioxidative Supplemente zeigten, wobei Diabetiker mit höheren Ausgangswerten an Strangbrüchen verminderte Strangbrüche nach einer Supplementation aufwiesen. 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 ferner zu berücksichtigen, dass ein Großteil der Studien gesunde Individuen mit einbezog, wohingegen Antioxidantien eher bei Probanden protektiv wirken könnten, die unter oxidativem Stress leiden. Eine Population oxidativ gestresster Probanden profitiert daher mehr von antioxidativen Supplementen, als eine Population mit geringen oxidativem Stress [LOFT et al., 2008].

In der folgenden Tabelle sind unterschiedliche Studien zur Effektivität verschiedener Supplemente bezüglich 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, welche die MN-Häufigkeit am deutlichsten beeinflussen, sind die Plasmawerte an 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, 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.

Die MN-Häufigkeit korrelierte positiv mit Plasma-Hcy und korrelierte negativ mit dem Serum-B12. Diese Korrelation wird auch durch eine Querschnittsstudie mit jungen Erwachsenen im Alter von 18-32 Jahren bestätigt. Als wichtigstes Resultat erwies sich die Tatsache, dass die MN-Häufigkeit signifikant reduziert war, wenn das Plasma-Hcy $<7,5 \mu\text{mol/l}$ und das Serum-B12 über 300 pmol/l lag [THOMAS et al., 2011].

Diese Konzentrationen sind nur erreichbar, wenn die Aufnahmemenge die derzeitigen „recommended dietary allowances“ (RDAs) oder Empfehlungen zur täglichen Aufnahme) übersteigt. Das wären mehr als $400 \mu\text{g}$ Folsäure pro Tag und mehr als $2 \mu\text{g}$ Vitamin B12 pro Tag [FENECH, 2002].

Eine Studie mit älteren Männern zwischen 50 und 70 Jahren zeigte eine signifikant erhöhte MN-Häufigkeit bei Individuen mit suboptimalen Serumspiegeln an Folat ($<6.8 \text{ nmol/l}$), B12 ($<150 \text{ pmol/l}$) und Hcy ($>10 \mu\text{mol/l}$) im Vergleich zu Individuen mit höheren Serumwerten. Probanden mit einem Homocysteinspiegel über $10 \mu\text{mol/l}$ und einem normalen B12 und Folsäurestatus hatten höhere MN-Werte als jene, mit einem Homocysteinspiegel unter $10 \mu\text{mol/l}$ und einem normalen B12 und Folsäurespiegel. Diese Beobachtung führt zu der Erkenntnis, dass ein erhöhter Homocysteinspiegel, unabhängig von B12- oder Folsäurekonzentrationen, ein wichtigen Faktor für chromosomale Schäden darstellt [FENECH et al. 1997 (A)].

Probanden mit Folsäurewerten im Normalbereich hatten eine um 39% erniedrigte MN-Anzahl als Probanden mit niedrigen Folsäurewerten. Bei Probanden mit niedrigen Folsäurewerten gab es eine signifikante Korrelation zwischen Folsäure und Hcy. Dies führt zu der Annahme, dass ein Folsäuremangel Risikofaktoren wie 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 zeigte eine Supplementierung keinen Effekt auf die MN-Häufigkeit bei normalem Folatstatus [LAL et al., 2011].

Folsäure- und B12-Supplemente reduzierten die MN-Häufigkeit in Individuen, die an Nierenversagen im Endstadium litten [STOPPER et al., 2008]. Bei Nierenpatienten ist sowohl die Krebsinzidenz als auch die MN-Häufigkeit erhöht [STOPPER et al., 1999].

Eine Studie mit Nierenpatienten 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% und 47% [STOPPER et al., 2008].

Eine kontrollierte Interventionsstudie ermittelte die MN-Häufigkeit in den Wangenschleimhautzellen von diagnostizierten DM-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. DM-Patienten, die Folsäure einnahmen, zeigten 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 hierbei 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 zeigte, dass 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 war [BENNER et al., 1994].

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 STUDIENDESIGN

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 aber 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 Nüchternglukosewerte (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 „Diabetes Tag“

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“. Hier wurden Diabetiker auf die Studie aufmerksam gemacht und zu einer Informationsveranstaltung 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 gesamt 130 Personen besucht, zusätzlich wurden 21 Personen telefonisch informiert.

Die Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie wurde von 120 Personen unterschrieben, davon sind 111 Personen in die Studie gestartet und 99 Personen haben die Studie beendet. Dies 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.

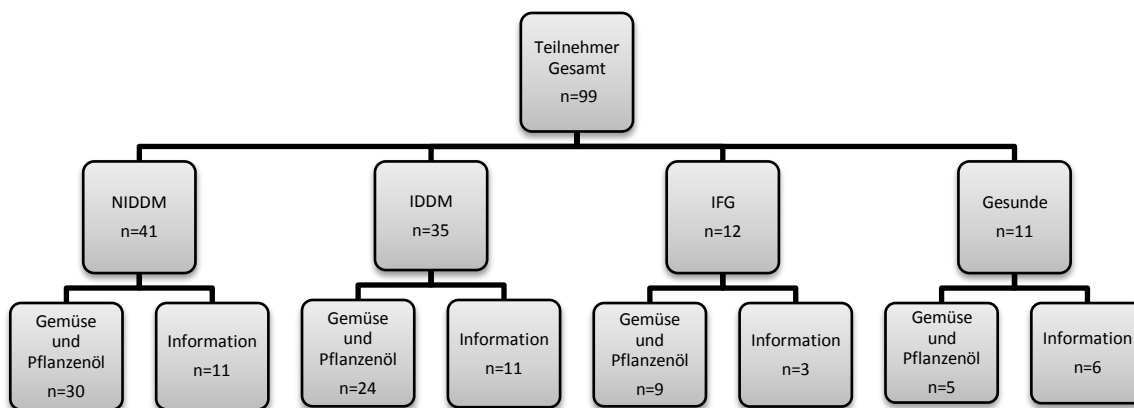


Abbildung 6: Studiendesign, Einteilung der Teilnehmer.

Nach folgenden Kriterien erfolgte die Rekrutierung der Teilnehmer.

Einschlusskriterien:

- Männer und Frauen mit Typ II Diabetes
 - 40 – 85 Jahre
 - Behandlung mit oralen Antidiabetika oder Insulin
- seit mind. 4 Wochen vor Studienbeginn:

- Gleichbleibende Medikation betreffend Glucose-, Fett- und Harnsäure-Stoffwechsel
- Gleichbleibende Essgewohnheiten und körperliche Betätigung
- Konstantes Körpergewicht
- $\text{HbA1c} \leq 9,5 \%$ (Schwankungen $< 10 \%$)
- Gesamtcholesterin $< 300 \text{ mg/dl}$ (mit oder ohne Medikation)
- Serum-Triglyceride $< 500 \text{ mg/dl}$ (mit oder ohne Medikation)
- Kreatinin $< 2,5 \text{ mg/dl}$
- Medikation der Nicht-Insulin Gruppe: Metformin, DPP-4-Hemmer, Sulfonylharnstoffe, GLP-1 Mimetika
- 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

- der Ernährungsgewohnheiten
- der körperlichen Aktivität
- 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 werden keine Interventionslebensmittel mehr ausgegeben.

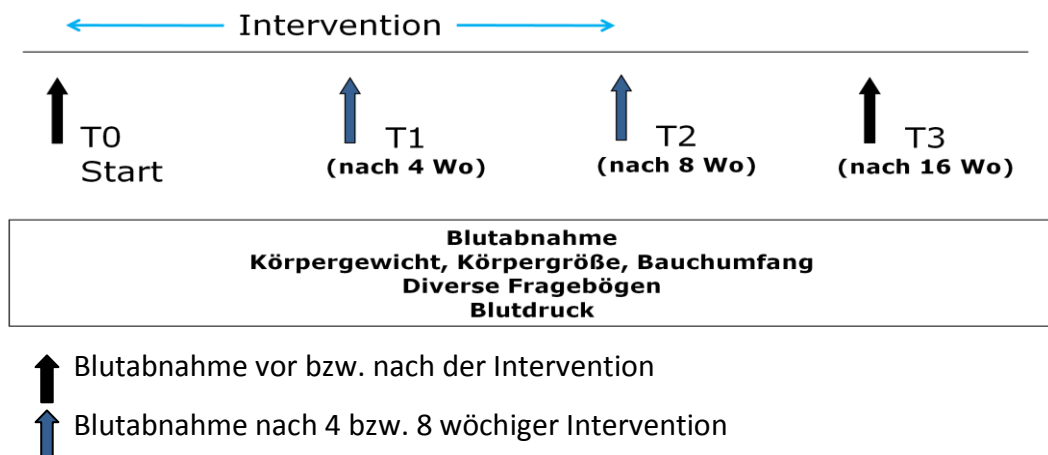


Abbildung 7: Zeitschema der Untersuchungen

Der zeitliche Verlauf der Studie wurde durch vier Blutabnahmetermine bestimmt. Die Probanden mussten nüchtern erscheinen und bei jedem Teilnehmer wurde Blutdruck gemessen, Urin gesammelt, ein Mundschleimhautabstrich und anthropometrische Messungen 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 Body Mass Index (BMI) der Probanden zu bestimmen.

Gesamt dienten die Daten des ersten Termins dazu, Ausgangswerte zu erfassen.

Die gleichen Untersuchungen wurden auch nach vier Wochen (T1) und acht Wochen (T2) der Intervention durchgeführt.

Zu 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, dieses musste einen Tag vor der Blutabnahme ausgefüllt werden.
- Ein Quality of Life Questionnaire (QLQ), dieses gibt Auskunft über das Wohlbefinden der Probanden.
- Ein Food Frequency Questionnaire (FFQ) zu den Terminen T0 und T3.

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

3.1.3 Ernährungsintervention

Die Teilnehmer der Interventionsgruppe erhielten tiefgekühltes Gemüse und ein Pflanzenöl zur täglichen Aufnahme. Sie wurden gebeten, täglich 25 ml des Öls und 300 g des Gemüses zu sich zu nehmen.

Bei dem Öl handelte es sich um ein Walnussöl (**Tabelle 6**).

Es wurden verschiedene Tiefkühlprodukte der Firma IGLO zur Verfügung gestellt (**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 ± 1,00
c18:3n3	11,49 ± 0,43
Tocopherolgehalt (mg/100 g Öl)	Mittelwert ± Standardabweichung
γ-Tocopherol	32,98 ± 1,82
α-Tocopherol	2,67 ± 0,14

Tabelle 7: Tiefkühlprodukte für die Interventionsgruppe.

Spinat passiert	Karfiol Broccoli DUO
Blattspinat Zwetschgerl	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

Die richtige Einnahme des Öls wurde während der Informationsveranstaltung erklärt. Hierbei 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 je nach geschmacklicher Vorliebe 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 darauf 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 DER CBMN-ASSAY

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) angewärmt.

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 bleibt 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 Medium vermischt. Es werden 750 µl Zell-Medium-Suspension mit einer Konzentration von 1×10^6 .

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 genaue Zeit muss notiert werden.

Die Falconröhrchen müssen 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 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 hinzugeben.

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 Färbekammer 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 gelegt. Dann trocknen die Objektträger über Nacht.

3.2.3 Zählkriterien

Tabelle 9: Zählkriterien des CBMN-Assays.

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
	verbunden mit NPB (nicht größer als $\frac{1}{4}$ vom Durchmesser des Kernes)
	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 $\frac{1}{16}$ und $\frac{1}{3}$ vom Durchmessers des Zellkerns
	die Größe des MNI variiert zwischen $\frac{1}{256}$ und $\frac{1}{9}$ der Größe des Zellkerns
	klar abgegrenzt von anderen Zellbestandteilen
	verbunden oder abgegrenzt vom Hauptkern
	überlappt mit dem Hauptkern nicht
Brücken (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

Die Studienergebnisse wurden mittels der Statistiksoftware SPSS 17.0. für Windows ausgewertet.

Für den Mittelwertvergleich der unterschiedlichen Zeitpunkte der Studie (T0, T2, T3) wurde die ANOVA mit Messwiederholungen herangezogen.

Alle Parameter und die Residuen wurden auf Normalverteilung getestet. Hierfür wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test herangezogen.

Es wurden einmal die Gesundheitsgruppen miteinander verglichen und die Geschlechterunterschiede ausgewertet. Hierfür wurden die Daten nach „Treatment“ aufgeteilt und die Zwischensubjektfaktoren „Health“ und „Sex“ ausgewählt.

Der zweite Test betraf Änderungen in der Gruppe IDDM. Hierfür wurden die Daten nach „Health“ und „Sex“ aufgeteilt und es wurden keine Zwischensubjektfaktoren gewählt.

Um den Effekt der Intervention zu analysieren, wurden zusätzlich Korrelationen durchgeführt.

