

**Interventionsstudie zur Wirkung eines Trinksupplements
auf antioxidativen Status und oxidative Stress- und Entzündungsmarker
bei Patienten mit aktivem Morbus Crohn**

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Ernährungs- und Haushaltswissenschaft

(Dr. oec. troph.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

genehmigte Dissertation

vorgelegt am 21.12.2006

von

Cornelia Roggenbuck

aus Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Peter Stehle,

Koreferent: Prof. Dr. Roland Goerlich,

Koreferent: Prof. Dr. Frank Lammert

Tag der mündlichen Prüfung 4. Mai 2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Erscheinungsjahr: 2007

Meiner Familie

Kurzfassung: Wirkung eines Trinksupplements auf antioxidativen Status und oxidative Stress- und Entzündungsmarker bei Patienten mit aktivem Morbus Crohn

Problemstellung: Morbus Crohn (MC) Patienten weisen eine Verschiebung des pro-/ anti-oxidativen Gleichgewichtes in Richtung Oxidantien (oxidativer Stress) auf, welche entzündliche Prozesse begünstigt. Ziel war es zu überprüfen, ob durch Gabe eines Trinksupplements, das reich an Antioxidantien und Glutamin ist, bei MC-Patienten der antioxidative Status und die antioxidative Kapazität im Plasma erhöht, der oxidative Stress vermindert, und damit antiinflammatorische Effekte in der Darmmucosa und eine Steigerung der Lebensqualität erzielt werden können.

Methoden: 8 MC-Patienten (28±9 Jahre, CDAI 163±73) wurden zwischen 01/2005 und 03/2006 in zwei klinischen Zentren (Marienhospital Essen, Medizinische Klinik Bonn) rekrutiert. Sie erhielten 4 Wochen 2 x täglich 200 ml Intestamin® trink (Fresenius Kabi, Bad Homburg) zusätzlich zur Basismedikation. Hiermit wurden täglich 1500 mg Vitamin C, 500 mg Vitamin E, 10 mg β-Carotin, 300 µg Selen, 20 mg Zink, 30 g Glutamin (als Dipeptid) zugeführt.

Vor und nach Intervention wurde die Konzentration der Vitamine A, C, E, sowie von β-Carotin (HPLC), Selen und Zink (AAS) im Plasma bestimmt, sowie die antioxidative Kapazität (TEAC). Als oxidative Stressmarker wurden endogene und H₂O₂-induzierte DNA-Strangbrüche in Leukozyten (Comet Assay) nachgewiesen. Zusätzlich wurden die Plasmaspiegel von 8-Hydroxydesoxyguanosin (OHdG), 8-Isoprostanen, Peroxiden (ELISA) sowie von Glutamin und Glutathion gemessen (HPLC). In der Mucosa wurden IL-8- und MRP-14 mRNA (RT-PCR) sowie der Glutathiongehalt (HPLC) untersucht. Die Lebensqualität wurde mit Hilfe des IBDQ Fragebogens quantifiziert.

Ergebnisse: 6 Patienten beendeten die Studie. Die Compliance betrug 90 % der Zieldosis. Nach der Einnahme des Trinkpräparates stiegen die Plasmaspiegel von Vitamin A (4,8±1,7 vs. 10,7±2,5 µM; p=0,028), Vitamin C (36,8±17,2 vs. 55,5±19,4 µM, p=0,028), Vitamin E (9,1±4,9 vs. 20,0±10,5 µM/mM Cholesterol, p=0,043), β-Carotin (0,4±0,3 vs. 1,6±0,6 µM, p=0,028) und Selen (74,6±16,6 vs. 121,8±29,1 µg/l, p=0,021) sowie die antioxidative Kapazität (1,36±1,4 vs. 1,54±1,5 mM TE, p=0,027) signifikant an. Der Zinkspiegel blieb unverändert (10,2±2,3 vs. 11,9±2,1 µM, n.s.). Die DNA-Strangbrüche (exogen: Tail Intensity: 3,6±3,8 vs. 7,1±1,5 %, Tail Moment: 0,4±1,1 vs. 1,0±1,8, n.s.) sowie die Plasmaspiegel von 8-OHdG (3,8±2 vs. 2,7±0,9 ng/ml, n.s.) und 8-Isoprostanen (16,72±6,7 vs. 18,3±5,5 pg/ml, n.s.) veränderten sich nicht. Die Peroxide (0,4±0,2 vs. 0,3±0,1 mM, p=0,043) im Plasma nahmen signifikant ab. Glutamin (606,6±206,6 vs. 587,5±92,7 µM) und Glutathion (3,7±1,3 vs. 5,6±3,4 µM) im Plasma blieben unverändert, ebenso die Transkriptspiegel der mukosalen Entzündungsmarker (IL-8: 2516±4043 vs. 5614±12131, MRP-14: 4268±3774 vs. 12161±22189 Transkripte/µl cDNA, n.s.). Der Glutathionspiegel in der entzündeten Mucosa (4,0±1,6 vs. 9,6±4,4 µmol/g, p=0,043) stieg an, ebenso die Lebensqualität (128±43 vs. 170±43 Punkte, p=0,027).

Schlussfolgerung: Die 4-wöchige Einnahme eines Trinkpräparates mit hohem Gehalt an Antioxidantien und Glutamin ist geeignet, um den antioxidativen Status von Plasma und entzündeter Mucosa zu verbessern. Aufgrund der geringen Fallzahl und/ oder der starken Streuung ist eine Bewertung der Ergebnisse bzgl. oxidativer Stress- und Entzündungsmarker schwierig. Das unkontrollierte Design schränkt die Aussagekraft der Ergebnisse ein. Daher ist es wünschenswert diesen Therapieansatz in einer placebokontrollierten Studie auf seine Wirksamkeit zu untersuchen.

Abstract: Effect of an oral nutritional supplement on antioxidant status, oxidative stress and inflammatory marker in patients with Crohn's disease

Background: Patients with Crohn's disease (CD) show an imbalance between oxidants (radicals) and antioxidants (oxidative stress), which favours inflammation. The aim of the study was to investigate whether supplementation with an oral nutritional supplement, which is rich in antioxidants and glutamine improves antioxidant status and antioxidant capacity in plasma, reduces oxidative stress and leads to anti-inflammatory effects in mucosa and to an increase in life quality.

Methods: 8 CD patients (28±9 years, CDAI 163±73) were recruited between 01/2005 and 03/2006 in two clinical centers (Marienhospital Essen, Medical Clinic, University Hospital Bonn). They received 200 ml Intestamin® drink (Fresenius Kabi, Bad Homburg) twice a day additional to basic medication so that 1500 mg vitamin C, 500 mg vitamin E, 10 mg β-carotene, 300 µg selenium, 20 mg zinc, 30 g glutamine (as dipeptide) was administered daily.

Before and after intervention the concentration of vitamin A, C, E and β-carotene (HPLC), selenium, zinc (AAS) as well as the antioxidant capacity (TEAC) was determined in plasma. As oxidative stress markers endogeneous and H₂O₂ induced DNA strand brakes in leukocytes (comet assay) were detected. Additionally plasma levels of 8-OHdG, 8-isoprostanes, peroxides (ELISA) as well as glutamine and glutathione were measured (HPLC). In gut mucosa IL-8, MRP-14 mRNA (RT-PCR) and glutathione (HPLC) were investigated. Life quality was quantified by the IBDQ questionnaire.

Results: 6 patients finished the study. The compliance was 90 % of target. After supplementation of the oral nutritional supplement the plasma levels of vitamin A (4.8±1.7 vs. 10.7±2.5 µM; p=0.028), vitamin C (36.8±17.2 vs. 55.5±19.4 µM, p=0.028), vitamin E (9.1±4.9 vs. 20.0±10.5 µM/mM cholesterol, p=0.043), β-carotene (0.4±0.3 vs. 1.6±0.6 µM, p=0.028) und selenium (74.6±16.6 vs. 121.8±29.1 µg/l, p=0.021) as well as the antioxidant capacity (1.36±1.4 vs. 1.54±1.5 mM TE, p=0.027) rose significantly. Der zinklevel remained unchanged (10.2±2.3 vs. 11.9±2.1 µM, n.s.). The DNA-strand brakes (exogeneous: Tail Intensity: 3.6±3.8 vs. 7.1±1.5 %, Tail Moment: 0.4±1.1 vs. 1.0±1.8, n.s.) as well as the plasma levels of 8-OHdG (3.8±2 vs. 2.7±0.9 ng/ml, n.s.) and 8-isoprostanes (16.72±6.7 vs. 18.3±5.5 pg/ml, n.s.) did not change. The peroxides (0.4±0.2 vs. 0.3±0.1 mM, p=0.043) in plasma decreased significantly. Glutamine und glutathione in plasma remained unchanged, also the transcript levels of the mucosal inflammatory marker (IL-8: 2516±4043 vs. 5614±12131, MRP-14: 4268±3774 vs. 12161±22189 transkripts/µl cDNA). The glutathione level in the inflamed mucosa (4.0±1.6 vs. 9.6±4.4 µmol/g, p=0.043) rose significantly, as well as life quality (128±43 vs. 170±43 points, p=0.027).

Conclusion: Four week ingestion of an oral nutritional supplement rich in antioxidants and glutamine is suitable to improve antioxidant status in plasma and inflamed mucosa. Due to the low falling number and/ or the broad variation an evaluation of results concerning oxidative stress and inflammatory marker is difficult. The uncontrolled design limitates the force of expression. Hence it is desirable to investigate the efficacy of this therapeutical approach.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung – wissenschaftlicher Sachstand	1
1.1 Ätiologie, Pathogenese, Klinik und medikamentöse Therapie von Morbus Crohn.....	1
1.2 Pathophysiologische Bedeutung von oxidativem Stress bei Morbus Crohn.....	3
1.2.1 Antioxidative Abwehr	6
1.2.2 Antioxidativer Status bei Morbus Crohn.....	9
1.2.3 Oxidative Stressmarker in Plasma und Mucosa bei Morbus Crohn	12
1.3 Interventionsstudien zur Wirkung von Antioxidantien auf Morbus Crohn..	14
2 Zielsetzung.....	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Studiendesign.....	19
3.2 Probanden.....	19
3.3 Durchführung.....	21
3.4 Anamnese	21
3.5 Trinksupplement.....	22
3.6 Blutentnahme, Gewinnung der Biopsien und Aufbereitung der Plasmaproben	23
3.7 Nutritive Aufnahme von Antioxidantien.....	24
3.8 Antioxidantienstatus in Plasma und Mucosa	24
3.8.1 Vitamin A, E und β -Carotin	24
3.8.2 Vitamin C	25
3.8.3 Selen und Zink.....	26

