

Aus der Abteilung Innere Medizin/Endokrinologie
des Klinikums Benjamin Franklin
der Freien Universität Berlin
(Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Oelkers)
eingereicht über
das Institut für Veterinär-Biochemie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Der Einfluß von Vitamin C und Vitamin E
auf die Nebennierenrindenfunktion beim Meerschweinchen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Katharina Möbius
Tierärztin aus Berlin

Berlin 1997
Journal-Nr. 2148

**Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Klaus Hartung
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Hans-Jörg Risse
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Oelkers

Tag der Promotion: 13. Februar 1998

Jede Schwierigkeit bedeutet immer auch eine Chance.

A. Einstein

***Meinen Eltern und
„Herrn Schulz“
in Dankbarkeit***

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS..... I

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....IV

1. EINLEITUNG 1

2. LITERATUR (STAND DER FORSCHUNG)..... 2

2.1 Die Nebenniere..... 2

 2.1.1 Geschichte 2

 2.1.2 Morphologie 2

 2.1.3 Gefäßversorgung..... 3

 2.1.4 Wachstum und Regeneration..... 5

2.2 Steroidbiosynthese in der Nebenniere..... 6

2.3 Regulation der adrenalen Steroidsekretion 12

 2.3.1 Das Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-System..... 12

 2.3.2 Das Renin-Angiotensin-System (RAS) 14

2.4 Funktionelle Zonierung der Nebennierenrinde 16

2.5 Lipidperoxidation und biologische Antioxidantien in der Nebennierenrinde..... 19

2.6 Rolle der Vitamine C und E in der Nebennierenrinde..... 21

 2.6.1 Vitamin C 22

 2.6.2 Vitamin E..... 26

3. FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT 30

4. MATERIAL UND METHODEN 31

4.1 Tierexperimente..... 31

 4.1.1 Tiere 31

 4.1.2 Spezialdiäten..... 31

 4.1.3 Stoffwechselkäfige 33

 4.1.4 Natrium-Verarmung..... 33

 4.1.5 ACTH-Behandlung 33

4.1.6 Narkose, Blut- und Organentnahme.....	34
4.2 Versuchsaufbau	35
4.2.1 Vorversuche.....	35
4.2.2 Hauptversuch Vitamin-C-Verarmung mit Pilotstudie	36
4.2.3 Hauptversuch Vitamin-E-Verarmung mit Pilotstudie	38
4.2.4 Pilotstudie kombinierte Vitamin-E- und Vitamin-C-Verarmung	40
4.3 Analysen.....	41
4.3.1 Radioimmunologische Steroidbestimmung von Cortisol und Aldosteron im Plasma.....	41
4.3.2 Immunoradiometrische Plasma-ACTH-Bestimmung	42
4.3.3 Plasma-Renin-Aktivität (PRA)	43
4.3.4 Photometrische Vitamin-C-Analytik in Serum und Gewebe	44
4.3.5 Vitamin-E-Bestimmung in Serum und Gewebe mittels HPLC (Hochleistungs- Flüssigchromatographie).....	45
4.3.6 Elektrolytbestimmung	47
4.4 Statistik	47
5. ERGEBNISSE	48
5.1 Hauptversuch Vitamin-C-Verarmung mit Pilotstudie.....	48
5.1.1 Vitamin-C-Verarmung, klinischer Verlauf und Vitamin-C-Konzentrationen	48
5.1.2 Vitamin E in Serum und Gewebe.....	52
5.1.3 Plasma-Cortisol und -Aldosteron.....	53
5.1.4 Plasma-ACTH und Plasma-Renin-Aktivität (PRA)	54
5.1.5 Serum-Natrium und -Kalium	55
5.1.6 Elektrolyt-Ausscheidung (Urin-Natrium und -Kalium).....	56
5.2 Hauptversuch Vitamin-E-Verarmung mit Vorversuch und Pilotstudie zur kombinierten Vitamin-E- und Vitamin-C-Verarmung	57
5.2.1 Vitamin-E-Verarmung, klinischer Verlauf und Vitamin-E-Konzentrationen	57
5.2.2 Vitamin C in Serum und Gewebe.....	60
5.2.3 Plasma-Cortisol und -Aldosteron.....	62
5.2.4 Plasma-ACTH und Plasma-Renin-Aktivität (PRA)	63

5.2.5 Serum-Natrium und -Kalium	64
5.2.6 Elektrolyt-Ausscheidung (Urin-Natrium und -Kalium)	65
6. DISKUSSION.....	67
6.1 Diskussion der Methoden: Tierexperimente.....	67
6.1.1 Tiere, Diäten, Handling	67
6.1.2 Stoffwechselkäfige	68
6.1.3 Narkose, Blut- und Organentnahme.....	69
6.2 Diskussion der Methoden: Analytik	70
6.2.1 Radioimmunologische Steroidbestimmung im Plasma	70
6.2.2 Immunoradiometrische ACTH-Bestimmung im Plasma	70
6.2.3 Plasma-Renin-Aktivität (PRA)	71
6.2.4 Photometrische Vitamin-C-Analytik in Serum und Gewebe	71
6.2.5 Vitamin-E-Bestimmung mittels HPLC in Serum und Gewebe	72
6.2.6 Elektrolytbestimmung	72
6.3 Diskussion der Ergebnisse	73
6.3.1 Hauptversuch der Vitamin-C-Verarmung	73
6.3.2 Hauptversuch der Vitamin-E-Verarmung	75
6.3.3 Besonderheiten in der Nebennierenrindenfunktion des Meerschweinchens	77
6.3.4 Mögliche Wirkungsweise von Vitamin C und Vitamin E auf die Aldosteron- Sekretion in der Nebennierenrinde	78
6.4 Schlußfolgerung	80
7. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	81
Zusammenfassung	81
Summary.....	82
8. LITERATURVERZEICHNIS	84
ANHANG	98

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
ACE.....	Angiotensin-Converting-Enzym
Acetyl-CoA	acetyliertes Coenzym A
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon, Corticotropin
cAMP.....	3', 5'-cyclo-Adenosinmonophosphat
cDNA.....	copy-Desoxyribonucleinsäure (-acid)
CRH.....	Corticotropin-Releasing-Hormon
DOC	11-Desoxycorticosteron
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
GSH.....	Glutathion
HPLC.....	High Pressure Liquid Chromatography
I. E.	Internationale Einheiten
i. m.	intramuskulär
IRMA.....	Immunoradiometrischer Assay
KG	Körpergewicht
LDL.....	Low density lipoprotein (Lipoproteine niedriger Dichte)
ME.....	metabolizable Energy (Umsetzbare Energie)
mRNA.....	messenger-Ribonucleinsäure (-acid)
NAD ⁺ /NADH.....	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidierte/reduzierte Form)
NADP/NADPH.....	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (oxidierte/reduzierte Form)
P450c11 β	11 β -Hydroxylase (CYP11B1)
P450c11AS	Aldosteron-Synthase (CYP11B2)
P450c17	17 α -Hydroxylase
P450c21	21-Hydroxylase
P450scc.....	Side-chain-cleavage-Enzym
POMC.....	Proopiomelanocortin
PRA	Plasma-Renin-Aktivität
RAS	Renin-Angiotensin-System
RIA	Radioimmunoassay
s. c.	subcutan
SD.....	standard deviation (Standardabweichung)
SEM.....	Standard error of the mean (Standardabweichung vom Mittelwert)
UPM	Umdrehungen pro Minute
Vit.	Vitamin
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG

Die Nebenniere ist eine kleine, lebenswichtige hormonelle Drüse. Paarig angelegt befindet sie sich in unmittelbarer Nachbarschaft zur Niere. Strukturell und funktionell läßt sich die Nebenniere in zwei Anteile untergliedern, das Mark und die Rinde. Während das sympathisch innervierte Mark mit den Katecholaminen Adrenalin und Noradrenalin die Anpassung des Organismus an kurzfristige Belastungszustände bewirkt, greift die Rinde mittels Steroidhormonen mittel- und langfristig in viele Körperfunktionen ein. Von außen nach innen besteht die Nebennierenrinde aus drei verschiedenen Zonen: Die Zona glomerulosa liegt unmittelbar unter der Organkapsel und bildet das Mineralocorticoid Aldosteron, das über die Regulation der Natrium- und Kaliumausscheidung in der Niere die Wasser- und Elektrolytbalance des Körpers und den Blutdruck beeinflusst. Die Zona fasciculata als breiteste Rindenschicht sezerniert unter ACTH-Einfluß Glucocorticoide, die mit ihrem Hauptvertreter, dem Cortisol, eine vielfältige Rolle z. B. im Stoffwechsel, Immungeschehen und Wachstum spielen. In der innersten Zellschicht, der Zona reticularis, werden Androgene und Östrogene gebildet. In Kultur wandeln sich die Zellen der Glomerulosa unter ACTH-Stimulation langfristig in Faszikulata-Zellen um, doch die funktionelle Differenzierung der Nebennierenrindenzellen *in vivo* ist noch immer ungeklärt.

Die antioxidativ wirksamen Vitamine C (Ascorbinsäure) und E (α -Tocopherol) sind in der Nebenniere außergewöhnlich hoch konzentriert. Während das wasserlösliche Vitamin C im Cytosol angereichert wird, kommt das fettlösliche Vitamin E überwiegend in den Membranen vor. Der Entdifferenzierungsprozeß von Glomerulosa-Zellen in Kultur, der sich durch Verlust der Aldosteron-Synthesekapazität auszeichnet, kann durch Zugabe von Ascorbinsäure aufgehalten werden und wird durch Addition von Cortisol beschleunigt. Hornsby und Crivello (1983b) postulierten, daß Cortisol und andere Steroide als Pseudosubstrate an die Cytochrom P450-Enzyme gebunden werden, ohne selbst hydroxyliert zu werden. In nachfolgenden Blindzyklen kommt es zur Bildung reaktiver Sauerstoffradikale, die in der Umgebung zur Lipidperoxidation führen. Lipidperoxide und Sauerstoffradikale können wiederum Enzyme oxidativ zerstören. Staats und Colby (1987) fanden, daß sich die von außen nach innen zunehmende Konzentration an Lipidperoxiden in der Nebennierenrinde umgekehrt proportional zu der Vitamin-E-Konzentration verhält.

Ob die antioxidative Wirkung der beiden Vitamine C und E auch *in vivo* eine Rolle bei der funktionellen Zonierung der Nebennierenrinde spielt, sollte diese Arbeit beim Meer-schweinchen, das wie der Mensch auf die exogene Vitamin-C-Zufuhr angewiesen ist, klären.

2. LITERATUR (STAND DER FORSCHUNG)

2.1 Die Nebenniere

2.1.1 Geschichte

Die Nebennieren wurden 1563 von Bartholomaeus Eustachius als besonderes Organ am kranialen Nierenpol beim Menschen entdeckt und nach ihrer anatomischen Lage benannt (Glandulae suprarenalis). Thomas Addison beschrieb fast 300 Jahre später, nämlich 1855, das nach ihm benannte klinische Bild der Nebennieren-Insuffizienz. Durch beidseitige Adrenalektomie bei verschiedenen Versuchstieren bestätigte Charles Brown-Séquard im folgenden Jahr Addisons Theorie, daß die Nebennieren lebensnotwendig sind. Klinische Bedeutung erlangte diese Erkenntnis erst im 2. Drittel dieses Jahrhunderts, als nach und nach die Isolierung von lebenserhaltenden Extrakten aus der Nebennierenrinde und Strukturaufklärung ihrer Steroide erfolgte, die 1953 mit der Isolierung des Aldosterons durch Simpson *et al.* abgeschlossen wurde. Weitergehende Erkenntnisse über Regulation und Wirkungsweise der adrenalen Steroide und die Herstellung potenter synthetischer Analoga ermöglichten einen bis heute unvermindert anhaltenden vielfältigen therapeutischen Einsatz. (Für einen historischen Überblick siehe Orth *et al.* 1992).

2.1.2 Morphologie

Jede Nebenniere besteht aus zwei ursprünglich getrennten Organen, die sich im Laufe der Phylogenese unter einer gemeinsamen Organkapsel vereinigt haben (Thun und Schwartz-Porsche 1994). So umgibt die Nebennierenrinde bei den Säugetieren konzentrisch das **Nebennierenmark**, das mit seinen chromaffinen Zellen als modifiziertes Ganglion dem Sympathikus zuzuordnen ist. Auf nervale Reize aus dem ZNS werden die in Sekretgranula gespeicherten Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin sezerniert, die eine schnelle Anpassung des Organismus an akute Notfallsituationen bewirken. Die **Nebennierenrinde** macht etwa 75% des Volumens der Nebenniere aus und läßt sich morphologisch und funktionell von außen nach innen in drei verschiedene Zonen unterteilen: Unter der bindegewebigen Organkapsel liegt die relativ schmale **Zona glomerulosa**, deren

verhältnismäßig kleine, acidophile Zellen bei den meisten Säugern knäuelartige Epithelformationen bilden, bei Hund und Pferd jedoch eher arkadenförmig angeordnet sind (Smollich 1985). Die Glomerulosazellen synthetisieren hauptsächlich Mineralocorticoide, die mit ihrem wichtigsten Vertreter, dem Aldosteron, den Natrium-, Kalium- und Wasserhaushalt des Körpers regulieren. Die mittlere Rindenschicht, die **Zona fasciculata**, nimmt als breiteste Zone allein etwa 50 % der Nebenniere ein. Ihre Zellen ziehen in Strängen radiär zur Organoberfläche und enthalten besonders viel Cholesterol. Der Lipidgehalt ist einerseits tierartspezifisch, andererseits vom Funktionszustand der Nebennierenrinde abhängig (Smollich 1985). In der Faszikulata werden die Glucocorticoide synthetisiert, die in vielfältiger Weise in Stoffwechsel, Entzündungs- und Immungeschehen sowie Wachstum eingreifen. An das Mark grenzt die schmale **Zona reticularis**, die sich durch netzartig miteinander verbundene Zellbalken auszeichnet. Ihre Zellen sind kompakter und reich an Lipofuszin-Granula. Sie ist Syntheseort für Nebennierenandrogene wie z. B. Dehydroepiandrosteron und sein Sulfat, deren Funktion beim Gesunden zur Zeit intensiv untersucht wird. Obwohl die Zona reticularis beim Meerschweinchen bis zu zwei Drittel des Volumens der Nebennierenrinde ausmachen kann, korreliert ihre Größe bei dieser Spezies nicht mit der Androgenproduktion, denn letztere ist minimal und bedeutungslos (Nishikawa und Strott 1984).

Bisher galt nur das Nebennierenmark als innerviert, doch sind auch in der Nebennierenrinde Nervenfasern gefunden worden, die vermutlich als Modulatoren bei der Regulation der Steroidsynthese wirken (Charlton 1990). Ein weiterer Hinweis für eine weniger strikte Trennung zwischen Mark und Rinde der Nebenniere ist die Entdeckung chromaffiner Zellen in allen drei Zonen der Rinde. Sie modulieren dort wahrscheinlich parakrin die Biosynthese der Steroide (Bornstein *et al.* 1991).

2.1.3 Gefäßversorgung

Die Nebenniere verfügt über eine einzigartige Gefäßversorgung (*Abb. 2.1*): Die Blutzufuhr erfolgt von der Kapsel aus zentripetal in Richtung Mark. Die Nebennierenarterien treten durch die Kapsel in die Rinde ein, bilden einen subkapsulären Plexus und verzweigen sich weiter in radiäre Kapillaren, die in den tieferen Schichten der Faszikulata in ein dichtes sinusoidales Netzwerk übergehen. Im Mark laufen die Sinusoide zu Venen zusammen und finden in der Zentralvene ihren Abfluß. Einige Markarterien durchdringen jedoch unverzweigt Kapsel und

2. Literatur

Rinde, um erst im Mark ein unabhängiges Netzwerk von Sinusoiden zu bilden, die ebenfalls in die Zentralvene münden. Damit wird eine zweite Versorgung des Nebennierenmarks unabhängig von der Steroidkonzentration des Nebennierenrindenblutes gewährleistet (Levine und Morita 1985, Junqueira und Carneiro 1986).

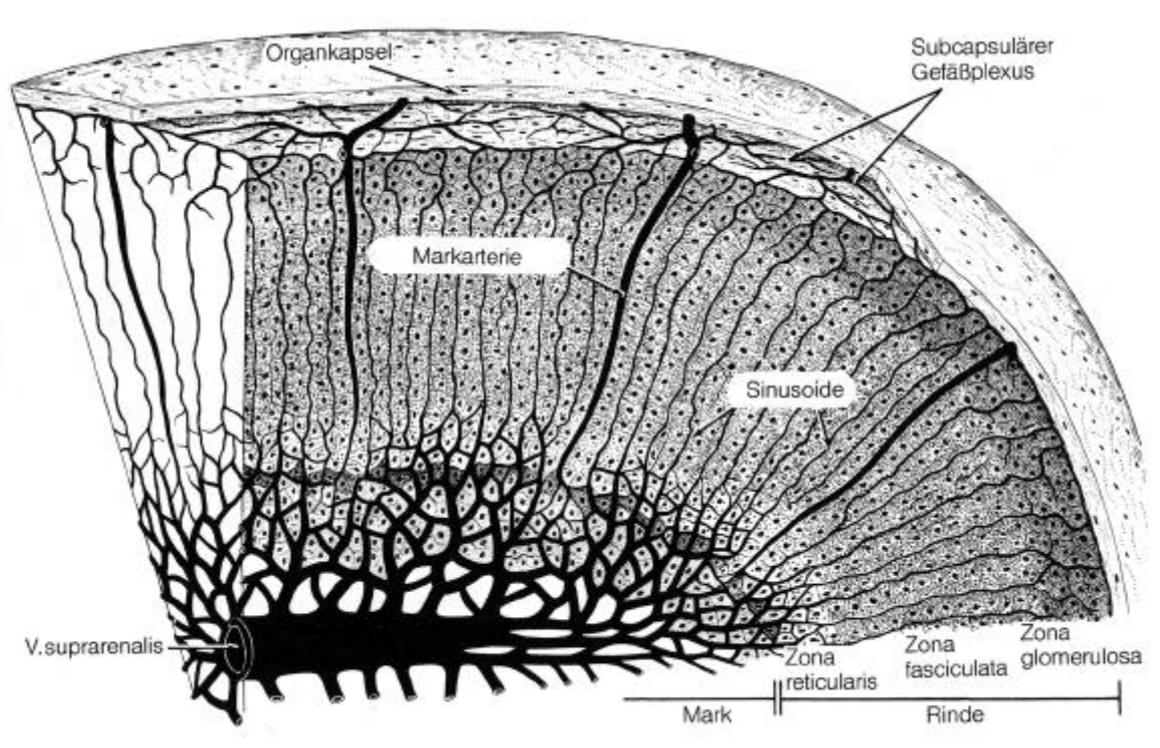


Abbildung 2.1: Gliederung und Gefäßversorgung der Nebenniere. Die Nebenniere ist von einer Organkapsel umgeben und besteht aus der Rinde mit Zona glomerulosa, fasciculata und reticularis und aus dem Mark. Der Blutfluß erfolgt zentripetal: Die Arterien treten an der Kapsel ein und bilden einen subcapsulären Plexus, der sich, arterielle Sinusoide bildend, weiter in Richtung Mark aufzweigt, wo sie in venöse Sinusoide übergehen, die in der zentralen Vene ihren Abfluß finden. Einige Arterien führen direkt ins Mark (Markarterien) und verzweigen sich erst dort zu sinusoidalen Kapillaren, so daß das Nebennierenmark eine doppelte Gefäßversorgung erhält. (nach Junqueira und Carneiro 1986).

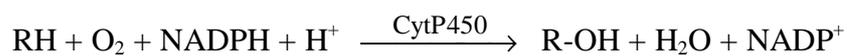
2.1.4 Wachstum und Regeneration

Ähnlich wie die Gefäßversorgung erfolgt auch das Zellwachstum der Nebennierenrindenzellen bei Regenerationsvorgängen zentripetal (Hornsby und Crivello 1983b, Hornsby 1987, Orth *et al.* 1992). Als jüngste Zellen der Rinde gelten die Zellen der Zona glomerulosa, wo überwiegend Mitosen zu finden sind. Bei ihrer zentripetalen Wanderung differenzieren sich die meisten Glomerulosa-Zellen zu Faszikulata-Zellen, die die Fähigkeit zur Aldosteronsynthese bereits verloren haben und nun Glucocorticoide bilden (Hornsby *et al.* 1974). In der Zona reticularis, die wiederum aus den inneren Zellen der Zona fasciculata hervorgegangen ist, sieht man häufiger morphologische Äquivalente des Zelluntergangs, da dies die ältesten Zellen der Nebennierenrinde sind. Als Zeichen der Zellalterung haben die Retikularis-Zellen viele Lipofuszin-Granula eingelagert. Durch chronische ACTH-Stimulation wandeln sich Ratten-Glomerulosa-Zellen in Kultur phänotypisch in Faszikulata-Zellen um (Hornsby *et al.* 1974), und die inneren Faszikulata-Zellen konvertieren zu Retikularis-Zellen (Neville und O'Hare 1985), so daß die Grenzschichten zwischen den Zonen jeweils als äußeres (Glomerulosa/Faszikulata) bzw. inneres (Faszikulata/Retikularis) Transformationsfeld angesehen werden (Hornsby 1987). Mitani *et al.* entdeckten 1994 eine indifferente Stammzellschicht in der Nebennierenrinde der Ratte zwischen der Zona glomerulosa und Zona fasciculata, die weder Gluco- noch Mineralocorticoide synthetisiert. Da sich die normalerweise fünf bis zehn Schichten umfassenden Zellen der Zwischenschicht einerseits bei diätetischer Natrium-Verarmung auf vier bis fünf Schichten verringern, andererseits eine Migration der Zellen in die Zonen der Faszikulata und Retikularis nachgewiesen wurden, wird angenommen, daß es sich hier um die „Brut-“ bzw. Stammzellen der Nebennierenrinde bei der Ratte handelt.

Schon lange wurde eine Volumenänderung der Nebennierenrinde aufgrund veränderter Breiten ihrer einzelnen Zonen beobachtet, die der Regulation der Steroidsynthese morphologisch Ausdruck verleihen (Hornsby 1987, Orth *et al.* 1992): Unter längerer ACTH-Stimulation kommt es zunächst zu Zellhypertrophie und -hyperplasie in der Zona fasciculata und später zur allgemeinen Rindenhypertrophie, während die Zona glomerulosa schmaler wird. Diese Veränderungen sind jedoch nach Beendigung der ACTH-Zufuhr reversibel. Chronische Angiotensin II-Stimulation bzw. diätetische Natrium-Restriktion wiederum rufen eine Hypertrophie der Zona glomerulosa mit gesteigerter Aldosteron-Sekretion hervor, ohne die Breite oder Funktion der Faszikulata zu beeinflussen.

2.2 Steroidbiosynthese in der Nebenniere

Steroidhormone besitzen ein Sterangerüst als Grundstruktur und werden aus Cholesterol synthetisiert, das in den Vesikeln der Nebennierenrindenzellen als Cholesterolester gespeichert wird. Das Cholesterol wird zu 80 % Rezeptor-vermittelt aus den Low-Density-Lipoproteinen (LDL) des Bluts aufgenommen, kann aber auch in den Nebennieren aus Acetyl-CoA hergestellt werden. Bei mangelndem LDL-Angebot scheinen auch beim Meerschweinchen die Glomerulosa-Zellen vermehrt auf die *de novo*-Synthese angewiesen zu sein, während Faszikulata-Zellen auf ihre Cholesterol-Speicher zurückgreifen müssen (Black 1987). Die Synthese der Steroide erfolgt in mehreren aufeinanderfolgenden Enzymreaktionen und wird überwiegend von Cytochrom P450-Enzymen katalysiert, die im Komplex mit Kohlenmonoxid ein Absorptionsmaximum bei 450 nm aufweisen. Sie bestehen aus etwa 500 Aminosäuren und besitzen eine Hämgruppe im aktiven Zentrum. Die Cytochrom P450-Enzyme sind Teil einer Elektronen-Transport-Kette, durch die Elektronen von NADPH über intermediäre Proteine auf Sauerstoff übertragen werden. Sie fungieren als Monooxygenasen und katalysieren folgende Hydroxylierungs-Reaktionen: Nach Aktivierung von molekularem Sauerstoff gelangt ein Sauerstoffatom des O₂-Moleküls in das Substrat, das andere wird unter Bildung von Wasser reduziert (Miller 1988, Stryer 1990).



Je nach intrazellulärer Lokalisation der Cytochrom P450-Enzyme sind am Elektronen-Transport verschiedene Systeme beteiligt: In den Mitochondrien, wo das Side-chain-cleavage-Enzym (P450scc), die 11β-Hydroxylase (P450c11β) und Aldosteron-Synthase (P450c11AS) an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, wird jeweils ein Elektronenpaar von NADPH auf ein Flavoprotein, die Adrenodoxin-Reduktase, übertragen, das ebenfalls mit der inneren Membran assoziiert ist. Die Adrenodoxin-Reduktase transferiert ihrerseits die Elektronen auf Adrenodoxin, ein in der Mitochondrienmatrix gelöstes und somit mobiles Eisen-Schwefel-Protein. Dieses überträgt die Elektronen dann auf die membranständigen Cytochrom P450-Enzyme. Die Adrenodoxin-Reduktase und Adrenodoxin dienen allen mitochondrialen P450-Enzymen als Elektronen-Shuttle, nicht nur den steroidogenen. Bei den mikrosomalen Cytochrom P450-Enzymen, der 17α-Hydroxylase (P450c17) und 21-Hydroxylase (P450c21), die an das glatte endoplasmatische Retikulum gebunden sind,

übernimmt ein anderes Flavoprotein, die P450-Reduktase, zwei Elektronen vom NADPH und gibt sie nacheinander direkt an die Cytochrome P450 weiter. Während das erste Elektron sehr schnell übertragen wird, erfolgt der Transfer des zweiten Elektrons, das auch von Cytochrom b_5 stammen kann, langsam. Da die 17α -Hydroxylase und 21-Hydroxylase in großem Überschuß zu der P450-Reduktase vorliegen, konkurrieren sie um denselben Elektronenpool (Übersicht bei Miller 1988, Orth *et al.* 1992).

Die Biosynthese der Nebennierensteroiden wird in Abbildung 2.2 (*s. Seite 9*) dargestellt: Die Konversion von Cholesterol zu Pregnenolon ist der erste, geschwindigkeitsbestimmende und hormonell regulierte Schritt in der Synthese aller Steroidhormone (Miller 1988). Drei aufeinanderfolgende chemische Reaktionen (20α -Hydroxylierung, 22-Hydroxylierung und die Abspaltung der Seitenkette zwischen C20 und C22) werden im Mitochondrium von einem einzigen Cytochrom, dem **Side-chain-cleavage-Enzym (P450_{scc})**, katalysiert. Pregnenolon wird ins Cytosol transportiert und kann dort zwei verschiedene Wege gehen: entweder wird es durch die mikrosomale **3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 β -HSD)** zu Progesteron dehydrogeniert und isomerisiert, oder aber durch die mikrosomale **17 α -Hydroxylase (P450_{c17})** zu Hydroxypregnenolon hydroxyliert.

Da die 17α -Hydroxylase aber erst in der Zona fasciculata unter ACTH-Einfluß exprimiert wird, nimmt dieses Enzym eine Schlüsselrolle bei der Synthese von Nebennieren-Steroidhormonen ein: Mineralocorticoide werden in der Zona glomerulosa bei fehlender P450_{c17}-Aktivität gebildet. In den tieferen Zonen entstehen durch 17α -Hydroxylierungen bei Mensch und Meerschweinchen die Glucocorticoide mit Cortisol als Hauptvertreter. Bei zusätzlicher 17,20-Lyase-Aktivität der 17α -Hydroxylase erfolgt die Synthese von C19-Steroiden in der Zona reticularis. Ob nach der 17α -Hydroxylierung eines Steroidmoleküls noch der Seitenkettenrest zwischen C17 und C20 abgespalten wird, scheint vom Angebot an Elektronen abzuhängen; nur wenn genügend Elektronen von der P450-Reduktase oder vom Cytochrom b_5 zur Verfügung gestellt werden, kann der C19-Syntheseweg beschritten werden (Yanagibashi und Hall 1986). Bei der Ratte wird die 17α -Hydroxylase in der Nebenniere überhaupt nicht exprimiert, so daß bei dieser Spezies Corticosteron das wichtigste Glucocorticoid darstellt und keine Nebennierenandrogene gebildet werden (Hornsby 1987).

Durch Katalyse der ebenfalls mikrosomalen **21-Hydroxylase (P450_{c21})** werden Progesteron und 17-OH-Progesteron an Position 21 zu 11-Desoxycorticosteron (DOC) *resp.*

2. Literatur

11-Desoxycortisol hydroxyliert. Der letzte Schritt in der Glucocorticoid-Synthese wird in allen drei Zonen von der **11 β -Hydroxylase (P450c11 β)** an der inneren Mitochondrienmembran katalysiert. Dabei erfolgt die Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol und 11-Desoxycorticosteron zu Cortisol *resp.* Corticosteron.

Beim Meerschweinchen scheint die Steroidproduktion nicht so strikt an die einzelnen Zonen der Nebenniere gebunden zu sein. Brody und Black (1991) haben in frisch isolierten Zellen und in Zellkulturen der Nebennierenrinde vom Meerschweinchen auch in Glomerulosa-Zellen geringe Mengen an 17 α -Hydroxylase, Cortisol und Androgenen gefunden, deren Konzentrationen sich durch kurzzeitige ACTH-Zugabe steigern ließen. Da sich die einzelnen Zellschichten nur schwer voneinander trennen lassen, können allerdings Verunreinigungen mit Zellen anderer Zonen zu diesen Ergebnissen geführt haben. Diverse Untersuchungen mit isolierten mitochondrialen bzw. mikrosomalen Fraktionen von Nebennierenrindenzellen (Zonae glomerulosa und fasciculata *versus* Zona reticularis) belegen andererseits, daß Cortisol und auch Androstendion beim Meerschweinchen überwiegend in den äußeren Zonen gebildet wird (Hyatt *et al.* 1983, Eacho und Colby 1985). Dabei wiesen die beteiligten Cytochrom P450-Enzyme regional unterschiedliche Aktivitäten auf: Das Side-chain-cleavage-Enzym, die 17 α -Hydroxylase und 11 β -Hydroxylase sind weitaus aktiver in den äußeren Zonen, während die 21-Hydroxylase in der Zona reticularis größere Aktivität zeigte (Eacho und Colby 1983, 1984). *In vivo*-ACTH-Stimulation über 6 Tage ließ den zonalen Unterschied weitgehend verschwinden (Colby *et al.* 1992). Die lokale Aktivität der 11 β -Hydroxylase wird vermutlich durch bisher unbekannte Faktoren reguliert, da sie in den äußeren Zonen wesentlich aktiver ist, obwohl die Konzentration an Proteinen und Cytochrom P450 und die Affinität für 11-Desoxycortisol in der äußeren Zone (Zonae glomerulosa und fasciculata) und inneren Zone (Zona reticularis) gleich ist, und die Substratbindung in der inneren Zone sogar höher ist (Colby und Eacho 1985).

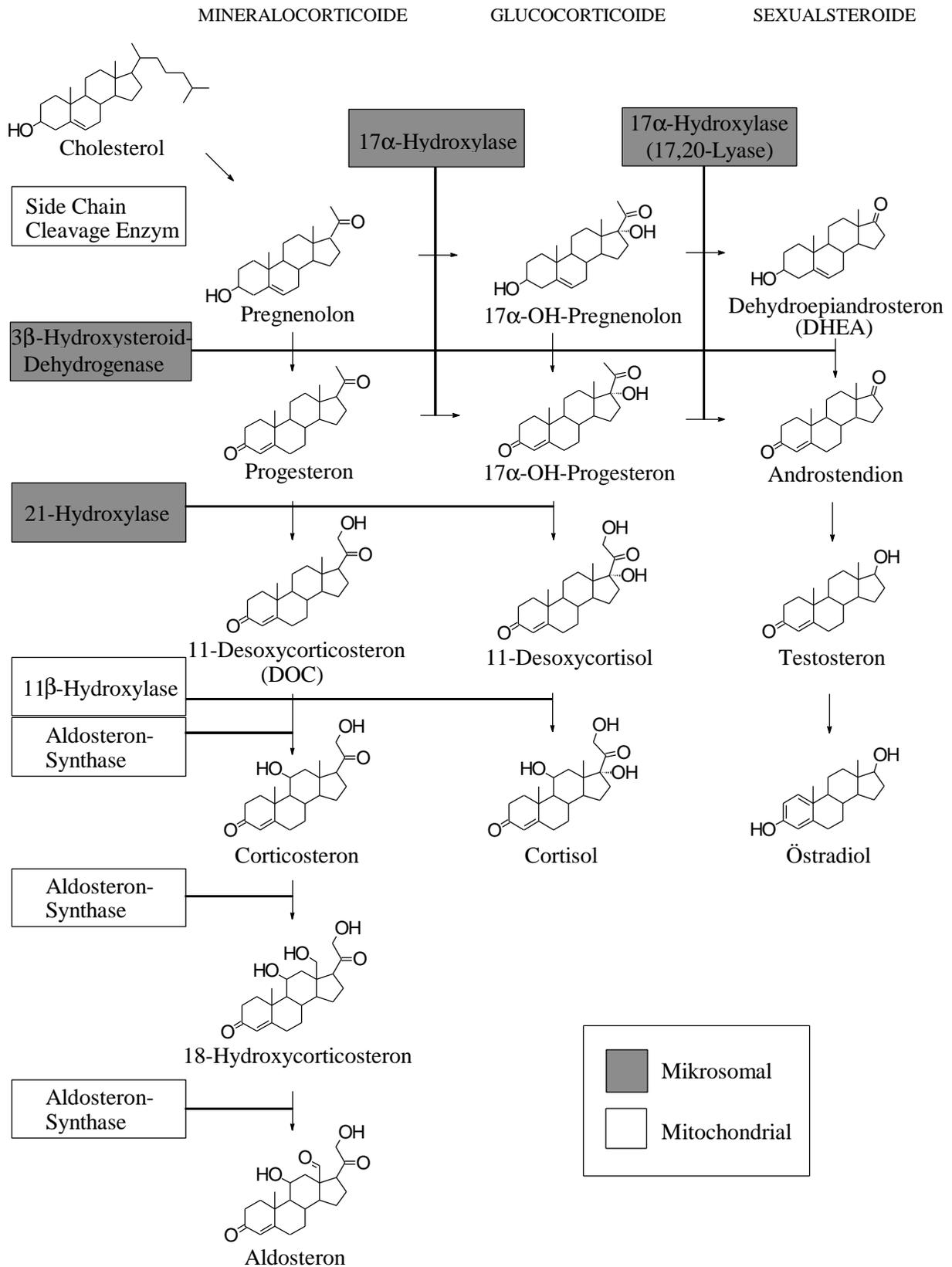


Abbildung 2.2: Die adrenale Steroidsynthese.

2. Literatur

Für die Synthese des Aldosterons aus 11-Desoxycorticosteron in der Zona glomerulosa sind drei aufeinanderfolgende Schritte nötig: 11 β -Hydroxylierung, 18-Hydroxylierung und 18-Methyl-Oxidation zum Aldehyd. Beim Rind werden alle drei Schritte von einem mitochondrialen Enzym katalysiert, das mit der **11 β -Hydroxylase (P450c11 β)** identisch ist (Yanagibashi *et al.* 1986), aber nur in der Zona glomerulosa und nicht in der Zona fasciculata Aldosteron zu produzieren vermag. Hall *et al.* (1991) vermuten, daß die 11 β -Hydroxylase bei Rind und Schwein in der Zona fasciculata durch den Einfluß der inneren Mitochondrienmembran selbst an der Aldosteron-Synthese gehindert wird, da reine Enzym-Extrakte aus beiden Zonen gleiche Aktivität bei der Konversion von DOC zu Aldosteron zeigen.