Die drei Signifikanzniveaus (95%, 99%, 99,9%) bei signifikanten Mittelwertunterschieden (2-seitige Signifikanzen) wurden durch folgende P-Werte festgelegt:

* $p < 0,05$ signifikant

** $p < 0,01$ hoch signifikant

*** $p < 0,001$ höchst signifikant

Die Tests wurden immer hinsichtlich der Parameter Apoptose, Necrose, Mikrokerne, NPBs und NBUDs ausgeführt.

Tabellen mit Mittelwerten sind aus „deskriptiven Statistiken“ entstanden.

Vor Durchführung der Tests wurden alle Daten auf Ausreißer bereinigt.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 LINEARE MESSWIEDERHOLUNG FÜR GRUNDGESAMTHEIT UND INSULINPFLICHTIGE DIABETIKER (IDDM)

Das untersuchte Kollektiv wurde in eine Informations- und eine Interventionsgruppe aufgeteilt. Die Ausgangswerte (T0) dieser beiden Gruppen sind in **Tabelle 10** dargestellt.

Das Ziel dieser Diplomarbeit war es, den Einfluss einer Ernährungsintervention auf die mittels CBMN Assay erhobenen Parameter (Apoptosen, Necrosen, MNi, NPBs und NBUDs) im Vergleich zur Informationsgruppe zu untersuchen. Die mittels CBMN Assay ausgewerteten Daten zu den drei Blutabnahmetermen (T0, T2 und T3) sind in **Tabelle 11** dargestellt.

Tabelle 10: Ausgangswerte (T0) des Kollektivs der Informations- und der Interventionsgruppe. Angegeben in Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (MW $\pm$ Std.).

	Information (MW $\pm$ Std.)	Intervention (MW $\pm$ Std.)
Fallzahl (Männer/Frauen)	31 (12/19)	65 (29/36)
Alter (Jahre)	61,65 $\pm$ 6,66	65,68 $\pm$ 7,45
Körpergewicht (kg)	90,02 $\pm$ 18,98	90,33 $\pm$ 16,11
BMI (kg/m ²)	32,21 $\pm$ 7,03	32,67 $\pm$ 5,68
HbA1c (%)	7,01 $\pm$ 1,05	7,23 $\pm$ 1,09
HbA1c IDDM (%)	7,80 $\pm$ 0,74	8,11 $\pm$ 0,90
Nüchternblutzucker (venös, mmol/l)	7,40 $\pm$ 2,07	8,09 $\pm$ 2,36
Vitamin B12 (pmol/l)	338,43 $\pm$ 150,41	330,00 $\pm$ 148,04
Folsäure (nmol/l)	18,06 $\pm$ 8,37	20,66 $\pm$ 8,88
Homocystein (μ mol/l)	13,08 $\pm$ 3,27	12,31 $\pm$ 2,81

Tabelle 11: Grundgesamtheit. Gemessene Parameter (Apoptosen, Necrosen, MNi, NPBs, NBUDs) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). Angegeben in Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (MW $\pm$ Std.).

	T0 (MW $\pm$ Std.)	T2 (MW $\pm$ Std.)	T3 (MW $\pm$ Std.)
Apoptose %	1,31 $\pm$ 0,56	1,43 $\pm$ 0,54	1,45 $\pm$ 0,75
Necrose %	1,36 $\pm$ 0,74	1,34 $\pm$ 0,59	1,39 $\pm$ 0,70
MNi/1000 BNC	25,03 $\pm$ 9,69	26,29 $\pm$ 12,00	27,97 $\pm$ 12,30
NPBs/1000 BNC	1,71 $\pm$ 1,28	2,00 $\pm$ 1,39	2,21 $\pm$ 1,39
NBUDs/1000 BNC	4,43 $\pm$ 2,91	4,76 $\pm$ 2,70	4,75 $\pm$ 2,62

Die in **Tabelle 11** aufgelisteten Ergebnisse werden in den folgenden 5 Kapiteln genauer beschrieben. Außerdem werden die unterschiedlichen Gesundheitsgruppen (NIDDM, IDDM, Gesund und IFG) bezüglich der Veränderung der Parameter im Zeitverlauf verglichen. Zuletzt werde auch Unterschiede zwischen Männern und Frauen untersucht.

4.1.1 Apoptosen

Tabelle 12: Alle Gesundheitsgruppen. Apoptosen zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). Angegeben in Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (MW $\pm$ Std.).

Information	T0 (MW $\pm$ Std.)	T2 (MW $\pm$ Std.)	T3 (MW $\pm$ Std.)
IDDM	1,42 $\pm$ 0,94	1,04 $\pm$ 0,33	1,33 $\pm$ 0,46
NIDDM	1,35 $\pm$ 0,56	1,44 $\pm$ 0,44	1,20 $\pm$ 0,60
Gesund	1,20 $\pm$ 0,46	1,36 $\pm$ 0,72	1,31 $\pm$ 0,40
IFG	1,12 $\pm$ 0,18	1,24 $\pm$ 0,20	1,05 $\pm$ 0,26
Intervention			
IDDM	1,22 $\pm$ 0,48	1,36 $\pm$ 0,46	1,33 $\pm$ 0,34
NIDDM	1,18 $\pm$ 0,46	1,56 $\pm$ 0,64	1,80 $\pm$ 1,11
Gesund	1,57 $\pm$ 0,69	1,58 $\pm$ 0,66	1,21 $\pm$ 0,78
IFG	1,55 $\pm$ 0,64	1,58 $\pm$ 0,59	1,51 $\pm$ 0,75

Geschlechtsspezifische Unterschiede

In der Informationsgruppe bestanden zwischen den Geschlechtern signifikante Unterschiede bezüglich der Apoptosenhäufigkeit ($p < 0,05$) (**Abbildung 8**). Männliche Studienteilnehmer wiesen mit durchschnittlich $1,45 \pm 0,64$ Apoptosen-% eine 18,7% höhere Apoptosenrate auf als Frauen ($1,18 \pm 0,44$ Apoptosen-%).

In der Interventionsgruppe konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen festgestellt werden.

Zeitlicher Verlauf

Im zeitlichen Verlauf der Studie wurden weder in der Informations- noch in der Interventionsgruppe signifikante Änderungen der Apoptosen-Anzahl festgestellt (**Tabelle 12**).

Auch bei IDDM gab sich keine Änderung der Apoptosen im zeitlichen Verlauf der Studie.

Unterschied der Gesundheitsgruppen

Zwischen den Gesundheitsgruppen bestand kein Unterschied in der zeitlichen Entwicklung der Häufigkeit von Apoptosen (**Tabelle 12**).

Die Entwicklung der IDDM war bezüglich der Apoptosen-Häufigkeit der, der anderen Gesundheitsgruppen ähnlich. Dies gilt für die Interventions- und Informationsgruppe.

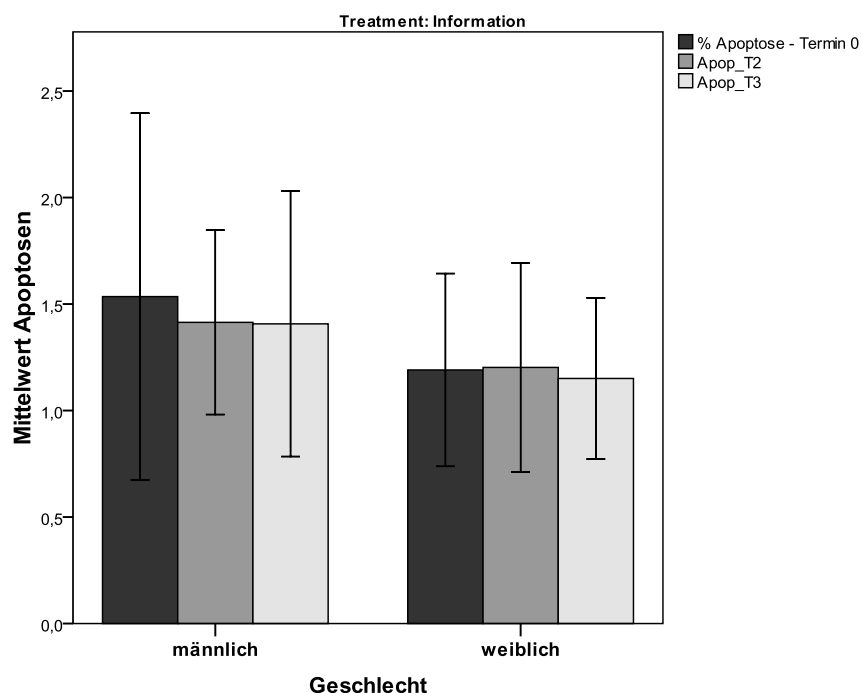


Abbildung 8: Grundgesamtheit, Informationsgruppe. Apoptosenhäufigkeit bei Männern und Frauen zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). T0, T2, T3: Männer>Frauen ($p < 0,05$).

4.1.2 Necrosen

Tabelle 13: Alle Gesundheitsgruppen. Necrosen zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). Angegeben in Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (MW $\pm$ Std.).

Information	T0 (MW $\pm$ Std.)	T2 (MW $\pm$ Std.)	T3 (MW $\pm$ Std.)
IDDM	1,23 $\pm$ 0,75	1,22 $\pm$ 0,39	1,19 $\pm$ 0,50
NIDDM	1,29 $\pm$ 0,72	1,29 $\pm$ 0,48	1,38 $\pm$ 0,67
Gesund	0,84 $\pm$ 0,51	0,74 $\pm$ 0,18	1,23 $\pm$ 0,44
IFG	0,89 $\pm$ 0,42	1,33 $\pm$ 0,42	0,98 $\pm$ 0,30
Intervention			
IDDM	1,31 $\pm$ 0,60	1,52 $\pm$ 0,69	1,35 $\pm$ 0,72
NIDDM	1,47 $\pm$ 0,78	1,46 $\pm$ 0,65	1,42 $\pm$ 0,80
Gesund	1,68 $\pm$ 0,62	1,22 $\pm$ 0,26	1,19 $\pm$ 0,12
IFG	1,70 $\pm$ 0,97	1,16 $\pm$ 0,58	1,51 $\pm$ 0,96

Geschlechtsspezifische Unterschiede

Während die Geschlechter in der Informationsgruppe ähnliche Necrosen-Werte aufwiesen, konnte in der Interventionsgruppe ein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen festgestellt werden ($p < 0,05$). Bei den Männern wurden mit durchschnittlich $1,55 \pm 0,72$ Necrosen-% um 14,53% mehr Necrosen festgestellt als bei den Frauen ($1,33 \pm 0,68$ Necrosen-%) (**Abbildung 9**).

Zeitlicher Verlauf

Bei den Necrosen (**Tabelle 13**) gab es weder in der Informations- noch in der Interventionsgruppe signifikante Änderungen im zeitlichen Verlauf der Studie. Diese Erkenntnis gilt auch für die Necrosen-Anzahl bei der Auswertung der Gruppe der IDDM.

Unterschied der Gesundheitsgruppen

Bezüglich der Necrosen-Häufigkeit zeigten die Gesundheitsgruppen keinen signifikanten Unterschied in der zeitlichen Entwicklung (**Tabelle 13**). Die Entwicklung der IDDM war bezüglich der Necrosen-Häufigkeit der, der anderen Gesundheitsgruppen ähnlich. Diese Ergebnisse zeigten sich sowohl bei der Interventions- als auch bei der Informationsgruppe.

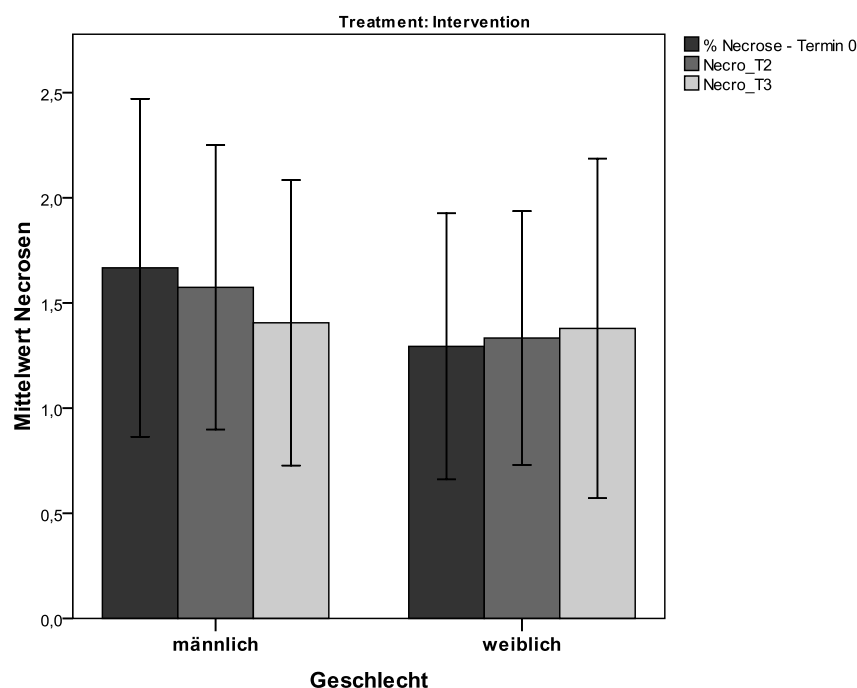


Abbildung 9: Grundgesamtheit, Interventionsgruppe. Necrosenhäufigkeit bei Männern und Frauen zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). T0, T2, T3: Männer > Frauen ($p < 0,05$).