3.8.4	Glutamin und Glutathion	26
3.8.5	Harnsäure	27
3.8.6	Antioxidative Kapazität	28
3.9	Oxidative Stressmarker in Plasma und Leukozyten	30
3.9.1	DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten	30
3.9.2	8-Hydroxydeoxyguanosin	35
3.9.3	Peroxide	36
3.9.4	8-Isoprostane.....	36
3.10	Inflammatorische Marker	39
3.11	Deskriptive Parameter	39
3.11.1	Lebensqualität	39
3.11.2	Subjective Global Assessment (SGA)	39
3.11.3	Präalbumin	40
3.12	Statistische Auswertung	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Probanden.....	41
4.2	Krankengeschichte der Probanden	42
4.3	Nutritive Aufnahme der Antioxidantien	43
4.4	Antioxidantienstatus in Plasma und Mucosa	44
4.4.1	Vitamin A, E und β -Carotin	44
4.4.2	Vitamin C	47
4.4.3	Selen und Zink.....	48
4.4.4	Glutamin und Glutathion	49
4.4.5	Harnsäure	51
4.4.6	Antioxidative Kapazität im Plasma.....	51
4.5	Oxidative Stressmarker in Plasma und Leukozyten	52
4.5.1	DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten	52

4.5.2	8-Hydroxydesoxyguanosin	53
4.5.3	Peroxide	53
4.5.4	F2-Isoprostane.....	53
4.6	Inflammatorische Marker	54
4.7	Deskriptive Parameter	55
4.7.1	Lebensqualität	55
4.7.2	Ernährungszustand.....	56
4.7.3	Präalbumin	56
5	Diskussion	57
5.1	Studiendesign und Methoden	57
5.2	Antioxidantiver Status in Plasma und Mucosa.....	62
5.3	Oxidative Stressmarker in Plasma und Leukozyten	73
5.4	Inflammatorische Marker	78
5.5	Klinische Parameter	80
5.6	Schlussbetrachtung	81
6	Zusammenfassung.....	85
	Literatur	87
	Anhang	101
	Danksagung	119
	Lebenslauf.....	120

Tabellenverzeichnis

Tab 1:	Konzentration antioxidativ wirksamer Substanzen und antiox. Kapazität bei Morbus Crohn Patienten im Vergleich zu Gesunden in Plasma und/ oder Erythrozyten	9
Tab 2:	Antioxidativer Status und antioxidative Kapazität in der Mucosa von Morbus Crohn Patienten.....	11
Tab 3:	Oxidative Stressmarker im Plasma bzw. Expirationsvolumen bei Morbus Crohn Patienten im Vergleich zu Gesunden.....	12
Tab 4:	Konzentrationen oxidativer Stressmarker in der Mucosa bei Morbus Crohn Patienten.....	13
Tab 5:	Interventionsstudien zur Wirkung von Antioxidantien auf antioxidative Parameter und oxidativen Stress bei Morbus Crohn Patienten	17
Tab 6:	Energie- und Nährstoffzufuhr einer Tagesdosis Intestamin® trink.....	22
Tab 7:	Pipetierschema des 8-Isoprostantests.....	38
Tab 8:	Probandencharakteristika	41
Tab 9:	CDAI/ Krankheitsbezogene Daten	42
Tab 10:	Mittlere nutritive Energie- und Nährstoffaufnahme während der Intervention.....	43
Tab 11:	Entzündungsmarker IL-8, MPR-1 und MRP-14 vor und nach Intervention (Transkripte/ μ l cDNA).....	54

Abbildungsverzeichnis

Abb 1:	Die Rolle phagozytischer Leukozyten und reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffprodukte bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (modifiziert nach Yamada und Grisham, 1993)	5
Abb 2:	Zellkern nach Einzelzell-Gelelektrophorese und Anfärbung mit Propidiumiodid im Fluoreszenzmikroskop.....	32
Abb 3:	Bestimmung von Kopf- und Schweiflänge zur Ermittlung der Tail Intensity eines Zellkerns mit dem Comet Assay III-System (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Bianca Arendt)[107]	34
Abb 4:	Retinolkonzentration im Plasma vor und nach 4-wöchiger Gabe des Trinkpräparates	44
Abb 5:	Korrigierter Tocopherolspiegel im Plasma vor und nach 4-wöchiger Gabe des Trinkpräparates.....	45
Abb 6:	β -Carotinkonzentration im Plasma vor und nach 4-wöchiger Gabe des Trinkpräparates	46
Abb 7:	Vitamin C Konzentration im Plasma vor und nach 4-wöchiger Gabe des Trinkpräparates	47
Abb 8:	Selen- und Zinkspiegel im Plasma vor und nach 4-wöchiger Intervention. .	48
Abb 9:	Glutaminkonzentration im Plasma vor und nach 4-wöchiger Intervention .	49
Abb 10:	Gesamtglutathiongehalte entzündeter und nicht entzündeter Mucosa vor und nach 4-wöchiger Intervention.....	50
Abb 11:	Antioxidative Kapazität im Plasma vor und nach 4-wöchigem Verzehr von Intestamin [®] trink	51
Abb 12:	Endogene DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten als Tail Intensity (TI) bzw. als Tail Moment (TM) vor und nach 4-wöchigem Konsum des Trinkpräparates	52
Abb 13:	Peroxide im Plasma vor und nach Intervention (mM).....	53
Abb 14:	Einschätzung der Lebensqualität vor und nach Intervention	55

Abkürzungsverzeichnis

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
8-OHdG	8-Hydroxydeoxyguanosin
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
Abs	Absorption
ABTS	(2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AChE	Acetylcholinesterase
B ₀	Maximale Bindung
BHT	Butylhydroxitoluol
BLS II 3.2	Bundeslebensmittelschlüssel II 3.2
CDAI	Crohn´s Disease Activity Index
CL	Chemilumineszenz
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzym Immuno Assay
ESR	Erythrozytensedimentationsrate
FRSC	Free Radical Scavenging Capacity
GC-MS	Gas-Chromatographie-Massenspektrometer
GSSG	Glutathion (oxidierte Form)
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GPx	Glutathionperoxidase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IBDQ	Inflammatory Bowel Disease Questionnaire
IL-8	Interleukin 8
k.A.	keine Angabe
kDa	Kilodalton
LPO	Lipidperoxide
Max	Maximum
MC	Morbus Crohn
MDA	Malondialdehyd
Min	Minimum
MR	Mucosaprobe aus makroskopisch unauffälligem Gewebe (Rektum)
MX	Mucosaproben aus entzündeten Darmabschnitten
MRP-14	Myeloid Related Protein 14

MW	Mittelwert
MUFS	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren
n	Anzahl Probanden/-innen
NO	Stickstoffmonoxid
NR	Nichtraucher
NSP	Nicht Spezifische Bindung
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCDAI	Paediatric Crohn´s Disease Activity Index
R	Raucher
Rm	Remission
RNS	Reaktive Stickstoff Spezies
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
RPM	Rounds Per Minute
Rv	Rezidiv
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time PCR
SCGE	Einzelzell-Gelelektrophorese
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
SGA	Subjective Global Assessment
SOD	Superoxiddismutase
SSA	Sulfosalicylsäure
TA	Totale Aktivität
TAS	Totaler Antioxidativer Status
TBARS	Thiobarbitursäure reaktive Substanzen
TE	Troloxäquivalente
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
THF	Tetrahydrofuran
TI / TI ₀ / TI ₃₀₀	Tail Intensity/ in unbehandelten Zellen / nach Behandlung mit 300 µM H ₂ O ₂
TM / TM ₀ / TM ₃₀₀	Tail Moment/ in unbehandelten Zellen / nach Behandlung mit 300 µMH ₂ O ₂
TOC	Total Oxidant Capacity
TRAP	Total Radical Antioxidant Potential
vs	versus

1 Einleitung – wissenschaftlicher Sachstand

1.1 Ätiologie, Pathogenese, Klinik und medikamentöse Therapie von Morbus Crohn

Morbus Crohn (MC) ist eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung, von der bundesweit etwa 170 000 Menschen betroffen sind [1]. Da die Ursachen der Erkrankung noch nicht eindeutig geklärt sind, werden schwerpunktmäßig Symptome behandelt. Strategien für eine erfolgreiche Prävention sind bisher spärlich bzw. nicht vorhanden. Daher ist zurzeit nur eine symptomatische Behandlung mit entzündungshemmenden Medikamenten möglich.

Charakteristisch für Morbus Crohn ist ein transmuraler Befall, so dass alle Darmwandschichten betroffen sind [1]. Grundsätzlich können jedoch alle Abschnitte des Gastrointestinaltraktes vom Mund bis zum Anus befallen sein. Bei 80% der Erkrankten liegt im terminalen Ileum oder proximalen Kolon eine Entzündung vor [1, 2]. Charakteristisch für Morbus Crohn ist der diskontinuierliche, segmentale Befall (sog. „*skip lesions*“) der Darmmucosa.

Im Plasma sind gehäuft proinflammatorische Cytokine und vermindert entzündungshemmende Cytokine nachweisbar. Bei Morbus Crohn werden vor allem TH₁ Cytokine wie TNF- α , IFN- γ und IL-12 exprimiert [3]. TH₂ Cytokine wirken der TH₁ Antwort entgegen. Das Ungleichgewicht zwischen TH₁ vs. TH₂ Antwort ist typisch für Morbus Crohn.

Die Ätiologie des Morbus Crohn ist noch weitgehend ungeklärt, wird jedoch als multifaktoriell betrachtet. Danach liegt ursächlich eine genetische Prädisposition für die Entwicklung der Erkrankung bei gleichzeitig gestörter Immunregulation vor. Die Erkrankung kann durch Umweltfaktoren ausgelöst werden und wird durch eine gesteigerte T-Zell-vermittelte Immunreaktion aufrechterhalten [4]. Neue Studien weisen auf einen unmittelbaren Defekt der mukosalen Immunantwort hin [4].

Morbus Crohn führt zu abdominellen Beschwerden, zu chronischer Diarrhöe, selten mit Blutauflagerungen, Gewichtsverlust, gelegentlich Fieber und tastbaren Resistenzen im rechten Unterbauch. Die Krankheitsaktivität wird häufig mit Hilfe des CDAI nach Best *et al.* [5] bestimmt.

Zusätzlich zu der früheren Standardtherapie mit Sulfasalazin haben sich Glukokortikoide, Immunsuppressiva und vor allem 5-Aminosalicylate (5-ASA) entweder als Mo-

no- oder Kombinationstherapie zur symptomatischen Behandlung von Morbus Crohn etabliert [6].

5-ASA ist ein entzündungshemmender Wirkstoff, der häufig in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eingesetzt wird [7]. Aminosalicylate haben eine antioxidative Wirkung; sie quenchen Superoxid- und Hydroxyl-Radikale [8]. Diese Medikation kann den antioxidativen Schutz der Mucosa wiederherstellen [9].

1.2 Pathophysiologische Bedeutung von oxidativem Stress bei Morbus Crohn

Im Organismus eines gesunden Menschen besteht ein physiologisches Gleichgewicht zwischen pro- und antioxidativ wirksamen Substanzen. Oxidativer Stress tritt dann auf, wenn dieses Gleichgewicht gestört ist und die Bildung von prooxidativen Substanzen nicht durch den Abbau durch Antioxidantien kompensiert wird [10]. Oxidativer Stress spielt bei verschiedenen degenerativen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Rheuma, Morbus Parkinson und Alzheimer sowie im Alterungsprozess eine wesentliche pathophysiologische Rolle [11, 12].