Der letzte Schritt in der Aldosteron-Synthese, die Oxidation an C18 zum Aldehyd, scheint in maximaler Aktivität nur möglich zu sein, wenn über eine zusätzliche Elektronen-Transport-Kette der äußeren Mitochondrienmembran weitere Reduktionsäquivalente zur Verfügung gestellt werden. Dabei werden die Elektronen von NADH über ein Flavoprotein und ein Cytochrom b auf die Semidehydroascorbat-Reduktase übertragen, die ihrerseits Semidehydroascorbat zu Ascorbat reduziert (Abb. 2.3). Der Weg des Elektronenflusses von Ascorbat, das somit an der äußeren Mitochondrienmembran generiert wird, zur Aldosteron-Synthese an der inneren Mitochondrienmembran bleibt ungeklärt (Natarajan und Harding 1985, Yanagibashi *et al.* 1990).

Bei der Ratte konnten Ogishima *et al.* (1989) zwei verschiedene Cytochrome P450 für die 11 β - und 18-Hydroxylierungen nachweisen. Während das eine, 49,5 kDa große Protein nur Corticosteron oder 18-OH-11-Desoxycorticosteron aus DOC durch 11 β -Hydroxylierung *resp.* 18-Hydroxylierung synthetisieren konnte, katalysierte das andere, 51,5 kDa große Enzym die Multihydroxylierungsreaktionen von DOC zu den (Zwischen-)Produkten Corticosteron, 18-OH-11-Desoxycorticosteron, aber auch 18-OH-Corticosteron und Aldosteron. Damit entspricht nur das erste Enzym der 11 β -Hydroxylase (P450c11 β), und das zweite Protein einer spezifischen **Aldosteron-Synthase (P450c11AS)**, deren cDNA bei der Ratte inzwischen auch kloniert worden ist (Imai *et al.* 1990). Die 11 β -Hydroxylase (P450c11 β) kommt bei der Ratte normalerweise nur in der Faszikulata und Retikularis vor, wird aber nach längerer ACTH-Stimulation auch in der Glomerulosa exprimiert (Ogishima *et al.* 1992, Ho und Vinson 1993). Hingegen wird die Aldosteron-Synthase nur in der Zona glomerulosa gefunden. Nach

diätetischer Natrium-Verarmung oder erhöhter Kalium-Zufuhr erhöht sich sowohl die Anzahl der Glomerulosa-Zellschichten (Ogishima *et al.* 1992) als auch der mRNA-Gehalt für die Aldosteron-Synthase (Tremblay *et al.* 1992). Auch beim Menschen (Kawamoto *et al.* 1990, Curnow *et al.* 1991) und der Maus (Domalik *et al.* 1991) existiert eine eigenständige Aldosteron-Synthase. Beim Meerschweinchen konnte bisher trotz *in vivo*-Stimulation durch Natrium-arme Diät und Kalium-reiche Tränke nur ein Enzym (P450c11 β) aus der Nebenniere kloniert und exprimiert werden, das zwar zur Glucocorticoid-Synthese, nicht aber zur Aldosteron-Synthase fähig war (Bülow *et al.* 1996). Ob darüberhinaus auch beim Meerschweinchen noch eine Aldosteron-Synthase existiert, wird zur Zeit von der Arbeitsgruppe untersucht.

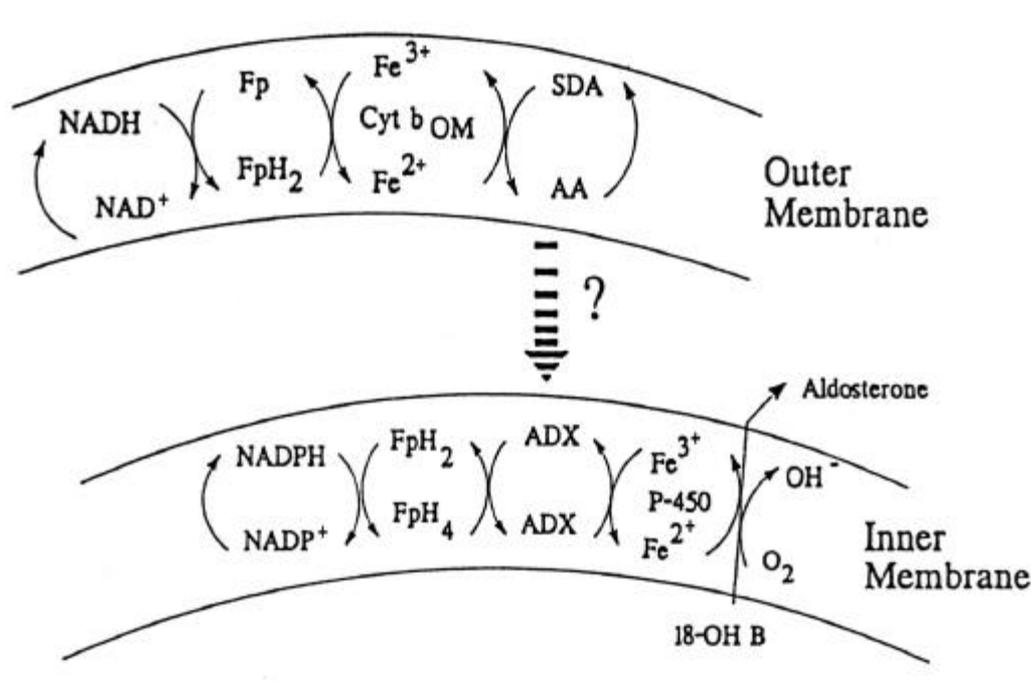


Abbildung 2.3: Elektronentransport in den Mitochondrien für die Aldosteron-Synthese. Bei der Aldosteron-Synthese werden die Reduktionsäquivalente über zwei Elektronen-Transport-Ketten bereitgestellt: An der inneren Mitochondrienmembran werden die Elektronen regulär von NADPH über ein Flavoprotein (FpH₂) und Adrenodoxin (ADX) auf das Häm (Fe³⁺) des Cytochrom P450 (P-450) übertragen, das letztendlich auch die Umwandlung von 18-OH-Corticosteron (18-OH-B) zu Aldosteron katalysiert. Über ein postuliertes zusätzliches Transport-System an der äußeren Mitochondrienmembran werden für den letzten Syntheseschritt auch weitere Elektronen über Ascorbat (AA) zur Verfügung gestellt. Sie stammen von NADH und werden über ein anderes Flavoprotein (FpH₂) und Cytochrom b auf die Semidehydroascorbat-Reduktase übertragen, die Semidehydroascorbat (SDA) zu Ascorbat (AA) reduziert. (nach Hall *et al.* 1991).

2.3 Regulation der adrenalen Steroidsekretion

2.3.1 Das Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-System

Die Regulation der Glucocorticoid-Synthese wird durch ein neuroendokrines System gesteuert, bei dem Hypothalamus, Hypophyse und Nebennierenrinde zu einem geschlossenen Regelkreis mit Rückkopplung (Feedback) zusammengeschaltet sind (Übersicht bei Thun und Schwartz-Porsche 1994, Orth *et al.* 1992). Auf nervale Stimuli des Gehirns, z. B. bei Streß, werden vom paraventriculären Nucleus des Hypothalamus das **Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH)**, ein Peptidhormon aus 41 Aminosäuren, an das Pfortadersystem der Hypophyse abgegeben. CRH bewirkt über Membranrezeptoren im Vorderlappen der Hypophyse eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel mit nachfolgender Sekretion des **Adrenocorticotropen Hormons (ACTH)**. ACTH ist ein Polypeptid aus 39 Aminosäuren und wird von einem großen Vorläufermolekül, dem Proopiomelanocortin (POMC) abgespalten. Die ersten 18 Aminosäuren des ACTH sind für seine biologische Wirksamkeit essentiell, und die Sequenz 1-24 galt bisher als hochkonserviert, da Spezies-Unterschiede nur zwischen Aminosäure 25-39 gefunden wurden. Beim Meerschweinchen haben Smith *et al.* (1987) im Vergleich zum menschlichen ACTH neben einem Aminosäure-Austausch in Position 29 auch eine Veränderung an Position 24 gefunden. Letztere soll für eine supraagonistische Wirksamkeit bei der Stimulation der Aldosteron-Produktion in Ratten-Glomerulosa-Zellen verantwortlich sein. Neuere Untersuchungen von Robinson *et al.* (1995) bestätigen zwar die außergewöhnliche Struktur des Meerschweinchen-ACTHs, erreichen aber - bei geringfügig niedrigerem K_M -Wert - nur eine dem humanen ACTH vergleichbare Maximalantwort bei der Stimulation von Corticosteron und Aldosteron in Bioassays mit Faszikulata/Retikularis- resp. Glomerulosa-Zellen von Ratten.

Die primäre **Wirkung von ACTH** auf die Nebennierenrinde stellt die Steigerung der Cortisol-Synthese dar und geht mit einer Verminderung der Cholesterin-Speicher einher (Übersicht bei Orth *et al.* 1992). Da Steroidhormone in der Nebenniere nicht gespeichert werden, entspricht die Syntheserate der Sekretionsrate. ACTH entfaltet seine Wirkung über spezifische Membranrezeptoren, die sich auf allen Zellen der Nebennierenrinde finden und das Adenylatcyclase-System aktivieren. Innerhalb von Minuten wird als Kurzeffekt die Konversion von Cholesterin zu Pregnenolon über eine Aktivierung des Side-chain-cleavage-

Enzyms, dem Schlüsselenzym der Steroidsynthese, gefördert. Die Langzeiteffekte des ACTH setzen erst nach Stunden oder Tagen ein und fördern die Synthese der meisten steroidogenen Enzyme wie P450_{scc}, P450_{c17}, P450_{c21} und P450_{c11β} über eine erhöhte Synthese der zugehörigen mRNAs. Außerdem steigen die Konzentrationen von weiteren Proteinen an, die für die Steroidsynthese benötigt werden, wie z. B. die LDL-Rezeptoren, Adrenodoxin und das Sterol Carrier Protein 2, das den Transport des Cholesterols von den intrazellulären Speichern zu den Mitochondrien übernimmt. ACTH stimuliert auch das Wachstum (Hypertrophie und Hyperplasie) der Nebenniere, nachdem es bereits frühzeitig die Durchblutung erhöht. Für die normale Steroidgenese ist ACTH essentiell. Es ist zur Aufrechterhaltung der normalen Größe der Nebennieren notwendig, wenn auch für sich allein nicht ausreichend.

Durch die produzierten Glucocorticoide, v. a. die Cortisol-Konzentration im Plasma, wird eine **Rückkopplung** zu den übergeordneten Zentren hergestellt. In der Hypophyse wird sowohl die ACTH-Sekretion als auch die POMC-Gen-Transkription gehemmt. Im Hypothalamus vermindern Glucocorticoide die mRNA- und Peptidkonzentrationen von CRH und verhindern den stimulatorischen Effekt von CRH auf die Transkription des POMC-Gens und die akute ACTH-Sekretion. Ein schneller Feedback-Effekt tritt innerhalb von Sekunden bis Minuten auf und ist dem Anstieg der Plasma-Cortisol-Konzentration proportional, während der langsame Rückkopplungseffekt erst nach Stunden bis Tagen in Erscheinung tritt und proportional zum Plasma-Spiegel der Glucocorticoide ist. Letzterer wird vermutlich über den Glucocorticoid-Rezeptor vermittelt (Orth *et al.* 1992). Auch ein unmittelbarer negativer Feedback-Mechanismus auf die Cortisol-Produktion selbst wird diskutiert, da exogenes Cortisol *in vitro* einen hemmenden Effekt auf die ACTH-stimulierte Cortisol-Sekretion kultivierter Nebennierenzellen vom Meerschweinchen besitzt, der jedoch durch höhere ACTH-Dosen überspielt werden kann. Der Mechanismus ist unklar, jedoch könnte eine Pseudosubstrat-Reaktion (*s. u.*) des Cortisols mit der 11β-Hydroxylase (P450_{c11β}) die Ursache sein, da die Synthese von 11-Desoxycortisol nicht betroffen ist (Pham-Huu-Trung *et al.* 1984).

ACTH wird pulsatil sezerniert und unterliegt einer **circadianen Rhythmik** des Hypothalamus, die vornehmlich durch den Hell-Dunkel-Rhythmus bestimmt wird. Die höchsten Plasma-Spiegel werden bei tagaktiven Wesen morgens erreicht, beim Meerschweinchen ergibt sich ein biphasisch diurnaler Rhythmus mit den Maxima vier bis acht Stunden nach dem Lichtwechsel (Wilbur und Walker 1977). Generell ändert sich die

2. Literatur

Amplitude, nicht aber die Frequenz der ACTH-Ausschüttung, die von Peaks des Plasma-Cortisols gefolgt werden. Aufgrund der längeren Halbwertszeit des Cortisols im Vergleich mit ACTH fallen die Cortisol-Peaks flacher ab (Orth *et al.* 1992). Sowohl der Feedback-Mechanismus als auch der circadiane Rhythmus können durch akuten physiologischen und psychologischen Streß überspielt werden (Thun und Schwartz-Porsche 1994).

2.3.2 Das Renin-Angiotensin-System (RAS)

Die Synthese des potentesten Mineralocorticoids Aldosteron wird - im Gegensatz zur ACTH-abhängigen Sekretion der Glucocorticoide - durch ein komplexes multifaktorielles System reguliert, dem Renin-Angiotensin-System. Dabei sind Angiotensin II und die Plasmakonzentrationen von Kalium (und Natrium) die wichtigsten Regulatoren, während ACTH die Sekretion des Aldosterons nur kurzfristig (weniger als 24 Stunden) zu stimulieren vermag (Aguilera 1993). Länger anhaltende ACTH-Stimulation führt bei Mensch (Oelkers 1985), Schaf (McDougall *et al.* 1980) und Ratte (Müller 1978, Aguilera *et al.* 1981) zu einer deutlichen Suppression der Aldosteron-Sekretion (Aldosteron Turn-Off Phänomen). Beim Meerschweinchen sind die Ergebnisse nach 7 Tagen ACTH-Stimulation widersprüchlich: acht Stunden nach der letzten Injektion war das Plasma-Aldosteron erhöht, aber 24 Stunden danach erniedrigt (Provencher *et al.* 1992). Die Aldosteron-Synthese kann auf zwei Ebenen moduliert werden: Der erste geschwindigkeitsbestimmende Schritt betrifft die Umwandlung von Cholesterol zu Pregnenolon, also das Side-chain-cleavage-Enzym. Das zweite Schlüsselenzym ist die Aldosteron-Synthase (P450c11AS), die die Umwandlung von Corticosteron zu Aldosteron katalysiert (Orth *et al.* 1992).

Renin, ein proteolytisches Enzym, wird auf folgende Stimuli aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere ins Blut freigesetzt: Natrium-Mangel, Hypovolämie, Blutdruckabfall und renale sympathische Reize. Zirkulierendes Angiotensinogen (Renin-Substrat) der Leber wird daraufhin durch Renin zu **Angiotensin I**, einem Dekapeptid, gespalten, das wiederum sehr schnell vorwiegend in der Lunge vom Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) in ein Oktapeptid, das **Angiotensin II**, umgewandelt wird. Angiotensin II wirkt stark vasopressorisch und stimuliert über spezifische Membranrezeptoren in der Zona glomerulosa sowohl das Side-chain-cleavage-Enzym als auch die Aldosteron-Synthase und somit die Biosynthese des Aldosterons. Seine Wirkung entfaltet das Angiotensin II nicht über

Stimulation der Adenylatcyclase wie ACTH, sondern über Aktivierung der Phospholipase C und Hydrolyse von Phosphatidylinositol-Bisphosphat mit nachfolgender Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration. Da die Plasma-Renin-Konzentration der limitierende Faktor im RAS ist, unterliegt sie einem negativen Rückkopplungsmechanismus. Die Freisetzung des Renins wird direkt durch Angiotensin II und Hypokalämie und indirekt über Aldosteron durch Steigerung der Natrium-Rückresorption und Plasmavolumen-Expansion gehemmt. Dabei bewirkt Aldosteron in den distalen Tubuli und den Sammelrohren der Niere die passive Natrium-Reabsorption über eine erhöhte Anzahl geöffneter Natrium-Kanäle in der apikalen Membran der Epithelien. Gleichfalls wird die Kalium-Exkretion durch spezifische Kalium-Kanäle gesteigert. Aldosteron fördert auch die Synthese der Na^+/K^+ -ATPase in den basolateralen Zellmembranen und schafft somit den elektrochemischen Gradienten für die passive Diffusion (White 1994).

Während die verschiedensten Faktoren *in vitro* die Aldosteron-Synthese beeinflussen, modulieren folgende den Effekt von Angiotensin II auf die Zona glomerulosa erwiesenermaßen *in vivo* (Aguilera 1993): Diätetische **Natrium-Verarmung** stimuliert einerseits über das RAS die Aldosteron-Sekretion, andererseits erhöht sie die Sensitivität der Glomerulosa gegenüber Angiotensin II, indem sie zumindest bei der Ratte die Zahl der Angiotensin II-Rezeptoren erhöht. **Kalium** stimuliert die Aktivität und mRNA-Expression der Aldosteron-Synthase wie Angiotensin II über eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration, jedoch durch Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle. Außerdem scheint Kalium die intraadrenale Reninaktivität (s. u.) in der Glomerulosa zu fördern. Auch **Serotonin** potenziert die Wirkung von Angiotensin II auf die Aldosteron-Synthase, vermutlich durch Steigerung des Calcium-Einstroms. **ANP (Atriales Natriuretisches Peptid)** hemmt die Aldosteron-Sekretion sowohl direkt über eine Suppression seiner Biosynthese als auch indirekt über eine Hemmung der Renin-Sekretion. Letztendlich soll auch **Dopamin** die Sensitivität der Glomerulosa gegenüber Angiotensin II herabsetzen.

In der Nebenniere von Ratten wurde ein **lokales, gewebesständiges RAS** nachgewiesen, dem autokrine oder parakrine Einflüsse auf die Regulation der Mineralocorticoid-Synthese zugeschrieben werden (White 1994). Offensichtlich wird jedoch nur die basale Expression der mRNA der Aldosteron-Synthase (P450c11AS) über das lokale Renin-Angiotensin-System reguliert, während die Regulation der Expression von P450scc, P450c11 β und P450c11AS mRNAs durch ACTH unberührt bleibt (Sander *et al.* 1994).

2. Literatur

2.4 Funktionelle Zonierung der Nebennierenrinde

Aufgrund der außergewöhnlichen Morphologie und Gefäßversorgung der Nebennierenrinde lag es nahe, die Voraussetzungen für ihre funktionelle Zonierung in der unmittelbaren Umgebung der Zellen selbst zu suchen. So vermuteten Greep und Deane bereits 1949, daß der zentripetale Blutfluß in der Nebennierenrinde für einen Gradienten sorgt, der die gleichfalls zentripetal wandernden Zellen einer variierenden Mikroumwelt aussetzt, und so die unterschiedliche morphologische und funktionelle Differenzierung in den drei Zonen bewirkt. Hornsby und Crivello (1983b) entwickelten auf dieser Basis eine Theorie, die davon ausgeht, daß die in der Nebennierenrinde gebildeten Steroide (v. a. die Glucocorticoide) selbst einen Gradienten bilden und die Aktivität der Cytochrom P450-Enzyme in der Steroidsynthese beeinflussen. Schließlich besitzt das Blut in den effluenten Nebennierenvenen eine etwa 100fach höhere Konzentration an Glucocorticoiden als das afferente arterielle Blut (*Abb. 2.4*) (Levine und Morita 1985, Hornsby 1987).

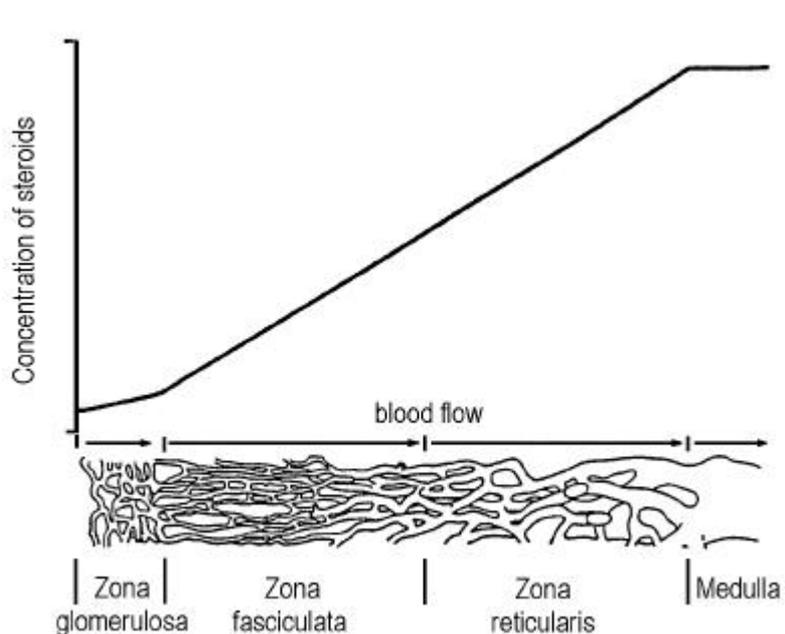


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Steroidgradienten im Blutgefäßsystem der Nebennierenrinde. Die Steroidkonzentration steigt in Richtung des Blutflusses der Nebenniere von außen (Zona glomerulosa) nach innen (Mark = Medulla) steil an. (nach Hornsby 1987).

Bovine Glomerulosa-Zellen verlieren in Kultur bald ihre Fähigkeit, Aldosteron zu synthetisieren. Sie gehen morphologisch und funktionell in Faszikulata-Zellen über. ACTH-Stimulation verursacht einen Verlust der Aldosteron-Synthase-Aktivität, während die Aktivität der 17α -Hydroxylase stark ansteigt (Hornsby 1987). Dieser Prozeß wird durch die Zugabe von Cortisol und anderen Steroiden wie Desoxycortisol, Desoxycorticosteron, Androstendion, Testosteron und ihre 11β -Hydroxy-Derivate beschleunigt, während Antioxidantien wie Dimethyl-Sulfoxid oder Butyl-Hydroxyanisol, Ascorbat und ferner ein verminderter Sauerstoffpartialdruck den Vorgang verlangsamen, ihn aber nicht völlig aufhalten können (Hornsby 1980, Crivello *et al.* 1983, Hornsby *et al.* 1985). Hornsby und Crivello (1983b) vermuten daher, daß Cortisol als Pseudosubstrat an die Aldosteron-Synthase gebunden wird, aber aus sterischen oder chemischen Gründen nicht hydroxyliert werden kann. Statt dessen werden Sauerstoffradikale (wahrscheinlich Superoxid) gebildet, während Enzym und Pseudosubstrat unverändert aus dem Zyklus hervorgehen (*Abb. 2.5*). Die Sauerstoffradikale initiieren Lipidperoxidation (Hornsby und Crivello 1983a), und die gebildeten Lipidperoxide schädigen dann das Enzym, indem sie es irreversibel inaktivieren oder zerstören. So könnten *in vivo* zunehmende Cortisol-Konzentrationen an der Grenze von Zona glomerulosa und Zona fasciculata für eine Zerstörung der besonders empfindlichen Aldosteron-Synthase durch Lipidperoxide verantwortlich sein. Ähnliche Mechanismen könnten auch an der Grenze zwischen Zona fasciculata und Zona reticularis bei noch höheren Steroidkonzentrationen durch eine vermehrte Inaktivierung der - an sich für Steroid-Cytochrom P450-Interaktionen weniger empfindlichen - 11β -Hydroxylase und 21-Hydroxylase die bevorzugte Synthese der C19-Steroide bewirken. Die 17α -Hydroxylase zeigt sich völlig unempfindlich gegenüber hohen Steroidkonzentrationen, ist aber hochempfindlich gegenüber den zerstörerischen Effekten von Lipidperoxidation (Imataka *et al.* 1985, Staats und Colby 1987). Der Abbau der zerstörten Enzyme erfolgt durch intrazelluläre Proteasen. Die Reste des Eiweißabbaus und v. a. die Endprodukte der Lipidperoxide finden sich in den vielen Lipofuszin-Granula der Retikularis-Zellen wieder, die somit zellulär die Vorgänge erfolgreich besiegt Lipidperoxidation bezeugen.

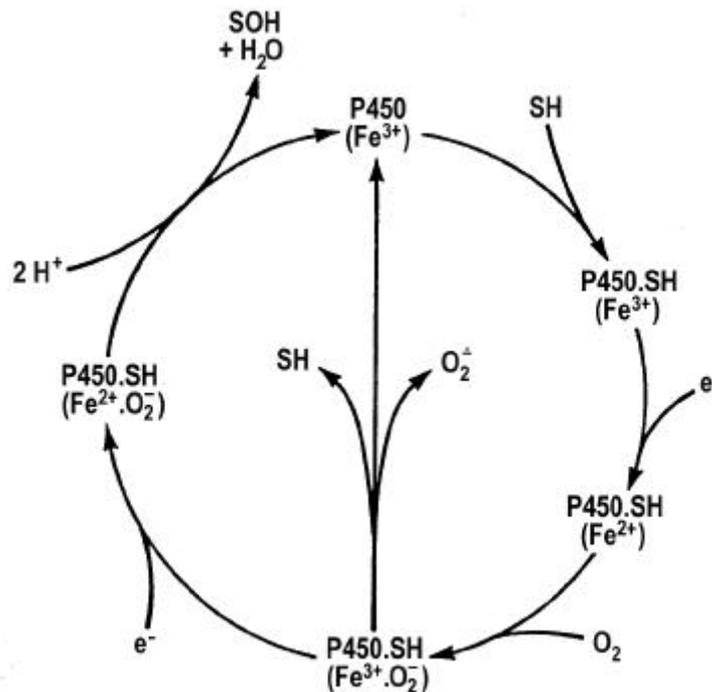


Abbildung 2.5: Mechanismus der Pseudosubstrat-Cytochrom P450-Interaktionen bei der Bildung von Sauerstoffradikalen. Substrate oder Pseudosubstrate (Produkte) (SH) werden vom Häm (Fe³⁺) des Cytochrom P450 gebunden und bilden nach Aufnahme eines Elektrons (e⁻) zusammen mit molekularem Sauerstoff einen (Pseudo)substrat-P450-O₂-Komplex. Während das Substrat nach Aufnahme eines zweiten Elektrons unter der Bildung von Wasser zum Produkt (SOH) hydroxyliert wird, zerfällt der Komplex im Falle eines Pseudosubstrates zum unveränderten Pseudosubstrat (SH) und Enzym (P450 Fe³⁺), wobei Superoxid (O₂⁻) entsteht. (nach Hornsby und Crivello 1983b).

Für die Theorie der Pseudosubstrate als Regulatoren der funktionellen Zonierung und gegen eine Rezeptor-vermittelte oder genomische Regulation der Expression der Cytochrom P450-Enzyme sprechen folgende Befunde (Hornsby 1986, 1987): Die Effekte der Pseudosubstrate treten unmittelbar nach Pseudosubstrat-Zugabe ein und sind i. d. R. erst nach 24 Stunden abgeschlossen. Sie sind unabhängig von Proteinsynthese und Rezeptor-Bindungsaffinität, auch werden viel höhere Konzentrationen an Pseudosubstraten benötigt, als für eine Sättigung der Rezeptoren bekannt sind. Pseudosubstrate sind schlechte Inhibitoren von Enzymen, der Aktivitätsverlust der Cytochrom P450-Enzyme ist irreversibel. Eine „Regeneration“ des Enzyms kann nur durch erneute Induktion, z. B. durch ACTH erfolgen. Die Wirkung der Pseudosubstrate wird erheblich abgeschwächt in Gegenwart von reversiblen

Inhibitoren oder Antioxidantien; während letztere die Bildung destruktiver Radikale vermindern, verhindern erstere vermutlich die Bindung des Pseudosubstrats an das Enzym. Enzym-Inhibitoren könnten jedoch auch über eine Hemmung der Peroxidase-Aktivität des Enzyms die Zerstörung der Cytochrom P450-Enzyme aufhalten. Im Western Blot zeigen sich Veränderungen an dem Protein-Gerüst der Cytochrom P450-Enzyme, die vermutlich durch die zelleigenen Proteasen entstehen, welche die geschädigten Enzyme erkennen und abbauen.

Oelkers und Bähr (1993) diskutieren alternative und zusätzliche Mechanismen der Nebennierenrinden-Zonierung: Noch ist ungeklärt, ob die Aldosteron-Synthase in der Zona fasciculata überhaupt exprimiert wird. So könnte ihre Expression doch genomisch reguliert sein, während von Hornsby (1987) bisher eine post-translationale Zerstörung durch Lipidperoxide vorausgesetzt wurde. Eine parakrine Modulation der Nebennierenrindenfunktion wird zumindest *in vitro* verschiedenen Substanzen wie dem Transforming growth factor- β_1 (TGF β), Endothelin und den Neurotransmittern Neuropeptid Y und Substanz P zugeschrieben. Auch könnte die unterschiedliche Angiotensin II-Rezeptordichte in Zona glomerulosa und Zona fasciculata zu einer Spezialisierung der Zellfunktion beitragen, da Angiotensin II via Stimulation der Proteinkinase C die Induktion der 17 α -Hydroxylase durch ACTH inhibiert.

Denkbar wäre auch eine spezifische Zerstörung der mRNA der Aldosteron-Synthase durch die in Pseudosubstrat-Reaktionen gebildeten Peroxidradikale, da neben Lipiden und Proteinen auch Nucleinsäuren Angriffspunkte für reaktive Sauerstoffspezies darstellen.

2.5 Lipidperoxidation und biologische Antioxidantien in der Nebennierenrinde

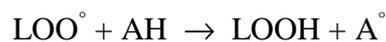
Lipidperoxidation beschreibt einen Prozeß, bei dem Membranlipide durch molekularen Sauerstoff zu Hydroperoxiden und anderen Produkten oxidiert werden. Am empfindlichsten sind hoch ungesättigte Fettsäuren. In einer Initiationsreaktion werden durch ein höchst reaktives Initiator-Radikal (R°) aus Lipiden und Phospholipiden (LH) weitere Radikale (L°) gebildet. Diese reagieren mit molekularem Sauerstoff (O_2) zu Lipidperoxiden (LOO°), die wiederum unter Bildung weiterer Radikale zu Hydroperoxiden ($LOOH$) reduziert werden. So wird eine für die Zelle sehr gefährliche Kettenreaktion nach folgendem Schema in Gang

2. Literatur

gebracht, deren Initiator-Rolle intrazellulär vermutlich Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) übernimmt (Hornsby und Crivello 1983a, Buettner 1993).



In lebenden Zellen gibt es verschiedene Schutzmechanismen, die entweder entstandenes Superoxid und andere reaktive Sauerstoffverbindungen wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyl-Radikale (OH^{\cdot}) entgiften (Superoxid-Dismutase, Katalase, Selen-abhängige Glutathion-Peroxidase), oder aber bei bereits erfolgter Initiation der Lipidperoxidation die Kettenreaktion unterbrechen (als biologische Antioxidantien v. a. Ascorbinsäure und α -Tocopherol, aber auch β -Carotin und Glutathion). **Antioxidantien** (AH) zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, einzelne Elektronen bzw. Wasserstoffatome zu übertragen, sie wirken reduzierend. Ihre oxidierten Formen (A^{\cdot}) müssen relativ stabil sein, da sie sonst zur Fortsetzung der Kettenreaktion beitragen würden.



In der Nebennierenrinde kommt es aufgrund der reichhaltigen Ausstattung mit Monooxygenasen während der Steroidsynthese besonders häufig zur Initiation von Lipidperoxidation, außerdem sind in besonders hohem Maß ungesättigte Fettsäuren in den Liposomen der Nebennierenrindenzellen vorhanden. Cytochrom P450-Enzyme als Teil der Elektronen-Transport-Kette sind sowohl Ursache für das Entstehen von Lipidperoxiden als auch Ziel der Inaktivierung durch dieselben. Sie fungieren andererseits aber auch als Peroxidase, indem sie verschiedene organische Hydroperoxide als Sauerstoff-Donatoren benutzen. Toxisches Superoxid kann sowohl beim irregulären Zerfall des Cytochrom P450(Fe^{III})-Substrat- $O_2^{\cdot-}$ -Komplexes entstehen, als auch beim Transfer eines Elektrons auf Sauerstoff durch das Cytochrom P450-Reduktase-Flavoprotein. Die unterschiedliche Empfindlichkeit der Cytochrom P450-Enzyme gegenüber der Zerstörung durch Lipoperoxide mag damit zusammenhängen, in welchem Ausmaß Lipid-Hydroperoxide als Sauerstoff-Donatoren akzeptiert werden können (Hornsby und Crivello 1983a).

Durch Metallionen (Fe^{II}) induzierte Lipidperoxidation tritt nicht in allen drei Zonen der Nebennierenrinde gleichmäßig auf, sondern ist sowohl in den Mikrosomen als auch den Mitochondrien der inneren Zona reticularis weitaus stärker vorhanden als in den äußeren Zonen (Glomerulosa und Faszikulata). Umgekehrt ist die α -Tocopherol-Konzentration etwa

vier- bis fünfmal größer in den äußeren beiden Zonen (Staats und Colby 1987, Staats *et al.* 1988a, Colby *et al.* 1995).

2.6 Rolle der Vitamine C und E in der Nebennierenrinde

Die Vitamine C und E sind in der Nebennierenrinde außergewöhnlich hoch konzentriert (Levine und Morita 1985, Friedrich 1988b) und wirken dort als Antioxidantien. Während das wasserlösliche Vitamin C im Cytosol vorliegt, entfaltet das fettlösliche Vitamin E seine Wirkung besonders in den Zellmembranen und schützt dort v. a. die ungesättigten Fettsäuren vor Lipidperoxidation. Ihre Wirkung ist synergistisch (Buettner 1993). Vitamin C vermag Vitamin E sowohl in wässrigen Homogenaten als auch in liposomalen Membransystemen zu regenerieren, indem es das Tocopheroxyl-Radikal in Tocopherol überführt (*Abb. 2.6*) (Niki 1987). Dieser „Spareffekt“ von Vitamin C auf den Vitamin-E-Haushalt ist jedoch *in vivo* noch immer umstritten (Jacob 1995). Während ältere Untersuchungen eine direkte Korrelation zwischen den Gewebespiegeln der beiden Vitamine bei hohen Vitamin-C-Dosen ergaben (Chen *et al.* 1980, Kanazawa *et al.* 1981, Bendich *et al.* 1984), konnten Chen und Barnes (1976) allein im Stadium des Vitamin-C-Mangels durch diätetische Vitamin-E-Gaben die Plasmaspiegel von Vitamin C bei Meerschweinchen erhöhen. Hrubá *et al.* (1982) wiesen bei chronisch marginaler Vitamin-C-Defizienz signifikant verminderte Vitamin-E-Konzentrationen nur in Lunge und Leber von Meerschweinchen nach. Neuere Untersuchungen zur Netto-Aufnahme und -Abgabe von radioaktiv markiertem α -Tocopherol bei Meerschweinchen mit verschiedenen Futterkonzentrationen beider Vitamine fanden keinen signifikanten Einfluß von Ascorbat auf die Plasma- oder Gewebekonzentrationen von α -Tocopherol (Burton *et al.* 1990).