4.1.3 Diskussion zu Apoptosen und Necrosen

Der CBMN-Assay ist ein umfassender Assay um DNA-Schäden, Zytostase und Zytotoxizität zu messen. Zytostatische Ereignisse werden über die Proportion von Ein-, Zwei- und Multikernzellen gemessen und die Zytotoxizität über den Anteil an Necrosen und/oder Apoptosen [FENECH, 2007].

Der Fokus auf die Ernährung als Schlüsselfaktor um die genomische Stabilität zu determinieren, ist wichtiger als bisher angenommen. Über die Nahrung können diätetische Karzinogene aufgenommen werden und die Aktivierung oder Entgiftung von Karzinogenen, die DNA-Reparatur, DNA-Synthese und Apoptose beeinflussen werden [AMES, 1998; FENECH AND FERGUSON, 2001].

Ein Schaden am Genom kann zum programmierten Zelltod (Apoptose) führen (**Abbildung 10**). Die Apoptose stellt einen der Mechanismen dar, durch den mutierte Zellen eliminiert werden können [NARULA et al., 2002; NG et al., 2002; Hsia et al., 2003].

Falls letzterer Mechanismus versagt, könnten Zellen mit genomischen Abnormalitäten überleben und zu ernsten Defekten führen [LIU et al., 2002; VINSON AND HALES, 2002].

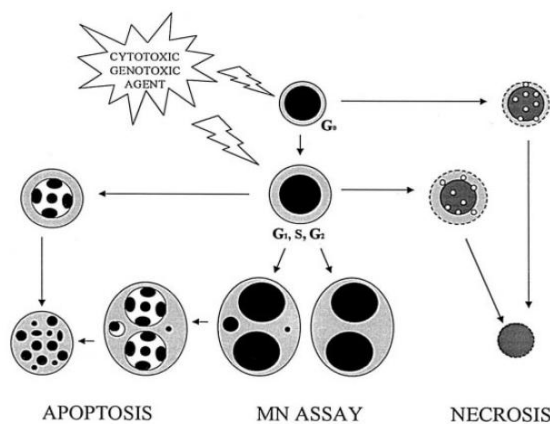


Abbildung 10: Die unterschiedlichen Schicksale, die einer kultivierten und in der Zellteilung blockierten Zelle widerfahren, nachdem sie zytotoxischen/ genotoxischen Agentien ausgesetzt wurde. [Modifiziert nach FENECH, 2000].

Eine Hemmung der Apoptose trägt zu der Entwicklung von Lungenkrebs und der Proliferation von Tumorzellen bei [JIN et al., 2004].

Krebspatienten zeigten signifikant höhere Apoptosen und Nekrosen als die Teilnehmer der Kontrollgruppe, bei denen keine Krebserkrankung diagnostiziert wurde [EL-ZEIN et al., 2008].

Für normale PBL, die unter optimalen Bedingungen nach Angaben des Protokolls kultiviert werden, kann man den in **Tabelle 14** dargestellten Wertebereich erwarten [FENECH, 2007].

Tabelle 14: Zu erwartende Ergebnisse bei dem CBMN Assay bei Durchführung nach Angaben des Protokolls und unter normalen Bedingungen. [Modifiziert nach FENECH, 2007].

Parameter	Wertebereich
Nekrosen	0-9%
Apoptosen	0-7%
MNi/1000 BNC	0–30
NPBs/1000 BNC	0–10
NBUDs/1000 BNC	0–5

Die Apoptosen- und Necrosenhäufigkeit hat sich bei keiner der Gesundheitsgruppen signifikant verändert. Dies gilt für die Informations- und Interventionsgruppe. Die Ernährungsintervention hatte somit keinen Einfluss auf die Entstehung von Apoptosen oder Necrosen.

Im Rahmen dieser Studie konnten signifikante Unterschiede in der Zahl an apoptotischen und necrotischen Zellen zwischen Männern und Frauen festgestellt werden.

Für beide Parameter gilt, dass der Unterschied trotz nachgewiesener Signifikanz lediglich bei weniger als 0,4 Apotosen- bzw. Necrosen-% liegt. Sowohl dieser geringe

Wert, als auch das Fehlen von vergleichbaren Daten über den Zusammenhang des Geschlechts und der Apoptosen- oder Necrosenhäufigkeit erschweren weitere Interpretationen. An diesem Punkt werden weitere Studien benötigt.

4.1.4 Mikrokerne (MNI)

Tabelle 15: Alle Gesundheitsgruppen. Mikrokerne zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). Angegeben in Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (MW $\pm$ Std.). * = signifikant bei $p < 0,05$, a = Änderung zwischen T0 und T2.

Information	T0 (MW $\pm$ Std.)	T2 (MW $\pm$ Std.)	T3 (MW $\pm$ Std.)
IDDM	29,63 $\pm$ 13,10 * ^a	35,31 $\pm$ 15,12 * ^a	39,38 $\pm$ 18,65
NIDDM	24,32 $\pm$ 8,42	23,18 $\pm$ 9,99	26,39 $\pm$ 13,11
Gesund	29,10 $\pm$ 6,42	26,60 $\pm$ 3,99	35,90 $\pm$ 5,18
IFG	24,00 $\pm$ 9,90	20,50 $\pm$ 13,44	27,60 $\pm$ 4,10
Intervention			
IDDM	26,55 $\pm$ 7,41	29,34 $\pm$ 11,47	28,77 $\pm$ 8,53
NIDDM	22,44 $\pm$ 9,93	24,12 $\pm$ 10,95	24,87 $\pm$ 11,23
Gesund	29,75 $\pm$ 13,80	25,58 $\pm$ 16,20	32,88 $\pm$ 19,03
IFG	24,20 $\pm$ 15,73	23,36 $\pm$ 16,81	22,64 $\pm$ 10,88

Geschlechtsspezifische Unterschiede

In der Informationsgruppe ließ sich feststellen, dass die Geschlechter sich signifikant in ihrer Mikrokernhäufigkeit unterschieden ($p < 0,05$) (**Abbildung 11**). Bei den Frauen der Informationsgruppe wurde mit durchschnittlich $32,87 \pm 12,73$ MNI/1000 BNC eine um 32% beziehungsweise um den Faktor 1,47 größere MNI-Häufigkeit festgestellt als bei den Männern ($22,39 \pm 7,44$ MNI/1000 BNC).

Die Interventionsgruppe zeigte sogar höchst signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) zwischen den MNI-Häufigkeiten bei Männern und Frauen (**Abbildung 12**). Auch hier wurde bei den Frauen mit durchschnittlich $29,77 \pm 11,78$ MNI/1000 BNC eine um 33%

(Faktor 1,49) höhere MNi-Anzahl als bei den Männern ($20,01 \pm 7,24$ MNi/1000BNC) festgestellt.

Die unterschiedliche Signifikanz trotz der beinahe gleichen prozentuellen Unterschiede kann an der unterschiedlichen Fallzahl der Gruppen liegen (Informationsgruppe 26 Probanden, 10 Männer, 16 Frauen; Interventionsgruppe 55 Probanden, 23 Männer, 32 Frauen).

Zeitlicher Verlauf

In der Informationsgruppe wurde eine hoch signifikante Änderung der MNi im zeitlichen Verlauf der Studie festgestellt ($p < 0,01$) (**Tabelle 15**). Hierbei ist zu erwähnen, dass sich zwischen den Zeitpunkten T0 und T2 keine signifikante Änderung ergab, die Mittelwerte sind um 2,17% gesunken. Zwischen T0 und T3 stiegen die MNi signifikant an (+19,45%) und zwischen T2 und T3 war der Anstieg sogar hoch signifikant (+23,74%). In **Abbildung 11** ist die Änderungen der MNi bei Männer und Frauen dargestellt.

In der Interventionsgruppe wurde bei Durchführung der linearen Messwiederholung lediglich eine tendenzielle Änderung ($p < 0,15$) der Mikrokernhäufigkeit erkannt. Im paarweisen Vergleich der einzelnen Zeitpunkte gab es keine signifikanten Veränderungen (**Abbildung 12**).

IDDM:

In der Gruppe der IDDM zeigte sich eine hoch signifikante Änderung der MNi im Zeitverlauf in der Informationsgruppe ($p < 0,01$) (**Tabelle 15**). Dieser Verlauf ist in **Abbildung 13** für beide Geschlechter dargestellt. Es ist gut sichtbar, dass Frauen stärker zum signifikanten Anstieg der MNi beitragen.

Im paarweisen Vergleich der Mittelwerte zeigt sich, dass der Anstieg der Mikrokern von T0 zu T2 signifikant (+19,17%) und der Anstieg von T0 zu T3 nur tendenziell (+32,91%) war, wobei sich zwischen T2 und T3 keinerlei Signifikanz (+11,53%) erkennen ließ.

Der tendenzielle Anstieg von T0 zu T3, trotz der deutlich stärkeren prozentuellen Änderung der Mittelwerte, lässt sich durch die starke Streuung der Mittelwerte erklären (**Tabelle 15**). Vergleicht man nur die Mittelwerte miteinander, so besteht zwischen T0 und T3 der größte Anstieg der MN-Häufigkeit.

Bei den IDDM der Interventionsgruppe veränderte sich die Zahl an MNi nicht.

Unterschied der Gesundheitsgruppen

Die Mikrokernhäufigkeit veränderte sich nicht signifikant in einzelnen Gesundheitsgruppen (**Tabelle 15**). Die Anzahl der MNi der IDDM veränderte sich in der Interventions- und Informationsgruppe ähnlich wie die in den anderen Gesundheitsgruppen.

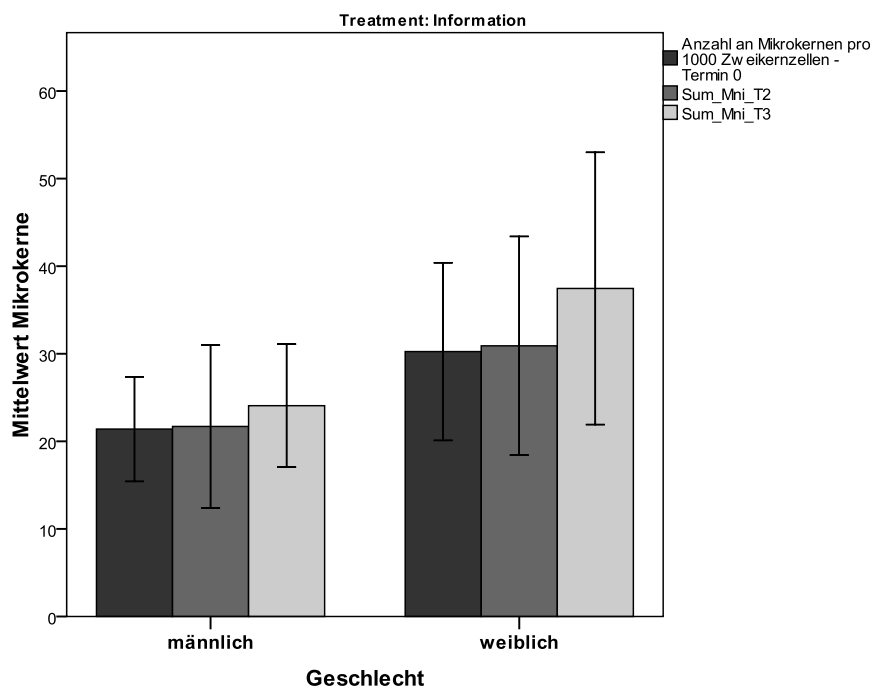


Abbildung 11: Grundgesamtheit, Informationsgruppe. Mikrokernhäufigkeit bei Männern und Frauen zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). T0, T2, T3: Frauen > Männer ($p < 0,05$). Beide Geschlechter: Änderung MNi T0 – T3 ($p < 0,05$), T2 – T3 ($p < 0,01$).