Als freie Radikale werden Moleküle bezeichnet, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen und daher besonders reaktiv sind [13]. Sie induzieren Oxidationen in ihrer Umgebung, um dadurch ihre elektrochemische Stabilität zurück zu gewinnen. Im menschlichen Organismus entstehen ROS (Superoxid, Wasserstoffperoxid und das Hydroxylradikal) physiologischerweise als Nebenprodukte der Atmungskette in den Mitochondrien [14] und bei anderen mikrosomalen Elektronentransporten (Cytochrom P-450) durch unvollständige Reduktion von molekularem Sauerstoff [15]. Zusätzlich entstehen freie Radikale durch Autooxidation (z. B. Katecholamine, Tetrahydrofolsäure) [16].

Freie Radikale unterteilen sich in „reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS) und „reaktive Stickstoffspezies“. Zu den ROS zählen das Superoxid-Radikal ($O_2^{\bullet-}$), das Hydroxylradikal (OH^{\bullet}), das Peroxyl-Radikal (RO_2^{\bullet}), aber auch nicht-radikalische Sauerstoff-Derivate wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Ozon und Hypochlorid [17]. Zu den reaktiven Stickstoffspezies zählen hochreaktive Verbindungen wie z. B. Stickoxidradikale (NO^{\bullet}) und Peroxynitrit ($ONOO^{\bullet}$) [18, 19].

Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies oxidieren Zellbestandteile, wie DNA, Proteine und Lipide [11]. Diese oxidative Schädigung kann die Zellfunktionen beeinträchtigen und damit die Entstehung von Krankheiten begünstigen [20, 21]. Im Organismus erfolgt die zelluläre Schädigung durch freie Radikale primär über die Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Membranen. Die dabei entstehenden Peroxylradikale induzieren eine Kettenreaktion. Durch Dekomposition können zytotoxische Verbindungen, z. B. Aldehyde (z. B. Malondialdehyd) entstehen, welche die Membranstabilität und -permeabilität stark beeinträchtigen, so dass sie das

Zellvolumen und den Zellmetabolismus verändern oder sogar Zellen zerstören [22]. Lipidperoxide und deren Metabolite können direkt auf Zellen und Zellorganellen toxisch und chemotaktisch auf Neutrophile Granulozyten wirken und die Cytolin- und Phospholipaseaktivitäten beeinflussen. Sie werden als Indikatoren für oxidativen Stress angesehen und *ex vivo* im Plasma quantifiziert [22].

Das Hydroxylradikal wird als reaktivstes ROS angesehen [23]. Es oxidiert u. a. DNA Basen [24]. Dabei entstehen diverse oxidierte Verbindungen (z. B. 8-Hydroxydesoxyguanosin), die zum Abbruch von DNA-Replikationen führen können [25] und zusammen mit unzureichenden Reparaturmechanismen für die Tumorentstehung und den Alterungsprozess verantwortlich gemacht werden [21].

Im Darm stimulieren Wasserstoffperoxid und Nitroxide die Wasser- und Elektrolytsekretion und sind damit zum Teil für die Durchfälle bei entzündlichen Darmerkrankungen verantwortlich [26].

Unter physiologischen Bedingungen werden ROS durch enzymatische und nicht-enzymatische Mechanismen abgefangen bzw. unschädlich gemacht. Im Vergleich zu Gesunden wurde bei MC-Patienten eine reduzierte Aktivität von antioxidativen Enzymen [27] und eine geringe Konzentration von antioxidativen Mikronährstoffen in der intestinalen Mucosa [28] und im Plasma [29, 30] beobachtet sowie eine erhöhte Konzentration von oxidativen Stressmarkern [31-33].

Die Schädigung des Gewebes ist Folge einer unphysiologischen mukosalen Immunreaktion auf bakterielle Produkte und andere lumenale Faktoren [34]. Diese wird durch infiltrierende polymorphe und mononukleäre Phagozyten initiiert, die in die Mukosa wandern und proinflammatorische Mediatoren sowie ROS und RNS [35] sezernieren [19, 36-40].

ROS und RNS greifen Zellkomponenten an (z. B. MUFS, DNA) und gefährden dadurch die Zellintegrität und -funktion [32, 41]. Damit sind sie verantwortlich für die Gewebeverletzung bei chronisch entzündlichen Erkrankungen [26, 42]. Zusätzlich stimulieren sie die Immunantwort und induzieren damit einen Teufelskreis, der die inflammatorische Kaskade aufrechterhält [34].

ROS können auch die intestinale Entzündung durch eine gesteigerte vaskuläre und mukosale Permeabilität verstärken und so die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten begünstigen [26, 36]. Daher spielen ROS eine wichtige Rolle in der Patho-

physiologie von Gewebeverletzung bei entzündlichen Darmerkrankungen, insbesondere in der Initiierung und Aufrechterhaltung der Entzündung und der Schädigung des Darmgewebes. Viele Studien zeigen erhöhte Konzentrationen oxidierter Produkte in der Darmmucosa [16, 37, 43, 44].

RNS wie Stickstoffmonoxyd (NO) haben ebenfalls eine wichtige Rolle in Bezug auf Gewebeschäden [45-47]. RNS werden von Neutrophilen und Makrophagen produziert und sind in intestinalen epithelialen und endothelialen Zellen nachweisbar. Ihre Synthese wird durch proinflammatorische Zytokine aktiviert. Hohe NO Spiegel, die aus induzierbarer NO Synthaseaktivierung resultieren, sind assoziiert mit Gewebeschäden [45].

In einem Rattenmodell demonstrierten Grisham & Granger [48], dass entzündetes Darmgewebe selbst bei adäquatem Antioxidantienstatus die Anzahl der entstehenden Radikale nicht kompensieren kann.

Bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen kann Apoptose direkt oder indirekt die Barrierefunktion gefährden, sowie die effektive epitheliale Rückbildung beeinträchtigen. Außerdem führt dies zu Verlust von Stammzellen und regenerativer Kapazität und ist relevant für die Carcinogenese.

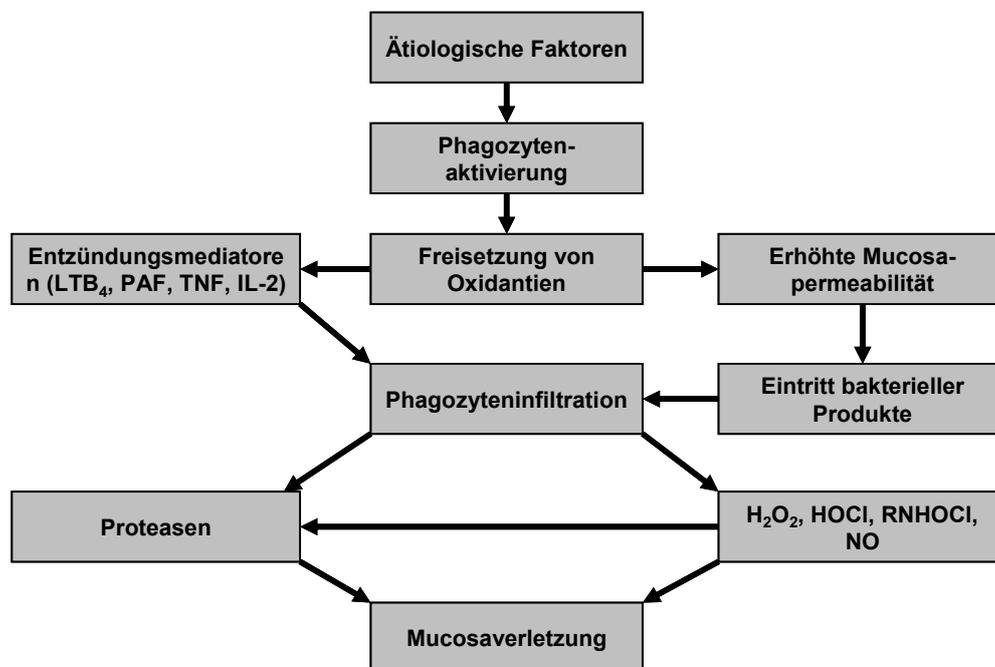


Abb 1: Die Rolle phagozytischer Leukozyten und reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffprodukte bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (modifiziert nach Yamada und Grisham, 1993)

Die Einflussfaktoren von ROS auf die Pathogenese von Morbus Crohn sind in Abb. 1 dargestellt.

Morbus Crohn ist durch entzündliche Veränderungen der intestinalen Mukosa mit Mukosaatrophie, erhöhter intestinaler Permeabilität und daraus resultierender systemischer Endotoxinämie charakterisiert [49]. Die Endotoxinämie und die erhöhte Freisetzung von Zytokinen werden unter anderem als eine Ursache der katabolen Stoffwechsellage bei Patienten mit Morbus Crohn und anderen chronisch-entzündlichen Erkrankungen gesehen [50].

Zusätzlich fördert die Gabe von Steroiden im akuten Schub der Erkrankung eine Mukosaatrophie [51]. Dabei kommt es zu einer Veränderung der Enzymaktivität und einer Abnahme der sekretorischen IgA-Level im Darm.

In vielen Studien wurde festgestellt, dass MC-Patienten geringere Konzentrationen antioxidativer Vitamine im Plasma im Vergleich zu Gesunden aufweisen [13, 29, 30, 32, 52-56] und die antioxidative Kapazität im Vergleich zu Gesunden erniedrigt ist [57]. Die Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ist im Plasma bei diesen Patienten erhöht [9]. Verbindungen, die bei der Oxidation von Lipiden und DNA entstehen, sind in erhöhten Konzentrationen im Plasma bzw. im Expirationsvolumen nachweisbar [29, 32, 38, 58, 59]. Diese generell erhöhte Belastung des Organismus mit ROS wird als „oxidativer Stress“ bezeichnet. Dieser korreliert invers mit dem chronischen Entzündungsgeschehen [60].

1.2.1 Antioxidative Abwehr

Der Organismus verfügt über zahlreiche enzymatische und nicht-enzymatische Mechanismen, die eine Akkumulation von freien Radikalen und ROS im Körper verhindern. Als Antioxidantien werden Substanzen definiert, welche die Oxidation eines Substrates signifikant verzögern oder verhindern und dabei in geringerer Konzentration als das Substrat vorliegen [61, 62].

Um den schädlichen Effekten durch ROS entgegen zu wirken, ist die gesunde intestinale Mucosa mit einem effizienten antioxidativen Abwehrsystem ausgestattet. Dazu gehören Enzyme wie SOD, Katalase und GPx und niedermolekulare Antioxidantien wie Glutathion und Metallothionin [40].

Enzyme wie Superoxid Dismutase (SOD), Katalase und Glutathionperoxidase (GPx) schützen die Zellen vor oxidativem Stress [63], indem sie ROS reduzieren und sie damit unschädlich machen [64]. Der Gewebespiegel der o. g. Enzyme ist gewebespezifisch. Der distale Darm besitzt z. B. im Vergleich zur Leber geringere enzymatische antioxidative Aktivität. Die Enzymaktivität von SOD, Katalase und GPx in der Mucosa beträgt nur 8%, 4% und 40% der enzymatischen Aktivität dieser Enzyme in der Leber [48, 65].