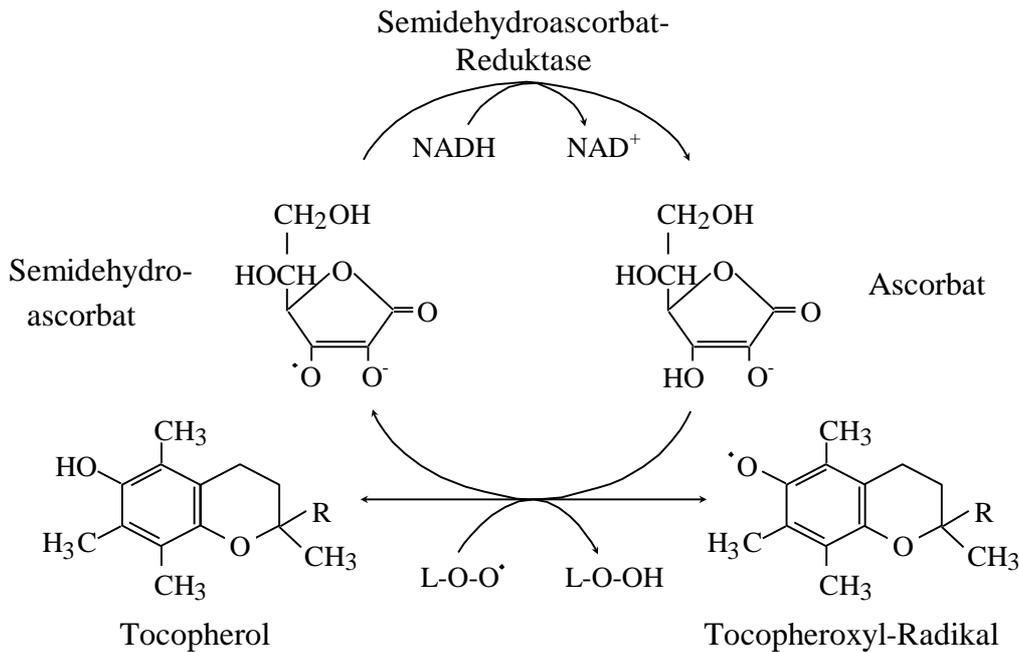


Abbildung 2.6: Interaktion von Vitamin C und Vitamin E. Regeneration von Vitamin E (α -Tocopherol) durch Vitamin C (Ascorbat). LOO^\bullet ist ein Lipidperoxid-Radikal, LOOH ein Hydroperoxid. (nach Niki 1987 und Jacob 1995).

2.6.1 Vitamin C

Die Isolierung und Strukturaufklärung von Ascorbinsäure (Vitamin C) erfolgte 1928 durch Szent-György aus der Nebennierenrinde nach Entdeckung ihrer dortigen reduzierenden Eigenschaften. Obwohl Vitamin C zusammen mit Metallionen *in vitro* auch prooxidativ wirken kann (Jacob 1995), werden seine biologischen Effekte durch Abgabe eines einzigen Wasserstoffatoms (bzw. gerichtete Übertragung eines Protons zusammen mit einem Elektron) erklärt, wobei Ascorbinsäure unter physiologischen Bedingungen als Monoanion vorliegt (Njus und Kelley 1993). Das entstehende Semidehydroascorbat ist als Radikal und Anion sogar in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff sehr stabil, da das ungepaarte Elektron resonanzstabilisiert ist. Ascorbat ist somit *in vivo* ein effektiver „Radikalfänger“, denn den meisten freien biologischen Radikalen und auch dem Tocopheroxyl-Radikal fehlt eben ein H-Atom und nicht nur ein Elektron. Cytosolisches Semidehydroascorbat wird durch die Semidehydroascorbat-Reduktase regeneriert. Dieses Enzym benutzt NADH als Elektronen-Donor und ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (Diliberto *et al.* 1982). Die Aktivität der Semidehydroascorbat-Reduktase ist in den Mitochondrien boviner Glomerulosa-

Zellen wesentlich höher als in den Mitochondrien der Faszikulata (Yanagibashi *et al.* 1990). Dehydroascorbat kann von cytosolischen Reduktasen unter Verwendung von Glutathion (GSH) und evt. NADPH zu Ascorbat reduziert werden (Jacob 1995). Die Regeneration von Dehydroascorbat dürfte jedoch überwiegend nicht-enzymatisch durch GSH erfolgen (Winkler 1992), so daß Glutathion unter physiologischen Bedingungen Ascorbat neben der Semidehydroascorbat-Reduktase im reduzierten Zustand erhält und es partiell sogar ersetzen kann (Mårtensson *et al.* 1993, Meister 1994a, 1994b).

Eine endogene Vitamin-C-Synthese ist dem Meerschweinchen wie dem Menschen und anderen Primaten nicht möglich, weil ihm das Schlüsselenzym, die L-Gulono- γ -Lakton-Oxidase, infolge eines hochmutierten Genes fehlt (Nishikimi *et al.* 1992). Folglich sind die Plasma- und Gewebespiegel von Vitamin C allein von der mit der Nahrung aufgenommenen Menge und dem körpereigenen Verbrauch an Ascorbinsäure abhängig (Ginter *et al.* 1979, Kolb 1990). Überschüssiges Vitamin C wird nicht gespeichert, sondern vom Meerschweinchen wie beim Menschen im Urin ausgeschieden, ersteres verstoffwechselt allerdings auch einen großen Teil zu CO₂ (Chen und Barnes 1976). In die Nebennierenrindenzellen selbst wird Vitamin C durch ein aktives Transportsystem aufgenommen (Leonard *et al.* 1983). In ihrer Dehydroform ist Ascorbinsäure nicht ionisiert und damit relativ hydrophob, also auch membrangängig (Friedrich 1988a). Vermutlich ist Dehydroascorbat sogar als überwiegende Transportform anzusehen und benutzt den Glucosecarrier für seine Aufnahme in die Zellen; es muß danach intrazellulär durch Glutathion wieder zu seiner stoffwechselaktiven Form reduziert werden (Meister 1994a, Navas *et al.* 1994).

Schon früh wurde ein Zusammenspiel von Vitamin C und der Nebennierenrinde entdeckt. So wird Vitamin C durch ACTH-Wirkung aus der Nebenniere freigesetzt (Sayers *et al.* 1944). Dieses Phänomen ist so spezifisch, daß Sayers *et al.* (1948) einen Bioassay zur quantitativen Bestimmung von ACTH anhand des Konzentrationsabfalls von Vitamin C in der Nebenniere bei Ratten entwickelten, der noch heute im Deutschen Arzneibuch (DAB 1996) zur Bestimmung von ACTH Vorschrift ist. Die Rolle von Vitamin C bei der Cortisol-Sekretion selbst ist jedoch noch nicht ganz klar. Ein hemmender Einfluß von Ascorbat auf die adrenale Steroidsynthese wurde schon länger diskutiert (Kitabchi 1967a), und umgekehrt ein reziproker Cortisol-Anstieg im Plasma von Meerschweinchen bei fallenden Ascorbinsäure-Konzentrationen durch diätetische Vitamin-C-Depletion in der Nebenniere beobachtet (Hodges und Hotston 1970, Odumosu 1982). *In vitro* wurde ein direkter inhibitorischer Effekt von

2. Literatur

Ascorbinsäure bei der Seitenkettenabspaltung des Cholesterols (Shimizu 1970, Pintauro und Bergan 1982) und der 11 β -Hydroxylierung von Desoxycorticosteron (Kitabchi 1967b) beschrieben, und ein Lipid-prooxidativer Effekt von Vitamin C im Verein mit Metallionen diskutiert. *In vivo* fanden Doulas *et al.* (1987) bei Meerschweinchen eine dosisabhängige Hemmung der Aktivität der ACTH-stimulierbaren Adenylatcyclase durch steigende orale Ascorbinsäuredosen, die umgekehrt proportional zur Plasma-Cortisol-Konzentration verlief. Nathans und Kitabchi (1975) beobachteten eine Hemmung der cAMP-Bildung durch subphysiologische Konzentrationen von Ascorbat (0,5 mM) *in vitro* nur bei Nebennierenzellen Vitamin-E-verarmter Ratten, die durch steigende Konzentrationen von ACTH überspielt werden konnte. Megadosen an Vitamin C vermindern den Gehalt an Cholesterolestern in der Nebenniere und senken somit die Verfügbarkeit von Cholesterol für die Steroidsynthese (Wilbur und Walker 1978, Civen *et al.* 1980). ACTH scheint nicht nur die Abgabe, sondern auch die Aufnahme von Ascorbat spezifisch in der Nebenniere zu fördern (Kipp und Rivers 1987). Nach neueren Untersuchungen an Meerschweinchen mit normaler Vitamin-C-Diät (500 mg Ascorbinsäure/kg Futter) und überphysiologisch hoher Vitamin-C-Aufnahme (10 g Ascorbinsäure/kg Futter), die zu entsprechend höheren Gewebe-Konzentrationen an Vitamin C führten, war weder die basale noch die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion (30 min bis vier Stunden nach einmaliger ACTH-Injektion) vom absoluten Ascorbinsäurespiegel der Nebennieren abhängig (Laney *et al.* 1990). Natarajan und Harding (1985) postulieren, daß durch die Semidehydroascorbat-Reduktase und Ascorbat ein Transfer von cytosolischen Reduktionsäquivalenten zur inneren Mitochondrienmembran und über Adrenodoxin auf das Side-chain-cleavage-Enzym (P450_{scc}) erfolgt und leiten daraus einen generell fördernden Effekt auf die Steroidsynthese ab, während Yanagibashi *et al.* (1990) den Elektronenfluß nur für die Aldosteron-Synthese vermuten. Hornsby *et al.* (1985) belegten mit umfangreichen Untersuchungen an bovinen Nebennierenrindenzellen in Kultur, daß Ascorbat spezifisch die 11 β -Hydroxylase (P450_{c11 β}) vor Pseudosubstratreaktionen mit Cortisol zu schützen vermag, die Reinduktion der 11 β -Hydroxylase durch ACTH fördert, und für die Aufrechterhaltung der Aldosteronsynthese *in vitro* nötig ist. Alpha-Tocopherol- und Selen-Zugabe zeigten jeweils diese Wirkung nicht, da sie im Gegensatz zu Vitamin C wahrscheinlich nicht bei der Isolierung der Zellen herausgelöst werden. Die Aktivität der 17 α -Hydroxylase (P450_{c17}) war durch Ascorbat nicht zu beeinflussen. Aufgrund seiner Struktur kann Vitamin C vermutlich an die Cytochrom P450-Enzyme binden und direkt am Ort ihrer Entstehung Sauerstoffradikale

entgiften, ohne dabei die Substratbindung und -metabolisierung zu behindern (Hornsby 1986). Somit hat Ascorbat *in vivo* eine antioxidative Wirkung in der Nebenniere; die berichteten inhibitorischen *in vitro*-Effekte anderer Autoren (s. o.) erklären Hornsby und Crivello (1983a, 1983b) durch unphysiologische experimentelle Bedingungen.

Der Einfluß von Vitamin C auf die Aldosteron-Sekretion *in vivo* ist bisher noch nicht untersucht worden. Die außergewöhnlich hohe Konzentration von Ascorbat in der Nebenniere, seine Beteiligung am mitochondrialen Elektronen-Transport im Zusammenhang mit der wesentlich höheren Aktivität der Semidehydroascorbat-Reduktase in der Glomerulosa und der *in vitro* beobachtete spezifische Schutz der 11 β -Hydroxylase vor Pseudosubstrat-Reaktionen mit Cortisol durch Ascorbat lassen jedoch vermuten, daß Vitamin C *in vivo* zur funktionellen Zonierung der Nebennierenrinde beiträgt und für die Aldosteronsynthese in der Glomerulosa benötigt wird.

Vitamin-C-Mangel ist für den Körper schwerer Streß, führt neben Reduktion des Körpergewichts zur Hypertrophie der Nebennierenrinde und geht mit erhöhten ACTH- und Cortisolspiegeln im Plasma einher (Hodges und Hotston 1970, 1971, Björkhem *et al.* 1978). Je nach Ausgangsgewicht (unterschiedliche Wachstumsintensität in Abhängigkeit vom Alter) und Geschlecht der Meerschweinchen wurden durchschnittliche Überlebenszeiten von 21 bis 24 (Meister 1994a, Hodges und Hotston 1970) *resp.* 27 bis 30 Tagen (Odumosu und Wilson 1973, Odumosu 1982, Doulas *et al.* 1987), sechs Wochen (Björkhem *et al.* 1978) und bis zu fünf Monaten (Odumosu und Wilson 1973) im experimentellen Skorbut beobachtet. Außerdem ist der Verlauf der Vitamin-C-Verarmung abhängig von der vor Versuchsbeginn erfolgten Aufnahme an Ascorbinsäure: Bei gleicher Halbwertszeit der Vitamin-C-Konzentration im Gewebe war die Überlebenszeit im Skorbut nach vorausgegangenen Megadosen von Ascorbinsäure signifikant größer als bei vorhergehender minimaler Erhaltungsdosis (Ginter *et al.* 1982).

Der **Skorbut-Streß** führt zu einer maximalen Syntheserate an Corticosteroiden in der Nebenniere, die im Endstadium weder durch ACTH noch Histamin zu steigern ist (Hodges und Hotston 1970). Bei mildem Vitamin-C-Mangel fanden Fordyce und Kassouny (1977) einen Anstieg der Plasma-Corticosteroide ohne parallelen ACTH-Anstieg, welche sich durch kurzzeitige ACTH-Gaben ebenfalls kaum mehr erhöhen ließen. Björkhem *et al.* (1978) verglichen die Effekte von fortgeschrittenem Skorbut beim Meerschweinchen mit denen einer ACTH-Stimulation, wobei die zunehmende Hypertrophie der Nebenniere in beiden Fällen die

2. Literatur

Ursache für den Plasma-Cortisol-Anstieg darstellt. Parallel mit der Gewichtszunahme der Nebenniere stiegen der Gesamtgehalt an Cytochrom P450-Enzymen, die Aktivität des Cholesterol Side-chain-cleavage-Enzyms, die Plasma-Cortisolkonzentration und die Exkretion von unkonjugiertem Cortisol im Urin an. Vermutlich aufgrund der insgesamt erhöhten Menge von P450-Cytochromen stieg auch die 11 β - und 18-Hydroxylierung von Desoxycorticosteron leicht an.

2.6.2 Vitamin E

Der Begriff Vitamin E umfaßt eigentlich eine Gruppe von acht Substanzen, vier Tocopherolen und vier Tocotrienolen, die sich jeweils in Zahl und Position von Methylgruppen ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) bzw. in der Art ihrer Seitenkette (gesättigt = Tocopherol, ungesättigt = Tocotrienol) unterscheiden (Machlin 1984). Da das α -Tocopherol von allen acht Verbindungen *in vivo* die höchste biologische Vitamin-E-Wirkung besitzt - es reagiert am schnellsten mit Lipidperoxiden und wird am langsamsten biodiskriminiert (Pongracz *et al.* 1995) - wird es als Synonym für Vitamin E verwendet.

Vitamin E entfaltet seine Wirkung aufgrund seiner amphiphilen Struktur als einziges biologisches Antioxidans unmittelbar innerhalb der Lipidmembranen (Navas *et al.* 1994) und ist in den Mitochondrien, dort hauptsächlich in der inneren Membran, am stärksten konzentriert (Machlin 1984). Die reaktive phenolische Hydroxylgruppe des α -Tocopherols ist zwischen den polaren Köpfen der Phospholipide an der Oberfläche der Membranen zur wäßrigen Grenzschicht orientiert, während der hydrophobe Schwanz parallel zu den Fettsäuren-Seitenketten der Membranlipide gelagert ist (Niki 1987). Nach der Bildung eines Lipidperoxidradikals, das ein Dipolmoment hat, lagert sich der betroffene Fettsäurepart des Phospholipids an die Oberfläche um, wo es durch α -Tocopherol reduziert und damit entgiftet werden kann (Fukuzawa *et al.* 1993). Die im wäßrigen Milieu vorhandene Ascorbinsäure regeneriert anschließend das entstandene α -Tocopheroxyl-Radikal, so daß auch nur geringe Mengen an α -Tocopherol innerhalb der Membran für ausreichenden Schutz sorgen können (ein Molekül α -Tocopherol schützt ca. 1000 Fettsäuremoleküle vor Lipidperoxidation) (Buettner 1993). Auch Glutathion soll α -Tocopherol *in vitro* regenerieren können (Niki 1987), entweder direkt über einen Glutathion-abhängigen Faktor (vermutlich ein Enzym) (McCay *et al.* 1986), oder indirekt über Ascorbat (Meister 1994a, 1994b). Schließlich ist schon seit längerem

bekannt, daß sich Vitamin E und Selen, das als Cofaktor bei der Selen-abhängigen Glutathion-Reduktase wirkt, partiell ersetzen können (Hornsby 1982, Friedrich 1988b).

Vitamin E zögert durch Verminderung der Lipidperoxidation die Zellalterung bzw. den experimentell verursachten Zelltod in kultivierten Nebennierenzellen heraus (Hornsby 1982). Hierbei ist Vitamin C wirkungslos. In Abhängigkeit von der Dauer der Vitaminverarmung verursacht Vitamin-E-Mangel in Homogenaten der Nebenniere von Ratten eine etwa 10fach höhere Kapazität für Lipidperoxidation als in der Leber (Kitabchi und Williams 1968). Sowohl in isolierten Nebennierenzellen als auch bei der Inkubation von Nebennieren-Vierteln geht Vitamin-E-Mangel bei Ratten mit erhöhter Lipidperoxidation und verminderter Corticosteron-Produktion einher (Kitabchi 1963, 1964, 1972). Einmalige *in vivo*-Gabe von α -Tocopherol 14 Stunden vor Organentnahme *resp. in vitro*-Zugabe zu inkubierten Nebennierenzellen Vitamin-E-mangelernährter Ratten hemmt die Lipidperoxidation und steigert die Steroidsynthese (Kitabchi und Williams 1968, Kitabchi 1972). Stimulation der Corticosteroid-Synthese durch ACTH oder cAMP *in vitro* ist bei Nebennierenzellen Vitamin-E-depletierter Ratten weniger effektiv als bei Kontrolltieren. Ascorbat-Zugabe (0,5 mM) wirkt darüberhinaus prooxidativ, hemmt aber die ACTH-stimulierte Steroidsekretion nur bei den Vitamin-E-Mangeltieren (Kitabchi 1972), obwohl kein Einfluß des Vitamin-E-Mangels auf die adrenale Vitamin-C- *resp.* Fettsäuren-Konzentration festgestellt werden konnte (Kitabchi und Williams 1968).

Staats und Colby (1987, 1988a) stellten fest, daß Lipidperoxidation und Vitamin-E-Konzentration in den Zonen der Nebennierenrinde beim Meerschweinchen umgekehrt proportional verteilt sind: Während die mikrosomale und mitochondriale α -Tocopherol-Konzentration in den äußeren Zonen (Zonae glomerulosa und fasciculata) vier- bis fünfmal so hoch war wie die der inneren Zone (Zona reticularis), war die Fe^{II}-induzierte Lipidperoxidation, gemessen als Malonaldehyd-Produktion, wesentlich größer in der inneren Zone. Der cytosolische Vitamin-C-Gehalt war dabei in den beiden untersuchten Zonen gleich (Staats und Colby 1987). Subphysiologische Konzentrationen an Ascorbat (0,1-0,2 mM) induzierten *in vitro* ebenso wie Fe^{II} die Lipidperoxidation vor allem in der inneren Zone, während physiologische Konzentrationen von Ascorbat (1-5 mM) die Fe^{II}-induzierte Lipidperoxidation außen wie innen hemmten, die äußeren Zonen waren jedoch aufgrund ihres höheren Vitamin-E-Gehalts sensibler für die antioxidative Wirkung des Vitamin C. Zugabe von α -Tocopherol konnte in der inneren Zone die Lipidperoxidation vermindern. Vitamin-E-

2. Literatur

Mangel ließ die regionalen Unterschiede der Lipidperoxidation in der Nebennierenrinde verschwinden, ohne die Vitamin-C-Konzentration der Nebenniere zu beeinflussen (Staats *et al.* 1988b). Als Hinweis auf eine infolge des Vitamin-E-Mangels zunehmende Lipidperoxidation *in vivo* nahm die Konzentration an ungesättigten Fettsäuren in der Nebenniere ab (Staats *et al.* 1988b, Staats und Colby 1989b). Während die Lipidperoxidation in den äußeren Zonen durch die α -Tocopherol-Depletion anstieg, ließ der antioxidative Effekt von Ascorbat in den äußeren Zonen nach. Ascorbat zeigte nun auch *in vitro* in physiologischen Dosen prooxidative Wirkung und induzierte Lipidperoxidation (Staats und Colby 1989a, 1989b). Das antioxidative Potential von Vitamin C korreliert also direkt mit der Gewebekonzentration von Vitamin E.

Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie von Hornsby und Crivello (1983b), daß Lipidperoxidation infolge von Pseudosubstratreaktionen zur funktionellen Zonierung der Nebennierenrinde beiträgt. Die zonal unterschiedliche α -Tocopherol-Konzentration erhält das Konzentrationsgefälle der Lipidperoxidation in der Nebennierenrinde aufrecht und sorgt damit für eine funktionelle Differenzierung der verschiedenen Zonen (Colby *et al.* 1995). So läßt sich erklären, warum einerseits die Aktivität der 11 β -Hydroxylase (P450c11 β) in den äußeren Zonen viel größer ist, und andererseits die gegenüber Lipidperoxidation besonders empfindliche 17 α -Hydroxylase (P450c17) beim Meerschweinchen in der Zona reticularis nur noch geringe Aktivität zeigt, so daß Cortisol und Androstendion lediglich in den beiden äußeren Zonen gebildet werden (Colby und Eacho 1985, Staats und Colby 1987, Staats *et al.* 1988b). Der Einfluß einer Vitamin-E-Verarmung auf die Aldosteronsekretion ist bisher weder *in vitro* noch *in vivo* untersucht worden. Man kann jedoch vermuten, daß infolge der erhöhten Lipidperoxidation in den äußeren Zonen der Nebennierenrinde bei Vitamin-E-Depletion auch die Aldosteronsekretion beeinträchtigt wird.

Der **Vitamin-E-Mangel** ist beim Meerschweinchen weit weniger gut untersucht als der Vitamin-C-Mangel. Während einer achtwöchigen Vitamin-E-Depletion junger Meerschweinchen sank die α -Tocopherol-Konzentration in Plasma, Nebenniere, Leber und anderen Geweben parallel ab (Burton *et al.* 1990), der Plasmaspiegel fiel erst zwischen acht und 12 Wochen steil unter die Nachweisgrenze (Machlin *et al.* 1979). Staats *et al.* (1988b) gehen von neun bis zehn Wochen Vitamin-E-Depletion aus, bis die Nebennieren Vitamin-E-verarmt sind. Nach acht Wochen traten nur bei einigen Tieren histologisch erkennbare Zeichen einer Myopathie auf, die nach 12 Wochen bei allen deutlich waren. Nach 16 Wochen Vitamin-E-Depletion zeigten alle Tiere schwere Myopathien und leichte Hodendegenerationen

(Machlin *et al.* 1979). Im Gegensatz zu *in vitro*-Ergebnissen zeigte Vitamin C *in vivo* keinen „Spareffekt“ beim Vitamin E, besonders in der Nebenniere ist die α -Tocopherol-Konzentration vielmehr von der Zufuhr mit der Nahrung abhängig (Burton *et al.* 1990). So kann die Nebenniere Vitamin E innerhalb von Stunden nach der Nahrungsaufnahme konzentrieren (Kitabchi und Williams 1968).

3. FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Nach den vielen Hinweisen auf einen Einfluß der Vitamine C und E auf die Nebennierenrindenfunktion *in vitro* lag es nahe, auch einen Einfluß dieser Vitamine auf die Steroidsynthese *in vivo*, besonders im Hinblick auf die Aldosteronsekretion, zu untersuchen. Sowohl die Theorie einer zusätzlichen mitochondrialen Elektronen-Transport-Kette über Ascorbat als auch die Pseudosubstrat-Theorie und die reziproke Verteilung von α -Tocopherol und Lipidperoxidation in den verschiedenen Zonen der Nebennierenrinde ließen vermuten, daß bei einer Verarmung der Nebenniere an Vitamin C bzw. Vitamin E die Aldosteron-Sekretion deutlich eingeschränkt wird.

Da das **Meerschweinchen** wie der Mensch auf die exogene Zufuhr von Vitamin C angewiesen ist, weil ihm das Schlüsselenzym für die Vitamin-C-Synthese fehlt, ist es ein geeignetes Versuchstier für Untersuchungen mit Vitamin-C-Mangelernährung.

In **Vorversuchen** sollte zunächst der Zeitpunkt bestimmt werden, zu dem die Nebenniere unter unseren Versuchsbedingungen maximal Vitamin-depletiert ist, ohne daß bereits klinische Anzeichen einer Hypovitaminose und damit verbundener Streß auftreten.

Da einerseits nicht bekannt war, ob eine **Langzeit-ACTH-Stimulation** beim Meerschweinchen wie bei Mensch und Ratte zu einer Suppression der Aldosteron-Sekretion führt, andererseits ein chronischer ACTH-Anstieg durch beginnenden Skorbut-Streß nicht ausgeschlossen werden konnte, sollten durch eine dreitägige ACTH-Behandlung in einer Vitamin-C-armen Gruppe und einer Kontrollgruppe parallel Effekte einer Dauerstimulation der Nebennieren mit ACTH untersucht werden.

Durch **Natrium-Verarmung** sollte die Aldosteron-Sekretion jeweils bei einer Vitamin-verarmten Gruppe und einer Kontrollgruppe stimuliert werden, um die postulierten Einflüsse einer Vitamin-Depletion besser sichtbar zu machen.

Das **Ziel der Arbeit** bestand darin, neben den Plasma-Konzentrationen von Cortisol und Aldosteron gleichzeitig ihre wichtigsten Regulatoren (endogenes ACTH, Serum-Kalium, Serum-Natrium und Plasma-Renin-Aktivität) zum Zeitpunkt einer maximalen Nebennieren-Verarmung an Vitamin C und/oder Vitamin E vor der Entwicklung von klinischen Symptomen einer Hypovitaminose zu bestimmen. Außerdem sollte die Exkretion von Natrium und Kalium im 24-Stunden-Urin über die gesamte Versuchszeit bestimmt werden können, so daß die Tiere in Stoffwechsellkäfigen gehalten werden mußten.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1 Tierexperimente

Die Tierversuche wurden unter den Aktenzeichen G 0195/93 und G 0280/95 geführt.

4.1.1 Tiere

Für alle Versuche wurden männliche Duncan-Hartley-Auszucht-Meerschweinchen (Stamm: Dunkin-Hartley:Mol) von der Firma Moellegaard Breeding Centre Deutschland (Schönwalde) mit einem Anfangsgewicht von 300 ± 20 g bezogen. Sie wurden unter Standardbedingungen bei $20 \pm 2^\circ$ C Raumtemperatur, 40-60% Luftfeuchte und 12 Stunden Licht von 6⁰⁰-18⁰⁰ Uhr gehalten. Wenn nicht anders angegeben, saßen die Tiere in durchsichtigen Polycarbonatkäfigen (Makrolon Typ IV) zu zweit oder zu dritt auf Weichholzgranulat und erhielten Standard-Haltungsfutter für Meerschweinchen (C 3020, Altromin, Lage) und Leitungswasser *ad libitum*.

4.1.2 Spezialdiäten

In den Versuchsphasen erhielten die Tiere pelletierte halbsynthetische Diäten auf Caseinbasis mit gereinigten und kontrollierten Inhaltsstoffen.

Für die **Vorversuche** bezogen wir Diäten der Firma Altromin (Lage) mit folgender Deklaration:

- Kontrolldiät (C 3000) mit 5020 mg/kg Vitamin C und 164 mg/kg Vitamin E
- Vit.-C-arme Diät (C 3015) ohne Vitamin C und 164 mg/kg Vitamin E
- Vit.-E-arme Diät (C 3018) mit 5020 mg/kg Vitamin C ohne Vitamin E

Eigene und unabhängige Untersuchungen nach Abschluß der Vorversuche ergaben jedoch gravierende Abweichungen von der Deklaration, so daß man von einem Vitamin-C-Gehalt von ca. 1000 mg/kg in der Kontroll- und Vitamin-E-armen Diät und einem Gehalt von 50-100 mg/kg Vitamin C in der Vitamin-C-armen Diät ausgehen muß. Lediglich der Vitamin-E-Gehalt in der Kontroll- und Vitamin-E-armen Diät entsprach annähernd den deklarierten Werten.

4. Material und Methoden

Für die **Hauptversuche** und ihre Pilotstudien bezogen wir die Experimentaldiäten für Meerschweinchen (ED 15717) von Ssniff (Soest/Westfalen) in folgender Zusammensetzung: ME 11,3 MJ, Rohprotein 20%, Rohfett 4,1%, Rohfaser 10%, Rohasche 8,6%; Calcium 1%, Phosphor 0,8%, Magnesium 0,2%, Selen 0,06 mg/kg, Kupfer 40,0 mg/kg, Vit. A 15000 IE/kg, Vit. D₃ 1000 IE/kg. Alle innerhalb eines Versuches verwendeten Diätvarianten wurden aus einer gemeinsamen Basischarge hergestellt und nur der Natrium- und/oder Vitamin-C- bzw. -E-Gehalt jeweils variiert (*Tab. 4.1*). Die versuchsentscheidenden Inhaltsstoffe (Vit. C, Vit. E, Natrium, Kalium) ließen wir von der Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt (LUFÄ, Kiel) überprüfen. Bei den Natrium-armen Diäten reduzierte sich der Chlorid-Gehalt von 3200 mg/kg (Natrium-Normaldiät) auf 1800 mg/kg (Natrium-arme Diät). Alle anderen Inhaltsstoffe blieben laut Herstellerangaben jeweils unverändert. Die Diäten wurden bis einige Tage vor der Fütterung bei 4-6° C gelagert.

Diätvarianten	Ascorbinsäure (Vitamin C) [mg/kg]	α-Tocopherol (Vitamin E) [mg/kg]	Natrium [mg/kg]	Kalium [mg/kg]
Kontrolldiät	1500	120	2000	6500
Natrium-arm	1500	120	200	6500
Vit.-C-arm	< 10	120	2000	6500
Vit.-C- & Natrium-arm	< 10	120	200	6500
Vit.-E-arm	1500	5	2000	6500
Vit.-E- & Natrium-arm	1500	5	200	6500
Vit.-C- & Vit.-E-arm	< 10	5	2000	6500
Vit.-C-, Vit.-E- & Natrium-arm	< 10	5	200	6500

Tabelle 4.1: In den Hauptversuchen verwendete Experimentaldiäten für Meerschweinchen: Versuchsrelevante Inhaltsstoffe. Der Chlorid-Gehalt von 3200 mg/kg (Natrium-Normaldiät) ist bei den Natrium-armen Diäten auf 1800 mg/kg reduziert.

4.1.3 Stoffwechselkäfige

Für die Bestimmung der Exkretion von Natrium und Kalium im Harn wurden die Tiere zur Gewinnung von 24-Stunden-Urin einzeln auf einem Drahtrost in runden durchsichtigen Stoffwechselkäfigen aus Polycarbonat (Größe 3 für Ratten & Meerschweinchen > 150 g, Fa. Scanbur, Köge, Dänemark) gehalten. Zwischen 8⁰⁰ und 9⁰⁰ Uhr wurden die Tiere gewogen, die Käfige gesäubert bzw. ausgewechselt und Futter und Trinkwasser erneuert. Die Urinnäpfe wurden täglich um 9⁰⁰ Uhr gewechselt, das Urinvolumen im Laufe des Vormittags abgemessen und zwei Aliquots bei -30° C eingefroren. Die Urinproduktion variierte von 14 ml/Tag bis zu 145 ml/Tag und Tier. Da die Tiere offensichtlich aus Langeweile mit den Tränken spielten und diese z. T. völlig leerten, wurde das Trinkwasserangebot auf 150 ml täglich begrenzt, das entspricht dem 3-5fachen Bedarf. Die Wasseraufnahme lag danach bei 10 bis 150 ml/Tag und Tier. Die Fütterung erfolgte *ad libitum*, die individuelle Futteraufnahme wurde jedoch täglich durch Kontrolle der Ein- und Auswaage verfolgt. Letztere betrug im Durchschnitt zwischen 10 und 20 g. Diese Werte wurden mit den Tieren aus dem Hauptversuch der Vitamin-C-Verarmung ermittelt.

4.1.4 Natrium-Verarmung

In beiden Hauptversuchen (Vitamin-C- und Vitamin-E-Verarmung) wurden jeweils eine Kontroll- und eine Vitamin-depletierte Gruppe Natrium-arm gefüttert, um die Aldosteronsekretion zu stimulieren. Der Natriumgehalt der entsprechenden Diäten betrug 10% der Natrium-Normalkost (s. 4.1.2). Die Natrium-Verarmung wurde einheitlich über 15 Tage durchgeführt.

4.1.5 ACTH-Behandlung

Im Hauptversuch der Vitamin-C-Verarmung erhielten zwei Gruppen von Meerschweinchen (eine Kontroll- und eine Vitamin-C-arme Gruppe) zweimal täglich (um 7¹⁵ Uhr und 17⁴⁵ Uhr) während der letzten drei Versuchstage (13. bis 15. Tag) 10 I.E. ACTH subkutan injiziert. Hierfür verwendeten wir synthetisches ACTH(1-24) (Synacthen^R Depot 100 I.E./ml, Ciba-Geigy, Wehr) und eine 1 ml Omnifix Tuberkulinspritze mit 0,45 x 12 mm Kanüle von Braun, Melsungen. Am Morgen des 16. Versuchstages erhielten die Tiere die

4. Material und Methoden

letzte Injektion und wurden 2 ½ Stunden später narkotisiert, entblutet und getötet. Alle anderen Tiere des Vitamin-C-Hauptversuches wurden analog mit 0,1 ml 0,9 % NaCl-Lösung als Placebo-Injektion behandelt.

4.1.6 Narkose, Blut- und Organentnahme

Alle Meerschweinchen wurden durch das tägliche Handling beim Wiegen und bei der klinischen Untersuchung gut an den Umgang mit Menschen gewöhnt. Am Tötungstag wurden sie einzeln nacheinander zwischen 9³⁰ Uhr und 10⁰⁰ Uhr (Hauptversuch Vitamin C), bzw. zwischen 10³⁰ und 11⁰⁰ Uhr (Hauptversuch Vitamin E) aus dem Käfig genommen und für ca. 10 min auf dem Arm gestreichelt und beruhigt, bevor sie eine Injektionsnarkose intramuskulär in die lange Sitzbeinmuskulatur erhielten und auf dem Arm einschliefen. Als Narkose wurden 100 mg/kg KG Ketamin (Ketamin 10%, Sanofi Ceva, Düsseldorf) kombiniert mit 4 mg/kg KG Xylazin (Rompun^R 2%, Bayer, Leverkusen) in einer Mischspritze (1 ml Omnifix Tuberkulinspritze mit 0,45 x 12 mm Kanüle, Braun, Melsungen) verabreicht. 20 min später wurden die Tiere mit dem Vacutainer^R-System (Becton Dickinson, Heidelberg) perkutan durch Herzpunktion weitgehend entblutet, mit einem Genickschlag getötet und Nebennieren und Leber entnommen. Anschließend wurden die Tiere seziiert, um subklinische Symptome einer Hypovitaminose festzustellen. Pro Tag wurden je nach Versuchsaufbau nur zwei bis vier Tiere nacheinander narkotisiert, entblutet und getötet, so daß der zeitliche Rahmen gewahrt blieb.