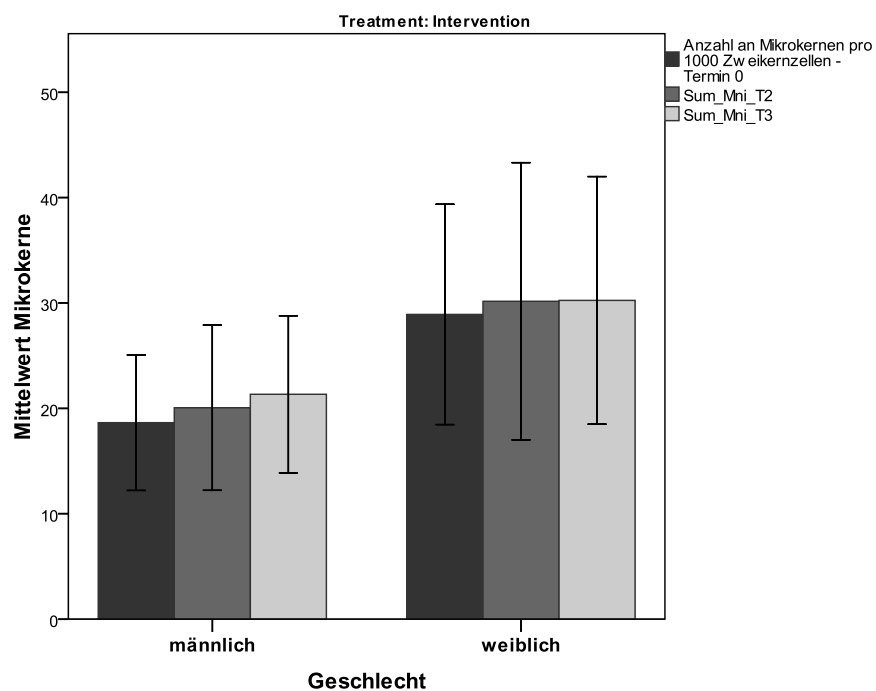


Abbildung 12: Grundgesamtheit, Interventionsgruppe. Mikrokernhäufigkeit bei Männern und Frauen zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). T0, T2, T3: Frauen > Männer ($p < 0,001$).

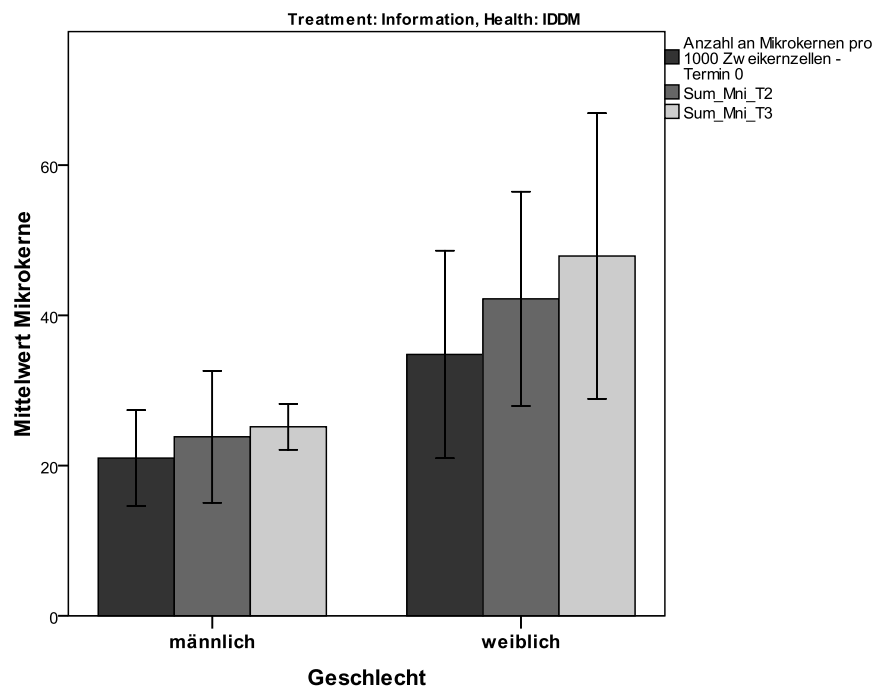


Abbildung 13: IDDM, Informationsgruppe. Mikrokernhäufigkeit bei Männern und Frauen zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). Beide Geschlechter: Änderung MNi T0 – T2 ($p < 0,05$).

4.1.5 Diskussion MNi

Eine Studie von Fenech et al. konnte eine reduzierte MN- Häufigkeit ab einer Folsäurekonzentration von 313 ng/ml in den Erythrozyten feststellen. Diese Konzentrationen wurden jedoch nur mit einer 3,5fach-erhöhten Aufnahme der derzeitigen RDAs erreicht [FENECH et al., 1998].

Michael Fenech gab in einer Studie über Mikronährstoffe und die genomische Stabilität an, dass mehrere Interventionsstudien zeigen konnten, dass die MN-Bildung durch Supplementation von Folat und/oder Vitamin B12 minimiert werden kann [FENECH, 2002].

Eine Querschnittsstudie mit jungen Erwachsenen im Alter von 18-32 Jahren zeigte eine positive Korrelation zwischen der MN-Häufigkeit und dem Plasma-Hcy bei Männern und eine negative Korrelation mit Serum-B12 bei Frauen. [Thomas et al., 2011]

Die IDDM-Probanden zeigen eine ähnliche Entwicklung in der MN-Häufigkeit wie das Gesamtkollektiv. In der Informationsgruppe wurde ein starker Anstieg der MNi im zeitlichen Verlauf der Studie festgestellt, während sich die Werte in der Interventionsgruppe stabil verhielten.

Vergleicht man die MN-Häufigkeit der Informationsgruppe des Gesamtkollektivs und die der IDDM mit den zu erwartenden Werten in **Tabelle 14**, kann man sehen, dass sich die Durchschnittswerte der Gesamtkollektivs zu den Zeitpunkten T0 ($26,76 \pm 9,46$ MNi/1000BNC) und T2 ($26,40 \pm 10,64$ MNi/1000BNC) noch im Normalbereich befinden und zu T3 ($32,32 \pm 10,26$ MNi/1000BNC) leicht erhöht sind. Die Werte der IDDM sind insgesamt höher und überschreiten zu T2 und T3 die Normwerte deutlich (**Tabelle 15**).

Das stabile Verhalten der MNi in der Interventionsgruppe und die insgesamt niedrigeren Werte (Durchschnittswerte T0: $25,74 \pm 11,72$ MNi/1000BNC, T2: $25,6 \pm 13,86$ MNi/1000BNC, T3: $27,29 \pm 12,42$ MNi/1000BNC), insbesondere bei den IDDM (**Tabelle 15**), könnten durch die Ernährungsintervention hervorgerufen worden sein.

Da sich weder die Folsäure- noch die Vitamin-B12- oder Hcy-Konzentrationen im Blut der Probanden signifikant veränderten, ist auch bezüglich der MNi keine Veränderung zu erwarten gewesen.

In unterschiedlichen Studien wurden verminderte MN-Häufigkeiten nur bei Folsäurekonzentrationen, die deutlich über der physiologischen Norm lagen und die im Rahmen dieser Intervention nicht erreichbar gewesen wären, festgestellt.

Alter und Geschlecht sind die wichtigsten demographischen Variablen, die einen Einfluss auf den MN-Index ausüben, da die MN-Häufigkeit bei Frauen je nach Altersgruppe um den Faktor 1,2 – 1,6 höher ist als bei Männern [THOMAS et al., 2011]. Nichtsdestotrotz ist das Risiko, an Krebs zu erkranken, im Allgemeinen bei Männern höher als bei Frauen [GIOVANNUCI et al., 2010; STATISTIK AUSTRIA, 2010].

Zusätzlich ist der Einfluss des Geschlechts und genetischer Polymorphismen zur Aufrechterhaltung des Genoms im Bezug auf erhöhte Häufigkeiten von MN, NPB und NBUDs bis auf weiteres nicht vollständig geklärt [KIRSCH-VOLDERS et al., 2010; IARMARCOVAI et al., 2008].

Der Unterschied der Geschlechter, der auch aus der Literatur bekannt ist, deckt sich mit den Werten unserer Studie. Die MNi-Häufigkeit war bei den Frauen gegenüber den Männern um den Faktor 1,47 erhöht. Nachdem die Teilnehmer dieser Studie eine relativ homogene Altersgruppe (**Tabelle 10**) darstellten, sind Auswertungen hinsichtlich des Alters nicht sinnvoll.

4.1.6 Bridges (NPBs)

Tabelle 16: Alle Gesundheitsgruppen. Bridges zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). Angegeben in Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (MW $\pm$ Std.). * = signifikant bei $p < 0,05$, b = Änderung zwischen T0 und T3.

Information	T0 (MW $\pm$ Std.)	T2 (MW $\pm$ Std.)	T3 (MW $\pm$ Std.)
IDDM	1,63 $\pm$ 1,89	2,38 $\pm$ 2,00	2,38 $\pm$ 0,83
NIDDM	2,32 $\pm$ 1,27	1,91 $\pm$ 1,38	2,32 $\pm$ 1,37
Gesund	1,70 $\pm$ 0,57	2,60 $\pm$ 0,89	3,44 $\pm$ 1,26
IFG	0,75 $\pm$ 0,35	1,75 $\pm$ 0,35	0,65 $\pm$ 0,92
Intervention			
IDDM	1,18 $\pm$ 1,17 ^{*b}	1,89 $\pm$ 1,23	2,43 $\pm$ 1,59 ^{*b}
NIDDM	1,69 $\pm$ 1,21	1,65 $\pm$ 1,26	2,13 $\pm$ 1,61
Gesund	2,25 $\pm$ 1,55	2,58 $\pm$ 0,54	1,75 $\pm$ 0,65
IFG	2,52 $\pm$ 1,03	1,83 $\pm$ 1,13	1,45 $\pm$ 0,76

Geschlechtsspezifische Unterschiede

Informationsgruppe: Innerhalb der Gesundheitsgruppen verändert sich die Anzahl der Bridges bei Frauen und Männern signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$).

In der Informationsgruppe der IDDM gab es bei den männlichen Teilnehmern eine leichte Verminderung der NPBs zwischen T0 und T2 sowie auch zwischen T2 und T3 (Mittelwerte NPBs T0: 3,33 $\pm$ 2,02; T2: 3,00 $\pm$ 3,12; T3: 2,50 $\pm$ 1,00).

Die Frauen dieser Gruppe zeigten deutlich weniger NPBs und einen starken Anstieg der Mittelwerte zwischen T0 und T2 und einen leichten Anstieg zwischen T2 und T3 (Mittelwerte NPBs T0: 0,6 $\pm$ 0,82; T2: 2,00 $\pm$ 1,27; T3: 2,30 $\pm$ 0,84).

In der Informationsgruppe der NIDDM hatten die Männer weniger NPBs und blieben zwischen T0 und T2 gleich und stiegen dann leicht zwischen T2 und T3 an (Mittelwerte NPBs T0: 1,50 $\pm$ 1,00; T2: 1,50 $\pm$ 1,17; T3: 2,00 $\pm$ 1,12).

Bei den Frauen sanken in dieser Gruppe die NPBs zwischen T0 und T2 und stiegen zwischen T2 und T3 leicht an (Mittelwerte NPBs T0: 3,00 $\pm$ 1,10; T2: 2,25 $\pm$ 1,54; T3: 2,58 $\pm$ 1,59).

In der Gruppe der Gesunden und der IFG konnte keine Auswertung zwischen den Geschlechtern stattfinden, da die Fallzahl hierfür zu gering war.

In der Interventionsgruppe zeigte sich lediglich ein tendenzieller Unterschied in der Anzahl der NPBs bei Frauen und Männern innerhalb der Gesundheitsgruppen ($p < 0,15$).

Zeitlicher Verlauf

Bei den NPBs (**Tabelle 16**) gab es weder in der Informations- noch in der Interventionsgruppe signifikanten Änderungen im zeitlichen Verlauf der Studie.

IDDM:

In der Gruppe IDDM konnte festgestellt werden, dass die Anzahl der NPBs sich in der Interventionsgruppe während der Studie signifikant veränderte ($p < 0,05$) (**Tabelle 16**). Signifikant war der Anstieg der NPBs zwischen T0 ($1,18 \pm 1,17$) und T3 ($2,43 \pm 1,59$). Zwischen T0 und T2 ($1,89 \pm 1,23$) bestand ein tendenzieller Anstieg und zwischen T2 und T3 lag keine signifikante Veränderung vor.

Die Anzahl an NPBs verändert sich in der Informationsgruppe nicht.

Unterschied der Gesundheitsgruppen

Zwischen den Gesundheitsgruppen bestand kein Unterschied in der zeitlichen Entwicklung der Häufigkeit von NPBs (**Tabelle 16**). Die Entwicklung der IDDM war bezüglich der NPB-Häufigkeit der, der anderen Gesundheitsgruppen ähnlich.

Dies gilt für die Interventions- und Informationsgruppe.

4.1.7 Buds (NBUDs)

Tabelle 17: Alle Gesundheitsgruppen. Buds zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen). Angegeben in Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (MW $\pm$ Std.). * = signifikant bei $p < 0,05$, a = Änderung zwischen T0 und T2.