Zu den nicht-enzymatischen endogenen Antioxidantien zählen wasserlösliche Substanzen (Harnsäure, Albumin, Vitamin C, Bilirubin, Glutathion), die sich im Plasma bzw. Zytosol befinden. Fettlösliche Antioxidantien (Vitamin E, Carotinoide, Ubichinon) sind vor allem in Zellmembranen lokalisiert.

Tocopherol ist ein lipophiles Antioxidans, das überwiegend zellmembrangebunden vorliegt und im Blut an Lipoproteine gebunden ist. α -Tocopherol reagiert direkt mit freien Radikalen, kann diese reduzieren [66] und so mehrfach ungesättigte Fettsäuren in Membranlipiden und Lipoproteinen vor einer Zerstörung durch Lipidperoxidation schützen [38]. Dabei wird es selbst zum stabilen und damit unschädlichen Tocopherylradikal, das ein Fortschreiten der Lipidperoxidation verhindert. Das Tocopherylradikal kann durch Glutathion [66] oder Ascorbat [67] reduziert werden. Eine diätetische Supplementation ist assoziiert mit einem erhöhten Schutz vor LDL-Oxidation und einer reduzierten Häufigkeit verschiedener Krankheiten [68]. Es schützt vor Endothelschäden.

Ascorbinsäure ist das potenteste nutritive intra- und extrazelluläre Antioxidans [69]. Das hydrophile Vitamin C schützt durch einen Vitamin E abhängigen Pfad vor Lipidperoxidation [68]. Unter den nutritiven Antioxidantien wird Vitamin C daher als eines der wichtigsten Antioxidantien zum Schutz vor Lipidperoxidation angesehen [25]. Vitamin C kann Hydroxylradikale, Wasserstoffperoxid und Hypochlorsäure [70] abfangen. Dabei entsteht das reaktionsträge Ascorbylradikal. Im weiteren Verlauf reagieren 2 Ascorbylradikale zu Dehydroascorbinsäure und Ascorbinsäure. Vitamin C wirkt außerdem indirekt antioxidativ, indem es oxidiertes Vitamin E regeneriert.

Glutathion ist ein Tripeptid (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycin) und das wichtigste intrazelluläre Antioxidans. In Körperflüssigkeiten ist die Konzentration vergleichsweise gering, der größte Anteil liegt intrazellulär (z. B. in Organen wie dem Darm) im Millimolarbereich vor [69, 71]. Die Rolle des intrazellulären Glutathions in der Detoxifi-

kation von Xenobiotika und ROS ist bekannt. Außerdem ist es Coenzym für diverse Enzyme und spielt somit eine essentielle protektive Rolle gegen oxidativen Stress [69]. Glutathion regeneriert Vitamin C Radikale zu Vitamin C [72].

In der Zelle spielt GSH eine Rolle in der Proteinsynthese, beim Aminosäuretransport und der DNA Synthese [33, 68]. Glutathion ist außerdem in die Reduktion von H_2O_2 zu Wasser und in die Reduktion von Lipidhydroperoxiden involviert.

Beim Abbau intrazellulärer Peroxide wird Glutathion von der Glutathionperoxidase oxidiert und von der Glutathionreduktase anschließend wieder reduziert [73].

1.2.2 Antioxidativer Status bei Morbus Crohn

In vielen Studien wurde der antioxidative Status bei Morbus Crohn Patienten im Plasma und in Erythrozyten untersucht und mit dem von Gesunden verglichen. Eine Beurteilung erfolgte anhand der Spiegel antioxidativ wirkender Pro-/ Vitamine (Vitamin A, C, E, β -Carotin), Glutathion oder der Aktivität antioxidativer Enzyme (GPx, Katalase und SOD).

Tab 1: Konzentration antioxidativ wirksamer Substanzen und antiox. Kapazität bei Morbus Crohn Patienten im Vergleich zu Gesunden in Plasma und/ oder Erythrozyten

	n	Stadium	R/ NR	Medikation	Vit A	Vit C	Vit E	β -Carotin	Se	TRAP	GSH
Hinks <i>et al.</i> , 1988 [74]	20	Rv+Rm	kA	S					↓		
Fernandez-Banares <i>et al.</i> , 1989 [52]	23	Rv+Rm	kA	kA	↓	↓		↓			
Rannem <i>et al.</i> , 1992 [75]	66	kA	kA	5-ASA, S, I					↓		
Kuroki <i>et al.</i> , 1993 [53]	24	Rv+Rm	kA	kA	↓	∅	↓				
Hoffenberg <i>et al.</i> , 1997 [13]	12	Rv+Rm	kA	5-ASA, S, I		↓	↑				↑
Bousvaros <i>et al.</i> , 1998 [54]	61	Rv+Rm	kA	5-ASA, S, I	↓		↓				
Geerling <i>et al.</i> , 1998 [30]	37	Rm	kA	5-ASA, S, I	∅	↓	↓				
Genser <i>et al.</i> , 1999 [57]	24	Rv+Rm	kA	kA	∅		∅	↓		↓	
Geerling <i>et al.</i> , 1999 [55]	62	Rv+Rm	kA	5-ASA, S, I	↓	↓	↓	↓			
Reimund <i>et al.</i> , 2000 [60]	26	Rv	kA	5-ASA, S, I					↓		
Levy <i>et al.</i> , 2000 [58]	22	Rv+Rm	NR	5-ASA	↓		∅	∅			↑
D'Odorico <i>et al.</i> , 2001 [29]	37	Rv+Rm	kA	5-ASA, S, I	↓		↓	↓			
Wendland <i>et al.</i> , 2001 [32]	37	Rv+Rm	NR	5-ASA, S, I, A	∅	↓	∅	↓			
Bala <i>et al.</i> , 2002 [38]	19	Rv	kA	kA		∅	∅				
Tuzun <i>et al.</i> , 2002 [56]	12	Rv+Rm	kA	Su, S	↓		↓				

TRAP = Total radical antioxidant capacity, GSH = Glutathion, Rv = Rezidiv, Rm = Remission, R = Raucher, NR = Nichtraucher, 5-ASA = 5-Aminosalicylsäure, S = Steroide, I= Immunsuppressiva, Su = Sulfasalazin, A = Antibiotika, Vit A = Vitamin A, Vit C = Vitamin C, Vit E = Vitamin E, Se = Selen, ↓ = erniedrigte Plasmakonzentration, ↑ = erhöhte Plasmakonzentration, ∅ = nicht signifikant erhöht/erniedrigt, kA = keine Angabe

Wie in Tab. 1 dargestellt, war in 60-70% der untersuchten Studien die Konzentration vieler antioxidativer Vitamine im Plasma bei MC-Patienten im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv erniedrigt [29, 30, 32, 52-54, 56, 76-78]. Dies gilt für Patienten im Rezidiv und auch für heterogene Kollektive aus Rezidiv und Remissionspatienten. Nur wenige Studien stellten bei einzelnen Parametern keine signifikanten Unterschiede [30, 32, 38, 53, 57] oder sogar höhere Plasmawerte [13] im Vergleich zu Gesunden fest. Auch die antioxidative Kapazität im Plasma war bei MC-Patienten geringer [9, 57].

Bei den antioxidativen Enzymen zeigten sich widersprüchliche Ergebnisse. Bala *et al.* [38] stellten im Vergleich zu Gesunden keine Unterschiede bezüglich der Katalaseaktivität fest allerdings eine geringere SOD-Aktivität. Reimund *et al.* [60] beobachteten dagegen keine Unterschiede bezüglich der Superoxiddismutaseaktivität. Die Aktivität der erythrozytären GPx war in zwei Studien im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht [13, 38], in einer vermindert [60] und bei Wendland *et al.* [32] nicht signifikant unterschiedlich.

Selen lag in Plasma und Erythrozyten von MC-Patienten in geringerer Konzentration vor als bei Gesunden [74, 75, 79]. In einer weiteren Studie wurde der Zinkspiegel im Plasma untersucht, der dort keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Gesunden aufwies [60].

Es existieren nur wenige Studien, bei denen die Konzentration antioxidativ wirksamer Substanzen oder Entzündungsmarker in der entzündeten Mucosa gemessen wurden. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 dargestellt.

Buffinton & Doe [28] stellten in Untersuchungen an 17 MC-Patienten fest, dass der Vitamin C Spiegel (reduziert und gesamt) in der entzündeten Schleimhaut im Vergleich zur makroskopisch unauffälligen Probe derselben Probanden signifikant um ca. 35 % erniedrigt war. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass lokal in entzündeten Mucosaabschnitten oxidativer Stress vorliegt.

In einer weiteren Untersuchung derselben Arbeitsgruppe an 28 MC-Patienten wurde die Kapazität der Darmschleimhaut, Peroxylradikale im wässrigen Milieu zu fangen, mit Hilfe der Total Radical Antioxidant Capacity (TRAP) in entzündeter im Vergleich zu normaler Mucosa gemessen. Außerdem wurden Harnsäure- und Glutathiongehalte der Mucosa bestimmt [80]. Dabei stellte sich heraus, dass die TRAP in entzündetem Gewebe deutlich geringer war als in nicht entzündeten Gewebe

derselben Person. Da die Harnsäure- und Glutathiongehalte sehr große Varianzen aufwiesen, ließen sich diesbezüglich keine eindeutigen Aussagen machen [80].

Tab 2: Antioxidativer Status und antioxidative Kapazität in der Mucosa von Morbus Crohn Patienten

	n	Stadium Rv/ Rm	R/ NR	Medi- kation	Antioxidativer Status				Antiox. Kapazität
					Vit C	Vit E	GSH	Harn- säure	FRSC
Buffinton & Doe* 1995 [28]	17	kA	kA	kA	↓				
Buffinton & Doe* 1995 [80]	28	kA	kA	kA		∅	∅	∅	↓
Miralles-Barrachina** <i>et al.</i> , 1999 [27]	18	Rv	kA	5-ASA S			↓		
Kruidenier*/**** <i>et al.</i> , 2003 [81]	19	kA	kA	kA			∅		
Morgenstern*** <i>et al.</i> , 2003 [82]	5	kA	kA	kA			∅		

Rv = Rezidiv, Rm = Remission, R = Raucher, NR = Nichtraucher, S = Steroide, 5-ASA = 5-Aminosalicylsäure, I = Immunsuppressiva, Vit C = Vitamin C, Vit E = Vitamin E, GSH = Glutathion, FRSC = Free Radical Scavenging Capacity, kA = keine Angabe, ∅ = keine Veränderung

*entzündete Mucosa vs. normaler Mucosa desselben Individuums (gepaarte Biopsien)

** Gesunde Probanden vs. MC-Patienten sowie gepaarten Biopsien

*** MC vs. andere Erkrankungen

**** MC vs. gesunde Kontrollen

Miralles-Barrachina *et al.* [27] stellten fest, dass die Glutathionkonzentration bei MC-Patienten in entzündeter Mucosa und in gepaarten nicht-entzündlichen Proben signifikant niedriger war als bei Gesunden. Es zeigte sich jedoch keine Korrelation zwischen dem CDAI und der Glutathionkonzentration in der Mucosa.