Das entnommene Blutvolumen betrug je nach Gewicht der Meerschweinchen zwischen 16 und 27 ml/Tier. Die EDTA-Plasma-Röhrchen wurden gleich nach der Entnahme auf Eis gestellt, während das Serum (Vacutainer^R-Röhrchen mit Trenngel und Gerinnungsaktivator) für 15 min bei Raumtemperatur zunächst gerinnen mußte, bevor es ebenfalls auf Eis plaziert wurde. Nach dem Zentrifugieren (10 min bei 3000 UPM und 4° C), Abpipettieren und Chargieren wurde das Plasma bei -80° C bis zur Analyse von ACTH, PRA, Aldosteron und Cortisol, das Serum bei -180° C (flüssiger Stickstoff) bis zur Analyse von Vitamin C, Vitamin E, Natrium und Kalium aufbewahrt.

Teile der Leber wurden sofort nach der Entnahme in mehrere Portionen aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und darin bis zur Analyse auf Vitamin C und E gelagert. Mit den Nebennieren wurde ebenso verfahren, sofern sie zur Vitaminanalytik zur Verfügung standen.

4.2 Versuchsaufbau

4.2.1 Vorversuche

Das Ziel der Vorversuche war, mit möglichst wenigen Tieren den zeitlichen Verlauf einer Vitamin-C- und E-Verarmung bei Meerschweinchen unter unseren Versuchsbedingungen bis zum Auftreten erster klinischer Symptome mittels Vitamin-Analysen in Nebenniere, Leber und Serum zu verfolgen. Durch Messung der Cortisol- und ACTH-Werte im Plasma sollte der Beginn des Stresses durch Skorbut und einer Hypovitaminose E ermittelt werden. Auch die Aldosteronsekretion im Plasma wurde bereits gemessen in der Hoffnung, frühzeitig postulierte Einflüsse der Vitamin-Depletion zu erkennen. Für die gesamte Versuchsdauer wurde der 24-Stunden-Urin gesammelt, um bei Bedarf die Elektrolyt-Ausscheidung bestimmen zu können. Während des Vorversuches konnten praktische Erfahrungen für den Tierversuch unter unseren Versuchsbedingungen (besonders im Hinblick auf die metabolischen Käfige) gewonnen und Methoden für Narkose, Blut- und Organentnahme etabliert werden.

19 Meerschweinchen einer Lieferung wurden zunächst nach Ankunft in Gruppen von drei bis vier Tieren auf Kontrolldiät gesetzt. Nach fünf Tagen hatten die Tiere drastisch an Gewicht verloren, da sie die Futterraufnahme der fremden halbsynthetischen Diät verweigerten, und mußten mit gewohntem Standardfutter über weitere vier Tage wieder auf Normalgewicht angefütert werden. Sie erhielten danach für fünf Tage eine Mischung aus Standardfutter und Kontrolldiät, bevor sie erneut auf reine Kontrolldiät gesetzt wurden. Der Gewichtsverlauf wurde täglich protokolliert. Nach einer Woche waren keine weiteren Gewichtseinbußen mehr zu verzeichnen, so daß die Tiere einzeln in die Stoffwechselkäfige gesetzt werden konnten. Durch diese Umstellung gingen Futterraufnahme und Gewicht wiederum für einige Tage zurück. Eine Woche nach dem Umsetzen wurden die Meerschweinchen in drei zufällige Gruppen aufgeteilt und folgendermaßen angefütert:

4. Material und Methoden

Gruppe:	Diät:	Anzahl der Tiere:
Kontrolltiere	Kontrolldiät	7
Vitamin-C-arm	Vitamin-C-arme Diät	6
Vitamin-E-arm	Vitamin-E-arme Diät	6

Jeweils zwei der Vitamin-C-armen Meerschweinchen wurden nach 10, 14 und 22 Tagen gleichzeitig mit je einem Kontrolltier getötet. Die Vitamin-E-armen Tiere wurden analog nach drei, fünf und acht Wochen paarweise zusammen mit einem (beim letzten Termin mit zwei) Kontrolltier(en) geopfert. Alle Tiere zeigten bis zum Tod ein ungestörtes Wachstum, doch hatten die zwei letzten Vitamin-E-armen Tiere nach acht Wochen nicht ganz das Endgewicht der beiden vergleichbaren Kontrolltiere erreicht (632 g *resp.* 702 g *vs.* 709 g *resp.* 746 g). Weder bei der täglichen klinischen Untersuchung noch bei der Sektion konnten Symptome einer Hypovitaminose festgestellt werden. Auch die Parameter ACTH und Cortisol im Plasma ergaben keinen Hinweis auf einen Streßzustand im Zusammenhang mit der Vitaminverarmung. Die Aldosteronsekretion war bei allen Gruppen unverändert. Die Vitamin-C-Analysen von Serum, Nebenniere und Leber (Mittelwerte nach 22 Tagen: Serum 6,4 µg/ml, Nebenniere 80,0 µg/g, Leber 43,5 µg/g) deuteten darauf hin, daß die Tiere nicht maximal depletiert worden waren. Daufhin veranlaßte Analysen der Diäten (*s.* 3.1.2) bestätigten, daß die Diäten und Versuchsergebnisse im Hinblick auf die Vitamin-C-Verarmung nicht verwendbar waren, da sie zu große Mengen an Ascorbinsäure erhielten, die zumindest einen makroskopischen Skorbut verhinderten (Shelton *et al.* 1978). Der Gehalt an Vitamin E in Serum und Gewebe entsprach jedoch den Literaturwerten (Burton *et al.* 1990), so konnten diese Ergebnisse (*s.* 5.2.1, *Abb.* 5.7) für die weitere Versuchsplanung herangezogen werden.

4.2.2 Hauptversuch Vitamin-C-Verarmung mit Pilotstudie

Der Hauptversuch zur Vitamin-C-Verarmung lief insgesamt über vier Monate, da wegen der großen Anzahl von Tieren bei knappem Angebot an Stoffwechselfäßen und begrenzter personeller Möglichkeit für Narkose, Entblutung, Sektion etc. und nachfolgender Zellinkubationen (Redmann *et al.* 1995) die Durchführung nur zeitlich versetzt möglich war. Die einzelnen Gruppen wurden jedoch kontinuierlich über den ganzen Versuchszeitraum durchmisch, um systematische Fehler auszuschließen.

Der Versuchsablauf gliederte sich in zwei Teile auf, eine Pilotstudie und den eigentlichen Hauptversuch. In der Pilotstudie sollte die optimale Versuchsdauer für den Hauptversuch ermittelt werden: Gesucht wurde der Zeitpunkt, zu dem die Vitamin-C-Verarmung maximal ausgebildet ist, aber noch kein Skorbutstreß ausgelöst wird. Beiden Versuchsteilen ging eine einheitliche Eingewöhnungsphase voraus. Alle Tiere wurden während des gesamten Versuchs in Stoffwechselläufigen gehalten, täglich gewogen und klinisch untersucht.

Bis zum Versuchsbeginn mußten die Meerschweinchen behutsam während einer dreieinhalb bis vier Wochen dauernden **Eingewöhnungsphase** an die halbsynthetische Experimentaldiät und die Einzelhaltung im Stoffwechselläufig adaptiert werden: So erhielten die Tiere in der ersten Woche nach ihrer Ankunft Standard-Haltungsfutter und Kontrolldiät im Verhältnis 1:1 gemischt *ad libitum*. Nach und nach verringerte sich der bevorzugte Anteil an Standardfutter im Futternapf durch die selektive Futteraufnahme, und die Tiere mußten zwangsläufig auch die übrigbleibende ungewohnte Experimentaldiät aufnehmen. Ab der zweiten Woche wurden die Meerschweinchen nur noch mit Kontrolldiät gefüttert. 7 bis 10 Tage später wurden die Tiere dann einzeln in die Stoffwechselläufige umgesetzt, und nach weiteren 10 Tagen Adaptationszeit konnte der jeweilige Versuch beginnen.

In der **Pilotstudie** erhielten zunächst sieben Meerschweinchen nach der Eingewöhnungsphase so lange Vitamin-C-arme Diät, bis sie Skorbut-Symptome entwickelten. Sobald jedoch die Tiere ein deutlich gestörtes Allgemeinbefinden aufwiesen oder der Gewichtsverlust größer als 30% war, wurden sie getötet. Der Versuch dauerte somit individuell zwischen 16 und 22 Tage. Diese Tiere werden im folgenden als **Pilottiere** bezeichnet.

Anschließend wurde mit insgesamt 56 Meerschweinchen der **Hauptversuch zur Vitamin-C-Verarmung** durchgeführt. Die Versuchsdauer in diesem Versuch betrug - aufbauend auf den Ergebnissen aus dem Pilotversuch - 15 Tage, da nach dieser Zeit noch kein Tier „klinisch“ an Skorbut erkrankt war, während die Vitamin-C-Depletion bereits maximal war. Nach der Eingewöhnungsphase wurden sechs verschiedene Gruppen an Tieren zufällig gebildet und folgendermaßen angefütert und behandelt (*Tab. 4.2*): Zwei Gruppen blieben weiterhin auf Kontrolldiät, zwei Gruppen erhielten Vitamin-C-arme Diät. Die fünfte Gruppe wurde Natrium-arm gefüttert und die sechste Gruppe Natrium- und Vitamin-C-arm. Eine der Kontroll- und eine der Vitamin-C-armen Gruppen bekam in den letzten 3 ½ Tagen zweimal täglich subkutane Injektionen mit 10 IE Depot-ACTH, während alle anderen Gruppen

4. Material und Methoden

0,9 % NaCl-Lösung als Placebo-Injektion erhielten. Sechs Tiere schieden im Verlauf des Versuchs aufgrund von versuchsunabhängigen Erkrankungen aus.

Gruppe	Diät (Tag 1-15)	Anzahl der Tiere	Behandlung
Kontrolle	Kontrolldiät	9	Placebo-Injektion
Vit.-C-arm	Vit.-C-arm	8	Placebo-Injektion
Kontrolle + ACTH	Kontrolldiät	8	ACTH-Injektion
Vit.-C-arm + ACTH	Vit.-C-arm	7	ACTH-Injektion
Natrium-arm	Natrium-arm	9	Placebo-Injektion
Natrium- & Vit.-C-arm	Vit.-C- & Natrium-arm	9	Placebo-Injektion

Table 4.2: Hauptversuch der Vitamin-C-Verarmung: Zusammensetzung, Fütterung und Behandlung der Meerschweinerguppen. Die Versuchsdauer und damit die Vitamin-C- und/oder Natrium-Verarmung betrug 15 Tage, die Tiere wurden am Morgen des 16. Tages getötet. Während der letzten 3 ½ Tage erhielten zwei Gruppen zweimal täglich 10 I.E. Depot-ACTH s.c. injiziert, alle anderen Gruppen wurden analog mit 0,9 % NaCl-Lösung als Placebo-Injektion behandelt.

4.2.3 Hauptversuch Vitamin-E-Verarmung mit Pilotstudie

In Anlehnung an den Vitamin-C-Versuch ging auch dem eigentlichen Hauptversuch zur Vitamin-E-Verarmung eine Pilotstudie voraus, da weder aus dem Vorversuch noch aus der Literatur hervorging, ob und in welchem Zeitraum sich die α -Tocopherol-Konzentration von Serum und Gewebe über eine achtwöchige Depletionsphase hinaus weiter verringern läßt, ohne daß klinische Symptome auftreten.

Die **Eingewöhnungsphase** dauerte zweieinhalb bis drei Wochen. In der ersten Woche erhielten die Meerschweinchen Standard-Haltungsfutter und Kontrolldiät im Verhältnis 1:1 gemischt, in der zweiten Woche bis Versuchsbeginn reine Kontrolldiät. Die Tiere wurden wöchentlich gewogen und zu zweit im Makrolon-Käfig gehalten. Auf eine Gewöhnung an den Stoffwechselkäfig konnte verzichtet werden, da von den Tieren über die lange Versuchsdauer nur einmal wöchentlich 24-Stunden-Urin gesammelt wurde und somit die Belastung der Tiere durch die Einzelhaltung im Stoffwechselkäfig nur vorübergehend war.

In der **Pilotstudie** zur Vitamin-E-Verarmung sollten acht Meerschweinchen als Pilottiere solange Vitamin-E-depletiert werden, bis sie klinische Symptome einer Hypovitaminose zeigen. Parallel dazu wurden zwei Kontrolltiere gehalten. Einmal pro Woche kamen alle Tiere für 24 Stunden zum Urinsammeln in die Stoffwechsellkäfige, zweimal wöchentlich wurden die Tiere gewogen und täglich beobachtet. Nach acht und zehn Wochen wurden jeweils zwei (noch klinisch gesunde) Pilottiere getötet, um die Gewebespiegel zu kontrollieren. Der Pilotversuch mußte daraufhin abgebrochen werden, da sich herausstellte, daß die Diäten im Verlauf des Versuchs leider verwechselt worden waren und keine reproduzierbaren Aussagen mehr erwartet werden konnten.

Der **Hauptversuch der Vitamin-E-Verarmung** wurde mit 40 Meerschweinchen ebenfalls zeitversetzt innerhalb von fast vier Monaten durchgeführt. Nach der Eingewöhnungsphase betrug die Versuchsdauer zehn Wochen. Diese Zeit wurde nach dem Mißlingen der Pilotstudie empirisch gewählt, da die Tiere des Vorversuchs nach acht Wochen noch keinerlei Anzeichen einer Hypovitaminose gezeigt hatten, und Staats *et al.* (1988b) von neun bis zehn Wochen als benötigten Zeitraum für eine α -Tocopherol-Depletion der Nebennieren ausgingen.

Zunächst erhielt die eine Hälfte der Tiere für acht Wochen Kontrollfutter, die andere Hälfte Vitamin-E-arme Diät. Anschließend wurden die beiden Gruppen nochmals unterteilt, indem je eine Untergruppe während der letzten 15 Tage zusätzlich Natrium-arm gefüttert wurde. So können insgesamt vier verschiedene Gruppen unterschieden werden (*Tab. 4.3*).

4. Material und Methoden

Gruppe	Diät 1.-8. Woche	Diät 9.+ 10. Woche	Anzahl der Tiere
Kontrolle	Kontrolldiät	Kontrolldiät	9
Vit.-E-arm	Vit.-E-arm	Vit.-E-arm	10
Natrium-arm	Kontrolldiät	Natrium-arm	10
Natrium- & Vit.-E-arm	Vit.-E-arm	Vit.-E- & Natrium-arm	9

Tabelle 4.3: Hauptversuch der Vitamin-E-Verarmung: Fütterung und Zusammensetzung der Meerschweinerguppen. Die Versuchsdauer und damit die Dauer der Vitamin-E-Verarmung betrug 10 Wochen, die Natrium-Verarmung wurde während der letzten 15 Tage durchgeführt.

Die Tiere wurden während der ersten drei Wochen weiterhin wöchentlich gewogen und zu zweit im Makrolon-Käfig gehalten. Ab der vierten Versuchswoche kamen die Meerschweinchen einmal pro Woche für 24 Stunden in den Stoffwechselkäfig zum Urinsammeln und wurden zweimal wöchentlich gewogen. Während der letzten 15 Tage (9. + 10. Woche) wurde das Gewicht täglich protokolliert. Am drittletzten und vorletzten Versuchstag wurde über zwei Tage Urin gesammelt (48 Stunden Stoffwechselkäfig). Am letzten Tag saßen die Tiere jedoch wie gewohnt zu zweit im Makrolon-Käfig, um den Streß, der mit der Einzelhaltung im Stoffwechselkäfig und dem anschließenden Umsetzen zurück zum Partnertier verbunden war, als Einfluß auf unsere Untersuchungen auszuschließen. Zwei Meerschweinchen verstarben im Verlauf des Versuchs an Erkrankungen, die nicht mit dem Versuch zusammenhingen.

4.2.4 Pilotstudie kombinierte Vitamin-E- und Vitamin-C-Verarmung

In einer kleinen **Pilotstudie über eine kombinierte Vitamin-E- und Vitamin-C-Verarmung** sollte mit einer geringen Zahl von Tieren ansatzweise geklärt werden, ob es durch den Mangel beider Vitamine zu einer Verstärkung des Effekts kommt, den ein Vitamin allein auf die Aldosteronsynthese vermutlich ausübt. Außerdem sollte in diesem Pilotversuch ermittelt werden, ob durch die kombinierte Depletion der Zeitraum bis zum Auftreten erster klinischer Symptome eines Vitamin-C- oder Vitamin-E-Mangels verkürzt wird, um die

Versuchsdauer bei einem evt. folgenden Hauptversuch einschätzen zu können. Dazu wurden parallel zum Hauptversuch der Vitamin E-Verarmung sechs Meerschweinchen zunächst acht Wochen Vitamin-E-verarmt. Ab Beginn der neunten Woche erhielten drei der Tiere dann Vitamin-E- und Vitamin-C-arme Diät, während die anderen drei Tiere Vitamin-E-, Vitamin-C- und Natrium-arm angefüttert wurden (Tab. 4.4). Ende der 11. Woche (19 bzw. 20 Tage nach Beginn der kombinierten Verarmung) wurden alle sechs klinisch gesunden Meerschweinchen narkotisiert, entblutet und getötet, damit der zeitliche Verlauf des Versuches einen Vergleich mit dem Hauptversuch der Vitamin-E-Verarmung noch zuließ. Selbstverständlich konnte aufgrund der geringen Tierzahl von jeweils 3 Tieren pro Gruppe nur ein erster Hinweis, sicherlich aber kein Beweis für eine Potenzierung des Effekts auf die Aldosteronsynthese durch den Mangel beider Vitamine erwartet werden.

Gruppe	Diät 1.-8. Woche	Diät 9.-11. Woche	Anzahl der Tiere
Vit.-E- & Vit.-C-arm	Vit.-E-arm	Vit.-E- & Vit.-C- arm	3
Natrium-,Vit.-E- & C-arm	Vit.-E-arm	Vit.-E-, C- & Natrium-arm	3

Table 4.4: Pilotversuch zur kombinierten Vitamin-E- und Vitamin-C-Verarmung: Fütterung und Zusammensetzung der Meerschweingruppen. Die Versuchsdauer und damit die Dauer der Vitamin-E-Verarmung betrug fast 11 Wochen, nach 8 Wochen wurde in beiden Gruppen zusätzlich während der letzten 19 bzw. 20 Tage eine Vitamin-C-Verarmung durchgeführt, die bei einer der beiden Gruppen noch von einer Natrium-Verarmung begleitet wurde.

4.3 Analysen

4.3.1 Radioimmunologische Steroidbestimmung von Cortisol und Aldosteron im Plasma

Versuchsprinzip:

In einem Radioimmunoassay (RIA) konkurrieren radioaktiv markiertes Antigen (Tracer) und unmarkiertes Antigen (nachzuweisendes Hormon) um die limitierten Bindungsstellen eines spezifischen Antikörpers. Nach Trennung von freiem Hormon und Antikörper-Hormon-

4. Material und Methoden

Komplex wird die Radioaktivität des verbleibenden Antigen-Antikörper-Komplexes gemessen. Das Signal ist umso größer, je weniger zu bestimmendes Steroid den Tracer von den Bindungsstellen verdrängen konnte, d. h. es ist umgekehrt proportional zur Steroidkonzentration. Durch Bezug auf eine Eichkurve mit bekannter Steroidkonzentration läßt sich die Hormonkonzentration im Plasma berechnen.

Die Plasma-Steroide Cortisol und Aldosteron wurden radioimmunologisch in einem Festphasen-Assay (coated tubes) mit einem kommerziell erhältlichen Kit (Coat-A-Count) von Hermann Biermann Diagnostica (Bad Nauheim) bestimmt. Die Intraassay-Varianzen betragen für Cortisol 4,2% und für Aldosteron 3,4%. Die Interassay-Varianzen waren 6,9% resp. 9,1%. Die untere Nachweisgrenze für Cortisol lag bei 27,6 nmol/l, für Aldosteron bei 0,07 nmol/l. Alle Tiergruppen aus einem Versuch wurden innerhalb des gleichen Assays bestimmt, um analytisch bedingte Einflüsse auf die Versuchsergebnisse zu minimieren.

4.3.2 Immunoradiometrische Plasma-ACTH-Bestimmung

Versuchsprinzip:

In einem immunoradiometrischen Assay (IRMA) werden alle zu bestimmenden Antigenmoleküle von einem an eine feste Phase gekoppelten und im Überschuß vorliegenden spezifischen Antikörper gebunden. Ein anschließend ebenfalls im Überschuß zugegebener, radioaktiv markierter Antikörper bindet spezifisch an das gleiche Antigen, aber an einem anderen Epitop. Nach Abtrennung der überschüssigen freien radioaktiven Antikörper wird der sandwichartig an die feste Phase gebundene Radioaktivitätsanteil gemessen. Das Signal ist dabei der steigenden Antigenkonzentration proportional. Durch Bezug auf eine Standardkurve mit bekannter Antigenkonzentration wird die Hormonkonzentration berechnet.

Die ACTH-Konzentration im Plasma wurden in einem immunoradiometrischen Assay (IRMA) mit einem kommerziell erhältlichen Kit (Nichols Institute, San Capistrano, CA, USA) bestimmt. Das Meerschwein-ACTH (Auspep, Parkville, Australien) besitzt in diesem Assay, der nur intaktes ACTH (1-39) messen kann, 100% Kreuzreaktivität mit humanem ACTH. Die untere Nachweisgrenze lag bei 1,2 pmol/l bei einer Intraassay-Varianz von 3,0% und einer Interassay-Varianz von 9,8%. Auch hier wurden die Proben aller Tiergruppen eines Versuchs zusammen in einem Assay bestimmt.

4.3.3 Plasma-Renin-Aktivität (PRA) (Haber *et al.* 1969, Oelkers *et al.* 1974)

Versuchsprinzip:

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität des Renins im Plasma erfolgt indirekt über die Bildung von Angiotensin I während einstündiger Inkubation bei 37° C und Hemmung der vorhandenen Angiotensinasen und des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) mittels EDTA und weiterer Chelatbildner (*ortho*-Phenanthrolin). Dabei wird ein pH von 6,0 eingestellt, da bei diesem pH-Wert die Angiotensinasen am wenigsten aktiv sind und das pH-Optimum von 5,5 für die Renin-Substrat-Reaktion in unmittelbarer Nähe liegt. Das entstandene Angiotensin I als Primärprodukt der Plasma-Renin-Aktivität (PRA) wird schließlich radioimmunologisch nachgewiesen (Haber *et al.* 1969).

Im **Hauptversuch der Vitamin-C-Verarmung** wurde die PRA mit einem kommerziellen Kit von New England Nuclear (Billerica, MA, USA) ermittelt. Da nur ein geringes Probenvolumen zur Verfügung stand, mußten die vorgesehene Plasmamenge (1 ml) und alle Reagentienvolumina auf ein Fünftel der angegebenen Menge reduziert werden. Statt Doppelbestimmungen wurden vier Verdünnungsschritte mit Nullserum im RIA eingesetzt und alle innerhalb der Standardkurve liegenden Werte gemittelt. Die Intraassay-Varianz wird vom Hersteller mit 5,2% angegeben (Pool mit 9,7 ng/ml/h) bei einer Sensitivität von 30 pg/ml. Die Tiere der Gruppen 1 + 2 und 5 + 6 (Kontrolle/Vitamin-C-arm mit bzw. ohne Natrium) wurden im gleichen Ansatz analysiert, die Gruppen 3 + 4 (ACTH-Behandlung) in einem weiteren Assay.

Im **Hauptversuch der Vitamin-E-Verarmung** stand genügend Plasma zur Verfügung, so daß die PRA hier nach der von Oelkers *et al.* (1974) modifizierten Methode von Haber *et al.* (1969) bestimmt werden konnte, die 1 ml Probenvolumen voraussetzt. Dabei geht der Inkubation und nachfolgender Angiotensin-I-Bestimmung unter Verwendung des oben genannten Kits eine initiale 12-stündige Dialyse der Plasma-Proben gegen einen isoosmotischen Puffer von pH 6,0 voraus. Die Interassay-Varianz eines humanen Plasma-Pools von 1,7 ng/ml/h lag bei 12,4%, während die Intraassay-Varianz eines 1:5 vorverdünnten Meerschwein-Pools von 6,6 ng/ml/h 4,6% betrug. Alle Proben der Tiere des Hauptversuchs der Vitamin-E-Verarmung und der Pilottiere der kombinierten Vitamin-C- und Vitamin-E-Verarmung wurden zusammen in einem Assay analysiert.

4. Material und Methoden

4.3.4 Photometrische Vitamin-C-Analytik in Serum und Gewebe (Zannoni *et al.* 1974)

Die Konzentration von Vitamin C in Nebenniere, Leber und Serum der Meerschweinchen wurde photometrisch nach der leicht modifizierten Methode von Zannoni *et al.* (1974) bestimmt. Dabei reduziert Ascorbinsäure Eisen^{III}-Chlorid zu Eisen^{II}-Chlorid. Letzteres bildet quantitativ mit 2,2'-Bipyridin einen roten Komplex, dessen Farbintensität der Vitamin-C-Konzentration direkt proportional ist und im Photometer gemessen wird. Anhand einer Eichkurve mit bekannter Ascorbinsäure-Konzentration wird die Vitamin-C-Konzentration in Serum bzw. Gewebe berechnet.

Durchführung:

Je nach erwarteter Vitamin-C-Konzentration werden im Eisbad 500 oder 800 µl Serum mit 60 bzw. 96 µl 40% Trichloressigsäure (TCA) deproteiniert. 100 bzw. 400 mg Leber oder 30 bzw. 150 mg Nebenniere werden mit 2 ml 5% TCA versetzt und homogenisiert (2 ml Glas-Homogenisatoren mit Schliff und Reservoir, Braun, Melsungen). Nach Zentrifugation bei 4° C und 14000 UPM (Centrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg) werden jeweils 150 bzw. 300 µl des Serum-Überstandes oder 100, 200 und 300 µl des Gewebe-Überstandes im Doppelansatz in Halbmicro-Einmalküvetten (10*4*45 mm, Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Parallel zu den Proben werden eine Verdünnungsreihe von bekannter Ascorbinsäure-Konzentration und ein Referenzwert mit 5% TCA pipettiert. Das Volumen der Probenansätze wird gegebenenfalls mit 5% TCA auf jeweils 300 µl ergänzt, bevor 180 µl einer 1% 2,2'-Bipyridin-Lösung zugegeben werden. Das Bipyridin wurde unter Abänderung der Methode bereits zusammen mit 85% *ortho*-Phosphorsäure (in unveränderter Endkonzentration von 10,625 %) in Lösung gebracht, um ein Ausfallen zu verhindern. Anschließend werden 20 µl einer 3% Eisen^{III}-Chlorid-Lösung hinzugegeben, die Ansätze gut durchmischt und die Extinktion des gebildeten Komplexes nach einer Stunde Inkubation (Raumtemperatur) bei 525 nm im Photometer (Uvikon 930, Kontron Instruments, Neufahrn) gemessen. Die Intraassay-Varianz eines humanen Serum-Pools lag bei 4,8%, die Interassay-Varianz bei 7,9%. Die untere Nachweisgrenze der Ascorbinsäure-Konzentration betrug für Serum 0,5 µg/ml, das entspricht einem Absolutgehalt von 0,15 µg Ascorbinsäure pro Probe.

Reagenzien:

- L-Ascorbinsäure (Vitamin C), Natriumsalz (Sigma, München)
- Trichloressigsäure (TCA), krist., reinst (Merck, Darmstadt)

- *ortho*-Phosphorsäure 85%, reinst (Merck, Darmstadt)
- Eisen^{III}-Chlorid Hexahydrat (Merck, Darmstadt)
- 2,2'-Bipyridin (Merck, Darmstadt)

4.3.5 Vitamin-E-Bestimmung in Serum und Gewebe mittels HPLC (Hochleistungs-Flüssigchromatographie) (Driskell *et al.* 1982, Zaspel und Csallany 1983)

Vitamin E (α -Tocopherol) wird zunächst mit einem lipophilen Lösungsmittel extrahiert, bevor es über ein Hochleistungs-Flüssigchromatographiesystem von anderen Lipiden getrennt und schließlich mit einem UV-Detektor bei 290 nm anhand einer Eichkurve quantifiziert werden kann. Ein interner Standard mit ähnlichem Lösungsverhalten und Absorptionsmaximum sowie differenzierbaren Retentionszeiten wird zur Überprüfung der Extraktionsausbeute den Proben zugegeben, um die Wiederfindung für α -Tocopherol indirekt zu berechnen.

Im Vorversuch wurden die Vitamin-E-Spiegel im Serum der Meerschweinchen nach Driskell *et al.* (1982) analysiert. Dabei wurde mit Hexan extrahiert und Retinol-Acetat als interner Standard verwendet. Für die Bestimmung der α -Tocopherol-Konzentrationen im Serum der Hauptversuchstiere und in allen Gewebeproben konnte die Methode von Zaspel und Csallany (1983) mit geringen Modifikationen etabliert werden, da sie in Wiederfindung und Reproduzierbarkeit überlegen war. Als Chromatographiesystem wurde eine *reversed phase* Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) mit einer Vertex Säule 250*4 mm und Vorsäule 5*4 mm, beide gefüllt mit Spherisorb S5 ODS II 5 μ m (Knauer, Berlin), und einem Laufmittelgemisch von 96% Methanol und 4% H₂O isokratisch bei einer Flußrate von 2 ml/min benutzt. Die HPLC-Anlage (LKB Brommer 2156 Solvent Conditioner, 2249 Gradient Pump, Pharmacia, Freiburg; Schlaufeninjektor von Knauer, Berlin) war mit einem UV-Detektor (2141 Variable Wavelength Monitor, Pharmacia, Freiburg) ausgestattet. Die quantitative Auswertung erfolgte durch Bezug auf einen externen Standard bei 290 nm mittels Nelson Analytical 900 Series Interface (Integrator) und PE Nelson 3000 Series Chromatography Data System (Perkin Elmer Nelson Systems, Cupertino, CA, USA).

Durchführung:

Zur Extraktion von Vitamin E aus dem **Serum** werden 300 μ l Serum mit 12,5 μ g α -Tocopherol-Acetat (50 μ l), 3 ml Aceton und 0,45 g wasserfreiem Natriumsulfat versetzt.

4. Material und Methoden

Nach jeder Zugabe wird gut gemischt und anschließend für 10 min bei 3000 UPM zentrifugiert. Der Überstand (Aceton-Phase) wird mit Stickstoff unter Lichtschutz abgedampft, in 300 µl Methanol rückgelöst und 100 µl davon injiziert. Um α -Tocopherol aus dem **Gewebe** zu extrahieren, werden ca. 100 mg Lebergewebe bzw. die Hälfte einer Nebenniere eines Meerschweinchens nach Zugabe von 50 µl des internen Standards (250 µg/ml α -Tocopherol-Acetat gereinigt in Laufmittel) mit 2 ml Aceton homogenisiert (2 ml Glas-Homogenisatoren mit Schliff und Reservoir, Braun, Melsungen) und zentrifugiert (10 min bei 3000 UPM). Nach Abnahme des Überstandes wird der Geweberest der Leberprobe noch einmal, der Nebennierenrest noch zweimal mit 2 ml Aceton reextrahiert. Die vereinigten Überstände einer Probe werden mit Stickstoff unter Lichtschutz abgedampft, in 300 µl Methanol (Leber) bzw. Aceton (Nebenniere) wieder aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Die Leberprobe (100 µl) kann danach direkt injiziert werden, während von der Probe der Nebennieren ein Aliquot abgenommen und mit der gleichen Menge an Laufmittel versetzt werden muß, um eine anfängliche Trübung verschwinden zu lassen. 100 µl werden schließlich injiziert. Nach jeder Gewebeprobe muß die Säule mit Isopropanol gespült werden. Die Intraassay-Varianz eines humanen Serum-Pools mit normaler Vitamin-E-Konzentration lag bei 5,9% (n = 6), die Interassay-Varianz bei 4,9% (n = 10). Für einen Normalpool aus Meerschwein-Leber betrug die Intraassay-Varianz 9,1%, die Interassay-Varianz respektive 12,0%. Serum-Tocopherol wurde zu 84,9%, Leber-Tocopherol zu 83,1% wiedergefunden. Die untere Nachweisgrenze für α -Tocopherol von 0,5 µg/ml wurde nur im Serum kombiniert Vitamin-E- und Vitamin-C-verarmter Tiere annähernd erreicht, sie konnte bei den entsprechenden Leberproben durch Erhöhung der Einwaage umgangen werden.

Reagenzien:

- *dl*-**a**-Tocopherol (Sigma, München)
- *dl*-**a**-Tocopherol-Acetat (Sigma, München), mit HPLC aufgereinigt
- Retinol-Acetat (Sigma, München)
- Natriumsulfat wasserfrei (Merck, Darmstadt)
- Aceton (Merck, Darmstadt)
- n-Hexan LiChrosolv^R (Merck, Darmstadt)
- Methanol LiChrosolv^R (Merck, Darmstadt)
- 2-Propanol LiChrosolv^R (Merck, Darmstadt)

4.3.6 Elektrolytbestimmung

Die Konzentrationen der Elektrolyte Natrium und Kalium wurden in Serum und Urin mit einem Flammenphotometer (Instrumentation Laboratory 973, Milano, Italien) bestimmt.

4.4 Statistik

Die statistischen Berechnungen von Mittelwerten, Standardabweichungen (SD), Standardabweichungen vom Mittelwert (SEM) und Korrelationskoeffizienten wurden mit einem Personalcomputer und dem Microsoft-Programm Excel 4.0 ausgeführt.

Für die statistische Analyse der Signifikanzen wurde der Mann Whitney Wilcoxon U Test unter Verwendung der Software SPSS for Windows 5.0 gewählt. Damit wurden jeweils alle Versuchsgruppen gegeneinander getestet, die sich nur in einem Parameter unterschieden. Der Mann Whitney Wilcoxon U Test ist ein ungepaarter Rangtest und setzt keine Normalverteilung voraus.

Falls nicht anders erwähnt, sind alle Ergebnisse in Text, Tabellen und Abbildungen als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

5. ERGEBNISSE

5.1 Hauptversuch Vitamin-C-Verarmung mit Pilotstudie

5.1.1 Vitamin-C-Verarmung, klinischer Verlauf und Vitamin-C-Konzentrationen

In der **Pilotstudie** wurden sieben Meerschweinchen 16 bis 22 Tage Vitamin-C-verarmt, um den zeitlichen Verlauf einer Hypovitaminose unter unseren Versuchsbedingungen zu erfassen und die optimale Versuchsdauer für den Hauptversuch zu finden. In dieser Zeit entwickelten sie folgende, individuell mehr oder weniger deutliche klinische Anzeichen eines Skorbut: Kümern und Gewichtsverlust bei ungestörter Futteraufnahme, Salivation, struppiges Haarkleid und Haarausfall, Melaena (Teerkot) und hundesitzartige Haltung mit Bewegungsunlust infolge von subfaszialen und periartikulären Haemorrhagien der Kniegelenke. Letztere wurden neben weiteren Blutungen in der Unterkiefer- und Unterschenkelmuskulatur, an der Rippen/Knorpelgrenze und in der Wand von Caecum und Colon auch *post mortem* durch Sektion bestätigt. Die Tiere wurden innerhalb von 16 bis 22 Tagen jeweils getötet, sobald der Gewichtsverlust mehr als 30% betrug oder das Allgemeinbefinden deutlich gestört war.

Der individuelle Verlauf der Wachstumskurven während der Eingewöhnungsphase und im Verlauf der Vitamin-C-Verarmung wird in *Abb. 5.1* dargestellt: Während beim ersten Tier bereits am 9. Tag der Vitamin-C-Depletion eine negative Wachstumsbilanz und am 15. Tag deutliche Allgemeinstörungen zu beobachten waren, zeigten die drei letzten der sieben Meerschweinchen erst nach 15 Tagen einen beginnenden Gewichtsverlust und entsprechend spät (17. bis 20. Tag) weitere Skorbutsymptome.