Information	T0 (MW $\pm$ Std.)	T2 (MW $\pm$ Std.)	T3 (MW $\pm$ Std.)
IDDM	4,97 $\pm$ 2,96	3,79 $\pm$ 1,58	4,50 $\pm$ 1,32
NIDDM	4,50 $\pm$ 3,15	5,41 $\pm$ 2,58	4,41 $\pm$ 3,32
Gesund	3,00 $\pm$ 1,70	3,10 $\pm$ 1,95	4,00 $\pm$ 1,06
IFG	1,00 $\pm$ 1,41	1,75 $\pm$ 0,35	2,10 $\pm$ 0,85
Intervention			
IDDM	3,26 $\pm$ 1,87 * ^a	4,82 $\pm$ 2,37 * ^a	4,97 $\pm$ 3,66
NIDDM	4,35 $\pm$ 1,47	5,25 $\pm$ 2,86	5,46 $\pm$ 2,38
Gesund	7,75 $\pm$ 1,94	3,30 $\pm$ 0,81	4,38 $\pm$ 0,75
IFG	7,36 $\pm$ 5,52	5,29 $\pm$ 4,48	4,63 $\pm$ 2,53

Geschlechtsspezifische Unterschiede

Während es in der Anzahl der NBUDs in der Informationsgruppe keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern gab, ist die Anzahl der Buds in der Interventionsgruppe bei Frauen und Männern tendenziell unterschiedlich ($p < 0,15$), (**Abbildung 15**). Die Frauen wiesen mehr NBUDs auf.

Zeitlicher Verlauf

In der Auswertung des Gesamtkollektivs wurden weder in der Informations- noch in der Interventionsgruppe signifikante Änderungen der Anzahl der NBUDs im zeitlichen Verlauf der Studie festgestellt (**Tabelle 17**).

IDDM:

Die IDDM-Probanden zeigten in der Informationsgruppe keine signifikanten Änderungen.

In der Interventionsgruppe wurde festgestellt, dass sich die Anzahl der NBUDs im Zeitverlauf signifikant änderte ($p < 0,05$) (**Tabelle 17**). Die Signifikanz bestand im Anstieg der NBUDs zwischen den Zeitpunkten T0 und T2 (+47,85%). T2 und T3 waren nahezu gleich (+3,11%) und zwischen T0 und T3 bestand zwar ein prozentueller Anstieg der Mittelwerte um 52,45%, durch die große Streuung der Werte wurde zwischen diesen Zeitpunkten keine signifikante Veränderung beobachtet.

Unterschied der Gesundheitsgruppen

Die Anzahl an NBUDs veränderte sich in den unterschiedlichen Gesundheitsgruppen der Informationsgruppe ähnlich.

In der Interventionsgruppe veränderten sich die NBUDs auf höchst signifikante Weise ($p < 0,001$), (**Abbildung 14**), (**Tabelle 17**).

Während sich die Gruppen der IDDM und NIDDM auf ähnlichem Niveau entwickelten, zeigten die Gesunden und die Gruppe der IFG eine gegenteilige Entwicklung. Am stärksten war dies bei den Gesunden ausgeprägt, die sehr hohe Ausgangswerte aufwiesen ($7,75 \pm 1,94$ NBUDs/1000BNC), die sich zu T2 unter das Niveau der anderen Gesundheitsgruppen verminderten ($3,3 \pm 0,81$ NBUDs/1000BNC). Zwischen T2 und T3, nach der aktiven Phase der Intervention, war ein leichter Anstieg auf $4,48 \pm 0,75$ NBUDs/1000BNC sichtbar. Die Gruppe der IFG zeigte eine stetige Verminderung der NBUDs von $7,36 \pm 5,52$ NBUDs/1000BNC zu T0 auf $5,29 \pm 4,48$ NBUDs/1000BNC zu T2 und $4,63 \pm 2,53$ NBUDs/1000BNC zu T3.

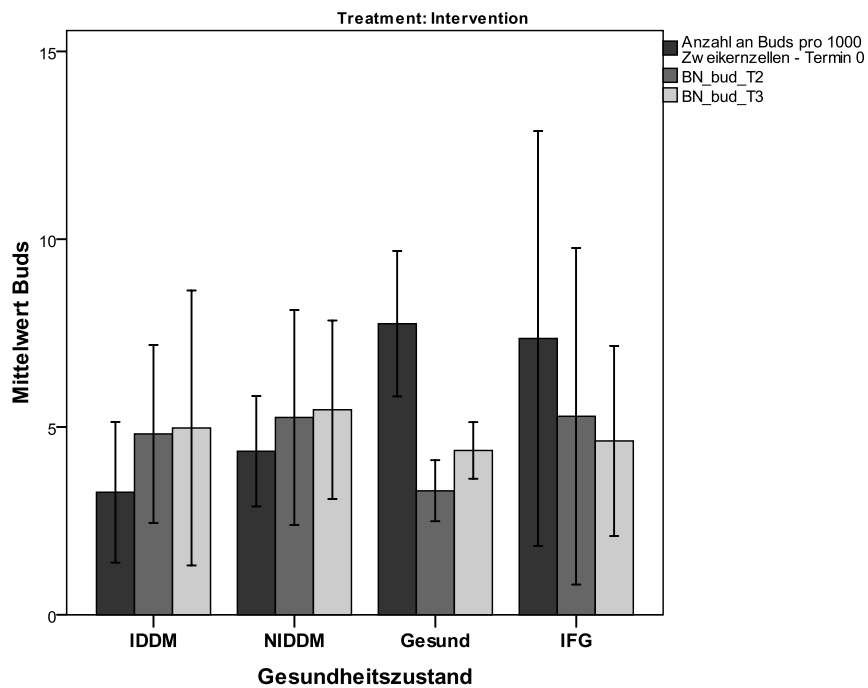


Abbildung 14: Grundgesamtheit, Interventionsgruppe. Häufigkeit der Buds in den Gruppen der unterschiedlichen Gesundheitszustände (IDDM, NIDDM, Gesund und IFG) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen).

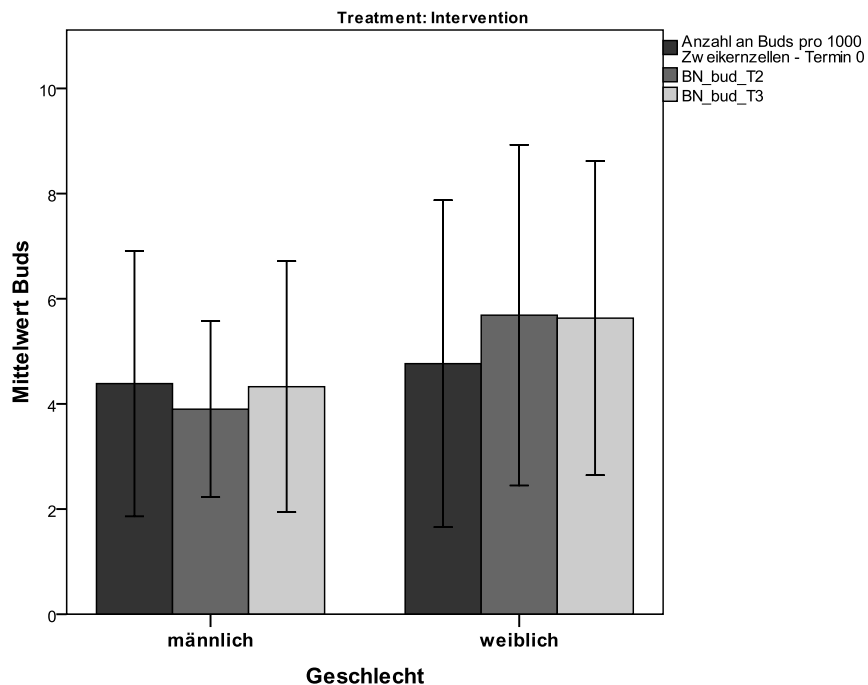


Abbildung 15: Grundgesamtheit, Interventionsgruppe. Häufigkeit der Buds bei Männern und Frauen zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T2 (nach 4 Wochen) und T3 (nach 16 Wochen).

4.1.8 Diskussion NPBs und NBUDs

Erscheinungen von DNA-Schäden werden im CBMN Assay spezifisch in einmal geteilten Zweikernzellen (BNC) ausgewertet und beinhalten (a) MNi, Biomarker für Chromosomenbrüche und/oder den Verlust ganzer Chromosomen, (b) NPBs, Biomarker für fehlerhaft reparierte DNA und/oder fusionierte Teleomerenenden und (c) NBUDs, Biomarker für die Beseitigung amplifizierter DNA und/oder fehlerhafter DNA-Reparaturkomplexe [FENECH, 2007].

MNi und andere Anomalien des Zellkerns, sowie NPBs und NBUDs sind Biomarker für genotoxische Ereignisse und Manifestationen chromosomaler Instabilität, die oft bei Krebs beobachtet werden [BONASSI et al., 2011].

Die NBUDs charakterisieren sich durch dieselbe Morphologie wie ein MN mit der Ausnahme, dass sie je nach Stadium des Budding-Prozesses durch einen schmalen oder breiten Stiel aus Kernmaterial mit dem Zellkern verbunden sind [FENECH, 2007].

Trotz des wissenschaftlichen Fortschrittes in den letzten Jahren, ist es vernünftig, sich einzugestehen, dass das Verständnis der Mechanismen, die zur Entstehung von MN, NPB und NBUD führen, noch nicht vollständig ist [Fenech et al., 2011].

Im zeitlichen Verlauf der Studie wurde weder für NPBs noch für NBUDs eine signifikante Änderung festgestellt. Das bedeutet, dass beide Parameter sich sowohl in der Informationsgruppe als auch in der Interventionsgruppe stabil verhielten.

Bei genauer Betrachtung der Geschlechter und der unterschiedlichen Gesundheitsgruppen sind einige Unterschiede aufgetreten.

In der Informationsgruppe wurde ein signifikanter Unterschied in der zeitlichen Entwicklung der Anzahl der NPBs zwischen den Geschlechtern in den einzelnen Gesundheitsgruppen erkannt.

Die Untersuchung der IDDM zeigte einen Anstieg der NPB insbesondere zwischen den Zeitpunkten T0 und T3.

Es zeigt sich jedoch bei allen Veränderungen, dass es sich um geringe Unterschiede handelt. Bei einem Vergleich mit den zu erwartenden Werten, die in **Tabelle 14** dargestellt sind, zeigt sich, dass alle Werte in der Norm und sogar im unteren Drittel liegen.

Auch für die NBUDs gibt es unterschiedliche Entwicklungen zwischen den Gesundheitsgruppen in der Interventionsgruppe. Die stärkste Verminderung zeigte die Gruppe der gesunden Teilnehmer, gefolgt von den IFG. Dies könnte bedeuten, dass eine Ernährungsintervention in der Prävention sehr wirksam sein kann. Außerdem zeigt diese Entwicklung auch, dass die Intervention am Meisten Nutzen bei den Teilnehmern bringt, deren Werte bereits vor der Intervention am meisten erhöht waren, wie dies hier der Fall ist.

In der Gruppe der IDDM wurde auch ein Anstieg der NBUDs im zeitlichen Verlauf der Studie festgestellt. Auch hier ergibt sich jedoch im Vergleich mit den Werten aus **Tabelle 14**, dass alle Werte im Normalbereich liegen.

Es zeigte sich auch eine stärkere Tendenz der PBL in den teilnehmenden Frauen, Buds zu entwickeln. Da NBUDs und MNi große Ähnlichkeiten besitzen und es erwiesen ist, dass Frauen deutlich mehr MNi entwickeln, lässt sich diese Tendenz somit erklären.

Für beide Parameter gilt, dass weiterer Forschungsbedarf nötig ist, um diese Unterschiede und Entwicklungen vergleichen und interpretieren zu können.

4.2 KORRELATIONEN

Um den Effekt der Intervention zu analysieren, wurden zusätzlich zur ANOVA mit Messwiederholungen, Korrelationen durchgeführt. Hierbei sollen Zusammenhänge zwischen den mittels CBMN Assay erhobenen Parametern (Apoptosen, Necrosen, MNi, NPBs, NBUDs) und den aus der Literatur bekannten Einflussfaktoren (Alter, BMI, Folsäure, Hcy, Vitamin B12) untersucht werden. Hierbei wurden die Differenzen der Werte herangezogen, um Veränderungen der Parameter oder Einflussfaktoren

erkennen zu können z.B. Korrelation zwischen „Veränderung der MN-Häufigkeit“ (Summe der MNi T2 – Summe der MNi T0) und „Veränderung der Konzentration an Folsäure“ (Konzentration Folsäure T2 – Konzentration Folsäure T0). Im Folgenden Text werden die Differenzen der Werte mit Δ angegeben.

4.2.1 Apoptosen

Tabelle 18: Informationsgruppe, Korrelationen zwischen Δ Apoptosen und möglichen Einflussfaktoren.
*Signifikant bei $p < 0,05$.

Information	Δ BMI		Δ Necro		Δ Hcy	
	p	R	p	R	p	R
Δ Apoptose	0,029*	0,405	0,017*	0,44	0,007*	0,488

Tabelle 19: Interventionsgruppe, Korrelationen zwischen Δ Apoptosen und möglichen Einflussfaktoren.
*Signifikant bei $p < 0,05$.

Intervention	Δ Necro	
	p	R
Δ Apoptose	0,000*	0,491

In der Informationsgruppe wurden Korrelationen zwischen Δ Apoptosen und Δ BMI, Δ Necrosen, und Δ Hcy (**Tabelle 18**) gefunden, in der Interventionsgruppe (**Tabelle 19**) zwischen Δ Apoptosen, Δ Necrosen und Δ Vitamin B12.