Morgenstern *et al.* [82] bestimmten die Glutathionkonzentration in der Mucosa bei Patienten verschiedener intestinaler Erkrankungen (u.a. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Divertikulitis, Darmkrebs). Dort zeigte sich, dass MC-Patienten im Gegensatz zu Patienten mit anderen Erkrankungen keine signifikant niedrigeren Glutathionkonzentrationen aufweisen.

Kruidenier *et al.* [81, 83] zeigten, dass die Konzentration von Glutathion, Metallothionin und die Aktivität antioxidativer Enzyme (Katalase, GPx und Myeloperoxidase) in der intestinalen Mucosa bei MC-Patienten reduziert sind. Dabei wurden entzündete und nicht-entzündete Gewebeproben von MC-Patienten mit makroskopisch unauffälliger Darmmucosa von Gesunden verglichen. In derselben Studie wurde außerdem die Aktivität von Cu/Zn-, Mn- und extrazellulärer SOD Isoformen in gepaarten

nicht-entzündeten und entzündeten mukosalen Biopsien von MC-Patienten bestimmt [83]. Die mukosalen SOD Isoformen im Darm waren unterschiedlich betroffen bei MC-Patienten. Die Mn-SOD Aktivität war in nicht-entzündlicher und entzündlicher Mucosa nicht unterschiedlich, wogegen die Cu/Zn-SOD Aktivität mit der Entzündung abnahm. Bei MC-Patienten war die extrazelluläre SOD Aktivität erniedrigt.

1.2.3 Oxidative Stressmarker in Plasma und Mucosa bei Morbus Crohn

In nahezu allen Studien konnten bei MC-Patienten im Vergleich zu Gesunden erhöhte Konzentrationen von Lipidperoxidationsprodukten wie Malondialdehyd (MDA), Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS), Isoprostane im Plasma [29, 38, 56, 58-60] bzw. Pentan/ Ethan im Expirationsvolumen [38] nachgewiesen werden (Tab. 3). Auch oxidierte DNA [29] und Neopterin [60] waren im Vergleich zu Gesunden erhöht.

Tab 3: Oxidative Stressmarker im Plasma bzw. Expirationsvolumen bei Morbus Crohn Patienten im Vergleich zu Gesunden

	n	Stadium	R/ NR	Medikation	Lipidperoxidationsmarker				Ox. DNA	Neopterin
					MDA	TBARS	F ₂ -Isoprostane	Pentan/ Ethan**	8-OHdG	
Levy <i>et al.</i> , 2000 [58]	22	Rv+Rm	NR	5-ASA	↑					
Reimund <i>et al.</i> , 2000 [60]	26	Rv	kA	5-ASA S, I	∅					↑
D'Odorico <i>et al.</i> , 2001 [29]	37	Rv+Rm	kA	5-ASA S, I					↑	
Wendland <i>et al.</i> , 2001 [32]	37	Rv+Rm	NR	5-ASA S, I, A			↑	↑		
Bala * <i>et al.</i> , 2002 [38]	19	Rv	kA	kA	↑					
Sampietro <i>et al.</i> , 2002 [59]	20	Rv	kA	5-ASA S		↑				
Tüzün <i>et al.</i> , 2002 [56]	12	Rv+Rm	kA	S, Su	∅					

MDA = Malondialdehyd, TBARS = Thiobarbitursäure, 8-OHdG = 8-Hydroxydesoxyguanosin, S = Steroide, 5-ASA = 5-Aminosalicylsäure, I = Immunsuppressiva, Su = Sulfasalazin, R = Raucher, NR = Nichtraucher, Rv = Rezidiv, Rm = Remission, kA = keine Angabe, ↑ = signifikant erhöht, ∅ = kein signifikanter Unterschied

* Kinder mit chronischer Gastroduodenitis

** im Expirationsvolumen

In Biopsien entzündeter Darmmucosa von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa fanden Lih-Brody *et al.* [15] erhöhte Konzentrationen an Stoffwechselprodukten, die bei der Oxidation von Proteinen und DNA *in vivo* entstehen (Tab. 4). Eine erhöhte Chemilumineszenz wurde gemessen, die auf einen erhöhten Spiegel an ROS (O_2^- , H_2O_2) hindeutet. Außerdem zeigte sich eine erniedrigte Aktivität von SOD in der entzündeten vs. nicht entzündeter Mucosa. Der Spiegel an freiem Eisen, das die Fenton-Reaktion initiieren kann und damit die Synthese von ROS, war erhöht.

Tab 4: Konzentrationen oxidativer Stressmarker in der Mucosa bei Morbus Crohn Patienten

	n	Stadium	R/NR	Medikation	MDA	8-OHdG
Lih-Brody** <i>et al.</i> , 1996 [15]	38	Rv+Rm	kA	kA		↑
Kruidenier <i>et al.</i> , 2003 [15]	19	Rv	kA	kA	↑	

MDA = Malondialdehyd, 8-OHdG = 8-Hydroxydesoxyguanosin, R=Raucher, NR=Nichtraucher, Rv = Rezidiv, Rm = Remission, kA = keine Angabe, ↑ = signifikant erhöht, ↓ = signifikant erniedrigt

* Entzündete Mucosa vs. nicht-entzündete Mucosa

** MC-Patienten vs. Gesunde, sowie vs. gepaarte Biopsien

Kruidenier *et al.* [40] stellten fest, dass die Lipidperoxidation, die anhand der Konzentration von MDA bestimmt wurde, in entzündeter Mucosa von MC-Patienten erhöht ist. Die Lipidperoxidation war unabhängig davon assoziiert mit der Konzentration von Metallothionin und mit der Mn-SOD Aktivität.

1.3 Interventionsstudien zur Wirkung von Antioxidantien auf Morbus Crohn

Erste Interventionsstudien bei MC-Patienten zeigen, dass durch Supplementierung von Vitamin C und E die Konzentration an oxidierten Lipiden im Plasma reduziert werden kann [38, 39]. Da der chronische Entzündungsprozess zu oxidativem Stress beiträgt und ROS die Genexpression von Entzündungsmarkern induzieren bzw. verstärken, wird die Gabe von Antioxidantien bei entzündlichen Erkrankungen zum Schutz vor Zell- und Gewebeschäden diskutiert [60, 84-86]. Inflammatorische Marker, die bei MC-Patienten mit moderater bzw. schwerer Erkrankung erhöht sind [60], wurden in diesen Studien [38, 39] jedoch nicht untersucht. Darüber hinaus gibt es bisher auch keine Daten darüber, ob die Supplementierung mit einer Linderung klinisch relevanter Beschwerden einhergeht. Ob diese Wirkungen auch mit diätetischen Maßnahmen anstelle medikamentöser Therapie zu erreichen sind, wurde bisher ebenso nicht untersucht.

Es existieren bisher nur wenige Interventionsstudien, bei denen die Wirksamkeit einer hochdosierten Gabe von antioxidativ wirksamen Vitaminen auf die Plasmaspiegel antioxidativ wirksamer Vitamine und/ oder auf den antioxidativen Status (gemessen in Plasma, Erythrozyten und Atemluft) bei MC-Patienten untersucht wurden. Einen Überblick darüber gibt Tab. 5.

Geerling *et al.* [87] führten eine dreiarmlige, placebokontrollierte Studie zur Wirkung von Antioxidantien an 27 MC-Patienten in Remission durch. Dabei wurde die Wirkung der Antioxidantien (40 mg Vitamin C, 8 mg Vitamin E, 0,38 mg Vitamin A, 4,6 mg Zink, 12,4 µg Selen pro Tag) allein und zusätzlich zu Fischöl auf die Plasmaspiegel von Vitamin C, E, β -Carotin und auf die Aktivität antioxidativer Enzyme untersucht. Durch die Supplementation mit Antioxidantien stieg der Vitamin C und E Spiegel im Plasma signifikant an. Außerdem war die Aktivität von SOD nach der Intervention signifikant höher. Die Plasmakonzentrationen von β -Carotin, Selen, Zink, die Aktivität der GPx sowie die antioxidative Kapazität blieben unverändert.

In der Gruppe, die zusätzlich zu den Antioxidantien ω 3-Fettsäuren erhielt, stiegen die Vitamin C und E Spiegel ebenfalls an. Die antioxidative Kapazität sowie β -Carotin veränderten sich nicht signifikant. In dieser Gruppe nahm jedoch die Aktivität der GPx und der SOD signifikant zu. In der Placebogruppe wurden keine signifikanten Veränderungen beobachtet.

Eine Studie mit hochdosierten Antioxidantien führten Bala *et al.* [38] durch. 19 Kinder mit chronischer Gastroduodenitis erhielten über 2 Monate 600-1000 mg Vitamin C und 100-200 mg Vitamin E pro Tag. Es zeigte sich zwar keine signifikante Änderung in der Plasmakonzentration von Vitamin C und Vitamin E; jedoch konnte in den Erythrozyten eine Reduktion des Malonaldehydspiegels beobachtet werden sowie eine Erhöhung der SOD. Die Aktivität von Katalase und GPx in den Erythrozyten veränderte sich nicht signifikant.

Eine weitere klinische, placebokontrollierte doppelblinde Studie wurde von Aghdassi *et al.* [39] durchgeführt. Ziel dieser Studie war festzustellen, ob die Supplementation antioxidativer Vitamine einen Einfluss auf Lipidperoxidation bei MC-Patienten hat. Untersucht wurden Patienten, die in Remission waren, nicht rauchten und einen Atempentanoutput > 6 pmol/kg/min aufwiesen. Sie sollten ihre normale Medikation mindestens 2 Wochen vor Studienbeginn unverändert beibehalten. Von den 57 MC-Patienten erhielten 28 Probanden über 4 Wochen das Vitaminpräparat, 29 Probanden das Placebo. Die Probanden nahmen mit dem Vitaminpräparat täglich 1000 mg Vitamin C und 537 mg Vitamin E auf. Die Plasmaspiegel von Vitamin C und E waren nach 4 Wochen Intervention in der Vitamingruppe signifikant erhöht im Vergleich zum Ausgangswert. In der Placebogruppe wurde keine Änderung beobachtet. Der Pentanoutput im Expirationsvolumen sowie die Konzentration von Isoprostanen, MDA und Lipidperoxiden im Plasma nahmen signifikant ab, in der Placebogruppe blieben sie dagegen unverändert.