Die Vitamin-C-Konzentrationen der Pilottiere fielen im Vergleich zu den Normalwerten herkömmlich gehaltener Meerschweinchen auf rund 1/30 in der Nebenniere (von 1362 µg/g auf $38,1 \pm 2,6$ µg/g), auf ca. 1/10 in der Leber (von 314 µg/g auf $29,6 \pm 1,8$ µg/g) und auf ca. 1/4 im Serum (von 5,90 µg/ml auf $1,49 \pm 0,15$ µg/ml). Somit verlief die Vitamin-C-Verarmung in den untersuchten Geweben zeitlich parallel. Im Hauptversuch, in dem die Nebennieren nicht mehr zur Vitamin-Analytik zur Verfügung standen, weil sie für weiterführende *in vitro*-Studien der Aldosteronsynthese (Redmann *et al.* 1995) bzw. molekularbiologische Untersuchungen

einer anderen Arbeitsgruppe (Bülow *et al.* 1996) gebraucht wurden, konnte die Vitamin-C-Depletion folglich allein über die Analyse von Serum und Leber kontrolliert werden.

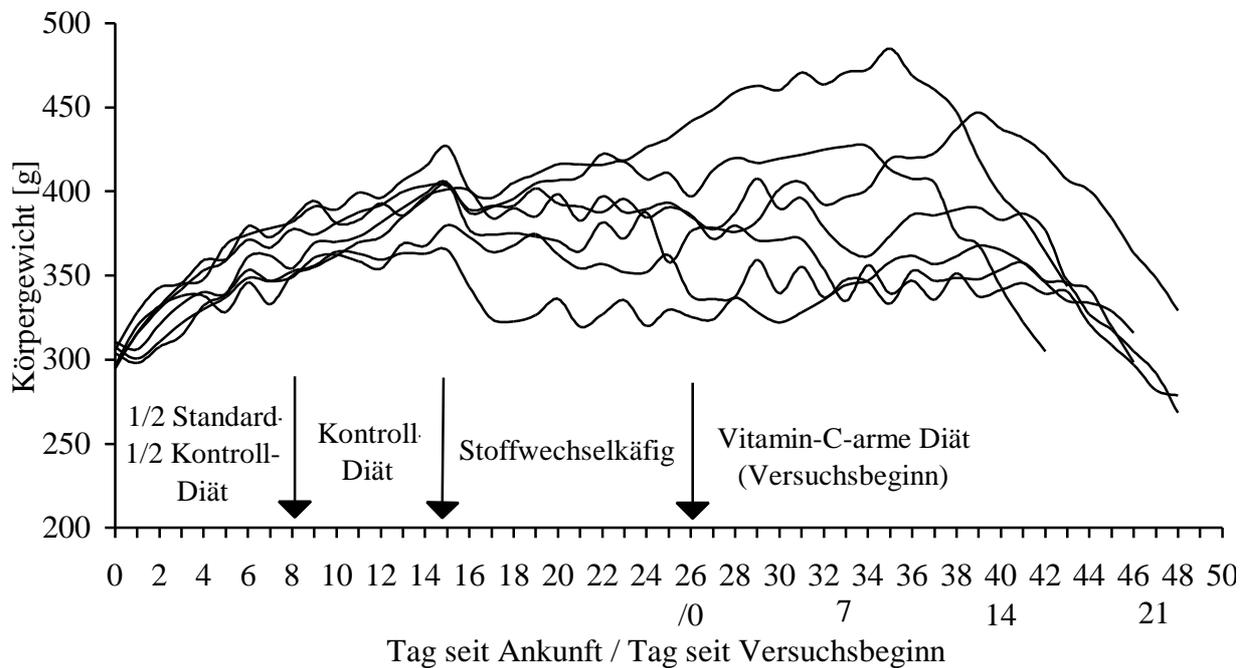


Abbildung 5.1: Wachstumsverlauf der sieben Pilottiere bei Vitamin-C-Verarmung. Nach einer 26tägigen Eingewöhnungsphase, in der die 7 Meerschweinchen zunächst an die Kontrolldiät und die Einzelhaltung im Stoffwechselkäfig adaptiert wurden, begann mit Fütterung der Vitamin-C-armen Diät der eigentliche Versuch. Die Tiere wurden solange Vitamin-C-arm ernährt, bis sie entweder über 30% an Gewicht verloren hatten, oder ihr Allgemeinbefinden deutlich gestört war.

Die α -Tocopherol-Konzentrationen der Pilottiere in Serum ($7,13 \pm 0,85 \mu\text{g/ml}$), Leber ($26,0 \pm 1,6 \mu\text{g/g}$) und Nebenniere ($448,6 \pm 60,1 \mu\text{g/g}$) wurden durch den Vitamin-C-Mangel nicht beeinflusst, sie lagen im Bereich der Normalwerte der Kontrolltiere des Hauptversuchs (vgl. 5.1.2 Tab. 5.1).

Obwohl die Nebennieren der Pilottiere makroskopisch etwas hyperämisch wirkten, konnte eine signifikante Hypertrophie im Vergleich zu den Kontrolltieren des Hauptversuchs allein über die Messung des Organgewichts nicht nachgewiesen werden (Relation Nebennierengewicht/Maximal-Körpergewicht: $0,43 \pm 0,02^{0/00}$ Pilottiere vs. $0,40 \pm 0,02^{0/00}$ Kontrolltiere).

5. Ergebnisse

Trotz ähnlicher Plasma-ACTH-Spiegel ($34,8 \pm 6,0$ pg/ml Pilottiere vs. $42,9 \pm 6,0$ pg/ml Kontrolltiere) stiegen die Cortisol- und Aldosteron-Konzentrationen im Plasma im Stadium des Skorbut bei den Pilottieren auf ca. ein Vierfaches der Kontrolltiere des Hauptversuchs (Plasma-Cortisol 6865 ± 1448 nmol/l, Plasma-Aldosteron $6,03 \pm 1,02$ nmol/l vs. 1518 ± 22 nmol/l resp. $1,51 \pm 0,30$ nmol/l; $p = 0,002$ resp. $p = 0,016$). Die Plasma-Renin-Aktivität (PRA $27,3 \pm 4,5$ ng/ml/h vs. $15,8 \pm 2,9$ ng/ml/h) war nur leicht, aber nicht signifikant erhöht. Während Serum-Natrium mit $136,9 \pm 2,1$ mmol/l in der Norm lag, war das Serum-Kalium mit $6,25 \pm 0,25$ mmol/l bei den Pilottieren im oberen Normbereich ($p = 0,0052$) (vgl. 5.1.5 Tab. 5.2). Letzteres ist aber durch die Skorbut-bedingte starke Hämolyse neigung zu erklären. Die durchschnittliche Natrium-Ausscheidung der letzten beiden Tage unterscheidet sich nicht signifikant von den Kontrollen des Hauptversuchs (Pilottiere: Urin-Natrium $0,87 \pm 0,08$ mmol/24h vs. $1,22 \pm 0,14$ mmol/24h Kontrolltiere).

Im **Hauptversuch der Vitamin-C-Verarmung** wurde die Vitamin-C-Depletion über 15 Tage durchgeführt. Erwartungsgemäß zeigten in dieser Zeit einige Meerschweinchen zwar Gewichtsverlust, aber - bis auf ein Tier mit Salivation - noch keine weiteren klinischen Symptome des Skorbut. Bei der Sektion waren jedoch bei fast allen Vitamin-C-armen Tieren leichte bis mittelgradige Haemorrhagien in der Umgebung der Kniegelenke, an der Rippen/Knorpelgrenze und (seltener) in der Dickdarmwand oder Unterkiefermuskulatur festzustellen. Die Ascorbinsäure-Spiegel fielen durch 15 Tage Vitamin-C-Verarmung in allen drei depletierten Gruppen im Serum auf ca. 1/3 und in der Leber auf ca. 1/10 der vergleichbaren, Vitamin-C-normal ernährten Kontrolltiere ($p < 0,001$) (Abb. 5.2). Durch die dreieinhalb tägige ACTH-Behandlung sank bei den Vitamin-C-armen Tieren die Ascorbinsäure-Konzentration im Serum sogar noch stärker ab als in der unbehandelten, Vitamin-C-armen Gruppe ($p = 0,006$).

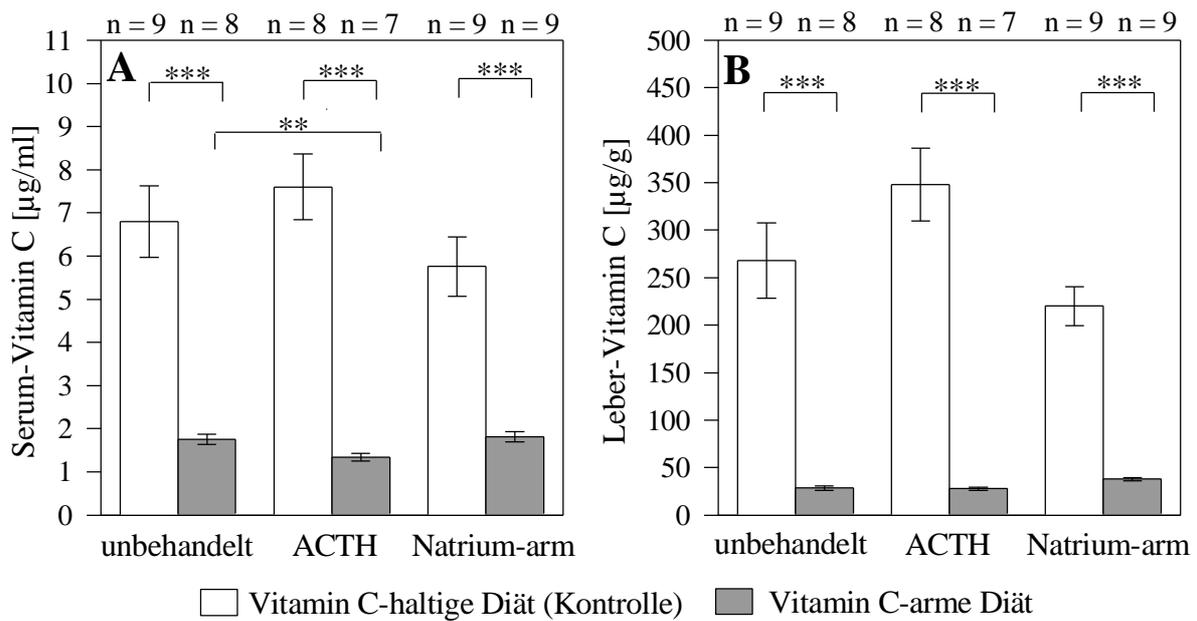


Abbildung 5.2: Vitamin-C-Konzentrationen in Serum (A) und Leber (B) im Hauptversuch der Vitamin-C-Verarmung. Der Versuch wurde über 15 Tage durchgeführt, die Tiere wurden am Morgen des 16. Tages getötet und entblutet. Während der letzten 3 ½ Tage wurden zwei Gruppen jeweils zweimal täglich mit 10 I.E. Depot-ACTH s.c. behandelt (= ACTH), alle anderen Gruppen erhielten analog 0,9 % NaCl-Lösung als Placebo-Injektion (= unbehandelt). Zwei weitere Gruppen wurden zusätzlich in den 15 Tagen diätetisch Natriumverarmt (= Natrium-arm). Angaben in Mittelwerten \pm SEM bei einer Anzahl (n) von 7 bis 9 Meerschweinchen pro Gruppe. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Alle drei Vitamin-C-armen Gruppen wiesen gegenüber ihren Kontrollgruppen einen deutlich geringeren Gewichtszuwachs während der 15 Versuchstage auf, allerdings ist die Gewichts Differenz nur im Vergleich der unbehandelten Tiere signifikant ($p = 0,02$) (Abb. 5.3).

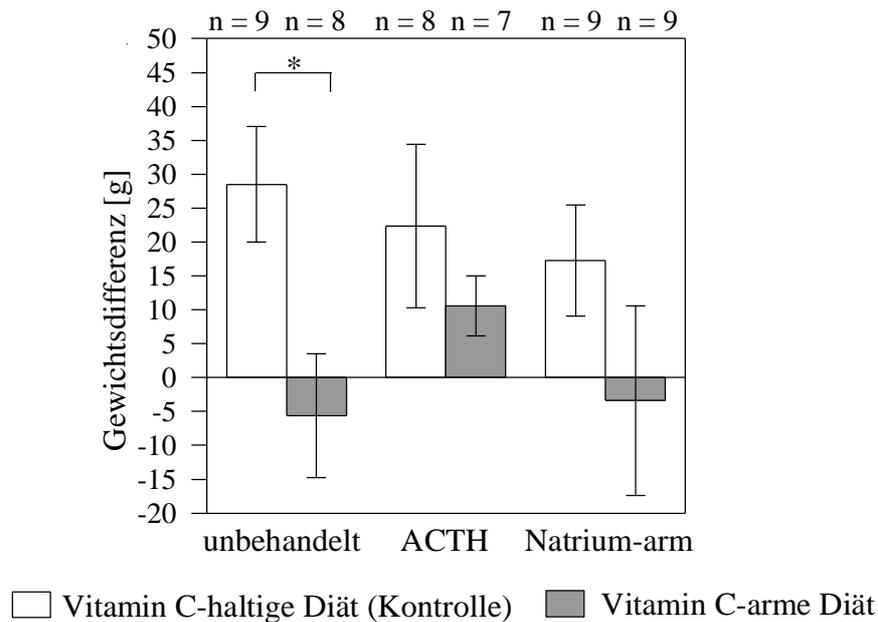


Abbildung 5.3: Entwicklung des Körpergewichts der Meerschweinchen während der 15 Tage Versuchsdauer im Hauptversuch der Vitamin-C-Verarmung. Der Versuch wurde über 15 Tage durchgeführt, das Körpergewicht täglich protokolliert. Die Tiere wurden am Morgen des 16. Tages getötet. Dargestellt ist die Differenz des Körpergewichts vom 16. Versuchstag zum Tag 0. Während der letzten 3 ½ Tage wurden zwei Gruppen jeweils zweimal täglich mit 10 I.E. Depot-ACTH s.c. behandelt (= ACTH), alle anderen Gruppen erhielten analog 0,9 % NaCl-Lösung als Placebo-Injektion (= unbehandelt). Zwei weitere Gruppen wurden zusätzlich in den 15 Tagen diätetisch Natrium-verarmt (= Natrium-arm). Angaben in Mittelwerten \pm SEM bei einer Anzahl (n) von 7 bis 9 Meerschweinchen pro Gruppe. * $p \leq 0,05$.

5.1.2 Vitamin E in Serum und Gewebe

Die Vitamin-E-Konzentration in Serum und Leber blieb durch eine Vitamin-C-Verarmung der Meerschweinchen unbeeinflusst (Tab. 5.1). Eine beobachtete Tendenz erhöhter α -Tocopherol-Konzentrationen im Serum aller Vitamin-C-verarmten Gruppen war nicht signifikant. Bei den ACTH-behandelten Kontrolltieren ließ sich gegenüber den unbehandelten Kontrollen ein geringgradig signifikanter ($p = 0,046$) Abfall der Vitamin-E-Spiegel im Serum erkennen.

	Kontrolle n = 9	Vit.-C-arm n = 8	Kontrolle + ACTH n = 8	Vit.-C-arm + ACTH n = 7	Natrium- arm n = 9	Natrium- & Vit.-C-arm n = 9
Serum-Vit. E [µg/ml]	5,16 ± 0,75	7,06 ± 1,27	3,17 * ^{a)} ± 0,46	3,97 ± 1,03	6,03 ± 1,30	8,24 ± 1,02
Leber-Vit. E [µg/g]	21,8 ± 2,5	26,2 ± 4,0	20,2 ± 1,8	14,3 ± 2,6	26,5 ± 4,7	28,2 ± 2,8

Table 5.1: Hauptversuch der Vitamin-C-Verarmung: Vitamin-E-Konzentrationen in Serum und Leber. Die Vitamin-C und/oder Natrium-Verarmung wurde über 15 Tage durchgeführt, die Tiere wurden am Morgen des 16. Tages getötet. Während der letzten 3 ½ Tage wurden zwei Gruppen jeweils zweimal täglich mit 10 I.E. Depot-ACTH s.c. behandelt, alle anderen Gruppen erhielten analog 0,9 % NaCl-Lösung als Placebo-Injektion. Angaben in Mittelwerten ± SEM bei einer Anzahl (n) von 7 bis 9 Meerschweinchen pro Gruppe. a) * p ≤ 0,05 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

5.1.3 Plasma-Cortisol und -Aldosteron

Bei den Vitamin-C-armen Meerschweinchen stieg das Plasma-Cortisol durch die Vitamin-C-Depletion im Vergleich zu den Kontrolltieren leicht an ($p = 0,015$), während die Plasma-Aldosteron-Konzentration nicht signifikant beeinflusst wurde (*Abb. 5.4*). Die ACTH-Behandlung führte in der Kontrollgruppe zu einem sechsfachen, in der Vitamin-C-depletierten Gruppe zu einem fast vierfachen Anstieg der Cortisol-Sekretion ($p < 0,001$) und zu einer deutlichen Nebennieren-Hypertrophie (Relation Nebennierengewicht/Maximal-Körpergewicht $0,40 \pm 0,02^{0/00}$ Kontrolltiere *resp.* $0,41 \pm 0,03^{0/00}$ Vitamin-C-arme Tiere *vs.* $0,62 \pm 0,04^{0/00}$ ACTH-behandelte Kontrolltiere *resp.* $0,60 \pm 0,04^{0/00}$ ACTH-behandelte Vitamin-C-arme Tiere, $p = 0,0003$ *resp.* $p = 0,004$). Im Gegensatz dazu wurde das Plasma-Aldosteron durch die dreitägige ACTH-Behandlung deutlich supprimiert ($p < 0,001$) (*Abb. 5.4 B*). Während die Natrium-Verarmung ohne Einfluß auf das Plasma-Cortisol blieb, wurde die Aldosteron-Sekretion durch die Natrium-Depletion um das Dreifache stimuliert ($p = 0,001$). Dieser stimulierende Effekt der Natrium-Verarmung auf die Aldosteron-Sekretion wurde durch die zusätzliche Vitamin-C-Depletion aufgehoben; in der Natrium- und Vitamin-C-verarmten Gruppe blieb eine Steigerung der Aldosteron-Sekretion also aus ($p = 0,014$) (*Abb. 5.4 B*).

5. Ergebnisse

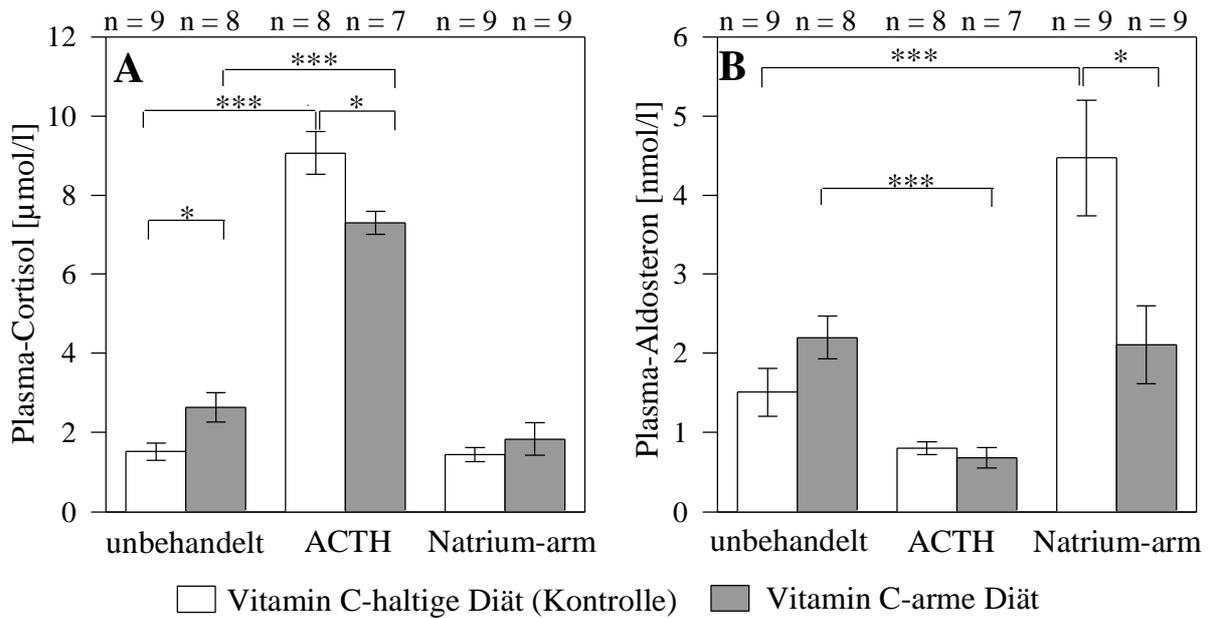


Abbildung 5.4: Plasma-Cortisol (A) und Plasma-Aldosteron (B) im Hauptversuch der Vitamin-C-Verarmung. Der Versuch wurde über 15 Tage durchgeführt, die Tiere wurden am Morgen des 16. Tages getötet und entblutet. Während der letzten 3 ½ Tage wurden zwei Gruppen jeweils zweimal täglich mit 10 I.E. Depot-ACTH s.c. behandelt (= ACTH), alle anderen Gruppen erhielten analog 0,9 % NaCl-Lösung als Placebo-Injektion (= unhandled). Zwei weitere Gruppen wurden zusätzlich in den 15 Tagen diätetisch Natrium-verarmt (= Natrium-arm). Angaben in Mittelwerten \pm SEM bei einer Anzahl (n) von 7 bis 9 Meerschweinchen pro Gruppe. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

5.1.4 Plasma-ACTH und Plasma-Renin-Aktivität (PRA)

Die **Plasma-ACTH-Konzentration** wurde weder durch die Vitamin-C-Verarmung noch durch die Natrium-Verarmung signifikant beeinflusst. Sie war in allen vier ACTH-unbehandelten Gruppen gleich hoch (Abb. 5.5 A).

Auch auf die **Plasma-Renin-Aktivität** hatte die Vitamin-C-Depletion keinen Einfluß (Abb. 5.5 B). Selbst bei Natrium-Verarmung war kein signifikanter Anstieg der PRA festzustellen. Durch die dreitägige ACTH-Behandlung wurde die PRA allerdings deutlich supprimiert ($p = 0,001$).

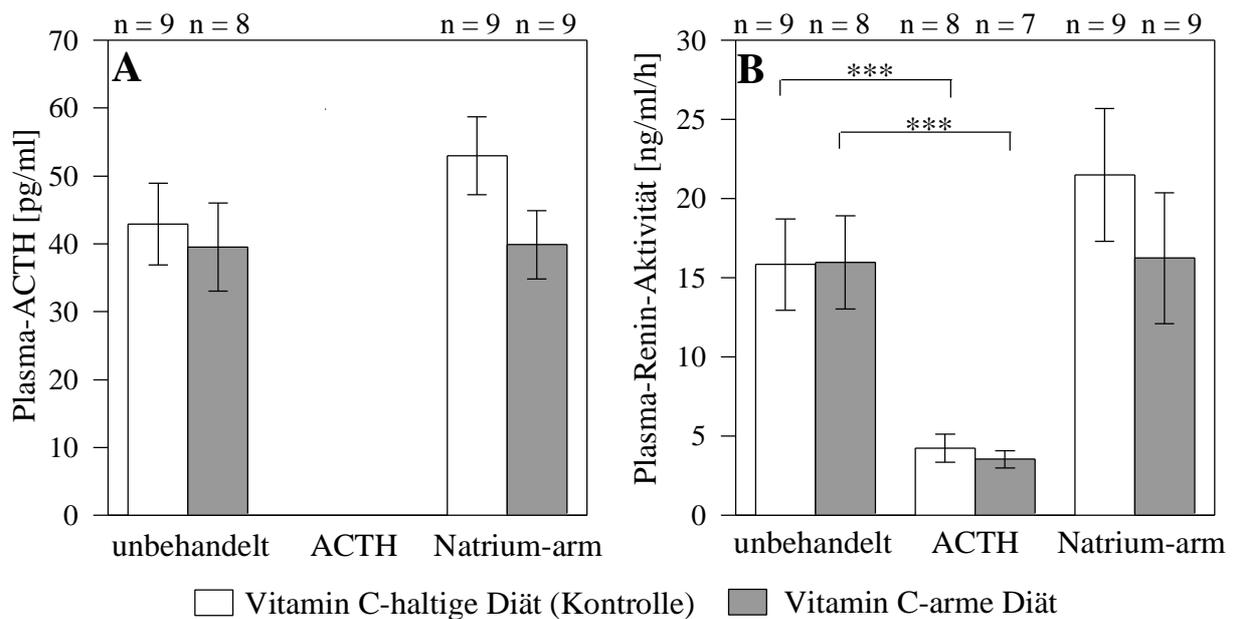


Abbildung 5.5: Plasma-ACTH-Konzentration (A) und Plasma-Renin-Aktivität (B) im Hauptversuch der Vitamin-C-Verarmung. Der Versuch wurde über 15 Tage durchgeführt, die Tiere wurden am Morgen des 16. Tages getötet und entblutet. Während der letzten 3 ½ Tage wurden zwei Gruppen jeweils zweimal täglich mit 10 I.E. Depot-ACTH s.c. behandelt (= ACTH), alle anderen Gruppen erhielten analog 0,9 % NaCl-Lösung als Placebo-Injektion (= unbehandelt). Zwei weitere Gruppen wurden zusätzlich in den 15 Tagen diätetisch Natriumverarmt (= Natrium-arm). Angaben in Mittelwerten \pm SEM bei einer Anzahl (n) von 7 bis 9 Meerschweinchen pro Gruppe. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

5.1.5 Serum-Natrium und -Kalium

Die **Natrium-Konzentration** im Serum blieb sowohl bei Vitamin-C-Verarmung als auch bei Natrium-Verarmung unverändert (Tab. 5.2). Eine tendentielle Erhöhung des Serum-Natriums nach dreitägiger ACTH-Behandlung ist nur bei den Vitamin-C-depletierten Meerschweinchen signifikant ($p = 0,0012$), nicht aber bei den Kontrolltieren.

In allen sechs Versuchsgruppen waren die **Kalium-Konzentrationen** des Serums etwa gleich (Tab. 5.2).

5. Ergebnisse

	Kontrolle n = 9	Vit.-C-arm n = 8	Kontrolle + ACTH n = 8	Vit.-C-arm + ACTH n = 7	Natrium- arm n = 9	Natrium- & Vit.-C-arm n = 9
Serum-Na⁺ [mmol/l]	136,1 ± 1,4	134,2 ± 1,7	141,3 ± 2,0	141,2 ** a) ± 0,7	134,1 ± 1,7	134,6 ± 0,9
Serum-K⁺ [mmol/l]	5,05 ± 0,24	5,22 ± 0,50	4,95 ± 0,35	4,45 ± 0,20	4,85 ± 0,14	4,80 ± 0,22

Tabelle 5.2: Hauptversuch der Vitamin-C-Verarmung: Elektrolyt-Konzentrationen im Serum. Die Vitamin-C und/oder Natrium-Verarmung wurde über 15 Tage durchgeführt, die Tiere wurden am Morgen des 16. Tages getötet. Während der letzten 3 ½ Tage wurden zwei Gruppen jeweils zweimal täglich mit 10 I.E. Depot-ACTH s.c. behandelt, alle anderen Gruppen erhielten analog 0,9 % NaCl-Lösung als Placebo-Injektion. Angaben in Mittelwerten ± SEM bei einer Anzahl (n) von 7 bis 9 Meerschweinchen pro Gruppe. a) ** p = 0,0012 im Vergleich zu den unbehandelten Vitamin-C-depletierten Tieren.

5.1.6 Elektrolyt-Ausscheidung (Urin-Natrium und -Kalium)

Zur Darstellung der durchschnittlichen Elektrolyt-Ausscheidung werden der Übersicht halber nur die 24-Stunden-Urine der letzten beiden Versuchstage herangezogen, obwohl über die gesamte Versuchsdauer Urin gesammelt wurde.

Ein Einfluß der Vitamin-C-Verarmung auf die durchschnittliche **Natrium-Exkretion** in den letzten zwei Versuchstagen ließ sich weder bei den unbehandelten noch bei den ACTH-behandelten Gruppen erkennen (*Abb. 5.6 A*). Durch die Natrium-arme Diät hingegen reduzierte sich bei den entsprechenden Gruppen die Natrium-Konzentration im 24h-Urin deutlich: Die Natrium-Exkretion der Kochsalz-arm gefütterten Tiere betrug nur 1/6 und die der Natrium- und Vitamin-C-armen Tiere 1/3 der vergleichbaren Ausscheidung von Kontrolltieren *resp.* Vitamin-C-depletierten Tieren (p jeweils < 0,001). Der Vitamin-C-Mangel führte aber bei den Natrium- und Vitamin-C-depletierten Tieren zu einer signifikant höheren Natrium-Ausscheidung als bei den rein Kochsalz-arm (und Vitamin-C-normal-) ernährten Tieren (p = 0,007).

Die mittlere **Kalium-Exkretion** der letzten beiden Versuchstage war in allen Versuchsgruppen ungefähr gleich (*Abb. 5.6 B*).

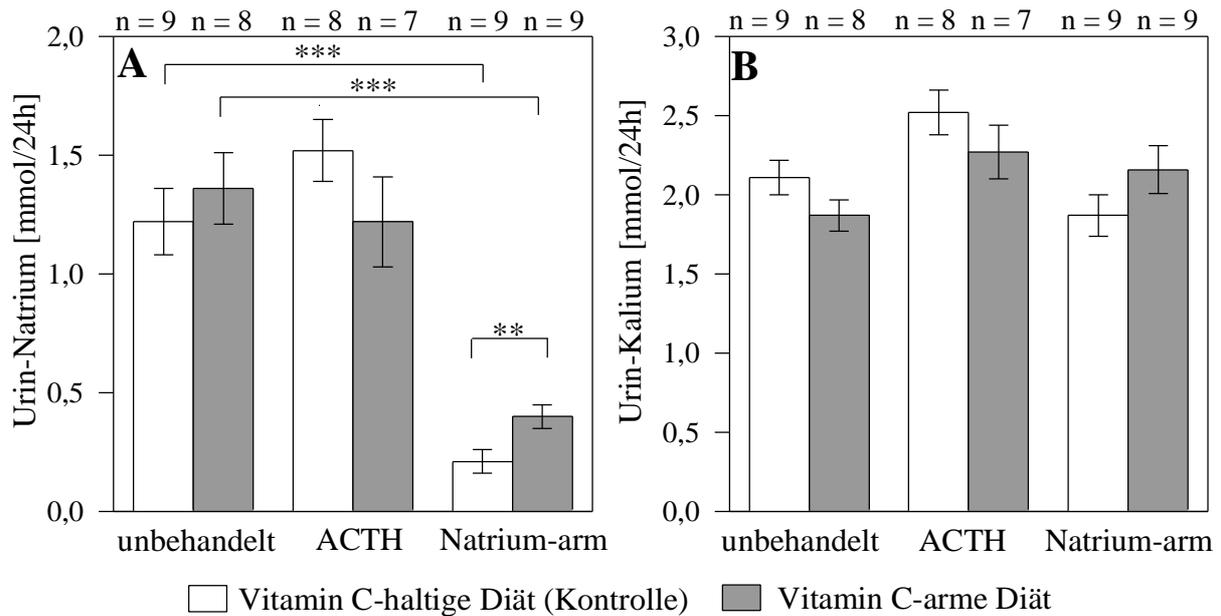


Abbildung 5.6: Urin-Natrium (A) und Urin-Kalium (B): Mittlere Elektrolyt-Ausscheidung im 24h-Urin der letzten beiden Versuchstage des Hauptversuchs der Vitamin-C-Verarmung. Der Versuch wurde über 15 Tage durchgeführt, die Tiere wurden am Morgen des 16. Tages getötet und entblutet. Während der letzten 3 ½ Tage wurden zwei Gruppen jeweils zweimal täglich mit 10 I.E. Depot-ACTH s.c. behandelt (= ACTH), alle anderen Gruppen erhielten analog 0,9 % NaCl-Lösung als Placebo-Injektion (= unbehandelt). Zwei weitere Gruppen wurden zusätzlich in den 15 Tagen diätetisch Natrium-verarmt (= Natrium-arm). Die durchschnittliche Elektrolyt-Ausscheidung wurde aus den jeweiligen 24-Stunden-Urinen der letzten beiden Tage ermittelt bei einer Anzahl (n) von 7 bis 9 Meerschweinchen pro Gruppe. Angaben in Mittelwerten \pm SEM. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

5.2 Hauptversuch Vitamin-E-Verarmung mit Vorversuch und Pilotstudie zur kombinierten Vitamin-E- und Vitamin-C-Verarmung

5.2.1 Vitamin-E-Verarmung, klinischer Verlauf und Vitamin-E-Konzentrationen

Das Ziel des **Vorversuchs**, mit wenigen Tieren den Verlauf einer Vitamin-E-Verarmung bis zum Auftreten von klinischen Symptomen zu verfolgen, wurde nur bedingt erreicht: Nach drei, fünf und acht Wochen wurden jeweils zwei Meerschweinchen zusammen mit je einem Kontrolltier getötet. Die α -Tocopherol-Konzentration nahm parallel in Nebenniere, Leber und

5. Ergebnisse

Serum ab (Abb. 5.7). Während in Serum und Leber bereits nach fünf Wochen ein Minimum erreicht schien, sank der Vitamin-E-Gehalt der Nebenniere, die eine fast zehnmal höhere Ausgangs-Konzentration an α -Tocopherol als die Leber besaß, auch nach acht Wochen noch ab. Keines der Tiere wies jedoch in dieser Zeit Symptome einer Hypovitaminose auf.

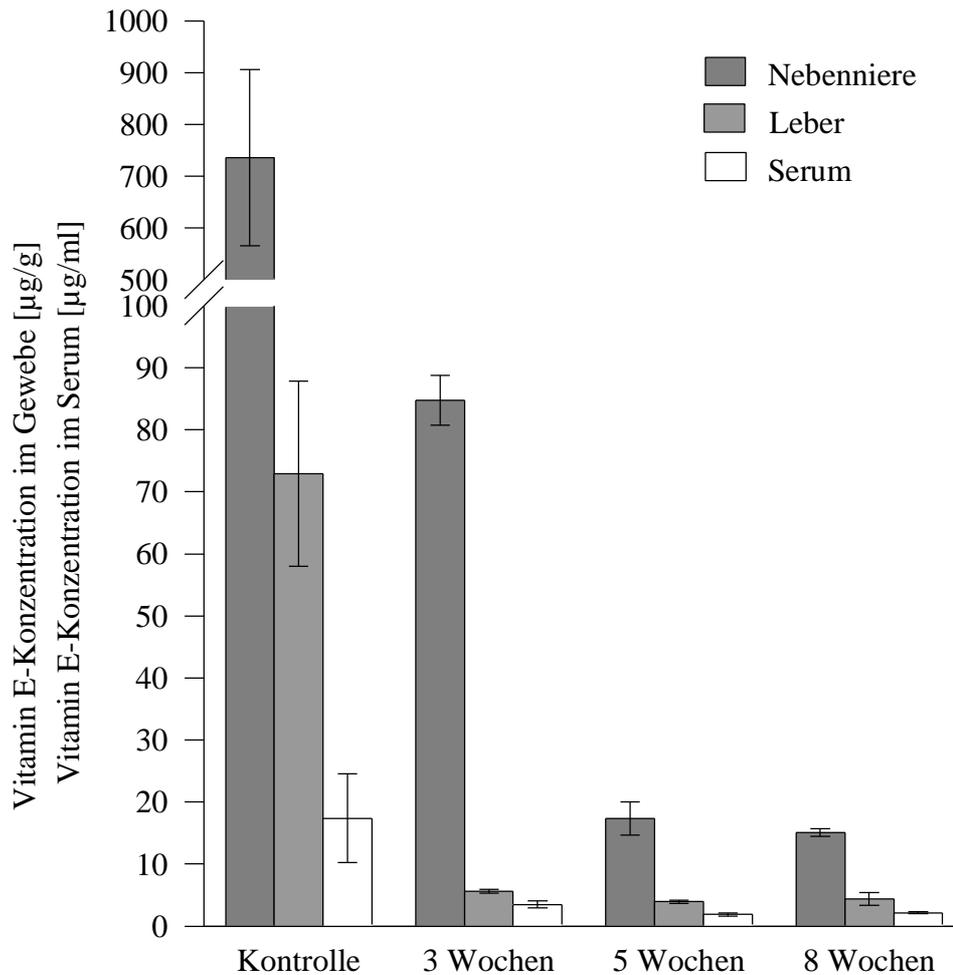


Abbildung 5.7: Vitamin-E-Konzentrationen in Nebenniere, Leber und Serum im Verlauf des Vorversuchs. Angaben in Mittelwerten \pm Einzelwerten von jeweils zwei Tieren. Die Kontrolltiere wurden nach 3 und 8 Wochen, je zwei Vitamin-E-verarmte Tiere nach 3, 5 und 8 Wochen Versuchsdauer getötet und entblutet.