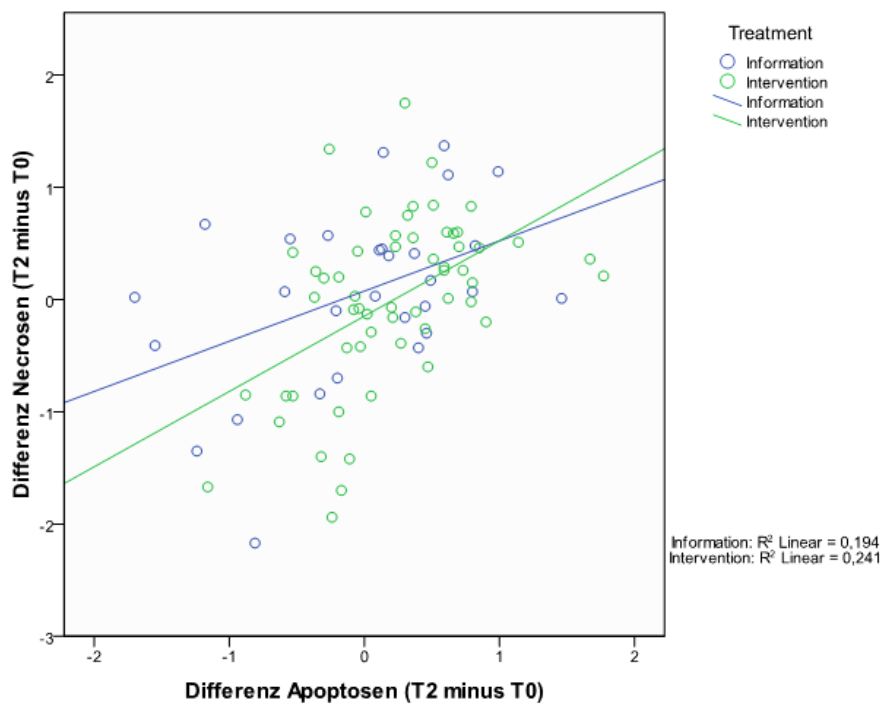


Abbildung 16: Interventions- und Informationsgruppe. Korrelation zwischen Δ Necrose und Δ Apoptose

4.2.2 Necrosen

Abgesehen von der bereits erwähnten Korrelation zwischen Δ Apoptosen und Δ Necrosen (**Abbildung 16**) und der Korrelation zwischen Δ MNi und Δ Necrosen, auf die später eingegangen wird, konnten weder in der Interventions- noch in der Informationsgruppe signifikante Korrelationen zwischen der Veränderung der Necrosenhäufigkeit und möglichen Einflussfaktoren beobachtet werden.

4.2.3 Mikrokerne (MNi)

Tabelle 20: Informationsgruppe, Korrelationen zwischen Δ Mikrokernen und möglichen Einflussfaktoren. *Signifikant bei $p < 0,05$.

Information	Δ NBZ		Δ Necrose	
	p	R	p	R
Δ MNi	0,065	0,347	0,026*	0,413

Tabelle 21: Interventionsgruppe, Korrelationen zwischen Δ Mikrokernen und möglichen Einflussfaktoren. *Signifikant bei $p < 0,05$.

Intervention	Δ BMI		Δ NPBs		Δ NBUDs	
	p	R	p	R	p	R
Δ MNi	0,022*	0,298	0,028*	0,288	0,018*	0,307

In der Informationsgruppe wurden eine signifikante und positive Korrelationen zwischen dem Mikrokernvorkommen und der Necrosenhäufigkeit und eine tendenziell positive Korrelation zwischen Δ MNi und dem Nüchternblutzucker festgestellt (**Tabelle 20**).

Die Interventionsgruppe zeigte eine signifikant positive Korrelation zwischen Δ MNi und Δ BMI, Δ NPBs und Δ NBUDs (**Tabelle 21**).

4.2.4 Bridges (NPBs)

Tabelle 22: Informationsgruppe, Korrelationen zwischen NPBs und möglichen Einflussfaktoren.
*Signifikant bei $p < 0,05$.

Information	Δ NBZ		Δ HbA1c	
	p	R	p	R
Δ NPBs	0,011*	0,463	0,002*	0,558

In der Interventionsgruppe konnten eine signifikant positive Korrelationen ($R = 0,281$) zwischen Δ NPBs und Δ NBUDs festgestellt werden. Die in der Informationsgruppe aufgetretenen Korrelationen sind in **Tabelle 22** dargestellt.

4.2.5 Buds (NBUDs)

Tabelle 23: Informationsgruppe, Korrelationen zwischen NBUDs und möglichen Einflussfaktoren.
*Signifikant bei $p < 0,05$.

Information	Δ BMI	
	p	R
Δ NBUDs	0,055	-0,366

In der Interventionsgruppe konnten keine Korrelationen zwischen Δ NBUDs und möglichen Einflussfaktoren gefunden werden. Die Korrelation in der Informationsgruppe zwischen Δ NBUDs und dem BMI war tendenziell, jedoch mit $p < 0,1$ nahezu signifikant, und ebenfalls negativ (**Tabelle 23**).

4.2.6 Diskussion Korrelationen

Korrelation der mittels CBMN Assay erhobenen Parameter untereinander

Korrelation Δ Apoptosen – Δ Necrosen und Δ MNi – Δ Necrosen

Die Analyse der Daten einer Studie von Crott und Fenech über den Effekt einer Vitamin C-Supplementation auf chromosomale Schäden, zeigte, dass die Frequenz necrotischer Zellen positiv mit der MNi-Häufigkeit und negativ mit der Häufigkeit apoptotischer Zellen korrelierte [CROTT AND FENECH, 1999].

Die negative Korrelation der oben genannten Studie konnte hier nicht bestätigt werden. Ganz im Gegenteil zeigte sich in dieser Studie eine positive Korrelation der beiden Mechanismen des Zelltodes. Die Korrelation war sowohl bei der Informations- als auch bei der Interventionsgruppe zu beobachten.

Dagegen können unsere Ergebnisse die Daten von Crott und Fenech bezüglich der positiven Korrelation zwischen MNi und necrotischen Zellen unterstützen. Bei den Probanden, bei denen die Zahl an MNi von T0 und T2 reduziert wurde, sank auch die Häufigkeit an Necrosen.

Korrelation Δ MNi – Δ NPBs und Δ NBUDs

Die NBUDs charakterisieren sich durch dieselbe Morphologie wie ein MN mit der Ausnahme, dass sie je nach Stadium des Budding-Prozesses durch einen schmalen oder breiten Stiel aus Kernmaterial mit dem Zellkern verbunden sind [FENECH, 2007].

MNi und andere Anomalien des Zellkerns, sowie NPBs und NBUDs sind Biomarker für genotoxische Effekte und chromosomale Instabilität, die oft bei Krebs beobachtet werden [BONASSI et al., 2011].

Eine durch die IAEA veröffentlichte Studie über die Analyse chromosomaler Anomalien zur Dosisbewertung schädlicher Strahlung konnte eine positive Korrelation zwischen NPBs und der MN-Häufigkeit feststellen [IAEA, 1986].

Serrano-Garcia und Montero-Montoya haben an menschlichen Lymphozyten gezeigt, dass NBUDs und MNi simultan, als Folge einer genotoxischen Belastung entstehen. Die beiden Biomarker korrelierten somit positiv miteinander [SERRANO-GARCIA AND MONTERO-MONTOYA, 2001].

Die positive Korrelation zwischen Mikrokernen und NPBs bzw. NBUDs entspricht der Literatur. Außerdem gelten alle drei als Biomarker für genotoxische Ereignisse und treten vermutlich gleichermaßen auf, wenn es zu einer Belastung der Zellen kommt. Bei den NBUDs und MNi spricht man sogar von der gleichen Morphologie.

Korrelation Δ NPBs – Δ NBUDs

Bonassi et al. bestätigten, dass alle drei, MNi, NPBs und NBUDs als Biomarker für genotoxische Ereignisse herangezogen werden können [BONASSI et al., 2011].

Die momentanen Forschungsergebnisse sind unzureichend, um genauer auf diese Korrelation eingehen zu können. Es wird jedoch ein gewisser Zusammenhang zwischen NPBs und NBUDs vermutet, vor allem, da beide als Biomarker für chromosomale Schäden genannt werden. Ihre Entstehung wird vermutlich gleichermaßen durch dieselben Auslöser initiiert.

Korrelation der mittels CBMN Assay erhobenen Parametern und NBZ und HbA1c

Korrelation Δ MNi – Δ NBZ

Bei Frauen mit DMT2 der „Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Studie“ wurden hohe Levels an chromosomalen Anomalien in PBL festgestellt, welche

auch einen direkten Zusammenhang mit dem Risiko eines vorzeitigen, Diabetes-assoziierten Todes zeigten [BOEHM et al., 2008].

Die Korrelation zwischen der Mikrokernanzahl und dem NBZ betrifft in unserer Studie die Informationsgruppe. Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte kein Zusammenhang zwischen einer Reduktion des NBZ oder des HbA1c während der Intervention und der Anzahl an MNi festgestellt werden. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass alle Studienteilnehmer stabile NBZ-Werte aufwiesen und somit metabolisch sehr stabil waren. Die durch die Intervention hervorgerufene Reduktion des HbA1c korrelierte nicht mit der Zahl der MNi.

Korrelation Δ NPB – Δ NBZ und Δ HbA1c

Es wurde eine starke Korrelation zwischen hohen Zuckerkonzentrationen im Serum und DNA Schäden entdeckt [COLLINS et al., 1996].

Um die Korrelation zwischen den NPBs und dem Nüchternblutzucker oder dem HbA1c interpretieren zu können, fehlen weitere Vergleichswerte aus der Literatur. Es gibt bereits Daten, die zeigen dass es einen Zusammenhang zwischen einer hohen Glucosebelastung der Zellen und erhöhten Raten an DNA-Schäden gibt, die mit diesen Ergebnissen bestätigt werden.

Wie bereits bei den MNi beobachtet werden konnte, tritt die Korrelationen zwischen Δ NPBs und Δ NBZ bzw. Δ HbA1c-Wert in dieser Studie nur in der Informationsgruppe auf.

Korrelation der mittels CBMN Assay erhobenen Parametern und Hcy, Folsäure und B12

In einem Review über die Rolle von Folsäure und Vitamin B12 für die genomische Stabilität in menschlichen Zellen berichtet Fenech, dass in vivo Studien zeigten, dass

ein Vitamin-B12-Mangel und erhöhte Plasma-Hcy-Spiegel signifikant mit einer erhöhten MN-Entstehung korrelierten [FENECH, 2001]

Das Ausbleiben einer negative Korrelation der MN-Häufigkeit mit dem Folatstatus in den roten Blutzellen deutet laut Fenech darauf hin, dass entweder die Aufnahmemenge des Vitamins in der Studienpopulation ausreichend war, um die Rate chromosomaler Schäden zu minimieren, oder, wie es bereits in anderen Interventionsstudien mit Folat [BLOUNT AND AMES, 1995; BLOUNT et al., 1997] vermutet wurde, die momentan akzeptierten Aufnahmemengen, die im Blut ausreichen, um vor Anämien zu schützen, auch optimal sind um chromosomale Schäden zu minimieren [FENECH 1999].

Korrelation Δ MNI - Δ Vitamin B12, Δ Folsäurespiegel und Δ Hcy

In unserer Studie konnten wir keine Korrelationen zwischen der MN-Häufigkeit und dem Folsäure-, Vitamin-B12- oder Hcy-Spiegel feststellen. Dies ist dadurch erklärbar, dass sich diese Parameter im Laufe der Studie nicht signifikant veränderten. Zudem war der Großteil der Probanden bereits zu Beginn der Studie ausreichend mit Folsäure versorgt.

Korrelation Δ Apoptosen - Δ Folsäurespiegel und Δ Hcy

Zwischen Δ Apoptosen und Δ Folsäure wurde in dieser Studie keine Korrelation festgestellt. Die benötigte Folsäuremenge um die genomische Stabilität aufrecht zu erhalten war bei den Probanden bereits vorhanden. Die Intervention unserer Studie führte zu keiner Änderung des Folsäurestatus der Probanden, wodurch auch keine Korrelationen zu erwarten waren.

In einer Studie von Fenech konnte beobachtet werden, dass die MN-Häufigkeit in Lymphozyten von Männern positiv und signifikant mit dem Plasma-Hcy korrelierte und die Querschnittsdaten der Studie mit Männern zwischen 50 und 70 Jahren ließen

vermuten, dass erhöhtes Plasma-Hcy ein möglicher Auslöser für chromosomale Schäden und eine wichtige Variable für die MN-Häufigkeit ist [FENECH, 1998].