In der kürzlich publizierten randomisierten, placebokontrollierten doppelblinden Studie von Trebble *et al.* [88] erhielten 61 MC-Patienten entweder Antioxidantien (90 mg Vitamin C, 150 µg β-Carotin, 30 mg Vitamin E, 200 µg Selen pro Tag) und Fischöl oder ein Placebo. Die Patienten befanden sich seit mindestens 4 Wochen im Rezidiv und nahmen seit dieser Zeit weder Corticosteroide noch Immunsuppressiva ein. Nach 6-monatiger Supplementierung konnte kein Anstieg des Vitamin A, C oder β-Carotinspiegels im Plasma beobachtet werden. Außerdem zeigte sich keine signifikante Veränderung des CDAI, des C-reaktiven Proteins (CRP) und der Erythrozytensedimentationsrate im Vergleich zu Studienbeginn. Auch im Vergleich zur Placebogruppe wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet.

In einer unkontrollierten Studie von Sturniolo *et al.* [89] erhielten 12 Crohn Patienten in Remission 3 x täglich 110 mg Zink über 8 Wochen. Nach der Intervention war der Zinkspiegel im Plasma signifikant angestiegen.

Insgesamt lassen die vorliegenden Studien folgendes Fazit zu:

- MC-Patienten haben verminderte Plasmaspiegel antioxidativer Vitamine sowie erhöhte Spiegel von ROS
- Eine Gabe von Antioxidantien bei MC-Patienten kann zu einem Anstieg der Vitaminspiegel im Plasma führen
- Die Supplementation reduziert die Konzentration von Lipidperoxidationsprodukten in Plasma und Expirationsvolumen
- Es existieren keine Studien, die die Wirkung von oral zugeführten Antioxidantien auf das Entzündungsgeschehen in der Mucosa untersuchen

Tab 5: Interventionsstudien zur Wirkung von nutritiven Antioxidantien auf antioxidative Parameter und oxidativen Stress bei MC-Patienten

	n	Intervention (Dosis / Tag)	Dauer	Stadium	R/ NR	Medi- kation	Vit C	Vit E	β-Car	TAS	GPx	SOD	Pentan ***	MDA ****	LPO
Geerling* <i>et al.</i> , 2000 [87]	27	40 mg Vit C 8 mg Vit E 0,38 mg Vit A 4,6 mg Zink 12,4 µg Selen Fischöl	3 Mo	Rm	kA	konst	↑	↑	∅	∅	∅	↑			
Bala** <i>et al.</i> , 2002 [38]	19	600-1000 mg Vit C 100-200 mg Vit E	8 Wo	kA	NR	kA	∅	∅						↓	↓
Aghdassi* <i>et al.</i> , 2003 [39]	57	1000 mg Vit C 537 mg Vit E	4 Wo	Rm	NR	konst	↑	↑	∅				↓		↓
Treble* <i>et al.</i> , 2004 [90]	31	90 mg Vit C 150 µg β-Carotin 300 µg Retinol 30 mg Vit E 200 µg Selen Fischöl	6 Mo	Rv	kA	konst ohne C und I	∅	∅	∅						

Rv = Rezidiv, Rm = Remission, R = Raucher, NR = Nichtraucher, TAS = Totaler antioxidativer Status, GPx = Glutathionperoxidase, LPO = Lipidperoxide, MDA = Malondialdehyd, C = Corticosteroide, I = Immunsuppressiva, ∅ = keine Veränderung, kA = keine Angabe

* placebokontrolliert

** bei Kindern mit chronischer Gastroduodenitis

*** in Atemluft

**** in Erythrozyten

2 Zielsetzung

In einer Interventionsstudie wurden daher die Effekte einer vierwöchigen Zufuhr eines Trinksupplementes, das reich an antioxidativen Vitaminen ist, auf die antioxidative Kapazität und den oxidativen Stress in Plasma und Leukozyten bei MC-Patienten im akuten Schub überprüft. Um die Wirkung des Präparates auf die Darmmucosa zu messen, wurden Glutathiongehalte wie auch Transkriptspiegel von Entzündungsmarkern in den entzündeten und nicht entzündeten Arealen bestimmt.

Folgende Ziele sollen in der Studie verfolgt werden:

1. Verbessert die Gabe eines Trinksupplements, das in hohen Konzentrationen antioxidative Vitamine und Glutamin enthält, den antioxidativen Status von Morbus Crohn Patienten im Plasma?
2. Reduziert die Einnahme des Trink-Supplements oxidativen Stress?
3. Sind nach Einnahme des Trinksupplements antiinflammatorische Effekte in der Mucosa nachweisbar, die durch eine Reduktion der IL-8 und MRP-14 Konzentrationen angezeigt werden?
4. Führt die Supplementierung zu einer Besserung der Lebensqualität?

3 Material und Methoden

Das vorliegende Projekt wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Nordrhein geprüft und befürwortet.

Die Untersuchungen folgten den Empfehlungen des Weltärztebundes (Deklaration von Helsinki, 1989) sowie den EU-Richtlinien der „Good Clinical Practice“. Alle Probanden/-innen gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Die Studie wurde in Zusammenarbeit mit dem Marienhospital Altenessen (Prof. Dr. Stallmach) sowie der Medizinischen Klinik der Universität Bonn (Prof. Dr. Lammert) durchgeführt. Professor Stallmach betreute diese Studie als Prüfarzt.

3.1 Studiendesign

Die Interventionsstudie wurde prospektiv und bizenitrisch durchgeführt.

3.2 Probanden

Die Probanden wurden durch Prof. Dr. Lammert, PD Dr. Terjung (Bonn) und Prof. Dr. Stallmach (Essen) rekrutiert.

An der Studie konnten nur MC-Patienten in einem leichten Schub ihrer Erkrankung teilnehmen. Mit Hilfe der ärztlichen Untersuchung und eines Fragebogens wurden die Ein- und Ausschlusskriterien überprüft. Darüber hinaus wurden die Aspekte der Einnahme von Medikamenten, Konsum von Genussmitteln, Zigaretten und Nahrungsergänzungsmitteln erfragt.

Die Probanden erfüllten die folgenden **Einschlusskriterien**:

- Gesicherte MC Diagnose
- Alter: 18-50 Jahre
- Schriftliches Einverständnis

Ausschlusskriterien waren:

- Schwangerschaft und Stillzeit
- Diabetes mellitus
- Einnahme von Antibiotika
- Bekannte Erkrankungen der Leber und des Pankreas
- Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln (z. B. Vitaminpräparate, Fischölkapseln (Fragebogen)
- Konsum von Probiotika, Multivitamin- sowie ACE-Säften (Fragebogen)
- Nierenfunktionsstörung (Kreatinin > 2 mg/dl)
- Eingeschränkte Geschäftsfähigkeit
- Jeder andere Zustand, der nach Ansicht des Prüfers den Probanden für die Aufnahme in die Studie als ungeeignet erscheinen lässt
- Teilnahme an einer anderen klinischen Studie gleichzeitig und während der vergangenen 4 Monate

Die Patienten wurden mündlich und schriftlich über den Studienablauf und mögliche Risiken informiert.

Auf eine Fallzahlab-schätzung wurde verzichtet, weil es sich bei der vorliegenden Studie um eine Pilotstudie handelt.

3.3 Durchführung

Die Patienten nahmen über 4 Wochen 2 x täglich 200 ml eines Trinksupplementes (Intestamin[®], Fresenius Kabi, Bad Homburg) zu sich.

Die Blutproben sowie die Biopsien im Rahmen der Koloskopie wurden vor und nach der 4-wöchigen Interventionsphase gewonnen. Außerdem wurde vor der Intervention ein Interview zur Anamnese durchgeführt (Anhang A), bei der auch der CDAI ermittelt wurde. Die Patienten wurden angewiesen, ihre Beschwerden während der Intervention sowie die tägliche Aufnahme des Trinksupplementes in einem Patiententagebuch zu dokumentieren. Dies diente gleichzeitig zur Überprüfung der Compliance (Anhang B).

Die Patienten erhielten ein standardisiertes Ernährungsprotokoll, das an 3 Tagen in der 2. Interventionswoche geführt werden sollte. Zur Ermittlung der Lebensqualität wurde vor und nach der Intervention außerdem ein entsprechender Fragebogen (IBDQ-D) ausgefüllt.

Die Interventionsdauer von 4 Wochen orientiert sich an Studien, bei denen nach Supplementierung vergleichbarer Dosen von Vitamin C und E die Lipidperoxidation reduziert und die antioxidative Kapazität im Plasma angestiegen war [38, 39].

3.4 Anamnese

Im Rahmen der Anamnese wurden anthropometrische Basisdaten wie Größe, Gewicht und BMI erhoben.

Die krankheitsbezogenen Daten (Krankheitsdauer, Lokalisation der Erkrankung, Allergien, Medikation) wurden zum Teil im Interview erfragt und zum Teil der Krankenakte entnommen.

Die Einstufung der Krankheitsaktivität erfolgte mit Hilfe des Crohn's Disease Activity Index (CDAI) nach Best *et al.* [91]. Dieser Index errechnet sich aus subjektiven (Allgemeinbefinden, Bauchschmerzen) und objektiven (Hämatokrit, Gewicht) Parametern, deren Punktsomme die individuelle Krankheitsaktivität widerspiegelt.

3.5 Trinksupplement

Für die Studie wurde Intestamin® trink (Fresenius Kabi, Bad Homburg) verwendet, das besonders reich an antioxidativen Vitaminen ist. Die Energie- und Nährstoffzufuhr einer Tagesdosis von 400 ml Intestamin® ist in Tab.6 angegeben.

Tab 6: Energie- und Nährstoffzufuhr einer Tagesdosis Intestamin® trink

Tagesdosis Intestamin® trink		
Energie	kcal	ca. 250
Protein (Dipeptide)	g	45
Fett	g	0
Kohlenhydrate ¹	g	15
Glutamin ²	g	30
Vitamin C	mg	1500
Vitamin E	mg	500
β-Carotin	mg	10
Selen	µg	300
Zink	mg	20

Mit Natriumcyclamat (150 mg) und Na-Saccharin (30 mg)

1: 64% Maltodextrin, 24% Saccharose, 12% Fructose,

2: als Dipeptid

3.6 Blutentnahme, Gewinnung der Biopsien und Aufbereitung der Plasmaproben

Die Blutentnahmen wurden durch Punktion der Armvene mit Monovetten (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) vorgenommen. Dabei wurde Vollblut in Lithium-Heparin, in EDTA beschichtete Vakuumröhrchen sowie für die Selen- und Zinkanalytik in Spurenmetall-freie Lithium-Heparin Monovetten entnommen.

Für die Messung der DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten wurde ein separates Heparin Plasmaröhrchen (1,2 ml) verwendet, das bis zur Durchführung des Tests (ca. 60-120 Minuten nach der Blutentnahme) bei Raumtemperatur (RT) lichtgeschützt aufbewahrt wurde. Nach Betti *et al.* [92] hat eine Lagerung bis zu 24 h unter diesen Bedingungen keinen Einfluss auf das Ergebnis der Einzelzellgelelektrophorese (SCGE).

Die übrigen Blutproben wurden sofort nach der Entnahme auf Eis gelegt, bei 4°C zentrifugiert (2000 x g, 10 Min) und das Plasma gewonnen.