Der **Hauptversuch zur Vitamin-E-Verarmung** wurde über zehn Wochen durchgeführt. Auch in dieser Zeit entwickelte keines der Meerschweinchen klinisch oder *post mortem* bei der Sektion erkennbare Anzeichen einer Hypovitaminose. Selbst die Tiere der Pilotstudie zur kombinierten Vitaminverarmung zeigten nach fast elf Wochen Vitamin-E-Depletion einschließlich fast dreiwöchiger Vitamin-C-Depletion weder Symptome eines α -Tocopherol-Mangels noch eines Skorbut. Zwischen den Kontrolltieren und den Vitamin-E-verarmten Tieren war jedoch ein geringgradig signifikanter Wachstumsunterschied festzustellen. Während die Kontrolltiere ein maximales Körpergewicht von $737,5 \pm 17,4$ g erreichten, konnten die Vitamin-E-depletierten Meerschweinchen dagegen nur ein durchschnittliches Maximalgewicht von $649,1 \pm 25,2$ g erzielen ($p = 0,028$). In den anderen Gruppen war das Wachstum nicht signifikant beeinflusst. Bei den Relationen der Nebennierengewichte zu den Maximalgewichten zeigten sich deutlichere Unterschiede: Sowohl in der Vitamin-E-verarmten als auch in der kombiniert Vitamin-E- und Vitamin-C-verarmten Gruppe konnte eine relative Vergrößerung der Nebennieren festgestellt werden (Relation Nebennierengewicht/Maximal-Körpergewicht: Kontrolltiere $0,28 \pm 0,01^{0/00}$ vs. $0,34 \pm 0,02^{0/00}$ Vitamin-E-arme Tiere vs. $0,37 \pm 0,01^{0/00}$ kombiniert Vitamin-E- und -C-verarmte Tiere, $p = 0,006$ resp. $0,009$). Auch die Natrium-armen Tiere zeigten wider Erwarten eine geringgradige Nebennierenhypertrophie im Vergleich zu den Kontrolltieren ($0,33 \pm 0,01^{0/00}$, $p = 0,035$). Bei Natriumverarmung in Kombination mit einer Vitamin-E- (und Vitamin-C-) Depletion konnte keine signifikante relative Größendifferenz der Nebenniere zu den jeweiligen mit normalen Natriummengen ernährten Kontrollen bzw. zu den reinen Kontrolltieren gefunden werden.

Als Ergebnis der zehnwöchigen Vitamin-E-Verarmung sank die α -Tocopherol-Konzentration im Serum auf ca. $1/6$ und in der Leber auf ca. $1/7$ der vergleichbaren, mit Vitamin-E-haltiger Diät gefütterten Kontrolltiere ($p < 0,001$) (Abb. 5.8). Obwohl die α -Tocopherol-Spiegel der kombiniert verarmten Tiere noch etwas stärker abfielen, ist hier die Signifikanz geringer ($p < 0,01$), da die Gruppen nur aus jeweils drei Tieren bestehen.

5. Ergebnisse

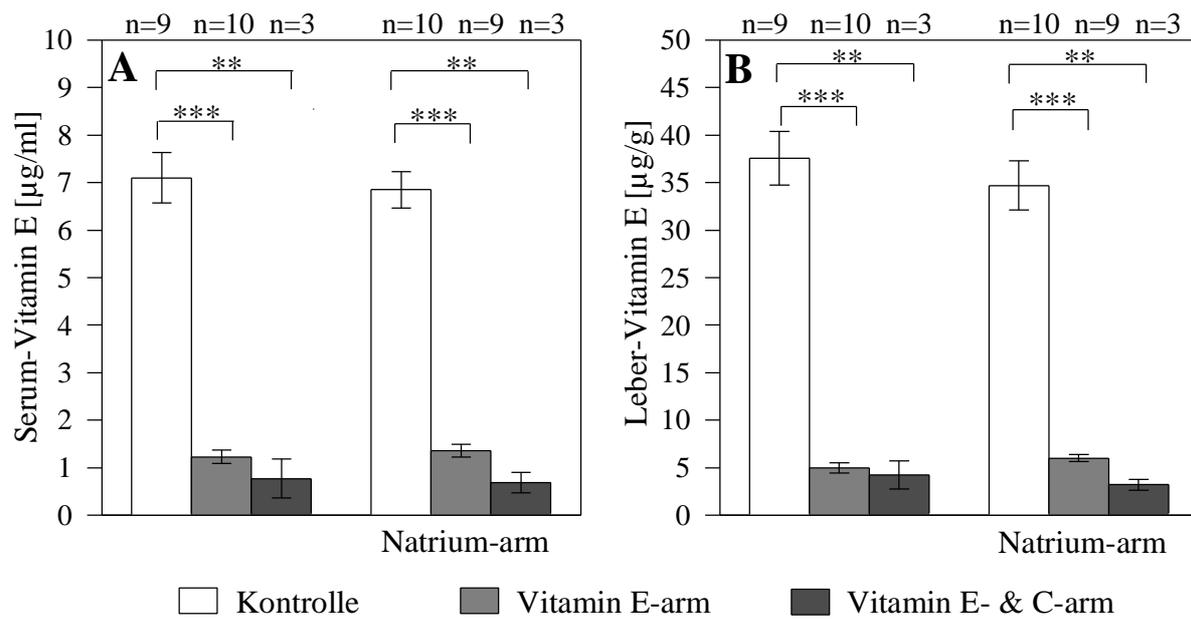


Abbildung 5.8: Vitamin-E-Konzentrationen in Serum (A) und Leber (B) im Hauptversuch der Vitamin-E-Verarmung im Vergleich mit den Tieren der Pilotstudie zur kombinierten Vitamin-E- und Vitamin-C-Verarmung. Die Versuchsdauer der Vitamin-E-Depletion betrug 71 Tage, die Natrium-Verarmung (= Natrium-arm) wurde während der letzten 15 Tage durchgeführt. Die Tiere wurden am Morgen des 72. Tages entblutet. Für die kombinierte Vitamin-Verarmung wurden 6 Meerschweinchen zunächst für 8 Wochen Vitamin-E-depletiert, und dann für weitere 19 bzw. 20 Tage noch zusätzlich Vitamin-C-depletiert. Dabei wurden 3 Tiere gleichzeitig Natrium-arm gefüttert. Angaben in Mittelwerten \pm SEM bei einer Anzahl (n) von 3, 9 oder 10 Meerschweinchen pro Gruppe. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

5.2.2 Vitamin C in Serum und Gewebe

Die Analyse des Ascorbinsäure-Status in Serum und Gewebe ergab einige überraschende Ergebnisse (Abb. 5.9): Während die Vitamin-C-Konzentration im Serum bei den Vitamin-E-armen Tieren leicht anstieg, fiel sie in der Leber ab ($p = 0,035$ resp. $0,017$). In den Natrium-verarmten Gruppen zeigte sich dieser Unterschied jedoch nicht. Diese Gruppen wiesen aber insgesamt einen signifikant ($p \leq 0,01$ bis $p \leq 0,001$) geringeren Vitamin-C-Gehalt in Serum und Leber auf als die mit normalen Natriummengen ernährten Meerschweinchen. Den Erwartungen entsprechend sank die Vitamin-C-Konzentration der beiden Kleingruppen bei kombinierter Vitamin-E- und Vitamin-C-Verarmung in Serum und Leber deutlich ab, sie betrug nur rund $1/6$ bis $1/8$ der Vitamin-C-normalernährten Kontrollen ($p < 0,01$, da nur wenige Tiere).

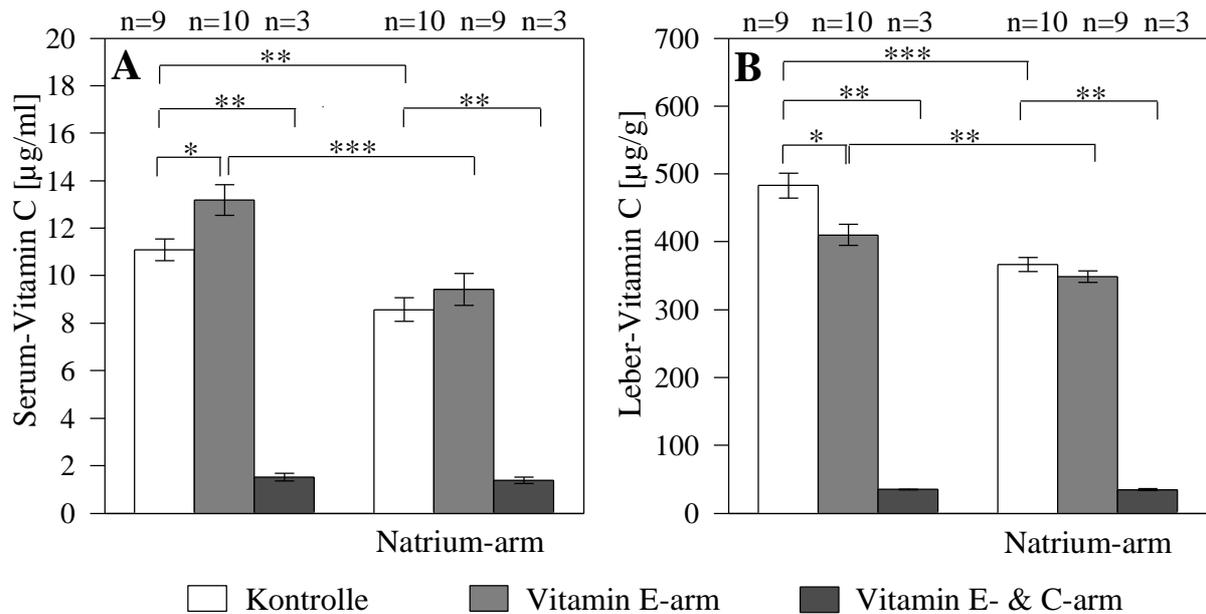


Abbildung 5.9: Vitamin-C-Konzentrationen in Serum (A) und Leber (B) im Hauptversuch der Vitamin-E-Verarmung im Vergleich mit den Tieren der Pilotstudie zur kombinierten Vitamin-E- und Vitamin-C-Verarmung. Die Versuchsdauer der Vitamin-E-Depletion betrug 71 Tage, die Natrium-Verarmung (= Natrium-arm) wurde während der letzten 15 Tage durchgeführt. Die Tiere wurden am Morgen des 72. Tages entblutet. Für die kombinierte Vitamin-Verarmung wurden 6 Meerschweinchen zunächst für 8 Wochen Vitamin-E-depletiert, und dann für weitere 19 bzw. 20 Tage noch zusätzlich Vitamin-C-depletiert. Dabei wurden 3 Tiere gleichzeitig Natrium-arm gefüttert. Angaben in Mittelwerten \pm SEM bei einer Anzahl (n) von 3, 9 oder 10 Meerschweinchen pro Gruppe. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

5.2.3 Plasma-Cortisol und -Aldosteron

Die **Cortisol**-Sekretion wurde weder von der Vitamin-E-Depletion noch von der kombinierten Vitamin-E- und Vitamin-C-Depletion signifikant beeinflusst (*Abb. 5.10 A*). Insgesamt war das Plasma-Cortisol bei allen Tieren im Hauptversuch der Vitamin-E-Verarmung (HVE) nur etwa halb so hoch wie im Hauptversuch der Vitamin-C-Verarmung (HVC) (Kontrolltiere HVE 760 ± 67 nmol/l vs. 1518 ± 219 Kontrolltiere HVC).

Das **Plasma-Aldosteron** stieg erstaunlicherweise bei den Vitamin-E-armen Meerschweinchen geringgradig an ($p = 0,032$) (*Abb. 5.10 B*). Ein Tier aus der Vitamin-E-armen Gruppe wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt, da es aus unerklärlichen Gründen ein extrem hohes Plasma-Aldosteron ($6,81$ nmol/l) bei entsprechend hoher Plasma-Renin-Aktivität ($89,8$ ng/ml/h) aufwies. Die Natrium-Verarmung ließ die Aldosteron-Sekretion auf das 4,35fache der Kontrolltiere ansteigen ($p < 0,0004$), während bei den Vitamin-E-defizienten, Natrium-verarmten Tieren nur eine 2,12fache Steigerung der Aldosteron-Sekretion erreicht wurde ($p = 0,004$). Der Unterschied in der prozentualen Stimulation des Plasma-Aldosterons durch die Natrium-Depletion zwischen den Vitamin-E-normalernährten Kontrollen und den Vitamin-E-verarmten Meerschweinchen ist signifikant ($p = 0,035$). Obwohl auch bei den kombiniert Vitamin-E- und Vit.-C-verarmten Meerschweinchen ein Anstieg der Aldosteron-Sekretion bei Natrium-Verarmung zu verzeichnen ist, kann aufgrund der kleinen Anzahl von je drei Tieren keine Aussage über signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gemacht werden.

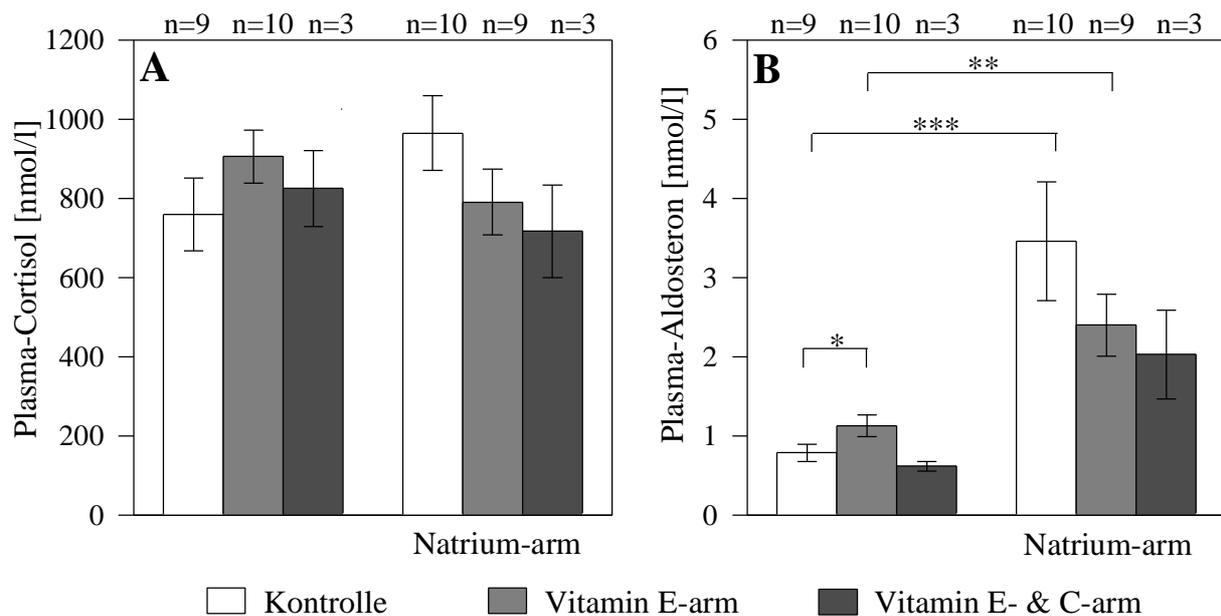


Abbildung 5.10: Plasma-Cortisol (A) und Plasma-Aldosteron (B) im Hauptversuch der Vitamin-E-Verarmung im Vergleich mit den Tieren der Pilotstudie zur kombinierten Vitamin-E- und Vitamin-C-Verarmung. Die Versuchsdauer der Vitamin-E-Depletion betrug 71 Tage, die Natrium-Verarmung (= Natrium-arm) wurde während der letzten 15 Tage durchgeführt. Die Tiere wurden am Morgen des 72. Tages entblutet. Für die kombinierte Vitamin-Verarmung wurden 6 Meerschweinchen zunächst für 8 Wochen Vitamin-E-depletiert, und dann für weitere 19 bzw. 20 Tage noch zusätzlich Vitamin-C-depletiert. Dabei wurden 3 Tiere gleichzeitig Natrium-arm gefüttert. Angaben in Mittelwerten \pm SEM bei einer Anzahl (n) von 3, 9 oder 10 Meerschweinchen pro Gruppe. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

5.2.4 Plasma-ACTH und Plasma-Renin-Aktivität (PRA)

Weder die Plasma-ACTH-Konzentration noch die Plasma-Renin-Aktivität wurden durch die Vitamin-E- und/oder Natrium-Verarmung signifikant beeinflusst (Tab. 5.3). Auch zwischen beiden Kleingruppen der Pilotstudie zur kombinierten Vitamin-E- und Vit.-C-Verarmung konnte bei beiden Parametern kein Unterschied gefunden werden.

Bei der Auswertung der Plasma-ACTH-Konzentration wurde ein Tier der Natrium-armen Gruppe nicht berücksichtigt, da es ein offensichtlich kurzfristig stark erhöhtes Plasma-ACTH von 404 pg/ml aufwies, während sein Plasma-Cortisol (519 nmol/l) im unteren Normbereich lag. Das Vitamin-E-arme Tier, das bereits bei der Darstellung des Plasma-Aldosterons ausgeklammert wurde (s.5.2.3), wurde hier auch wegen seiner sehr hohen PRA nicht mitgewertet.

5. Ergebnisse

	Kontrolle n = 9	Vit.-E-arm n = 10	Vit.-E- & Vit.-C-arm n = 3	Natrium- arm n = 10	Natrium- & Vit.-E-arm n = 9	Vit.-E-, C- & Na ⁺ -arm n = 3
Plasma- ACTH [pg/ml]	69,0 ± 7,6	57,5 ± 8,8	61,4 ± 6,6	77,1 ⁽ⁿ⁼⁹⁾ ± 10,4	68,4 ± 7,2	48,0 ± 6,0
PRA [ng/ml/h]	36,9 ± 4,4	38,8 ⁽ⁿ⁼⁹⁾ ± 3,2	37,3 ± 5,8	45,8 ± 7,0	38,2 ± 3,9	41,7 ± 5,5

Tabelle 5.3: Hauptversuch der Vitamin-E-Verarmung und Pilotstudie zur kombinierten Vitamin-E- und Vitamin-C-Verarmung: Plasma-ACTH-Konzentration und Plasma-Renin-Aktivität (PRA). Die Versuchsdauer und somit die Dauer der Vitamin-E-Depletion betrug 71 Tage, die Natrium-Verarmung wurde während der letzten 15 Tage durchgeführt. Die Tiere wurden am Morgen des 72. Tages getötet und entblutet. Für die kombinierte Vitamin-E- & -C-Verarmung wurden 6 Meerschweinchen zunächst für 8 Wochen Vitamin-E-depletiert, und dann für weitere 19 bzw. 20 Tage noch zusätzlich Vitamin-C-depletiert. Dabei wurde die Hälfte der Tiere gleichzeitig Natrium-arm gefüttert. Angaben in Mittelwerten ± SEM bei einer Anzahl (n) von 9, 10 oder 3 Meerschweinchen pro Gruppe.

5.2.5 Serum-Natrium und -Kalium

Die Serum-Konzentrationen der Elektrolyte Natrium und Kalium waren in allen Gruppen unverändert (Tab. 5.4).

	Kontrolle n = 9	Vit.-E-arm n = 10	Vit.-E- & Vit.-C-arm n = 3	Natrium- arm n = 10	Natrium- & Vit.-E-arm n = 9	Vit.-E-, C- & Na ⁺ -arm n = 3
Serum-Na⁺ [mmol/l]	132,2 ± 1,2	135,3 ± 1,4	136,2 ± 0,9	134,0 ± 0,8	136,2 ± 0,7	133,3 ± 1,6
Serum-K⁺ [mmol/l]	4,68 ± 0,13	4,92 ± 0,17	5,07 ± 0,44	5,05 ± 0,22	4,87 ± 0,19	4,94 ± 0,58

Table 5.4: Hauptversuch der Vitamin-E-Verarmung und Pilotstudie zur kombinierten Vitamin-E- und Vitamin-C-Verarmung: Elektrolyt-Konzentrationen im Serum. Die Versuchsdauer und somit die Dauer der Vitamin-E-Depletion betrug 71 Tage, die Natrium-Verarmung wurde während der letzten 15 Tage durchgeführt. Die Tiere wurden am Morgen des 72. Tages getötet und entblutet. Für die kombinierte Vitamin-E- & -C-Verarmung wurden 6 Meerschweinchen zunächst für 8 Wochen Vitamin-E-depletiert, und dann für weitere 19 bzw. 20 Tage noch zusätzlich Vitamin-C-depletiert. Dabei wurde die Hälfte der Tiere gleichzeitig Natrium-arm gefüttert. Angaben in Mittelwerten ± SEM bei einer Anzahl (n) von 9, 10 oder 3 Meerschweinchen pro Gruppe.

5.2.6 Elektrolyt-Ausscheidung (Urin-Natrium und -Kalium)

In *Abb. 5.11* wird nur die mittlere Elektrolyt-Ausscheidung des drittletzten und vorletzten Versuchstages des Hauptversuchs zur Vitamin-E-Verarmung, die sich aus allen 24h-Urinen des 69. und 70. Tages einer Gruppe ergibt, dargestellt. Von den wenigen Tieren aus der Pilotstudie zur kombinierten Vitamin-E- und Vit.-C-Verarmung ging Probenmaterial verloren, so daß sich die Elektrolyt-Exkretion dieser Tiere statistisch nicht auswerten läßt. Man darf jedoch vermuten, daß auch bei diesen Tieren die Natrium-Depletion erfolgreich war, da die Natrium-Exkretion der verbliebenen zwei Proben in der letzten Gruppe deutlich vermindert war.

Sowohl bei den Vitamin-E-normalernährten als auch bei den Vitamin-E-depletierten Tieren wurde durch die Natrium-Restriktion im Futter die **Natrium-Ausscheidung** auf ca. 1/4 resp. 1/3 der Natrium-Exkretion der vergleichbaren mit normalen Kochsalz-Mengen ernährten Gruppen gemindert (p jeweils < 0,001) (*Abb. 5.11 A*). Bei den Vitamin-E-armen Tieren kam es im Vergleich zu den Kontrolltieren zu einem leichten Abfall der Natrium-Exkretion, der jedoch nur grenzwertig signifikant war (p = 0,049). Es zeigte sich hingegen kein Einfluß des Vitamin-E-Mangels auf die Natrium-Ausscheidung bei gleichzeitiger Natrium-Verarmung.

5. Ergebnisse

Die Analyse der mittleren **Kalium-Exkretion** während der letzten Versuchstage ergab zwei signifikante Unterschiede zwischen den Tiergruppen (*Abb. 5.11 B*): Die Vitamin-E- und Natrium-armen Tiere schieden mehr Kalium aus als die rein Vitamin-E-verarmten Tiere ($p = 0,005$), während letztere wiederum eine signifikant geringere Kalium-Ausscheidung als die Kontrolltiere aufwiesen ($p = 0,004$). Bei den mit normalen Vitamin-E-Mengen ernährten Tieren wirkte sich die Natrium-Depletion weniger deutlich auf die Kalium-Exkretion aus.

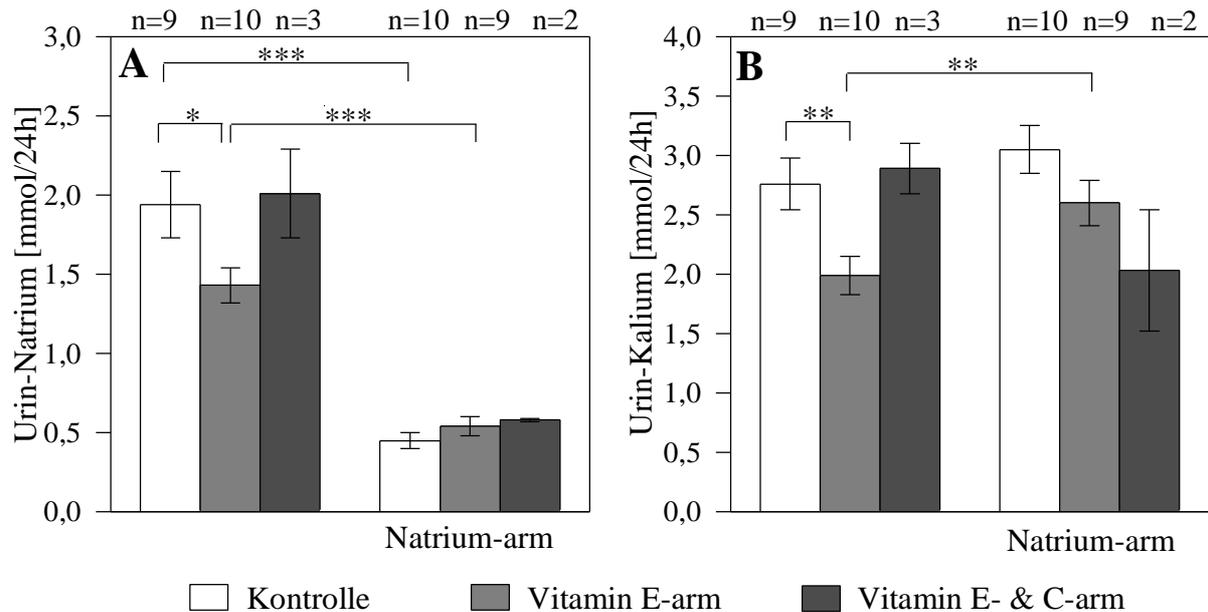


Abbildung 5.11: Urin-Natrium (A) und Urin-Kalium (B): mittlere Elektrolyt-Ausscheidung im Urin des 69. und 70. Versuchstages des Hauptversuchs der Vitamin-E-Verarmung und des 70. Versuchstages der Pilotstudie zur kombinierten Vitamin-E- und Vitamin-C-Verarmung. Die Versuchsdauer der Vitamin-E-Depletion betrug 71 Tage, die Natrium-Verarmung (= Natrium-arm) wurde während der letzten 15 Tage durchgeführt. Die Tiere wurden am Morgen des 72. Tages getötet. Für die kombinierte Vitamin-E- & -C-Verarmung wurden 6 Meerschweinchen zunächst für 8 Wochen Vitamin-E-depletiert, und dann für weitere 19 bzw. 20 Tage noch zusätzlich Vitamin-C-depletiert. Dabei wurde die Hälfte der Tiere gleichzeitig Natrium-arm gefüttert. Die durchschnittliche Elektrolyt-Ausscheidung wurde aus den jeweiligen 24h-Urinen der vorletzten beiden Tage ermittelt (Hauptversuch zur Vitamin-E-Verarmung) bzw. nur des 70. Versuchstages (Pilotstudie zur kombinierten Vitamin-E- und Vitamin-C-Verarmung). Angaben in Mittelwerten \pm SEM bei einer Anzahl (n) von 2, 3, 9 oder 10 Meerschweinchen pro Gruppe. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

6. DISKUSSION

6.1 Diskussion der Methoden: Tierexperimente

6.1.1 Tiere, Diäten, Handling

Die Duncan-Hartley Auszucht-Meerschweinchen (Albinos) wurden immer mit einem Anfangsgewicht von 300 ± 20 g (entspricht etwa dem Alter von 4 ½ Wochen) bestellt, um vergleichbare Ausgangsbedingungen zu schaffen und den altersabhängigen Einfluß unterschiedlicher Wachstumsintensitäten auf den Vitaminbedarf auszuschließen. Auszuchttiere vom gleichen Stamm eines Züchters gewährleisteten eine große - aber innerhalb des Stammes etwa ähnliche, damit reproduzierbare - genetische Heterogenität, ohne die Variabilität, die ja auch unter den Menschen besteht, zu reduzieren (Gärtner 1989). Zyklusbedingte Änderungen der Aldosteronsekretion (Whipp *et al.* 1976) wurden durch ausschließliche Verwendung männlicher Versuchstiere umgangen. Obwohl Meerschweinchen sehr streßanfällige Tiere sind, die bei veränderten Umweltbedingungen sensibel mit Verminderung der adrenalen Vitamin-C-Konzentration (Hughes und Nicholas 1971) und Erhöhung des Plasma-Cortisols reagieren (Haemisch 1990), mußte auf diese Tierart zurückgegriffen werden, da sie als einzige Versuchstierspezies kein Vitamin C synthetisieren kann, was ja für den Versuchsaufbau essentiell war. Daher war das streßfreie Handling bei der Versuchsplanung von großer Bedeutung.

Meerschweinchen sind sehr wählerische Fresser (Ediger 1976) und bevorzugen, anders als Ratte und Maus, häufig ihr Leben lang das Futter, an das sie vor dem Absetzalter gewöhnt wurden (Navia und Hunt 1976). Heu (bzw. Gras und Gemüse in freier Natur) stellt dabei einen wichtigen und bevorzugten Nahrungsanteil (Harper 1976). In unserem Versuch wurde eine halbsynthetische Diät mit kontrollierten Inhaltsstoffen ohne Heu verfüttert, die im Gegensatz zum Standardfutter nicht auf Grünmehl, sondern auf Caseinbasis beruht. Damit wurde zwar eine gleichmäßige Zusammensetzung gewährleistet, aber die Akzeptanz des Futters deutlich herabgesetzt. Vor dem eigentlichen Versuchsbeginn mußte daher jedesmal eine längere Phase der Futterumstellung einkalkuliert werden, da Meerschweinchen bei abruptem Futterwechsel die Nahrungsaufnahme sogar bis zum Hungertod verweigern (Ediger 1976). Auch nach

6. Diskussion

Umstellung auf die Haltung im Stoffwechsellkäfig dauerte es zehn Tage, bis wieder eine gleichmäßige Futteraufnahme eintrat. Nur so konnte der durch die Futter- und Haltungsumstellung bedingte Streß als Einflußfaktor auf den Versuch minimiert werden.

Nachdem unterschiedliche Angaben auch für den Vitamin-Bedarf von Meerschweinchen existieren (Übersicht bei Islam 1987), sollten unsere verwendeten Kontrolldiäten auch bei geringer Futteraufnahme während der Haltung der Tiere in Stoffwechsellkäfigen eine optimale Bedarfsdeckung gewährleisten, aber keine überphysiologisch hohen Megadosen enthalten. In der amerikanischen Literatur wird von einem Vitamin-C-Bedarf von 200-500 mg/kg Diät ausgegangen, während im deutschsprachigen Raum ein wesentlich höherer Gehalt von 1000-1500 mg Ascorbinsäure/kg Diät als bedarfsdeckend für wachsende Meerschweinchen angegeben wird. Für den Vitamin-E-Bedarf variieren die Angaben zwischen 60 und 150 mg α -Tocopherol/kg Diät. Die Einhaltung der deklarierten Vitamin- und Salzgehalte in den Experimentaldiäten ist zwar unbedingt Voraussetzung für das Gelingen der Tierversuche, aber produktionstechnisch offenbar jedoch nicht selbstverständlich. Um möglichst genaue Übereinstimmung der Diätvarianten zu erzielen, wurden einer einheitlichen Grundcharge jeweils nur die versuchsentscheidenden Inhaltsstoffe zugesetzt, und die variierenden Komponenten dann zu unserer Sicherheit im Ausschlußverfahren überprüft. Ohne diese teure und zeitaufwendige Kontrolle wären die Diäten ein immenser Risikofaktor bei der Interpretation der Versuchsergebnisse und führen - wie u. a. im Vorversuch geschehen - im nachhinein zu unnötigem Tierverbrauch und nicht reproduzierbaren Ergebnissen.

6.1.2 Stoffwechsellkäfige

Die Haltung der Meerschweinchen in Stoffwechsellkäfigen hatte einen großen Einfluß auf das Wohlbefinden der Meerschweinchen und stellte einen deutlichen Streßfaktor dar, der unter anderem in einer verminderten Futteraufnahme infolge sozialer Isolation (Harper 1976) zum Ausdruck kam. Während in der Eingewöhnungsphase trotz Futterumstellung die Wachstumskurven recht einheitlich und eng beieinanderliegend verliefen, drifteten sie vom Tage des Umsetzens in die Stoffwechsellkäfige an weit auseinander, ein Zeichen der individuell empfundenen psychischen Belastung (vgl. 5.1.1, Abb. 5.1). Sowohl die Bewegungsfreiheit als auch das Sozialverhalten der kontaktfreudigen, in der Natur in hierarchisch geordneten Kleingruppen lebenden Tiere (Manning *et al.* 1984), sind bei dieser isolierten Einzelhaltung auf

einem Drahtrost von ca. 25 cm Durchmesser drastisch eingeschränkt. In dieser reizarmen Umgebung traten Verhaltensanomalien wie Kahlfressen von Bauch und Flanke, Wetzen der Zähne am Futternapf und Spielen mit der Tränke auf. Die durch letzteres Verhalten bedingte übermäßige Wasseraufnahme führte zu einem inter- und intraindividuell stark variierendem Urinvolumen und zum Überlaufen der Urin-Auffangbecher. Trotz zusätzlicher Auffanggefäße ließen sich Ungenauigkeiten bei den zu bestimmenden Parametern aus dem Urin nicht vermeiden. Da der chronische Streß durch die Haltung in den Stoffwechsellkäfigen nicht zuletzt auch die Nebennierenrindenfunktion deutlich beeinflusste (1½ bis 2fach höhere Plasma-Cortisol-Spiegel bei den Kontrolltieren im Hauptversuch der Vitamin-C-Verarmung), wurde für den mehrwöchigen Versuch der Vitamin-E-Verarmung daher darauf verzichtet, die Tiere über die gesamte Versuchsdauer in den Stoffwechsellkäfigen zu lassen, um so die Belastung der Meerschweinchen verringern zu können.

6.1.3 Narkose, Blut- und Organentnahme

Um den circadianen Einfluß der CRH-Ausschüttung auf die Parameter Plasma-ACTH und Plasma-Cortisol bei den Versuchen auszuschließen, wurden alle Tiere immer zur gleichen Tageszeit narkotisiert. Alle Pflegearbeiten wie Füttern und Tränken, Wechseln der Käfige und Wiegen der Meerschweinchen wurden vormittags ausgeführt, so daß es die Tiere am Tötungstag kannten, zu dieser Tageszeit aus den Käfigen genommen zu werden und schon während des Versuchs an das Handling durch verschiedene Menschen gewöhnt waren. Da Aufregung zu erhöhter ACTH-Ausschüttung führt, wurde bei der Narkose sehr darauf geachtet, daß die Tiere ganz besonders behutsam auf dem Arm beruhigt wurden, bevor sie die Injektionsnarkose erhielten und bis sie eingeschlafen waren.