Unsere Studie zeigte eine positive Korrelation zwischen Δ Apoptose und Δ Hcy in der Informationsgruppe. Das bedeutet, dass bei Probanden, bei denen während der Studie der Hcy-Spiegel zunahm, auch die Häufigkeit der Apoptosen stieg. Die bisherige Literatur ist nicht ausreichend um genauere Interpretationen abzugeben. Jedoch ist es physiologisch erklärbar, dass sich die Apoptosenanzahl mit steigendem Hcy-Spiegel steigert, da auch häufiger Zellschäden eliminiert werden müssen.

In der Interventionsgruppe gab es keine Korrelation mit dem Hcy-Spiegel. Das war auch nicht zu erwarten, da der Hcy-Spiegel während der Intervention konstant blieb.

Korrelation der mittels CBMN Assay erhobenen Parametern und dem BMI

Korrelation Δ Apoptosen - Δ BMI

Des Weiteren wurden positive Korrelationen zwischen Δ Apoptosen und dem Δ BMI festgestellt. Um das Zustandekommen dieser Werte genauer interpretieren und vergleichen zu können sind jedoch weitere Studien und Ergebnisse nötig.

Korrelation Δ MNi – Δ BMI

Übergewicht zeigt einen engen Zusammenhang mit der Entstehung von DMT2 und führt auch zu einem erhöhten Risiko verschiedener Krebsarten [GIOVANNUCCI AND MICHAUD, 2007].

In den Studien von Demirbag et al. und Moran et al. konnte festgestellt werden, dass erhöhte Level genomischer Instabilität (erhöhte Anzahl an MNi und fehlerhafte Chromosomentrennungen), die in Frauen mit dem polyzystischem Ovarialsyndrom

vorhanden sind, positiv mit dem BMI und der Insulinresistenz korrelierten [DEMIRBAG et al., 2006; MORAN et al., 2008].

Auch unsere Studie zeigte eine sehr schwache, aber signifikant positive Korrelation zwischen Δ BMI und Δ MN-Häufigkeit. Nachdem sowohl ein erhöhter BMI als auch ein erhöhtes MN-Vorkommen das Risiko bestimmter Krebsarten erhöhen, war diese positive Korrelation zwischen BMI und MNi zu erwarten.

Korrelation Δ NBUD – Δ BMI

Übergewicht und Adipositas erhöhen das Risiko für Krebsarten der Speiseröhre (Adenokarzinom), des Kolorektums, der Brust (postmenopausal), der Gebärmutter Schleimhaut und der Nieren, der BMI sollte in einem Bereich von 18,5-25 kg/m² gehalten werden und man sollte eine starke Gewichtszunahme im Erwachsenenalter vermeiden [KEY et al., 2004].

Auch hier fehlen weitere Daten, um eine stichhaltige Interpretation zu liefern. Es ist jedoch bekannt, dass Übergewicht das Risiko bestimmter Krebsarten erhöhen kann und dass NBUDs wie MNi als Biomarker für Krebs angesehen werden.

Somit steht das Ergebnis dieser Studie, die tendenziell negative Korrelation zwischen den NBUDs und dem BMI, genau entgegengesetzt der zu erwartenden positiven Korrelation.

Da Korrelation trat nur in der Informationsgruppe auf, wobei sich der BMI während der gesamten Studie nicht signifikant veränderte.

5 SCHLUSSBETRACHTUNG

Bei Typ 2 Diabetikern besteht eine erhöhte Gefahr der oxidativen Schädigung der DNA. Die Hypothese, dass antioxidativ wirksame Nahrungsmittel und die Zufuhr von Folsäure und Vitamin B12 eine schützende und DNA-Stabilisierende Wirkung haben, wurde durch eine Ernährungsintervention bei Typ 2 Diabetikern und gesunden Probanden untersucht und mittels bestimmter Parameter des CBMN Assay auf zellulärer Ebene ausgewertet. Die Ernährungsintervention soll oxidativem Stress entgegenwirken und das durch oxidative DNA-Schäden entstehende Krebsrisiko senken. Somit wäre eine Verminderung der MN-, NPB-, NBUD-Werte und evtl. auch des Hcy-Levels wünschenswert.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigten bei den meisten der untersuchten Parameter keine signifikanten Änderungen.

Im Gegensatz zu anderen Studien, die zum Teil mit Mikronährstoffen „übersupplementierten“ oder auf in vitro-Experimenten beruhten, rief unsere Humanstudie mit moderater Ernährungsintervention keine starken Änderungen der Levels der Mikronährstoffe im Blut der Probanden und somit auch keine deutlichen Änderungen der CBMN-Parameter hervor.

Die Probanden zeichneten sich durch MN-Levels aus, die im oberen Normbereich lagen bzw. diesen teilweise überschritten. Am stärksten war davon die Gruppe der IDDM betroffen, die anderen Gesundheitsgruppen, auch die Gesunden und IFG, folgten jedoch diesem Trend und unterschieden sich kaum von den IDDM.

Dies lässt sich mit der Auswahl der Probanden erklären.

Die gesamte Studienpopulation bestand aus Menschen höheren Alters. Viele von ihnen Diabetiker, die zu erhöhter DNA-Oxidation und somit zur Mikrokernentstehung neigen. Es ist auch bewiesen, dass mit zunehmendem Alter die MN-Häufigkeit steigt, was die erhöhten Werte der Gesunden und der IFG erklärt. Zudem waren die

Probanden in der Gruppe der Gesunden oder der IFG oft Lebenspartner der Diabetiker, was bedeutet, dass alle Gruppen bezüglich der Ernährung und Bewegung möglicherweise einen suboptimalen Lebensstil teilten, der auch zu erhöhten MN-Werten führen kann.

Vorangegangene Studien bestätigen einen positiven Zusammenhang zwischen der MN-Entstehung und dem Alter. Dieser konnte hier nicht untersucht werden, da unsere Studienpopulation eine homogene Altersgruppe höheren Alters bildete. Die steigende MN-Anzahl mit dem Alter bestätigt sich jedoch durch die hohen MN-Werte aller Gesundheitsgruppen.

Dieser Faktor erschwert die Interpretation andere Ergebnisse, wie z.B. den Einfluss des Lebensstils. Dieser ließe sich durch unsere Werte gut belegen, da die Häufigkeit der CBMN-Parameter der Gesunden oder IFG nicht geringer war, als bei den Diabetikern. Jedoch scheint das Alter einflussreicher zu sein und somit sind in diesem Hinblick weitere Studien mit einer gemischteren Studienpopulation zu empfehlen.

Einen Hinweis auf einen möglichen präventiven Schutz konnte die Auswertung der NBUDs liefern, die in der Gruppe der Gesunden und der IFG signifikant durch die Intervention gesunken sind. Dies würde für eine erfolgreiche Primärprävention durch gesunde Ernährung sprechen wobei die Sekundärprävention, bei bereits vorhandener Krankheit, in diesem Fall keine Verbesserung mit sich bringen konnte.

Bei der Auswertung der Mikrokerne zeigte sich, dass es in der Informationsgruppe starke Schwankungen der MN-Anzahl gab, während die Interventionsgruppe stabil blieb. Hier besteht die Möglichkeit, dass die Ernährungsintervention eine gewisse Stabilität hervorgerufen hat. Dies gilt auch für die IDDM, was positiv ist, da eine Stabilität grundsätzlich förderlich für eine gute glykämische Kontrolle ist und somit ein geringeres gesundheitliches Risiko für Diabetiker darstellt.

Am deutlichsten waren die Unterschiede zwischen den Geschlechtern zu erkennen. Diese Entdeckung entspricht auch den Angaben der Literatur.

Bei Mikrokernen und NBUDs, die sich durch eine ähnliche Morphologie auszeichnen, zeigten die Frauen einen höheren Anteil als die Männer. Im Gegensatz dazu wurden bei den Männern mehr Apoptosen und Necrosen festgestellt als bei den Frauen, was für eine negative Korrelation zwischen Apoptosen und Necrosen mit Mikrokernen sprechen würde, die jedoch nicht bewiesen ist.

Die Gruppe der IDDM zeigte fast keinen Unterschied zu den anderen Gesundheitsgruppen. Dies deutet darauf hin, dass die Diabetestherapie keinen Einfluss auf eine Mikrokernentstehung hat.

Wie bereits von Michael Fenech angemerkt, besteht eine Diskrepanz zwischen den Aufnahmemengen bestimmter Mikronährstoffe zur Prävention von Mangelercheinungen und der Dosis zur Verhinderung degenerativer Krankheiten und Krebs durch ihre Schutzwirkung vor chromosomalen Schäden. In diesem Feld besteht großer Forschungsbedarf, insbesondere an Humanstudien, da es grundsätzlich schwierig ist, in Vitro- und Tiermodelle auf den menschlichen Organismus in seiner natürlichen Umgebung zu übertragen. Auch die genauen Wirkmechanismen zum Schutz der DNA-Schädendurch Nährstoffe oder der Auslöser der Mikrokernentstehung sind noch nicht aufgeklärt. Bisher gab es keine vergleichbaren Studien mit Typ 2 Diabetikern bezüglich der MN-Entstehung und einer Ernährungsintervention. Eine Unterteilung von Typ 2 Diabetikern in IDDM und NIDDM in anderen Studien ist bisher nicht bekannt.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Diabetes-Inzidenz steigt weltweit rapide an und durch multivariante Auslöser und diverse Folgeerkrankungen der Stoffwechselkrankheit stellt Diabetes Mellitus (DM) eine der größten Herausforderungen für die Gesundheitssysteme dar. DM kommt zu ca. 90% als Typ 2 Diabetes (DMT2) vor. Durch eine erhöhte Anfälligkeit auf oxidative DNA-Schäden ist auch das Krebsrisiko bei Diabetikern erhöht.

Diese Arbeit versteht sich als ein Teil der DIAPLANT-Studie, welche den Einfluss gesunder Ernährung auf unterschiedliche metabolische Werte bei Patienten mit Typ 2 Diabetes (DMT2) untersucht. Der Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Bewertung der Ernährungsintervention auf zellulärer Ebene anhand der Parameter des Cytokinesis Block Micronucleus Assay (CBMN-Assay) (Apoptosen, Necrosen, Micronuclei (MNi), Nucleoplasmic Bridges (NPBs) und Nucleoplasmic Buds (NBUDs)) in den Lymphozyten. Die Studienpopulation wurde in unterschiedliche Gesundheitsgruppen (insulinpflichtige DMT2 (IDDM) (N = 41), nicht insulinpflichtige DMT2 (NIDDM) (N = 35), GESUND (N = 11) und Patienten mit gestörter Nüchtern glucose (IFG) (N = 12)) eingeteilt. In dieser Arbeit wird die Gruppe der IDDM mit den anderen Gesundheitsgruppen verglichen.

Der CBMN-Assay hat sich zu einer zuverlässigen Methode entwickelt, um DNA-Schäden und somit die Wahrscheinlichkeit einer Krebsentstehung zu bewerten. Ein erhöhtes Vorkommen an MNi ist unterschiedlichen Studien zufolge mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert.

Unterschiedliche Studien berichteten bereits von einer krebspräventiven Wirkung gesunder Ernährung. Einige Studien konnten DNA-stabilisierende Effekte nach der Einnahme von Folsäure und Vitamin B12 und antioxidativen Vitaminen wie Vitamin E feststellen.

Unter diesem Aspekt erhielt die Interventionsgruppe unserer Studie eine Ernährungsintervention aus 300 g Gemüse und 25 g Pflanzenöl. Beide mussten täglich über einen Zeitraum von 8 Wochen verzehrt werden. Am Anfang, am Ende der Intervention, nach 8 Wochen sowie nach 16 Wochen wurde die Studienpopulation auf die CBMN-Parameter und diverse Einflussfaktoren untersucht und die Interventionsgruppe mit der Informationsgruppe, die keine Lebensmittel erhielt, verglichen.

Die Mikrokernhäufigkeit wurde durch die Ernährungsintervention nicht signifikant beeinflusst (MNI Interventionsgruppe **alle Gesundheitsgruppen T0:** $24,62 \pm 10,28$, **T2:** $25,93 \pm 12,23$, **T3:** $26,52 \pm 11,02$; **IDDM T0:** $26,55 \pm 7,41$, **T2:** $29,34 \pm 11,47$, **T3:** $28,77 \pm 8,53$), was auch den Erwartungen entspricht, da sich auch die Einflussfaktoren nicht signifikant geändert haben.

Am deutlichsten zeigten sich die der Literatur entsprechenden Unterschiede der Geschlechter. Bei den Frauen war eine signifikant höhere MN-Frequenz zu erkennen als bei den Männern, welche jedoch mehr Apoptosen und Necrosen als die Frauen zeigten.

Die Gruppe der IDDM zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den Gesundheitsgruppen, was bedeutet, dass die Gemüse- und Ölintervention keinen Einfluss auf die Entstehung von MNI bei insulinpflichtigen DM2 hat.

Schlussendlich sind noch einige Studien auf diesem Gebiet nötig, da viele Fragen wie z.B. die nach den genauen Wirkmechanismen der MN-Entstehung und des Zellschutzes durch Mikronährstoffe bisweilen ungeklärt sind.