Zur Stabilisierung des Vitamin C wurden 200 µl EDTA Plasma mit 600 µl einer frisch hergestellten 1 M meta-Phosphorsäurelösung versetzt und geschüttelt. Anschließend wurde bei 13000 x g zentrifugiert und der Überstand in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Das Heparinplasma für die Bestimmung des Glutamingehaltes wurde zunächst deproteinisiert. Dafür wurde 1 ml Plasma mit 100 µl einer 30%igen Sulfosalizinsäurelösung (SSA) versetzt, geschüttelt und 60 Min bei 4°C inkubiert, um eine vollständige Proteinfällung zu gewährleisten. Nach der Zentrifugation (2000 x g, 15 Min, 4°C) wurde der proteinfreie Überstand gewonnen und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Für die Bestimmung der übrigen Parameter wurde das Plasma in entsprechende Eppendorf Gefäße pipettiert und bis zur endgültigen Lagerung bei -80 °C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Die Biopsien der Darmmukosa wurden im Rahmen der Koloskopie gewonnen. Eine entzündete und eine makroskopisch unauffällige Mucosaprobe (Rektum) wurden sofort in 2 mL „RNA Later“ überführt und zum Institut für Immunologie der Universität Heidelberg geschickt. Jeweils 2 Biopsien aus entzündeten und aus makroskopisch unauffälligen Darmabschnitten wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.7 Nutritive Aufnahme von Antioxidantien

Um die nutritive Aufnahme an antioxidativ wirksamen Mikronährstoffen (Vitamin A, C, E, β -Carotin), sowie Zink und Selen zu erheben, wurde in der zweiten Interventionswoche ein standardisiertes dreitägiges Ernährungsprotokoll geführt.

In diesem Protokoll waren die Lebensmittel nach Gruppen sortiert (z. B. Brot, Obst, Gemüse) und die einzelnen Lebensmittel in haushaltsüblichen Verzehrsmengen (z. B. 1 Scheibe Vollkornbrot = 50 g) angegeben. Die verzehrten Portionen wurden von den Patienten geschätzt.

Berechnet wurde die durchschnittliche tägliche Aufnahme an Energie, Makronährstoffen, antioxidativen Pro-/Vitaminen und Mineralstoffen aus der Nahrung unter Verwendung der Software EBIS pro[®] für Windows, Version 4.0 (Erhardt, Universität Hohenheim), dessen Auswertung auf dem BLS II 3.2 basiert.

3.8 Antioxidantienstatus in Plasma und Mucosa

3.8.1 Vitamin A, E und β -Carotin

Die Bestimmung der Retinol- und α -Tocopherolkonzentration im Plasma erfolgte mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) [93]. Zunächst wurden durch Zugabe von 400 μ l Ethanol zu 400 μ l EDTA-Plasma die Proteine gefällt und damit die Proteine gegebenenfalls aus der Proteinbindung freigesetzt. Anschließend konnten die Vitamine mit Hilfe von n-Hexan (400 μ l) aus dem Überstand extrahiert werden. Der fettlösliche Überstand (150 μ l) wurde in Mikrovials pipettiert und mit einem Probengeber (Basic Marathon, Spark Holland, Emmen, Niederlande) in das HPLC Gerät (Sykam, Fürstenfeldbruck) injiziert. Alle Proben wurden doppelt aufbereitet und analysiert. Der Variationskoeffizient betrug 7,8 %.

Für die HPLC wurde eine EC 200-4 Nucleosil 100-5 CN Säule verwendet (Macherey Nagel, Düren). Der Lauf erfolgte jeweils isokratisch bei einem Verhältnis Hexan/Isopropanol von 50:1 bei einer Flussrate von 2 ml/ min.

α -Tocopherol wurde bei einer Wellenlänge von 292 nm gemessen, Retinol bei 325 nm. Beide Vitamine konnten in einem 6-minütigen Lauf analysiert werden. Die ermittelten Peakflächen wurden manuell integriert (Software Pyramid 1.0, Axxiom Chromato-

graphy, Moorpark, USA) und auf den jeweiligen Standard bezogen. Die Berechnung der Vitaminkonzentrationen im Plasma erfolgte durch folgende Formel:

Konzentration (Probe) = (Konz. Standard * Peakfläche Probe) / Peakfläche Standard.

Die Konzentrationen von Tocopherol wurden auf die Cholesterolkonzentration im Plasma bezogen.

Die Konzentration von β -Carotin im Plasma wurde von der Firma BioTeSys, Esslingen, mittels HPLC bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt.

3.8.2 Vitamin C

Die Konzentration von L-Ascorbinsäure im EDTA-Plasma wurde ebenfalls mit HPLC (Sykam, Fürstfeldbruck) nach der Methode von Steffan [94] bestimmt. Nach dem Auftauen wurden die Proben zentrifugiert und 150 μ l des Überstandes in Mikrovials gegeben. Für die Injektion der Proben in die HPLC wurde ein kühlbarer automatischer Probengeber (Basic Marathon, Spark Holland, Emmen, Niederlande) verwendet. Alle Proben wurden doppelt analysiert. Der Variationskoeffizient der Methode beträgt 5,4 %.

Zur Herstellung der mobilen Phase wurden 1,38 g Natriumdihydrogenphosphat-1-Hydrat in 1000 ml *Aqua bidest.* gelöst und mit 23 ml 14 %iger (w/w) Orthophosphorsäure auf pH 2,0 eingestellt. Der erhaltene 0,045 M Phosphatpuffer (pH 2) wurde anschließend durch einen 0,45 μ m Filter filtriert. Die mobile Phase wurde täglich neu angesetzt, um mikrobielle Verunreinigungen zu verhindern. Die Flussrate betrug 1 ml/min.

Für die Standards wurden 60 mg L-Ascorbinsäure (Sigma Aldrich, München) in 50 ml eines 3 % (w/w) Perchlorsäure / 1 % (w/w) Metaphosphorsäure-Gemisches gelöst.

Die Kalibrierlösungen mit 1,2 mg/l und 12 mg/l L-Ascorbinsäure wurden durch Verdünnen der 1200 mg/l Ascorbinsäure-Stammlösung mit einer 3 % (w/w) Perchlorsäure / 1 % (w/w) Metaphosphorsäure-Mischung erhalten.

Aufgrund der Instabilität von L-Ascorbinsäure und der Hydrolyse der Metaphosphorsäure wurden alle Lösungen täglich neu hergestellt.

Die Messung der Ascorbinsäurekonzentration erfolgte bei einer Wellenlänge von 243 nm in einem 10-minütigen Lauf. Die Messung der Peakflächen erfolgte durch einen Integrator (Kontron, München). Durch den Bezug der Peakfläche auf den Standard konnte die Konzentration ermittelt werden.

3.8.3 Selen und Zink

Selen und Zink wurden im heparinisierten Plasma mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) mit der Graphitrohrtechnik vom Labor W&T (Berlin) analysiert. Die Proben wurden in ein Graphitrohr eingeführt und dort verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. Dabei wurden sie getrocknet, thermisch zersetzt und atomisiert. Der Variationskoeffizient der Methode beträgt 4,4 %.

Die Extinktion wurde bei folgenden Wellenlängen gemessen: Selen: 196 nm, Zink: 213,9 nm.

3.8.4 Glutamin und Glutathion

Glutamin

Die Konzentration von Glutamin im Heparin-Plasma wurde mittels reversed-phase HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/3-MPA (Orthophthaldialdehyd/ 3-Mercaptopropionsäure) und anschließender Fluoreszenzdetektion ermittelt [95]. Der Variationskoeffizient der Methode beträgt 1,53 % [96].

Von den proteinfreien Überständen der Proben wurden 20 µl zu 1 mL *Aqua bidest.* und 0,2 mL Boratpuffer (1,0 M, pH 10,2) in Vials pipettiert und gut durchmischt.

Die Proben wurden im Probengeber mit OPA/3-MPA 5 min derivatisiert und anschließend 20 mL auf die Säule injiziert. Die Trennung der Aminosäuren erfolgte mittels ansteigender Acetonitril-Gradientenelution auf einer RP-HPLC-Säule (Inertsil ODS-2, 5 µm, 250 x 4,6 mm, MZ Analysentechnik, Mainz). Die Flussrate betrug 0,9 mL/min. Die Analyse erfolgte in einem Gradientenverfahren, wobei Eluent A aus 1,5 % Tetrahydrofuran in Natriumphosphatpuffer (12,5 mmol/L, pH 7,2) bestand und sich Eluent B aus 35 % Methanol, 15 % Acetonitril und 50 % Natriumphosphatpuffer zusammensetzte. Die Detektion erfolgte mit einer Anregung von 330 nm und einer Emission bei 450 nm.

Das HPLC-System bestand aus einem HPLC Controller S4010, einer HPLC Pumpe S1100 (Sykam, München), einem Triathlon Autosampler (Spark, Emmen, NL) und einem Linear Fluor LC 304 Detektor (Linear Instruments, Fremont, CA, USA). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Pyramid P1931 (Pyramid, Moorpark, CA, USA).

Glutathion in Plasma und Mucosa

Die Konzentration von Gesamtglutathion (GSH + GSSG) im heparinisierten Plasma wurde mit HPLC bestimmt. Der Variationskoeffizient der Methode beträgt 5,2 %. Hierzu wurden die oxidationsempfindlichen Thiole im heparinisierten Plasma mit Tri-n-Butylphosphin reduziert und stabilisiert. Gleichzeitig wurden proteingebundene Thiolverbindungen gelöst. Die Proteinfällung erfolgte durch Zugabe von SSA, das N-2-Mercaptopropionylglycin als internen Standard enthielt.

Die reduzierten Thiole wurden mit Ammonium-7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonat, einem Reagenz, das spezifisch mit Thiolgruppen reagiert, zu stabilen fluoreszierenden Derivaten umgesetzt.

Als Säule wurde eine RP-18 Säule verwendet. Die Detektion erfolgt fluorimetrisch, die Konzentrationen wurden durch Vergleich mit einem Standardgemisch und MPG als internem Standard ermittelt [97].

Die Konzentration von Glutathion in der Mucosa wurde ebenfalls nach Kuhn *et al.* [97] analog zur Bestimmung im Plasma durchgeführt. Der Variationskoeffizient dieser Methode beträgt 1,1 % [97].

Die Mucosa (ca. 20-50 mg) wurde im gefrorenen Zustand gewogen. Anschließend wurden die Proben jeweils in ein Homogenisationsröhrchen gegeben und mit 0,5-2 ml eiskühler SSA-Lösung nach Zugabe von internem Standard homogenisiert. Das Homogenisat wurde dann in 2 ml Eppendorfgefäße umgefüllt und 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (150 x g, 15 Min, 4 °C), und die Glutathionkonzentration wurde bestimmt.

Die Ergebnisse wurden anschließend auf die Einwaage bezogen und in $\mu\text{mol/g}$ umgerechnet.

3.8.5 Harnsäure

Die Harnsäurekonzentration in heparinisiertem Plasma wurde in einem medizinischen Labor (Lentzen-Gütgemann, Bonn) im Autoanalyzer bestimmt.