Die umfangreichen Analysen erforderten große Mengen an Vollblut, die sich nur durch Herzpunktion gewinnen lassen, welche wiederum aus Gründen des Tierschutzes eine Vollnarkose voraussetzt (Bivin und Smith 1984). Bei einer Herzpunktion besteht immer die Gefahr einer Herztamponade, die schon vor der vollständigen Entblutung einen Herzstillstand bewirkt und die „Ausbeute“ an Probenvolumen mindert. Dieser Fall trat häufiger bei den Vitamin-C-verarmten Tieren ein, offenbar infolge der mit einem Vitamin-C-Mangel einhergehenden Gerinnungsstörungen (Navia und Hunt 1976, Kaspereit 1985). Ketamin/Rompun^R als Neuroleptanalgesie ist beim Meerschweinchen eine verträgliche Narkose, die nach 10 bis 15 Minuten eine ausgezeichnete Analgesie und gute Muskelrelaxation

6. Diskussion

bewirkt (Isenbügel 1985, Richardson 1992), trotz häufig verlängerter Narkosedauer im Vitamin-C-Mangel (Wasel 1995).

6.2 Diskussion der Methoden: Analytik

6.2.1 Radioimmunologische Steroidbestimmung im Plasma

Auch die Verwendung spezifischer Antikörper in einem RIA schließt eine zu Meßfehlern führende Kreuzreaktion mit anderen Stoffen nicht aus, besonders dann, wenn das gesuchte Antigen in wesentlich geringerer Konzentration vorliegt als kreuzreagierende Antigene. Obwohl Cortisol in 1000fach größerer Menge im Plasma vorliegt als Aldosteron, konnte auf eine chromatographische Trennung der Proben verzichtet werden, weil der verwendete Antikörper für Aldosteron hochspezifisch war.

6.2.2 Immunoradiometrische ACTH-Bestimmung im Plasma

In einem immunoradiometrischen Assay (IRMA) wird das gesuchte Antigen aus der Probe (ACTH) von zwei spezifischen Antikörpern sandwichartig gebunden. Dazu müssen beide Antikörper das Antigen an verschiedenen Bindungsstellen erkennen und binden, um sich nicht gegenseitig zu behindern. ACTH, ein Peptidhormon aus 39 Aminosäuren, wird in dem benutzten Assay einmal am C- und einmal am N-Terminus spezifisch gebunden, so daß nur intaktes ACTH(1-39) gemessen werden kann, nicht aber synthetisches ACTH(1-24), das die gleiche biologische Wirksamkeit besitzt, aber nicht das entsprechende Epitop am C-Terminus. Meerschweinchen-ACTH besteht ebenfalls aus 39 Aminosäuren, jedoch sind in der sonst bei Säugetieren hochkonservierten Sequenz zwei Aminosäuren an Position 24 und 29 ausgetauscht (Smith *et al.* 1987). Da aber das Amino- und Carboxy-Ende jeweils unverändert sind, besteht in diesem Assay eine 100%ige immunologische Kreuzreaktivität zwischen Meerschweinchen-ACTH und humanem ACTH, die experimentell bestätigt werden konnte.

6.2.3 Plasma-Renin-Aktivität (PRA)

Die initiale Dialyse der Plasmaproben gegen einen isoosmotischen Puffer von pH 6,0 erlaubt eine „Aufreinigung“ der Proben, da nicht nur bereits vorhandenes Angiotensin I, sondern auch andere Stoffe, die den nachfolgenden RIA stören könnten, in das Medium diffundieren. Außerdem wird die Einstellung des pH-Wertes für die folgende Inkubation gefördert. Die Bestimmung der PRA im Hauptversuch der Vitamin-C-Verarmung, bei dem für eine Dialyse nicht genug Probenvolumen zur Verfügung stand, mußte also mit einem Verlust an Genauigkeit erkauft werden. Das vorhandene Angiotensin I der Plasmaproben wurde hier in dem RIA als Nullwert bestimmt und von den nach der Inkubation erreichten Werten abgezogen. Auch wenn der Assay im Hinblick auf den Hauptversuch der Vitamin-C-Verarmung nicht optimal durchgeführt werden konnte, so war er doch empfindlich genug, die Suppression der PRA bei dreitägiger ACTH-Behandlung anzuzeigen. Die weiteren Ergebnisse innerhalb des Hauptversuch der Vitamin-C-Verarmung (kein signifikanter PRA-Anstieg bei Natrium-Verarmung) decken sich zumindest mit denen des Hauptversuchs der Vitamin-E-Verarmung. Bei letzterem waren allerdings, bedingt durch die unterschiedliche Methode, alle Werte der PRA etwa doppelt so hoch.

6.2.4 Photometrische Vitamin-C-Analytik in Serum und Gewebe

Der photometrische Nachweis des Vitamin C aufgrund seiner reduzierenden Eigenschaften ist eine ältere einfache Methode, deren Zeitaufwand durch Chargierung und Bevorratung der TCA-Stammlösung bzw. Eisen^{III}-Chlorid-Lösung bei -20° C und Lyophilisieren der Vitamin-C-Stammlösung verringert werden konnte. Problematisch war das schlechte Lösungsverhalten des Bipyridins in aqua dest.: Laut Vorschrift durch kurzes Erhitzen in Lösung gebracht, fiel es bei Erreichen unserer Umgebungstemperaturen wieder aus. Durch Addition der 85% *ortho*-Phosphorsäure bereits bei Herstellung der Bipyridin-Lösung statt späterer getrennter Zugabe zum Versuchsansatz konnte ein saures Milieu hergestellt und das basische Bipyridin dadurch konstant in Lösung gehalten werden. Obwohl eine Färbung der Ansätze schon nach 15 min auftrat, war die Komplexbildung erst nach einer Stunde abgeschlossen, blieb dann aber noch für mindestens eine weitere Stunde stabil. Die Methode ist ausreichend empfindlich, um sogar die Vitamin-C-Verarmung zu differenzieren: nur bei den Vitamin-C-depletierten und mit

6. Diskussion

ACTH behandelten Tieren wurde bei den Serumproben die Nachweisgrenze erreicht, da nicht wie im Falle des Gewebes die Einwaage erhöht werden konnte.

6.2.5 Vitamin-E-Bestimmung mittels HPLC in Serum und Gewebe

Das lipidlösliche und oxidationsempfindliche Vitamin E (α -Tocopherol) wird im Serum von Lipoproteinen transportiert, während es im Gewebe hauptsächlich membrangebunden vorliegt. Zur Analyse muß es zunächst mit einem geeigneten Lösungsmittel extrahiert und von störenden Proteinen und Membranlipiden getrennt werden, bevor es über die HPLC nachgewiesen werden kann. Nach Driskell *et al.* (1982) wählten wir zunächst Hexan für die Extraktion. Dieses Lösungsmittel tritt aber in Wechselwirkung mit den Lipoproteinen und wird teils in Micellen festgehalten, so daß die Extraktion des α -Tocopherols nur unvollständig gelingt (MacCrehan und Schönberger 1987). Der Einsatz eines geeigneten internen Standards war daher nötig. Doch besonders bei der Extraktion des Vitamin E aus dem Gewebe nach vorangegangener Verseifung der störenden Lipide (Staats *et al.* 1988b in Anlehnung an Driskell *et al.* 1982) erwies sich nicht nur der interne Standard Retinol-Acetat als instabil, sondern auch das gesuchte α -Tocopherol, das im alkalischen Milieu während der Verseifung zum hydrophilen Phenolat-Anion konvertiert (MacCrehan und Schönberger 1987). Nierenberg und Nann (1992) vermeiden die Verseifung und schließen das Gewebe enzymatisch auf, eine Methode, die bei uns zu stark variierenden und unplausiblen Wiederfindungsraten des α -Tocopherols und zur Verstopfung der HPLC-Säulen führte. Nur die direkte Extraktion von Vitamin E aus Serum und Gewebe mit Aceton unter Verwendung von α -Tocopherol-Acetat als internen Standard (Zaspel und Csallany 1983) brachte hohe und gleichmäßige Wiederfindungsraten (Gewebe 83%, Serum 85%) bei akzeptablen Laufzeiten, so daß diese Methode für unsere Versuchszwecke am besten geeignet schien.

6.2.6 Elektrolytbestimmung

Hämolytische Proben können bei der flammenphotometrischen Elektrolytbestimmung zu falsch hohen Werten der Serum-Kalium-Konzentration führen, da das intrazellulär angereicherte Kalium der Erythrozyten bei Hämolyse ins Serum austritt. Eine leichte Hämolyse trat öfter bei Vitamin-C-Verarmung auf, seltener bei Vitamin-E-verarmten Tieren. Die im Vergleich zu anderen Spezies relativ hohen Serum-Kalium-Konzentration der

Meerschweinchen dieser Arbeit sind aber alle als „normal“ anzusehen und entsprechen den von Rechkemmer (1992) bei ähnlichen Versuchsbedingungen und Natrium-Verarmung veröffentlichten Werten.

6.3 Diskussion der Ergebnisse

6.3.1 Hauptversuch der Vitamin-C-Verarmung

Die Meerschweinchen des Pilotversuches zeigten nach 16- bis 22-tägiger Vitamin-C-Verarmung die typischen Skorbut-Symptome infolge einer haemorrhagischen Diathese, wie sie von verschiedenen Autoren (Kaspereit 1985, Doulas *et al.* 1987, Richardson 1992) nach unterschiedlich langen Mangelzuständen beschrieben wurden. Allerdings war im Gegensatz zu Hodges und Hotston (1970), Björkhem *et al.* (1987) und Doulas *et al.* (1987) mit leider nur relativ groben Messungen der Nebennierengewichte und ohne mikroskopische Untersuchung eine signifikante Nebennieren-Hypertrophie infolge Vitamin-C-Mangels nicht nachweisbar. Die Verarmung der Gewebe an Vitamin C konnte erwartungsgemäß (Zannoni *et al.* 1974, Odumosu 1982) parallel in Serum, Leber und Nebenniere verfolgt werden, und die angegebene Dauer von 14 bis 16 Tagen bis zur vollständigen Vitamin-C-Depletion der Nebenniere (Collins und Elvehjem 1958, Ginter *et al.* 1979) stimmte mit den Ergebnissen des Pilotversuches überein. Nach den 15 Tagen Versuchsdauer im Hauptversuch waren die Meerschweinchen bis auf ein Tier klinisch unauffällig, und nur der moderate Anstieg des Plasma-Cortisols der Vitamin-C-armen Tiere zusammen mit den verminderten Wachstumsraten kann als Zeichen eines beginnenden Skorbut-Stresses gewertet werden, der aber noch nicht bei den anderen beiden Vitamin-C-depletierten Gruppen aufgetreten ist. Da auch *post mortem* erst leichte bis mittelgradige Haemorrhagien nachgewiesen wurden, entsprachen die 15 Tage Versuchsdauer genau dem Ziel, die Meerschweinchen stark an Vitamin C zu depletieren, ohne sie in den Streßzustand des Skorbut zu führen und die Nebennierenfunktion damit zu beeinträchtigen.

Vitamin C scheint in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Hodges und Hotston (1970) für die Cortisol-Synthese nicht essentiell zu sein, da im Vitamin-C-Mangel das Plasma-Cortisol anstieg und auch durch die ACTH-Behandlung noch deutlich, jedoch signifikant geringer stimulierbar war. Allerdings war im Gegensatz zu den Ergebnissen von Hodges und

6. Diskussion

Hotston (1971) weder bei den Vitamin-C-armen Tieren des Hauptversuchs, noch bei den Pilottieren im Finalstadium des Skorbut ein paralleler ACTH-Anstieg zu beobachten, obwohl bei letzteren das Plasma-Cortisol sehr erhöht war. Fordyce und Kassouny (1977) fanden bereits bei milder Vitamin-C-Hypovitaminose eine stark gesteigerte Corticosteroid-Sekretion bei unverändertem Plasma-ACTH, die durch ACTH-Injektionen kaum mehr stimulierbar war. Zusammen mit den erhöhten Plasma-Aldosteron-Werten der Pilottiere kann man die erhöhte Konzentration der Steroide im Plasma ohne parallelen ACTH-Anstieg beim Skorbut als Zeichen einer (hier makroskopisch nicht sichtbaren, s. o.) Nebennieren-Hypertrophie deuten, die unabhängig von ACTH im Streß auftritt (Björkhem *et al.* 1978) (s. S. 26). Die Nebennierenrinde erreicht dabei maximale metabolische Aktivität und kann nicht mehr adäquat auf exogene ACTH-Stimulation reagieren (Fordyce und Kassouny 1977). Andererseits können die Plasmaspiegel der Steroide auch infolge eines durch den Vitamin-C-Mangel beeinträchtigten Steroid-Metabolismus in der Leber (Sato und Zannoni 1974, Ginter 1975, Björkhem und Kallner 1976, Harris *et al.* 1979, Nagyová und Ginter 1994) erhöht sein. Dafür wiederum spricht, daß das Plasma-Cortisol der Vitamin-C-verarmten Tiere zwar erhöht war, aber die inkubierten Nebennierenzellen dieser Tiere gleichzeitig eine tendentiell verminderte *in vitro*-Sekretion aufwiesen (Redmann *et al.* 1995).

Während eine dreitägige ACTH-Behandlung die Aldosteron-Sekretion unabhängig vom Vitamin-C-Status beim Meerschweinchen wie auch bei dem Menschen (Oelkers 1975), der Ratte (Müller 1978, Aguilera *et al.* 1981) und dem Schaf (McDougall *et al.* 1980) supprimiert, stimuliert die 15-tägige Natrium-Verarmung die Aldosteron-Sekretion um das Dreifache und damit in der gleichen Größenordnung wie bei Rechkemmer (1992) unter vergleichbaren Versuchsbedingungen. Die Plasma-Renin-Aktivität (PRA) nimmt unter Langzeit-ACTH-Einfluß parallel mit der Aldosteron-Sekretion ab, interessanterweise steigt die PRA jedoch beim Meerschweinchen durch Natrium-Verarmung nur geringgradig und nicht signifikant an. Bisher sind meines Wissens nach noch keine PRA-Werte beim Meerschweinchen bei Natrium-Verarmung oder ACTH-Stimulation veröffentlicht worden, mit denen diese unerwarteten Befunde verglichen werden könnten.

Das wichtigste Ergebnis dieser Untersuchungen ist jedoch, daß sich die Aldosteron-Sekretion bei den Vitamin-C-verarmten Tieren nicht durch Natrium-Depletion stimulieren ließ (vgl. 5.1.3 Abb. 5.4 B), während alle Regulatoren (PRA, Plasma-ACTH, Serum-Kalium) keine Unterschiede zu den Natrium-armen und Vitamin-C-normalen Kontrollen aufwiesen. Darüber

hinaus vermochten die Natrium- und Vitamin-C-armen Tiere durch die mangelhafte Aldosteron-Sekretion das Natrium nur unvollständig zu retinieren, denn sie schieden doppelt soviel Natrium mit dem Urin aus wie die entsprechenden Kontrolltiere. Wie erwartet, scheint die Aldosteron-Synthese selbst durch den Vitamin-C-Mangel beeinträchtigt zu sein, da erstens ihre wichtigsten humoralen Stimuli unverändert blieben und zweitens auch in den zugehörigen *in vitro*-Experimenten (Redmann *et al.* 1995) sowohl die basale Aldosteron-Sekretion der Nebennierenzellen als auch die Konversion von ³H-markiertem 11-Desoxycorticosteron (DOC) zu 18-OH-Corticosteron und Aldosteron, nicht aber zu Corticosteron, durch Natrium-Depletion nicht mehr stimulierbar waren.

6.3.2 Hauptversuch der Vitamin-E-Verarmung

Da der Pilotversuch zur Vitamin-E-Verarmung ergebnislos abgebrochen werden mußte, wurde die Versuchsdauer für den Hauptversuch mit zehn Wochen empirisch gewählt. Nach den Ergebnissen des Vorversuchs konnte über acht Wochen eine synchrone Abnahme der Vitamin-E-Konzentrationen in Nebenniere, Leber und Serum analog zu den Ergebnissen von Machlin *et al.* (1979) und Burton *et al.* (1990) verfolgt werden. Staats *et al.* (1988b) gehen von 9 bis 10 Wochen Versuchsdauer aus, bis die Nebennieren weitgehend α -Tocopherol-depletiert sind. Allerdings zeigten sich entgegen den Zeitangaben von Machlin *et al.* (1979) unter unseren Versuchsbedingungen auch nach zehn Wochen makroskopisch weder klinisch noch subklinisch Symptome einer Hypovitaminose, so daß der gesuchte Zustand einer maximalen Vitamin-E-Verarmung unmittelbar vor Auftreten einer Mangelkrankung vermutlich noch nicht erreicht war, die Versuchsdauer also noch zu kurz gewählt wurde. In der Pilotstudie zur kombinierten Vitamin-E- und C-Verarmung konnten darüber hinaus nach fast elfwöchiger α -Tocopherol-Depletion mit kombiniertem Vitamin-C-Mangel über knapp drei Wochen weder Symptome einer Myopathie noch eines (auch nicht subklinischen) Skorbut festgestellt werden, so daß auch hier im Vergleich zum Hauptversuch der Vitamin-C-Verarmung der optimale Versuchszeitpunkt noch nicht gegeben war. Allerdings weisen sowohl die verminderten Körpergewichte als auch die signifikante relative Vergrößerung der Nebennieren bei den Vitamin-E- (und kombiniert Vitamin-C-) verarmten Tieren bereits auf eine Nebennierenhypertrophie hin, wie sie meines Wissens bisher nur als typisches Symptom beim Vitamin-C-Mangel beschrieben wurde. Ob die leichte Nebennierenhypertrophie bei den

6. Diskussion

Natrium-armen, nicht aber Natrium- und Vitamin-E- (und Vitamin-C-) depletierten Tieren allein mit der erhöhten Aldosteron-Sekretion zu erklären ist, bleibt fraglich.

Obwohl Vitaminanalysen in den Nebennieren nur im Vorversuch durchgeführt wurden, kann man davon ausgehen, daß eine Vitamin-E-Depletion in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Staats *et al.* (1988b) und Burton *et al.* (1990) keinen Einfluß auf den Vitamin-C-Gehalt der Nebenniere ausübt, und umgekehrt hatte die Vitamin-C-Depletion ja auch keinen Einfluß auf die α -Tocopherol-Konzentrationen in Serum und Gewebe. Die signifikante Erhöhung des Serum-Vitamin-C-Spiegels bei gleichzeitiger Verminderung der Vitamin-C-Konzentration in der Leber bei den α -Tocopherol-depletierten Meerschweinchen ist bisher nicht zu erklären. Da es sich dabei aber um Veränderungen innerhalb der Vitamin-C-Normalbereiche handelt, die bei zusätzlicher Natrium-Verarmung nicht auftraten, dürften sie für den Versuch irrelevant sein. Eine signifikante, aber ebenfalls „normale“ Verminderung der Ascorbat-Konzentration in Serum und Leber bei den beiden Natrium-arm ernährten Gruppen könnte auf eine verminderte Futteraufnahme der vermutlich weniger schmackhaften kochsalzarmen Diät zurückzuführen sein.

Da Plasma-Cortisol ebenso wie Plasma-ACTH bei allen Versuchsgruppen gleich waren, scheint - zusammen mit den fehlenden Symptomen einer Hypovitaminose - auch kein dem „Skorbutstreß“ vergleichbarer Zustand die Hypophysen-Nebennierenachse beeinflußt zu haben. Das im Gegensatz zum Hauptversuch der Vitamin-C-Verarmung nur halb so hohe Plasma-Cortisol im Vitamin-E-Hauptversuch läßt darauf schließen, daß die Tiere während der langen Vitamin-E-Verarmung weniger unter Streß standen, vermutlich weil sie hierbei nicht ständig im Stoffwechsellkäfig saßen, sondern zu zweit gehalten wurden.

Ähnlich wie bei Vitamin-C-Depletion stieg auch bei der Vitamin-E-Verarmung die Aldosteron-Sekretion leicht an, im letzteren Fall sogar signifikant und - anders als bei der Vitamin-C-Verarmung - gleichsinnig mit der *in vitro*-Sekretion der Nebennierenzellen (Möbius *et al.* 1996). Daran könnte die beobachtete Nebennierenhypertrophie ursächlich beteiligt sein. Das wichtigste Ergebnis dieser Arbeit ist jedoch, daß sich die Aldosteronsekretion durch Natrium-Depletion im Stadium des Vitamin-E-Mangels *in vivo* nur zu rund 50% der Antwort von α -Tocopherol normal ernährten Tieren stimulieren ließ (vgl. 5.2.3 Abb. 5.10 B), *in vitro* aber überhaupt nicht (Möbius *et al.* 1996). Wie beim Vitamin-C-Mangel scheint auch hier die Aldosteron-Sekretion in der Nebenniere selbst durch die Vitamin-E-Depletion betroffen zu sein, denn die humoralen Stimuli sind unverändert.

6.3.3 Besonderheiten in der Nebennierenrindenfunktion des Meerschweinchens

Das Meerschweinchen besitzt eine „Glucocorticoid-Resistenz“. Die im Vergleich zu Mensch, Maus und Ratte sehr hohen Plasmaspiegel von Glucocorticoiden sind nicht durch versuchstechnischen Streß bedingt, sondern schon lange beim Meerschweinchen als Besonderheit bekannt (zur Übersicht s. Funder 1994, Keightley and Fuller 1996). Die hohen Plasmaspiegel des freien Cortisols gehen einher mit einer niedrigen Konzentration und Bindungsaffinität von Transcortin, einer erhöhten Bioaktivität von ACTH und einer wesentlich erniedrigten Affinität des Glucocorticoid-Rezeptors zu Cortisol als bei anderen Spezies. Die Affinität des Mineralocorticoid-Rezeptors (Typ I) zu Aldosteron ist beim Meerschweinchen allerdings unverändert (Miles und Funder 1994). So ist es noch nicht geklärt, wie der Mineralocorticoid-Rezeptor vor der im Vergleich zu Aldosteron etwa 1000fach höheren Konzentration von freiem Cortisol geschützt wird, zumal die Plasma-Aldosteron-Konzentration beim Meerschweinchen auch bei anderen Untersuchern (Wipp *et al.* 1976, Rechkemmer 1992) nicht wesentlich höher war als bei Maus und Ratte.

In der vorliegenden Untersuchung fiel auf, daß beim Meerschweinchen nicht immer eine Korrelation zwischen der Plasma-Renin-Aktivität (PRA) und der Aldosteron-Sekretion bestand. Durch die Natrium-Verarmung wurde die PRA nur leicht und nicht signifikant erhöht, während die Plasma-Aldosteron-Konzentration auf das Dreifache stieg (*s. Abb. 5.4 B, 5.5 B, 5.10 B und Tab. 5.3*). Andererseits supprimierte die dreitägige ACTH-Behandlung sowohl die Plasma-Renin-Aktivität als auch die Aldosteron-Sekretion. Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um zu klären, ob beim Meerschweinchen eine verstärkte Sensibilisierung der Zona glomerulosa während der Natrium-Verarmung gegenüber Angiotensin II zu einer Steigerung der Aldosteron-Sekretion führt. Dieses Sensibilisierungsphänomen ist beim Menschen bekannt: bei anhaltender Angiotensin II-Stimulation nimmt die Empfindlichkeit der Zona glomerulosa gegenüber Angiotensin II zu (Oelkers *et al.* 1974, Williams *et al.* 1976, Oelkers *et al.* 1978). Denkbar wäre auch, daß beim Meerschweinchen ein lokales, gewebsständiges Renin-Angiotensin-System, wie es bei der Ratte in der Nebenniere entdeckt wurde (White 1994), unter Natrium-Verarmung größere Bedeutung erlangt.

6.3.4 Mögliche Wirkungsweise von Vitamin C und Vitamin E auf die Aldosteron-Sekretion in der Nebennierenrinde

Die Vitamine C und E wirken als Antioxidantien und schützen die Nebennierenrindenzellen vermutlich vor Lipidperoxidation durch reaktive Sauerstoffverbindungen, welche bei der Steroidbiosynthese durch Cytochrom P450-Enzyme entstehen. Erst kürzlich wurden von Chakraborty *et al.* (1994) bei Meerschweinchen eine Steigerung der Lipidperoxidation in der Nebenniere durch marginale Vitamin-C-Verarmung *in vivo* und *in vitro* beobachtet, die bei oraler Zufuhr von Ascorbinsäure nach mehreren Tagen reversibel war. Daß Vitamin-E-Depletion die Lipidperoxidation in der Nebenniere erhöht *resp.* α -Tocopherol-Addition die Lipidperoxidation vermindert, ist aus *in vitro*-Versuchen schon länger bekannt (Kitabchi und Williams 1968, Kitabchi 1963, 1964, 1972, Hornsby 1982, Staats *et al.* 1988b, 1989b). Die Ursache für eine eingeschränkte Aldosteron-Sekretion bei Stimulation durch Natrium-Depletion sowohl im Stadium des Vitamin-C- als auch Vitamin-E-Mangels könnte also in einer erhöhten Lipidperoxidation in der Nebennierenrinde liegen, die die besonders oxidationsempfindlichen letzten beiden Schritte der Aldosteron-Synthese beeinträchtigt (*vgl.* 2.5). Die Ergebnisse unterstützen somit die Theorie von Hornsby und Crivello (1983b) über die funktionelle Zonierung der Nebennierenrinde, die besagt, daß ein in der Nebennierenrinde von außen nach innen zunehmender Steroidgradient (v. a. von Cortisol) über Pseudosubstratreaktionen mit den Cytochrom P450-Enzymen die Lipidperoxidation fördert und in den *Zonae fasciculata* und *reticularis* die Aldosteron-Synthese hemmt (*vgl.* 2.4). Das Konzentrationsgefälle an Lipidperoxiden in der Nebennierenrinde wird wiederum von der reziprok verteilten Vitamin-E-Konzentration aufrecht erhalten (Colby *et al.* 1995). Ni *et al.* (1995) konnten kürzlich demonstrieren, daß sich das durch chronische ACTH-Stimulation hervorgerufene „Aldosteron Turn-Off Phänomen“ bei der Ratte *in vivo* durch Gaben von Vitamin E oder DMSO als Antioxidantien überspielen läßt. Sie vermuten, damit eine Steigerung der Aldosteron-Synthase-Aktivität (P450c11AS) durch Verminderung der Lipidperoxidation hervorgerufen zu haben.

Der von Yanagibashi *et al.* (1990) diskutierte Elektronen-Transfer von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran durch Ascorbat, der für die Aldosteron-Biosynthese zusätzliche Reduktionsäquivalente bereitstellt, wird durch eine Vitamin-C-Depletion vermutlich ebenfalls beeinträchtigt. Während unter physiologischen Bedingungen auch bei Vitamin-C-Verarmung die Aldosteron-Sekretion noch gewährleistet war, trat die Folge der

Vitamin-C-Mangelernährung erst unter Stimulation (Natrium-Verarmung) in Erscheinung: die Aldosteron-Sekretion war nicht mehr stimulierbar, und die Meerschweinchen konnten Natrium nicht genügend retinieren. Bei Vitamin-E-Verarmung trat die Beeinträchtigung der Aldosteron-Synthese nicht ganz so deutlich zu Tage: Entweder, weil außer der gesteigerten Lipidperoxidation nicht noch ein zweiter Mechanismus wie der Elektronen-Transfer über Ascorbinsäure betroffen ist, oder weil die Vitamin-E-Depletion im Vergleich mit der Vitamin-C-Depletion nicht so vollständig war (Versuchsdauer zu kurz gewählt). Die kombinierte Vitamin-C- und Vitamin-E-Verarmung führte tendentiell zu einer weiteren Verminderung der Aldosteron-Sekretion. Sie ist zwar aufgrund der kleinen Tierzahl statistisch nicht abzusichern, läßt sich aber durch eine Potenzierung der Lipidperoxidation infolge des Fehlens zweier antioxidativer Schutzmechanismen erklären. So wurden bei kombinierter Vitamin-C- und E-Verarmung bei Meerschweinchen deutlich höhere Mengen an Produkten der Lipidperoxidation in der Leber gemessen als bei Mangel jeweils nur eines Vitamins (Chen und Barnes 1976).

Die Folgen einer verstärkten Lipidperoxidation durch freie Radikale sind für den Organismus in vielerlei Hinsicht gefährlich und spielen z. B. beim Altern, bei der Tumorentstehung und bei kardiovaskulären Erkrankungen eine dominierende Rolle (Fürst 1996). Daher schützt sich der Körper durch ein vielfältiges interaktives System aus allen biologisch aktiven Antioxidantien exogener und endogener Herkunft. Nicht nur bei dem Zusammenspiel von Vitamin C und Vitamin E ist es schwer zu beurteilen, wieweit bei diätetischem Entzug einzelner exogener Komponenten Interaktionen der verbliebenen Antioxidantien betroffen werden (Jacob 1995). So wirkt z. B. auch β -Carotin mit α -Tocopherol synergistisch bei der Begrenzung von Lipidperoxidation in mikrosomalen Membranen von Rattenlebern (Palozza und Krinsky 1992), und die Gabe von Glutathion-Estern konnte bei Vitamin-C-Mangel sowohl den Abfall der Vitamin-C-Konzentrationen im Gewebe als auch das Auftreten von Skorbut-Symptomen bei Meerschweinchen verzögern (Mårtensson *et al.* 1993). Als Überlebensstrategie ist es schließlich nur sinnvoll, daß bei diätetischem Mangel z. B. eines einzigen Vitamins andere Antioxidantien ausgleichend wirken, bevor eine lebenswichtige Funktion wie die Aldosteron-Synthese ausfällt. So ist es vielleicht zu erklären, warum die Aldosteron-Sekretion erst bei zusätzlicher Natrium-Depletion durch den Vitamin-C- bzw. Vitamin-E-Mangel beeinträchtigt wurde.

6.4 Schlußfolgerung

Sowohl Vitamin C als auch Vitamin E spielen *in vivo* eine Rolle bei der Aldosteron-Biosynthese des Meerschweinchens. Sie sind zumindest für die Stimulation der Aldosteron-Sekretion durch Natrium-Verarmung notwendig. Vermutlich schützen sie als Antioxidantien die Nebennierenrindenzellen vor Lipidperoxidation durch reaktive Sauerstoffverbindungen, die bei der Steroidbiosynthese durch Cytochrom P450-Enzyme gebildet werden. Vitamin C nimmt darüberhinaus wahrscheinlich noch an einem Elektronen-Transportsystem über die innere Mitochondrienmembran teil, das zusätzliche Reduktionsäquivalente für die Aldosteron-Biosynthese bereitstellt. Nach der Pseudosubstrat-Theorie und über eine reziproke Verteilung von α -Tocopherol in der Nebennierenrinde tragen die Vitamine C und E vermutlich zur funktionellen Differenzierung der Nebennierenrinde bei.

Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um den zugrundeliegenden Mechanismus für die Beeinträchtigung der durch Natrium-Depletion stimulierten Aldosteron-Sekretion im Vitamin-C- bzw. Vitamin-E-Mangel zu erklären.

7. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

Vitamin C (Ascorbinsäure) und Vitamin E (α -Tocopherol) sind auffallend hoch in der Nebenniere konzentriert. Sie wirken als Antioxidantien und schützen die Nebennierenrindenzellen zumindest *in vitro* vor reaktiven Sauerstoffspezies, die bei der Steroidsynthese durch Cytochrom P450-Enzyme entstehen. In der Nebennierenrinde liegt ein nach innen zunehmender Lipidperoxidations-Gradient vor, der durch eine reziproke Verteilung von α -Tocopherol stabilisiert wird und zur funktionellen Differenzierung der Nebennierenrinde beitragen könnte. Ascorbinsäure stellt möglicherweise über eine Elektronen-Transport-Kette an der inneren Mitochondrienmembran zusätzliche Reduktions-äquivalente für die Aldosteron-Biosynthese zur Verfügung.

In dieser Arbeit wurde der Einfluß eines Vitamin-C- bzw. Vitamin-E-Mangels *in vivo* auf die Steroidsekretion der Nebennierenrinde beim Meerschweinchen untersucht, dabei wurden Untergruppen Natrium-verarmt oder mit Depot-ACTH über drei Tage behandelt. Neben den Vitamin-Konzentrationen in Serum und Geweben wurden die Plasma-Konzentrationen von Cortisol und Aldosteron und gleichzeitig ihre wichtigsten Regulatoren (endogenes ACTH, Serum-Kalium, Serum-Natrium und die Plasma-Renin-Aktivität) gemessen. Während der letzten zwei Versuchstage wurde die Natrium- und Kalium-Exkretion im 24-Stunden-Urin bestimmt.

In Vorversuchen wurde die optimale Dauer der Vitamin-C- und Vitamin-E-Depletion ermittelt, um den Zeitpunkt zu finden, an dem der Vitamin-Mangel hochgradig war, ohne jedoch die Hypophysen-Nebennieren-Achse durch Streß zu aktivieren. In den Hauptversuchen dauerte die Vitamin-C-Verarmung danach 15 Tage, während die Vitamin-E-Verarmung über 72 Tage durchgeführt wurde.

Vitamin-C-Verarmung erhöhte die Plasma-Cortisol-Konzentration leicht, ohne daß das Plasma-ACTH anstieg. Durch Langzeit-ACTH-Stimulation wurde die Cortisol-Sekretion deutlich stimuliert und die Aldosteron-Sekretion zusammen mit der Plasma-Renin-Aktivität supprimiert, unabhängig vom Vitamin-C-Status. Die Vitamin-E-Verarmung hatte auf das Plasma-Cortisol keinen signifikanten Einfluß, allerdings stieg die Aldosteron-Sekretion leicht an. Alle anderen Parameter blieben unverändert.

7. Zusammenfassung / Summary

Eine 15-tägige Natrium-Verarmung stimulierte die Aldosteron-Synthese um das Dreifache. Die Steigerung der Aldosteron-Sekretion wurde jedoch durch die Vitamin-C-Depletion völlig, durch die Vitamin-E-Depletion zu rund 50% aufgehoben. Alle anderen Parameter, auch die Plasma-Renin-Aktivität, blieben dabei unbeeinflusst. Die Natrium- und Vitamin-C-verarmten Tiere konnten Natrium signifikant weniger retinieren als Natrium-verarmte Tiere mit normalem Vitamin-C-Status.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß Ascorbinsäure und α -Tocopherol auch *in vivo* einen fördernden Einfluß auf die Aldosteron-Synthese des Meerschweinchens ausüben und vermutlich bei der funktionellen Zonierung der Nebennierenrinde eine Rolle spielen.

SUMMARY

Influence of vitamin C and vitamin E on adrenal cortical function in the guinea pig

Vitamin C (ascorbate) and vitamin E (α -tocopherol) are highly concentrated in the adrenal gland. Being antioxidants, they protect adrenocortical cells from oxygen derived radicals produced by steroidogenic cytochrome P450 enzymes. In the adrenal cortex, there exists a gradient of lipidperoxidation that increases towards the inner zones, corresponding with high concentrations of α -tocopherol in the outer and low concentrations in the inner zone. These gradients may contribute to the functional zonation of the adrenal cortex. Ascorbate may be, in addition, part of an electron transport system within the inner mitochondrial membrane, supplying additional reduction equivalents for aldosterone biosynthesis.

In the present study the *in vivo* influence of vitamin C or vitamin E depletion on cortisol and aldosterone secretion of the adrenal cortex was examined in guinea pigs. Subgroups of animals were sodium depleted or injected with depot-ACTH for three days. Besides the vitamin concentrations of serum and tissues, the plasma concentrations of cortisol and aldosterone and their most important regulators, ACTH, serum potassium, serum sodium and plasma renin activity were measured. Within the last two days of vitamin depletion, the daily urine excretion of sodium and potassium was determined.

In preliminary experiments the optimum duration of vitamin depletion was determined in order to find out the point of severe vitamin deficiency at which the pituitary-adrenal-axis was not yet significantly activated by scorbutic stress. In the main experiments, vitamin C depletion lasted 15 days while vitamin E depletion was carried out over 72 days.