7 SUMMARY

The incidence of diabetes is rising rapidly worldwide and by multivariate trigger and various metabolic complications is Diabetes Mellitus (DM) a major challenge for the health systems. DM occurs in about 90% as Type 2 Diabetes (DMT2). By an increased susceptibility to oxidative DNA damage, cancer risk in diabetics is also increased.

This work is one part of the DIAPLANT study, which examined the impact of a healthy diet with different metabolic biomarkers in Type 2 Diabetics (DMT2). The focus of this study is to assess the effects of a nutritional intervention at cellular level on the basis of the parameters of cytokinesis block micronucleus assay (CBMN assay) (apoptosis, necrosis, micronuclei (MNI), nucleoplasmic bridges (NPBs) and nucleoplasmic buds (NBUDs)) in lymphocytes. The study population was divided into different health groups (insulin dependent DMT2 (IDDM) (N = 41), non insulin dependent DMT2 (NIDDM) (N = 35), healthy (N = 11) and patients with an impaired fasting glucose (IFG) (N = 12)). In this work, the group of IDDM was compared to the other health groups.

The CBMN assay has become a comprehensive method to assess DNA damage and thus to predict the likelihood of cancer. Different studies have already shown that a higher incidence of MNI is associated with an increased risk of cancer.

Further cancer-preventive effects of healthy nutrition are evident. Some studies could show DNA-stabilizing effects after consumption of folic acid, vitamin B12 and antioxidant vitamins like vitamin E.

Within this aspect, the intervention group of our study received a dietary intervention with 300 g of vegetables and 25 g of vegetable oil. At baseline and after the intervention of 8 weeks as well as after totally 16 weeks the study population was assessed for CBMN parameters and various confounding factors. The intervention group was compared with the information group which received no food-intervention.

The MNi-frequency was not significantly affected by dietary intervention (MNI intervention group, **all health groups T0:** $24,62 \pm 10,28$, **T2:** $25,93 \pm 12,23$, **T3:** $26,52 \pm 11,02$; **IDDM T0:** $26,55 \pm 7,41$, **T2:** $29,34 \pm 11,47$, **T3:** $28,77 \pm 8,53$), which meets the expectations, since the other influencing factors showed no significant change.

The results demonstrated most clearly the differences between the sexes, which is known from literature. Women had a higher MN-frequency than men, however, men showed more apoptotic and necrotic cells than women.

The IDDM-group showed no significant difference to the healthy groups, which means that the treatment with vegetables and the oil has no influence on the development of MNi in insulin dependent DM2.

However, in order to draw final conclusions, more studies are needed in this area, as many open questions remain such as the mechanisms of MN-formation or cell protection by micronutrients.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 2010; 33: 62-69.
- AMES B N. Micronutrients prevent cancer and delay ageing. Toxicology Letters 1998; 102/103: 5-18.
- 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.
- BAUR D, KLOTSCHED J, HAMNVIK O, SIEVERSG C, PIEPERD L, WITTCHEND 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.
- BLOUNT B C AND AMES B N. DNA damage in folate deficiency. Bailleres Clin. Haematol. 1995; 8 (3): 461–478.
- BLOUNT B C, MACK M M, WEHR C M , MCGREGOR J T, HIATT R A, WANG G, WICKRAMASINGHE S N, EVERSON R B, AMES B N. Folat deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. Proc. Natl Acad. Sci USA 1997; 94: 3290-3295.

- BOEHM B O, MÖLLER P, HÖGEL J. Lymphocytes of type 2 diabetic women carry a high load of stable chromosomal aberrations: a novel risk factor for disease-related early death. *Diabetes* 2008; 57: 2950–2957.
- 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.
- 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.
- 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. R., DUSINSKA M., GEDIK C. M. R., STETINA R.: Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker?. *Environ. Health. Perspect.* 1996; 104: 465–946.
- 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 J W, FENECH M. Effect of vitamin C supplementation on chromosome damage, apoptosis and necrosis ex vivo. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1035–1041.
- CURRIE C J, POOLE C D, GALE E A M. The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2009; 52: 1766-1777.
- DEMIRBAG R, YILMAZ R, GUR M, CELIK H, GUZEL S, SELEK S, KOCYIGIT A. DNA damage in metabolic syndrome and its association with antioxidative and oxidative measurements. *Int. J. Clin. Pract.* 2006; 60: 1187–1193.
- EL-ZEIN R A, FENECH M, LOPEZ M S, SPITZ M R, ETZEL C J. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay biomarkers identify lung cancer cases amongst smokers. *Cancer Epidemiol. Bio- markers Prev.* 2008; 17: 1111–1119.
- EL-ZEIN R, VRAL A, ETZEL C J. Cytokinesis-blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. *Mutagenesis* 2011; vol. 26. no. 1: 101-106.
- ELMADFA I, PARK E. Impact of diets with corn oil or olive/sunflower oils on DNA damage in healthy young men. *European Journal of Nutrition* 1999; vol. 38: 286-292.
- FENECH M, AITKEN C, RINALDI J. Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1163–1171.
- FENECH M, BAGHURST P, LUDERER W, TURNER J, RECORD S, CEPPI M, BONASSI S. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, {beta}-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* 2005; 26: 991–999.

- 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, DREOSTI I E, RINALDI J R. (A) Folate, vitamin B12, homocysteine status and chromosome damage rate in lymphocytes of older men. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1329–1336.
- FENECH M, DREOSTI I, AITKEN C. (B) Vitamin-E supplements and their effect on vitamin-E status in blood and genetic damage rate in peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis* 1997; 18: 359–364.
- FENECH M, FERGUSON L R. Micronutrients and Genomic Stability. *Mutation Research* 2001; 475: 1–6.
- FENECH M, KIRSCH-VOLDERS M, NATARAJAN A T, SURRALLS J, CROTT J W, PARRY J, NORPPA H, EASTMOND D A, TUCKER J D, THOMAS P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 2011; vol. 26 no. 1: 125-132.
- 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. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2007; vol.2 no.5: 1084 – 1104.
- FENECH M. Genome health nutrigenomics and nutrigenetics – diagnosis and nutritional treatment of genome damage on an individual basis. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46: 1365-1370.
- FENECH M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutation Research* 1998; 404: 155 – 165.

- FENECH M. Micronucleus frequency in human lymphocytes is related to plasma vitamin B12 and homocysteine. *Mutation Research* 1999; 428: 299–304.
- FENECH M. Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs). *Food and chemical toxicology: (an international journal published for the British Industrial Biological Research Association)* 2002; 40(8): 1113-7.
- FENECH M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 2000; 455: 81–95.
- FENECH M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. REVIEW. *Mutation Research* 2001; 475: 57–67.
- GAZIEV A I, SOLOGUB G R, FOMENKO L A, ZAICHKINA S I, KOSYAKOVA N I, BRADBURY R J. Effect of vitamin-antioxidant micronutrients on the frequency of spontaneous and in vitro gamma-ray- induced micronuclei in lymphocytes of donors: the age factor. *Carcinogenesis* 1996; 17: 493–499.
- GIOVANNUCCI E AND MICHAUD D. The role of obesity and related metabolic disturbances in cancers of the colon, prostate, and pancreas. *Gastroenterology* 2007; 132: 2208-25.
- 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.
- GREENROD W, STOCKLEY C S, BURCHAM P, ABBEY M, FENECH M. Moderate acute intake of de-alcoholized red wine, but not alcohol, is protective against radiation-induced DNA damage ex vivo—results of a comparative in vivo intervention study in younger men. *Mutat. Res.* 2005; 591.
- HSIA K T, MILLAR M R, KING S, SELFRIDGE J, REDHEAD N J, MELTON D W, SAUNDERS P T. DNA repair gene Ercc1 is essential for normal spermatogenesis and oogenesis

and for functional integrity of germ cell DNA in the mouse. *Development* 2003; 130 (2): 369– 378.

IAEA. Biological dosimetry: chromosomal aberrations analysis for dose assessment. Technical Reports Series no. 260, International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, 1986: 13–27.

IARMARCOVAI G, BONASSI S, BOTTA A, BAAN R A, ORSIÈRE T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutation Research* 2008; 658: 215–233.

JIN Z, GAO F, FLAGG T, DENG X. Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone promotes functional cooperation of Bcl2 and c-Myc through phosphorylation in regulating cell survival and proliferation. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 40209–40219.

KASPER H. Diabetes mellitus. In: *Ernährungsmedizin und Diätetik*, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München. 2004, 277-299.

KIRSCH-VOLDERS M, BONASSI S, HERCEG Z, HIRVONEN A, MÖLLER L, PHILLIPS D H. Gender-related differences in response to mutagens and carcinogens. *Mutagenesis* 2010; 25: 213–221.

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.

LIU L, BLASCO M, TRIMARCHI J, KEEFE D. An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development. *Dev. Biol.* 2002; 249 (1): 74–84.

- 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.
- MIGLIORE L, MOLINU S, NACCARATI A, MANCUSO M, ROCCHI A, SICILIANO G. Evaluation of cytogenetic and DNA damage in mitochondrial disease patients: effects of coenzyme Q10 therapy. Mutagenesis 2004; 19: 43–49.
- 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.
- MORAN L J, NOAKES M, CLIFTON P M, NORMAN R J, FENECH M. Genome instability is increased in lymphocytes of women with polycystic ovary syndrome and is correlated with insulin resistance. Mutation Research 2008; 639: 55–63.
- NARULA A, KILEN S, MA E KROEGER J, GOLDBERG E, WOODRUFF T K. Smad4 overexpression causes germ cell ablation and leydig cell hyperplasia in transgenic mice. Am. J. Pathol. 2002; 161 (5): 1723–1734.

- 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.
- ÖSTERREICHISCHE GESELLSCHAFT FÜR DIABETES. Diabetes Dunkelziffer von 30% verursacht unnötiges Leid und Kosten. Presseaussendung, 2011.
- 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.
- SCHNEIDER M, DIEMER K, ENGELHART K, ZANKL H, TROMMER W E, BIESALSKI H K. Protective effects of vitamins C and E on the number of micronuclei in lymphocytes in smokers and their role in ascorbate free radical formation in plasma. *Free Radic. Res.* 2001; 34: 209–219.
- SERRANO-GARCIA L, MONTERO-MONTOYA R. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events, *Environ. Mol. Mutagen.* 2001; 38: 38–45.
- 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.
- STATISTIK AUSTRIA: ZIELONKE N. Krebsinzidenz und Krebsmortalität in Österreich. Statistik Austria 2010.

- 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; vol. 26 no. 1: 69-76.
- UMEGAKI K, IKEGAMI S, INOUE K, ICHIKAWA T, KOBAYASHI S, SOENO N, TOMABECHI K. Beta-carotene prevents x-ray induction of micronuclei in human lymphocytes. *Am. J. Clin. Nutr.* 1994; 59: 409–412.
- VIGNERI P, FRASCA F, SCIACCA L, PANDINI G, VIGNERI R. Diabetes and Cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2009; 16: 1103-1123.
- VINSON R K, HALES B F. DNA repair during organogenesis. *Mutation Research* 2002; 509 (1–2): 79–91.
- WORLD HEALTH ORGANISATION (2011): Diabetes Fact sheet N°312, URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>.
Zugriff: 13.02.2011
- WU J, SALISBURY C, GRAHAM R, LYONS G, FENECH M. Increased consumption of wheat biofortified with selenium does not modify biomarkers of cancer risk, oxidative stress, or immune function in healthy Australian males. *Environ. Mol. Mutagen.* 2009; 50: 489–501.
- 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.

ZÚÑIGA-GONZÁLEZ G M, BATISTA-GONZÁLEZ C M, GÓMEZ-MEDA B C, RAMOS-IBARRA M L, ZAMORA-PEREZ A L, MUÑOZ-MAGALLANES T, RAMOS-VALDÉS C, GALLEGOS-ARREOLA M P. Micronuclei in diabetes: folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model. *Mutation Research* 2007; 634: 126-134.

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Name:	Marie Therese Katharina Bulla
Geburtsdatum:	05.04.1982
Familienstand:	ledig

AUSBILDUNG

03/2004 - 07/2011	Studium Ernährungswissenschaften/Universität Wien
09/1999 - 06/2002	Klenze-Gymnasium München, Abitur
09/1992 - 07/1999	Gymnasium Starnberg
09/1988 - 07/1992	Ferdinand Maria Grundschule, Starnberg

BERUFSERFAHRUNGEN UND PRAKTIKA

06/2009 – 10/2009	Praktikum im Bereich Hospital Care/Marketing, Baxter Deutschland GmbH, München-Unterschleißheim, Deutschland
08/2008 – 09/2008	Laborpraktikum am Institut für Immunologie des Universitäts-Klinikums Schleswig-Holstein, Kiel, Deutschland
07/2008 – 08/2008	Praktikum: Bearbeitung von Verzehresstudien und Kontaminantenschätzung für Risikobewertung und Auswertung der Daten für Nationale Verzehrsstudie (NVS) am Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland
10/2006 – 02/2007	Tutorium für die Lehrveranstaltung „Chemische Übungen für Biologen und Ernährungswissenschaftler“ am chemischen Institut der Universität Wien, Österreich