Vitamin C depletion led to a slight rise in plasma cortisol without a concomitant rise in plasma ACTH. ACTH administration greatly stimulated cortisol secretion and suppressed aldosterone and renin secretion irrespective of the vitamin C status. Vitamin E depletion did not influence cortisol secretion, but plasma aldosterone rose slightly. All other parameters did not change.

15 days of sodium depletion stimulated aldosterone secretion threefold. The stimulation of aldosterone secretion was totally abolished by vitamin C depletion and reduced to fifty percent in vitamin E depleted animals. All other parameters, even plasma renin activity, were not affected by vitamin C or E depletion. A functional correlate of inhibited aldosterone secretion in sodium and vitamin C depleted animals was an impaired renal sodium conservation.

These results show that ascorbate and α -tocopherol play a permissive role in aldosterone biosynthesis and secretion in the guinea pig. The antioxidant vitamins may also be important for the functional zonation of the adrenal cortex.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Addison T (1855):

On the constitutional and local effects of disease of the suprarenal capsules. *Highley, London.*

Aguilera G (1993):

Factors controlling steroid biosynthesis in the zona glomerulosa of the adrenal. *J Steroid Biochem Molec Biol 45: 147-151.*

Aguilera G, Fujita K, Katt KJ (1981):

Mechanisms of inhibition of aldosterone secretion by adrenocorticotropin. *Endocrinology 108: 522-528.*

Bendich A, D'Apolito P, Gabriel E, Machlin LJ (1984):

Interaction of dietary vitamin C and vitamin E on guinea pig immune responses to mitogens. *J Nutr 114: 1588-1593.*

Bivin WS und Smith GD (1984):

Techniques of experimentation. In: Fox JG, Cohen BJ and Loew FM (eds.): Laboratory animal medicine. *American College of Laboratory Animal Medicine Series, Academic Press, New York, 1984. S. 563-594.*

Björkhem I, Kallner A, Kalmar K-E (1978):

Effects of ascorbic acid deficiency on adrenal mitochondrial hydroxylations in guinea pigs. *J Lipid Res 19: 695-704.*

Black VH (1987):

Lipoprotein requirements for secretion of ultraviolet-absorbing corticosteroids by guinea pig adrenocortical cell *in vitro*: Inner versus outer cortices; zona glomerulosa versus zona fasciculata. *Endocrinology 120: 640-650.*

Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Usadel H, Böckmann M, Scherbaum WA (1991):

Morphological evidence for a close interaction of chromaffin cells with cortical cells within the adrenal gland. *Cell Tissue Res 265: 1-9.*

Brody RI und Black VH (1991):

Differential ACTH response of immunodetectable HMG CoA reductase and cytochromes P450_{17 α} and P450₂₁ in guinea pig adrenal outer zone cell types, zona glomerulosa and zona fasciculata. *Endocr Res 17: 195-208.*

Brown-Séguard CE (1856):

Recherches expérimentales sur la physiologie et la pathologie des capsules surrenales. *Arch Gen Med* 5: 385-401.

Bülow HE, Möbius K, Bähr V, Bernhardt R (1996):

Molecular cloning and functional expression of the cytochrome P450 11B-hydroxylase of the guinea pig. *Biochem Biophys Res Commun* 221: 304-312.

Buettner GR (1992):

The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 300: 535-543.

Burton GW, Wronska U, Stone L, Foster DO, Ingold KU (1990):

Biokinetics of dietary RRR- α -Tocopherol in the male guinea pig at three dietary levels of vitamin C and two levels of vitamin E. Evidence that vitamin C does not 'spare' vitamin E *in vivo*. *Lipids* 25: 199-210.

Chakraborty S, Nandi A, Mukhopadhyay M, Mukhopadhyay CK, Chatterjee IB (1994):

Ascorbate protects guinea pig tissues against lipid peroxidation. *Free Radical Biol Med* 16: 417-426.

Charlton BG (1990):

Adrenal cortical innervation and glucocorticoid secretion. Review. *J Endocrinol* 126: 5-8.

Chen LH und Barnes KJ (1976):

Nutritional relationship of vitamin E and vitamin C in guinea pigs. *Nutr Rep Int* 14: 89-96.

Chen LH, Lee MS, Hsing WF, Chen SH (1980):

Effect of vitamin C on tissue antioxidant status of vitamin E deficient rats. *Int J Vitamin Nutr Res* 50: 156-162.

Civen M, Leeb JE, Wishnow RM, Morin RJ (1980):

Effects of dietary ascorbic acid and vitamin E deficiency on rat adrenal cholesterol ester metabolism and corticosteroidogenesis. *Int J Vitam Nutr Res* 50: 70-78.

Colby HD und Eacho PI (1985):

Mitochondrial steroid metabolism in the inner and outer zones of the guinea-pig adrenal cortex. *J Steroid Biochem* 23: 477-482.

Colby HD, Larson TW, Kowalski C, Levitt M (1995):

Zonal differences in adrenocortical lipid peroxidation: role of α -tocopherol. *Free Radic Biol Med* 18: 373-376.

8. Literaturverzeichnis

Colby HD, Levitt M, Pope MR, Johnson PB (1992):

Differential effects of adrenocorticotrophic hormone on steroid hydroxylase activities in the inner and outer zones of the guinea pig adrenal cortex. *J Steroid Biochem Molec Biol* 42: 329-335.

Collins M, und Elvehjem CA (1958):

Ascorbic acid requirement of the guinea pig using growth and tissue ascorbic acid concentrations as criteria. *J Nutr* 64: 503-511.

Crivello JF, Hornsby PJ, Gill GN (1983):

Suppression of cultured bovine adrenocortical zona glomerulosa cell aldosterone synthesis by steroids and its prevention by antioxidants. *Endocrinology* 113: 235-242.

Curnow KM, Tusie-Luna MT, Pascoe L, Natarajan R, Gu JL, Nadler JL, White PC (1991):

The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol Endocrinol* 5: 1513-1522.

Deutsches Arzneibuch (DAB) (1996):

Monographie „Corticotrophin“. *Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart. 1996.*

Diliberto EJ Jr, Dean G, Carter C, Allen PL (1982):

Tissue, subcellular, and submitochondrial distributions of semidehydroascorbate reductase: possible role of semidehydroascorbate reductase in cofactor regeneration. *J Neurochem* 39: 563-568.

Domalik LJ, Chaplin DD, Kirkman MS, Wu RC, Liu WW, Howard TA, Seldin MF, Parker KL (1991):

Different isozymes of mouse 11 β -hydroxylase produce mineralocorticoids and glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 5: 1853-1861.

Douglas NL, Constantopoulos A, Litsios B (1987):

Effect of ascorbic acid on guinea pig adrenal adenylate cyclase activity and plasma cortisol. *J Nutr* 117: 1108-1114.

Driskell WJ, Neese JW, Bryant CC, Bashor MM (1982):

Measurement of vitamin A and vitamin E in human serum by high-performance liquid chromatographie. *J Chromatogr* 231: 439-444.

Eacho PI und Colby HD (1983):

Regional distribution of microsomal drug and steroid metabolism in the guinea pig adrenal cortex. *Life Sci* 32: 1119-1127.

Eacho PI und Colby HD (1984):

Functional zonation of the guinea pig adrenal cortex: differences in mitochondrial steroid metabolism between the inner and outer zones. *Endocrinology* 114: 1463-1465.

Eacho PI und Colby HD (1985):

Differences in microsomal steroid metabolism between the inner and outer zones of the guinea pig adrenal cortex. *Endocrinology* 116: 536-541.

Ediger RD (1976):

Care and management. In: Wagner JE and Manning PJ (eds.): The biology of the guinea pig. *Academic Press, New York-San Francisco-London*. 1976. S. 5-12.

Fordyce MK und Kassouny ME (1977):

Influence of vitamin C restriction on guinea pig adrenal calcium and plasma corticosteroids. *J Nutr* 107: 1846-1851.

Friedrich W (1988a):

Vitamin C. In: Vitamines. *De Gruyter, Berlin-New York*, 1988. S. 929-1001.

Friedrich W (1988b):

Vitamin E. In: Vitamines. *De Gruyter, Berlin-New York*, 1988. S. 217-283.

Fürst P (1996):

The role of antioxidants in nutritional support. *Proc Nutr Soc* 55: 945-961.

Funder JW (1994):

The tale of the guinea pig. Commentary. *Frontiers Neuroendocrinol* 15: 384-389.

Gärtner K (1989):

Auswahl von Versuchstieren und tierexperimentelles Vorgehen in der medizinischen Forschung. In: Lippert H (Hrsg.): Die medizinische Dissertation: Eine Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten für Medizinstudenten. 3. Aufl. *Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore*, 1989. S. 30-58.

Ginter E (1975):

Ascorbic acid in cholesterol and bile acid metabolism. *Ann NY Acad Sci* 258: 410-421.

Ginter E, Bobek P, Vargova D (1979):

Tissue levels and optimum dosage of vitamin C in guinea pigs. *Nutr Metab* 23: 217-226.

Ginter E, Drobna E, Ramacsay L (1982):

Kinetics of ascorbate depletion in guinea pigs after long-term high vitamin C intake. *Int J Vit Nutr Res* 52: 307-311.

8. Literaturverzeichnis

Greep RO und Deane HW (1949):

Histological, cytochemical and physiological observations on the regeneration of the rat's adrenal gland following enucleation. *Endocrinology* 45: 42-50.

Haber E, Koerner T, Page LB, Kliman B, Purnode A (1969):

Application of a radioimmunoassay for angiotensin I to the physiologic measurements of plasma renin activity in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 29: 1349-1355.

Haemisch A (1990):

Coping with social conflict, and short-term changes of plasma cortisol titers in familiar and unfamiliar environments. *Physiol Behav* 47: 1265-1270.

Hall PF, Yanagibashi K, Kobayashi Y (1991):

Synthesis of aldosterone by mitochondria and homogeneous 11 β -hydroxylase from beef and pig. *Endocr Res* 17: 135-149.

Harper LV (1976):

Behavior. In: Wagner JE and Manning PJ (eds.): The biology of the guinea pig. *Academic Press, New York-San Francisco-London, 1976. S. 31-51.*

Harris WS, Kottke BA, Subbiah MT (1979):

Bile acid metabolism in ascorbic acid deficient guinea pigs. *Am J Clin Nutr* 32: 1837-1841.

Ho MM und Vinson GP (1993):

11 β -hydroxylase gene expression in the rat adrenal cortex. *J Endocrinol* 139: 301-306.

Hodges JR und Hotston RT (1970):

Ascorbic acid deficiency and pituitary adrenocortical activity in the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 40: 740-746.

Hodges JR und Hotston RT (1971):

Suppression of adrenocorticotrophic activity in the ascorbic acid deficient guinea-pig. *Br J Pharmacol* 42: 595-602.

Hornsby PJ (1980):

Regulation of Cytochrome P-450-supported 11 β -hydroxylation of deoxycortisol by steroids, oxygen and antioxidants in adrenocortical cell cultures. *J Biol Chem* 255: 4020-4027.

Hornsby PJ (1982):

The role of vitamin E in cellular energy metabolism in cultured adrenocortical cells. *J Cell Physiol* 112: 207-216.

Hornsby PJ (1986):

Cytochrome P-450 / pseudosubstrate interactions and the role of antioxidants in the adrenal cortex. *Endocr Res* 12: 469-494.

Hornsby PJ (1987):

Physiological and pathological effects of steroids on the function of the adrenal cortex. *J Steroid Biochem* 27: 1161-1171.

Hornsby PJ und Crivello JF (1983a):

The role of lipid peroxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. Part 1: A background review. Review. *Mol Cell Endocrinol* 30: 1-20.

Hornsby PJ und Crivello JF (1983b):

The role of lipid peroxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. Part 2. Review. *Mol Cell Endocrinol* 30: 123-147.

Hornsby PJ, Harris SE, Aldern KA (1985):

The role of ascorbic acid in the function of the adrenal cortex: studies in adrenocortical cells in culture. *Endocrinology* 117: 1264-1271.

Hornsby PJ, O'Hare MJ, Neville AM (1974):

Functional and morphological Observations on rat adrenal zona glomerulosa cells in monolayer culture. *Endocrinology* 95: 1240-1251.

Hrubá F, Nováková V, Ginter E (1982):

The effect of chronic marginal vitamin C deficiency on the α -tocopherol content of the organs and plasma of guinea-pigs. *Experientia* 38: 1454-1455.

Hughes RE und Nicholas P (1971):

Effects of caging on the ascorbic acid content of the adrenal glands of the guinea-pig and gerbil. *Life Sci* 10: 53-55.

Hyatt PJ, Bell JB, Bhatt K, Tait JF (1983):

Preparation of steroidogenic properties of purified zona fasciculata and zona reticularis cells from the guinea-pig adrenal gland. *J Endocrinol* 96: 1-14.

Imai M, Shimada H, Okada Y, Matsushima Hibiya Y, Ogishima T, Ishimura Y (1990):

Molecular cloning of a cDNA encoding aldosterone synthase cytochrome P-450 in rat adrenal cortex. *FEBS Lett* 263: 299-302.

Imataka H, Suzuki K, Tamaoki B (1985):

Effect of Fe²⁺-induced lipid peroxidation upon microsomal steroidogenic enzyme activities of porcine adrenal cortex. *Biochem Biophys Res Commun* 128: 657-663.

8. Literaturverzeichnis

Isenbügel E (1985):

Meerschweinchen. In: Isenbügel und Frank: Heimtierkrankheiten. *Ulmer, Stuttgart, 1985. S. 17-47.*

Islam R (1987):

Versuche zur Ermittlung des Stickstofferhaltungsbedarfs sowie des Zuwachsbedarfs an Protein und Energie für weibliche Meerschweinchen. *Vet. med. Diss., Berlin, 1987.*

Jacob RA (1995):

The integrated antioxidant system. *Nutr Res 15: 755-766.*

Junqueira LC und Carneiro J (1986):

Histologie. Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen. Übers., überarb. u. erg. von: Schiebler TH, Peiper U, Schneider F. 2. Aufl. *Springer, Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris-Tokyo, 1986. S. 354-364.*

Kanazawa K, Takeuchi S, Hasegawa M, Okada M, Makiyama I, Hirose N, Toh T, Cho SH, Kobayashi M (1981):

Influence of ascorbic acid deficiency on the level of non-protein SH compounds and vitamin E in the blood and tissues of guinea pigs. *Nihon Univ J Med 23: 257-265.*

Kaspereit J (1985):

Untersuchungen der plasmatischen Gerinnung und Thrombozytenaggregation bei normalen und an Vitamin C-Mangel leidenden Meerschweinchen. *Vet. med. Diss., Hannover, 1985.*

Kawamoto T, Mitsuuchi Y, Onishi T, Ichikawa Y, Yokoyama Y, Sumimoto H, Toda K, Miyahara K, Kuribayashi I, Nakao K, Hosoda K, Yamamoto Y, Imura H, Shizuta Y (1990):

Cloning and expression of a cDNA for human cytochrome P-450_{aldo} as related to primary aldosteronism. *Biochem Biophys Res Commun 173: 309-316.*

Keightley MC und Fuller PJ (1996):

Anomalies in the endocrine axes of the guinea pig: relevance to human physiology and disease. *Endocr Rev 17: 30-44.*

Kipp DE und Rivers JM (1987):

Uptake and release of adrenal ascorbic acid in the guinea pig after injection of ACTH. *J Nutr 117: 1570-1575.*

Kitabchi AE (1963):

Corticoid synthesis by adrenal gland preparations of tocopherol sufficient and deficient rats. *Fed Proc 22: 593.*

Kitabchi AE (1964):

Adrenal glands in vitamin E deficiency: in vitro corticoid synthesis by quartered adrenal glands of rats deprived of vitamin E. *Nature* 203: 650-651.

Kitabchi AE (1967a):

Ascorbic acid in steroidogenesis. *Nature* 215: 1385-1386.

Kitabchi AE (1967b):

Inhibitory effect of ascorbic acid on steroid hydroxylase systems of beef adrenal cortex. Abstract. *Fed Proc* 26: 484.

Kitabchi AE (1972):

Corticosteroidogenesis in isolated adrenal cell preparations of vitamin E-deficient rats. *Ann NY Acad Sci* 203: 123-126.

Kitabchi AE und Williams RH (1968):

Adrenal gland in vitamin E deficiency. Lipidperoxidation and malonaldehyde production *in vitro*. *J Biol Chem* 243: 3248-3254.

Kolb E (1990):

Einige neuere Erkenntnisse zum Stoffwechsel und zur Funktion der Ascorbinsäure. *Z gesamt inn Med* 45: 205-210.

Laney PH, Levy JA, Kipp DE (1990):

Plasma cortisol and adrenal ascorbic acid levels after ACTH treatment with high intake of ascorbic acid in the guinea pig. *Ann Nutr Metab* 34: 85-92.

Leonhard RK, Auersperg N, Parkes CO (1983):

Ascorbic acid accumulation by cultured rat adrenocortical cells. *In Vitro* 19: 46-52.

Levine M und Morita K (1985):

Ascorbic acid in endocrine systems. *Vit and Horm* 42: 2-64.

MacCrehan WA und Schönberger E (1987):

Determination of retinol, **a**-tocopherol and **b**-carotene in serum by liquid chromatography with absorbance and electrochemical detection. *Clin Chem* 33: 1585-1592.

Machlin LJ (1984):

Vitamin E. In: Machlin LJ (ed.): Handbook of vitamins. Nutritional, biochemical, and clinical aspects. *Marcel Dekker, New York-Basel, 1984. S. 99-145.*

Machlin LJ, Keating J, Nelson J, Brin M, Filipski R, Miller ON (1979):

Availability of adipose tissue tocopherol in the guinea pig. *J Nutr* 109: 105-109.

Manning PJ, Wagner JE, Harkness JE (1984):

Biology and diseases of guinea pigs. In: Fox JG, Cohen BJ and Loew FM (eds.): Laboratory animal medicine. *American College of Laboratory Animal Medicine Series, Academic Press, New York, 1984. S. 149-181*

Mårtensson J, Han J, Griffith OW, Meister A (1993):

Glutathione ester delays the onset of scurvy in ascorbate-deficient guinea pigs. *Proc Natl Acad Sci 90: 317-321.*

McCay PB, Lai EK, Powell SR, Breuggemann G (1986):

Vitamin E functions as an electron shuttle for glutathione-dependent "free radical reductase" activity in biological membranes. *Fed Proc 45: 451.*

McDougall JG, Butkus A, Coghlan JP, Denton DA, Müller J, Oddie CJ, Robinson PM, Scoggins BA (1980):

Biosynthetic and morphological evidence for inhibition of aldosterone production following administration of ACTH to sheep. *Acta Endocrinol (Copenh) 94: 559-570.*

Meister A (1994a):

Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. Minireview. *J Biol Biochem 269: 9397-9400.*

Meister A (1994b):

Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res (Suppl) 54: 1969s-1975s.*

Miller WL (1988):

Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev 9: 295-318.*

Mitani F, Suzuki H, Hata J-I, Ogishima T, Shimada H, Ishimura Y (1994):

A novel cell layer without corticosteroid-synthesizing enzymes in rat adrenal cortex: histochemical Detection and possible physiological role. *Endocrinology 135: 431-438.*

Möbius K, Redmann A, Hiller HH, Oelkers W, Bähr V (1996):

Permissive role of α -tocopherol in the stimulation of aldosterone by sodium depletion in the guinea pig. *Europ J Endocrinol 134 :758-763.*

Müller J (1978):

Suppression of aldosterone biosynthesis by treatment of rats with adrenocorticotropin: comparison with glucocorticoid effects. *Endocrinology 103: 2061-2068.*

Nagyová A und Ginter E (1994):

Interaction between hepatic ascorbic acid, cytochrome P-450 and lipids in female guinea pigs with different ascorbic acid intake. *Physiol Res 43: 307-312.*

Natarajan RM und Harding BW (1985):

Cholesterol side chain cleavage in rat adrenal supported by outer mitochondrial membrane NADH-semidehydroascorbate reductase. *J Biol Chem* 260: 3902-3905.

Nathans AH und Kitabchi AE (1975):

Effect of ascorbic acid on ACTH-induced cyclic AMP formation and steroidogenesis in isolated adrenal cells of vitamin E-deficient rats. *Biochim Biophys Acta* 399: 244-253.

Navas P, Villalba JM, Córdoba F (1994):

Ascorbate function at the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1197: 1-13.

Navia JM und Hunt CE (1976):

Nutrition, nutritional diseases, and nutrition research applications. In: Wagner JE and Manning PJ (eds.): The biology of the guinea pig. *Academic Press, New York-San Francisco-London*. 1976. S. 235-267.

Neville AM und O'Hare MJ (1985):

Histopathology of the human adrenal cortex. *Clin Endocrinol Metab* 14: 791-820.

Ni H, Mune T, Morita H, Daidoh H, Hanafusa J, Shibata T, Yamakita N, Yasuda K (1995):

Inhibition of aldosterone turn-off phenomenon following chronic adrenocorticotropin treatment with in vivo administration of antiglucocorticoid and antioxidants in rats. *Europ J Endocrinol* 133: 578-584.

Nierenberg DW und Nann SL (1992):

A method for determining concentrations of retinol, tocopherol and five carotinoids in human plasma and tissue samples. *Am J Clin Nutr* 56: 417-426.

Niki E (1987):

Interaction of ascorbate and α -tocopherol. *Ann NY Acad Sci* 498: 186-199.

Nishikawa T und Strott CA (1984):

Steroid concentrations in the outer and inner zones of the adrenal cortex of the guinea pig. *J Steroid Biochem* 20: 1123-1127.

Nishikimi M, Kawai T, Yagi K (1992):

Guinea pigs possess a highly mutated gene for L-gulonolactone oxidase, the key enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in this species. *J Biol Chem* 267: 21967-21972.

Njus D und Kelley PM (1993):

The secretory-vesicle ascorbate-regenerating system: a chain of concerted H^+ / e^- -transfer reactions. Review. *Biochim Biophys Acta* 1144: 235-248.

8. Literaturverzeichnis

Odumosu A (1982):

Ascorbic acid and cortisol metabolism in hypovitaminosis C guineapigs. *Int J Vitam Nutr Res* 52: 176-185.

Odumosu A und Wilson CWM (1973):

Metabolic availability of vitamin C in the guinea-pig. *Nature* 242: 519-521.

Oelkers W (1985):

Prolonged ACTH infusion suppresses aldosterone secretion in spite of high renin activity. *Acta Endocrinol (Copenh)* 108: 91-97.

Oelkers W und Bähr V (1993):

Funktionelle Aspekte der Zonierung der Nebennierenrinde. In: Schulte HM, Benker G und Allolio B (Hrsg.): Therapie mit Glukokortikoiden. Molekularbiologische, pharmakologische und klinische Aspekte. *Schattauer, Stuttgart-New York, 1993.* S. 69-79.

Oelkers W, Schöneshöfer M, Blümel A (1974):

Effects of progesterone and four synthetic progestagens on sodium balance and the renin-aldosterone-system in man. *J Clin Endocrinol Metab* 39: 882-890.

Ogishima T, Mitani F, Ishimura Y (1989):

Isolation of aldosterone synthase cytochrome P-450 from zona glomerulosa mitochondria of rat adrenal cortex. *J Biol Chem* 264: 10935-10938.

Ogishima T, Suzuki H, Hata J, Mitani F, Ishimura Y (1992):

Zone-specific expression of aldosterone synthase cytochrome P-450 and cytochrome P-45011 β in rat adrenal cortex: Histochemical basis for the functional zonation. *Endocrinology* 130: 2971-2977.

Orth DN, Kovacs WJ, DeBold CR (1992):

The adrenal cortex. In: Wilson JD and Foster DW (eds): William's Textbook of Endocrinology. 8th Ed. *Saunders, Philadelphia-London-Toronto-Montreal-Sydney-Tokio-Pennsylvania, 1992.* S. 489-520.

Palozza P und Krinsky NI (1992):

β -carotene and α -tocopherol are synergistic antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 279: 184-187.

Pham-Huu-Trung MT, de Smitter N, Bogyo A, Girard F (1984):

Inhibition of cortisol production in isolated guinea-pig adrenal cells. *J Steroid Biochem* 21(1): 93-99.

Pintauro SJ und Bergan JG (1982):

Effects of ascorbic acid on in vitro steroidogenesis in guinea pigs. *J Nutr* 112: 584-591.

Pongracz G, Weiser H, Matzinger D (1995):

Tocopherole - Antioxidantien der Natur. *Fat Sci Technol* 97: 90-104.

Provencher PH, Tremblay Y, Caron S, Belanger A (1992):

Effect of chronic ACTH treatment on guinea-pig adrenal steroidogenesis: steroid plasma levels, steroid adrenal levels, activity of steroidogenic enzymes and their steady-state mRNA levels. *J Steroid Biochem Molec Biol* 41: 69-78.

Rechkemmer G (1992):

Effects of a low-sodium diet on electrolyte transport in the proximal and distal colon of the guinea pig (*cavia porcellus*). *Comp Biochem Physiol* 103A: 501-505.

Redmann A, Möbius K, Hiller HH, Oelkers W, Bähr V (1995):

Ascorbate depletion prevents aldosterone stimulation by sodium deficiency in the guinea pig. *Europ J Endocrinol* 133: 499-506.

Richardson VCG (1992):

Anaesthetics and surgical preparations In: Diseases of domestic guinea pigs. *Library of Veterinary Practice, Blackwell, Oxford-London-Edinburgh-Boston-Melbourne-Paris-Berlin-Vienna, 1992. S. 97-102.*

Robinson P, Toney K, James S, Bennett HP (1995):

Mass spectrometric and biological characterization of guinea pig corticotrophin. *Regul Pept* 56: 89-97.

Sander M, Ganten D, Mellon SH (1994):

Role of adrenal renin in the regulation of adrenal steroidogenesis by corticotropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 148-152.

Sato PH und Zannoni VG (1974):

Stimulation of drug metabolism by ascorbic acid in weanling guinea pigs. *Biochem Pharmacol* 23: 3121-3128.

Sayers G, Sayers MA, Lewis HL, Long CNH (1944):

Effect of adrenotropic hormone on ascorbic acid and cholesterol content of the adrenal. *Proc Soc Biol Med* 55: 238-239.

Sayers MA, Sayers G, Woodbury LA (1948):

The assay of adrenocorticotrophic hormone by the adrenal ascorbic acid-depletion method. *Endocrinology* 42: 379-393.

Shelton DC, Farmer FA, Hunt CE, Navia JM (1978):

Nutrient requirements of the guinea pig. In: Nutrient requirements of laboratory animals. 3rd Ed. *The National Research Council, National Academy of Sciences, Washington DC, 1978. S. 59-69.*

8. Literaturverzeichnis

Shimizu K (1970):

Effects of ascorbic acid on the side chain cleavage of cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 210: 333-340.

Simpson A, Tait JF, Wettstein A, Neher R, von Euw VJ, Reichstein T (1953):

Isolierung eines neuen kristallisierten Hormons aus Nebennieren mit besonderer hoher Wirksamkeit auf den Mineralstoffwechsel. *Experientia* 9: 333.

Smith AI, Wallace CA, Moritz RL, Simpson RJ, Schmauk-White LB, Woodcock EA, Funder JW (1987):

Isolation, amino acid sequence and action of guinea-pig ACTH on aldosterone production by glomerulosa cells. *J Endocrinol* 115: R5-R8.

Smollich A (1985):

Nebenniere. In: Smollich A und Michel G: Mikroskopische Anatomie der Haustiere. *VEB Gustav Fischer, Jena, 1985. S. 305-309.*

Staats DA und Colby HD (1987):

Regional differences in microsomal lipid peroxidation and antioxidant levels in the guinea pig adrenal cortex. *J Steroid Biochem* 28: 637-642.

Staats DA, Lohr DP, Colby HD (1988a):

Relationship between mitochondrial lipid peroxidation and α -tocopherol levels in the guinea pig adrenal cortex. *Biochim Biophys Acta* 961: 279-284.

Staats DA, Lohr DP, Colby HD (1988b):

Effects of tocopherol depletion on the regional differences in adrenal microsomal lipid peroxidation and steroid metabolism. *Endocrinology* 123: 975-980.

Staats DA und Colby HD (1989a):

Modulation of the effects of ascorbic acid on lipid peroxidation by tocopherol in adrenocortical mitochondria. *J Steroid Biochem* 32: 609-611.

Staats DA und Colby HD (1989b):

α -tocopherol depletion eliminates the regional differences in adrenal mitochondrial lipid peroxidation. *Mol Cell Endocrinol* 62: 189-195.

Stryer L (1990):

Biochemie. 4. Aufl. *Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg, 1990. S. 571-600.*

Szent-Györgi A (1928):

Observations on the function of peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex. Description of a new carbohydrate derivative. *Biochem J* 22: 1387-1409.

Thun R und Schwartz-Porsche D (1994):

Nebennierenrinde. In: Döcke F (Hrsg.): Veterinärmedizinische Endokrinologie. 3. Aufl. G. Fischer, Jena-Stuttgart, 1994. S. 309-356.

Tremblay A, Parker KL, Lehoux JG (1992):

Dietary potassium supplementation and sodium restriction stimulate aldosterone synthase but not 11 β -hydroxylase-P-450 messenger ribonucleic acid accumulation in rat adrenals and require angiotensin-II production. *Endocrinology* 130: 3152-3158.

Whipp GT, Wintour EM, Coghlan JP, Scoggins BA (1976):

Regulation of aldosterone in the guinea-pig - effect of oestrus cycle, pregnancy and sodium status. *Aust J Exp Biol Med Sci* 54: 71-78.

White PC (1994):

Disorders of aldosterone biosynthesis and action. Review article. *N Engl J Med* 331: 250-258.

Wilbur VA und Walker BL (1977):

Dietary vitamin C, plasma cortisol and adrenal cholesterol ester circadian rhythms in the guinea pig. *Nutr Rep Int* 16: 403-411.

Winkler BS (1992):

Unequivocal evidence in support of the nonenzymatic redox coupling between glutathion / glutathion disulfide and ascorbic acid / dehydroascorbic acid. *Biochim Biophys Acta* 1117: 287-290.

Yanagibashi K und Hall PF (1986):

Role of electron transport in the regulation of the lyase activity of C₂₁ side chain cleavage P-450 from porcine adrenal and testicular microsomes. *J Biol Chem* 261: 8429-8433.

Yanagibashi K, Haniu M, Shively JE, Shen WH, Hall PF (1986):

The synthesis of aldosterone by the adrenal cortex: two zones (fasciculata and glomerulosa) possess one enzyme for 11 β -, 18-hydroxylation, and aldehyde synthesis. *J Biol Chem* 261: 3556-3562.

Yanagibashi K, Kobayashi Y, Hall PF (1990):

Ascorbate as a source of reducing equivalents for the synthesis of aldosterone. *Biochem Biophys Res Commun* 170: 1256-1262.

Zannoni V, Lynch M, Goldstein S, Sato P (1974):

A rapid micromethod for the determination of ascorbic acid in plasma and tissues. *Biochem Med* 11: 41-48.

Zaspel BJ und Csallany AS (1983):

Determination of alpha-tocopherol in tissues and plasma by high-performance liquid chromatographie. *Anal Biochem* 130: 146-150.

VERÖFFENTLICHUNGEN:

Auszüge der vorliegenden Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin in folgenden Publikationen veröffentlicht:

A. Redmann, K. Möbius, W. Oelkers, V. Bähr:

The influence of ascorbate depletion in aldosterone biosynthesis in guinea pigs.
Poster, 39. Symposion der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Leipzig, März 1995.

A. Redmann, K. Möbius, H.H. Hiller, W. Oelkers, V. Bähr:

Ascorbate depletion prevents aldosterone stimulation by sodium deficiency in the guinea pig.
European Journal of Endocrinology 1995, 133: 499-506.

V. Bähr, A. Redmann, K. Möbius, W. Oelkers:

Permissive Wirkung der Vitamine C und E auf die Stimulation der Aldosteronsynthese durch Natriumverarmung im Meerschwein.
Poster, 6. Wissenschaftswoche des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität Berlin, Abdruck im wissenschaftlichen Jahrbuch 1995.

V. Bähr, K. Möbius, A. Redmann, W. Oelkers:

Ascorbate and α -tocopherol influence aldosterone stimulation by sodium deficiency in the guinea pig.
Poster, 17. Meeting der International Study Group for Steroid Hormones, Berlin, November 1995.

K. Möbius, A. Redmann, H.H. Hiller, W. Oelkers, V. Bähr:

Permissive role of α -tocopherol in the stimulation of aldosterone by sodium depletion in the guinea pig.
European Journal of Endocrinology 1996, 134: 758-763.

V. Bähr, K. Möbius, A. Redmann, W. Oelkers:

Ascorbate and α -tocopherol depletion inhibit aldosterone stimulation by sodium deficiency in the guinea pig.
Endocrine Research 1996, 22: 595-600.

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. W. Oelkers danke ich nicht nur für die Überlassung des Themas, sondern auch für die jederzeit gewährte persönliche Betreuung und umfassende fachliche Beratung.

Bei Herrn Professor Dr. H.-J. Risse möchte ich mich für seine verständnisvolle Unterstützung und wertvollen Anregungen während meines Studiums und der Doktorandenzeit bedanken.

Herrn Dr. Bähr gebührt Dank für die praktische Betreuung und fachlichen Hilfestellungen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei allen ständigen und temporären Mitarbeiterinnen des „Renin-Labors“ für die freundschaftliche Zusammenarbeit und große Hilfe, ohne die ich diese Arbeit nicht hätte durchführen können. Es seien erwähnt: P. Exner, B. Faust, B. Kosmale, I. Moll, B. Söhl und meine Mitstreiterin A. Redmann.

Last but not least danke ich Herrn Dr. Hiller für die Unterstützung bei Planung und Durchführung der Tierversuche, und den Tierpflegerinnen für ihre Geduld bei der arbeitsaufwendigen Versorgung der Meerschweinchen in den Stoffwechselkäfigen.

LEBENS LAUF

Katharina Möbius, geboren am 4. März 1965 in Berlin-Wilmersdorf

Vater: Prof. Dr. Klaus Möbius, Diplomphysiker
Mutter: Uta Möbius, geb. Schirmer, Diplomvolkswirtin

Schulausbildung:

1971-1975: Maria-Montessori-Grundschule, Berlin-Tempelhof
1975-1977: Erich-Kästner-Grundschule, Berlin-Dahlem
1977-1983: Walther-Rathenau-Gymnasium, Berlin-Grunewald
5. 12. 1983: **Abitur**

Studium und Praktika:

Sommer 1984: 3 Monate Landwirtschaftspraktikum in Schleswig-Holstein
WS 84/85-SS 86: **Studium der Agrarwissenschaften**, TU-München/Weihestephan
WS 86/87: **Studium der Kommunikationswissenschaften und Nordischen Philologie**, LMU-München
Sommer 1987: 5 Monate Auslandsaufenthalt in Island, davon 2 Monate Praktikum in einer tierärztlichen Landpraxis
WS 87/88-WS 92/93: **Studium der Veterinärmedizin** an der FU-Berlin
11. 2. 1993: **Abschluß der Tierärztlichen Prüfung**
3. 3. 1993: **Approbation** als Tierärztin

Berufsbezogene Tätigkeiten:

10/90-3/93: **Studentische Hilfskraft** im Institut für Veterinär-Biochemie des Fachbereichs Veterinärmedizin an der FU-Berlin
5/93-5/95: **Wissenschaftliche Mitarbeiterin** (DFG) in der Arbeitsgruppe von Prof. Oelkers, Abt. Endokrinologie im Klinikum Benjamin Franklin der FU-Berlin, Beginn der Promotion
seit 3/96: **Wissenschaftliche Mitarbeiterin** im Institut für Tierernährung des Fachbereichs Veterinärmedizin der FU-Berlin