3.8.6 Antioxidative Kapazität

Die antioxidative Kapazität im Plasma wurde mittels TEAC nach Miller *et al.* [98] bestimmt. Durch Metmyoglobin wird in Gegenwart von H₂O₂ aus 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonat (ABTS) ein stabiles ABTS-Radikalkation gebildet, das bei einer Absorption von 734 nm photometrisch gemessen wird. Je höher der Gehalt an Antioxidantien in der Probe, desto stärker wird die Bildung von ABTS-Radikalen und damit die Bildung des grünen Farbstoffs verzögert. Die Extinktion wird gemessen und die Inhibition in Relation zur Standardsubstanz Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylsäure), eines wasserlöslichen, synthetischen Tocopherolderivates in Troloxäquivalenten angegeben. Der Variationskoeffizient betrug 2,85 %.

Die Herstellung der Myoglobinlösung (400 µM) erfolgte durch Lösen von 0,1128 g equinem Herzmuskel-Myoglobin (Sigma Aldrich, München) in 15 mL PBS (5 mM, pH = 7,4).

Für die Herstellung des Kaliumhexacyanoferrats (III) wurden 0,0244 g K₃[Fe(CN)₆] (Sigma Aldrich, München) kurz vor Gebrauch in 100 mL PBS (RT) gelöst.

Metmyoglobin entsteht durch die Oxidation von Myoglobin mit Kaliumhexacyanoferrat (III). Beide Lösungen wurden gemischt und 15 Min lichtgeschützt inkubiert (RT). Das entstandene Metmyoglobin wurde aufgereinigt über 2 Ultrafree-15 Filtereinheiten (Millipore, Billerica, USA), die in Zentrifugenröhren eingesetzt wurden. Die Lösung wurde bei 2000 x g 15-45 Min zentrifugiert, bis in jeder Filtereinheit nur noch wenige mL Überstand vorhanden waren.

Die Metmyoglobinkonzentration wurde über den Whitburn-Algorithmus berechnet.

Whitburn-Algorithmus (Miller *et al.*, 1993):

$$\text{Konz. Met-Mb} = 146 \times A(490 \text{ nm}) - 108 A(560 \text{ nm}) + 2,1 A(580 \text{ nm})$$

$$\text{Konz. Ferryl-Mb} = -62 A(490 \text{ nm}) - 242 A(560 \text{ nm}) - 123 A(58 \text{ nm})$$

$$\text{Konz. MbO}_2 = 2,8 A(490 \text{ nm}) - 127 A(560 \text{ nm}) + 153 A(58 \text{ nm})$$

Der Metmyoglobinanteil macht in der Regel > 95 % des gesamten Hämproteins aus. Die Konzentration der Metmyoglobinlösung sollte bei etwa 140 µM liegen. Die konzentrierte Lösung ist bei -20 °C bis zu 6 Monate, bei 4 °C etwa 5 Tage haltbar. Das Metmyoglobin wurde aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Die Wasserstoffperoxidlösung (0,45 mM) wurde durch Verdünnung von 515 µL H₂O₂ mit 10 mL PBS hergestellt. Von dieser wurden 50,1 µL entnommen und auf 50 mL mit

3 Material und Methoden

PBS aufgefüllt. Die H₂O₂ Arbeitslösung wurde lichtgeschützt aufbewahrt und täglich frisch angesetzt.

Die Trolox-Stammlösung (5 mM) bestand aus 0,15641 g Trolox, das in 250 ml PBS gelöst wurde. Der pH-Wert wurde anschließend mit HCl auf 7,4 eingestellt. Die Stammlösung ist bei -20 °C mehrere Monate haltbar.

Für die ABTS-Stammlösung (5 mM) wurde 0,02743 g ABTS in 10 mL PBS gelöst. Diese Lösung wurde täglich neu angesetzt.

Aus den Stammlösungen entstanden täglich die verdünnten Arbeitslösungen. Die Metmyoglobinlösung wurde hierzu mit PBS auf 90 µL verdünnt.

Aus der Trolox-Stammlösung wurde durch Zugabe von PBS eine Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 0-2,5 mM angesetzt.

Die ABTS Stammlösung wurde mit PBS 1:10 verdünnt (500 µM).

Das Plasma wurde im Wasserbad bei 24 °C aufgetaut und bei 10 000 x g für 10 min zentrifugiert, um Trübungen zu beseitigen. Im Überstand erfolgte die Messung der antioxidativen Kapazität des Plasmas.

Hierzu wurden 300 µL ABTS Arbeitslösung, 8,4 µL Standard (bzw. Probe und Puffer für den Leerwert), 506 µL PBS und 36 µL Metmyoglobin-Arbeitslösung gemischt und 15 Minuten im Photometer bei 30 °C inkubiert. Durch Zugabe von 150 µL H₂O₂-Arbeitslösung wurde die Reaktion gestartet. Die Messung der Absorption wurde jeweils 3 Minuten nach H₂O₂-Zugabe bei 734 nm durchgeführt.

Die Absorption (Abs) der einzelnen Proben wurde im UV/Vis Spektralphotometer (Uvikon, AJ Bunnik, Niederlande) gemessen und auf den Leerwert bezogen:

$$(\text{Abs}_{\text{Leerwert}} - \text{Abs}_{\text{Probe}}) / \text{Abs}_{\text{Leerwert}} = \text{Inhibition (\%)}$$

Die antioxidative Kapazität der Probe wurde anhand der Trolox-Standardgeraden berechnet und in Troloxäquivalenten angegeben.

3.9 Oxidative Stressmarker in Plasma und Leukozyten

3.9.1 DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten

Die Einzelzell-Gelelektrophorese (SCGE, Comet Assay) ist eine Technik, die es ermöglicht, DNA-Schäden in einzelnen Zellen semiquantitativ zu bestimmen. Einen Überblick über die Einsatzgebiete und unterschiedlichen Methoden bieten Kassie *et al.* [99]. Entwickelt wurde der Test 1984 von Östling und Johanson zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen [100]. Mit der Modifizierung durch Singh *et al.* [101] im Jahre 1988 können durch die Verwendung von basischen Puffern zusätzlich auch DNA-Einzelstrangbrüche festgestellt werden. In dieser Arbeit wurde der Comet Assay nach der Methode von Bauch *et al.* durchgeführt [102].

Die Zellen werden als Einzelzellsuspension in Agarose eingebettet. Danach werden die Zellen entweder in phosphatgepufferter Salzlösung oder in einer Wasserstoffperoxidlösung inkubiert. Durch die Wasserstoffperoxidlösung werden DNA-Einzelstrangbrüche induziert. Anschließend werden die Zellen lysiert, um die Kernmembran aufzulösen. Bei der Elektrophorese werden die Bruchstücke entsprechend ihrer Größe getrennt. Nur DNA mit Strangbrüchen kann aus dem Zellkern herauswandern, chromosomale DNA verbleibt im Kern. Nach Anfärbung mit einem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff ist die DNA im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Der Zellkern erscheint als stark fluoreszierender Kopf, die im elektrischen Feld aufgetrennten DNA-Fragmente erscheinen als Schweif. Bestimmt wird der Anteil der beschädigten und unbeschädigten DNA mit Hilfe einer Software. Die SCGE gilt als sensitive Methode, um oxidativen Stress und die Wirkung nutritiver Antioxidantien *in vitro* sowie *ex vivo* zu untersuchen [99, 103-105].

In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Isolierung mononukleärer Zellen wie bei Giovanelli *et al.* [106] verzichtet. Stattdessen wurde Vollblut eingesetzt, um Artefakte durch die Aufarbeitung zu vermeiden. Der Variationskoeffizient der Methode beträgt 24 %.

Die Lösungen für die Durchführung des Tests wurden folgendermaßen angesetzt:

Die 10 mM PBS Lösung wurde durch 9,55 g PBS-Pulver (Sigma Aldrich) hergestellt, das mit *Aqua bidest.* auf 1 L aufgefüllt wurde.

Für die Vorbeschichtung der Objektträger (mattiert mit klarem Fenster, Best-Nr: ES-370-CE24, (Erie Scientific, Portsmouth, USA)) wurden 0,01 g niedrig schmelzende Agarose (Serva, Heidelberg, D) in 10 mL PBS aufgeköcht. Anschließend wurde die

3 Material und Methoden

Lösung im Wasserbad für 20 Min. auf 80 °C gehalten und vor der Verwendung auf 60°C (Vorbeschichtung) abgekühlt.

Für das Auftragen der Zellen wurde 0,075 g Agarose mit 10 ml PBS gelöst (Procedere wie oben). Die 0,75 %ige Agaroselösung wurde auf 42 °C abgekühlt, um eine Schädigung der Zellen zu verhindern.

Die 300 µM H₂O₂ Lösung zur Induktion der DNA-Strangbrüche wurde durch Zugabe von 51,6 µL einer 30 %igen H₂O₂ Lösung (Applichem, Darmstadt) zu 5 mL PBS angesetzt. Anschließend wurden 769 µL dieser Stammlösung in 200 mL PBS (300 µM) verdünnt. Die Lösung wurde täglich frisch angesetzt.

Die Lyselösung setzte sich aus 25,0 g Natriumlaurylsulfat (SDS), 10,0 g N-Lauroylsarcosinat und 7,35 g Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) zusammen und wurde mit *Aqua demin.* auf 1 L aufgefüllt. Der pH-Wert wurde zuvor mit 10 M NaOH auf 9,5 eingestellt.

Der Elektrophoresepuffer bestand aus 14,2 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Carl Roth, Karlsruhe), 5,6 g Borat (Merck) und 0,74 g EDTA (Sigma Aldrich, München), der mit *Aqua demin.* auf 1 L aufgefüllt wurde. Der pH-Wert der Lösung lag bei 8,3.

Es wurde eine Stammlösung von Propidiumiodid (Sigma Aldrich) hergestellt (1 mg/mL in *Aqua bidest.*). 3,08 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und 1,468 g NaCl wurden in 200 mL *Aqua bidest.* gelöst, 4,175 mL der Propidiumiodid-Stammlösung zugegeben und der pH-Wert mit 1 M HCl auf 7,5 eingestellt. Anschließend wurde mit *Aqua demin.* auf 250 mL aufgefüllt, so dass eine 25 µM Lösung entstand.

Die Objektträger wurden mit jeweils 500 µL der 0,1 %igen Agarose vorbeschichtet und auf einer Wärmeplatte bei 75 °C etwa 20 Min getrocknet. Die vorbeschichteten Objektträger waren bei 4°C eine Woche haltbar.

Um DNA-Strangbrüche durch UV-Strahlung zu vermeiden, wurde das Labor abgedunkelt. Alle Inkubationsschritte wurden in einer Styroporkiste mit Deckel durchgeführt.

10 µL heparinisiertes Vollblut wurden in 90 µL PBS (37 °C) gegeben. Nach der Zugabe von 500 µL 0,75 %iger Agarose (40-45 °C) wurde die Lösung sofort auf Objektträger aufgetragen. Die Agarose gelierte 10 Min. im Dunkeln auf einer Kühlplatte bei 4 °C.

Die Objektträger wurden danach für 20 Min in 300 µM Wasserstoffperoxid inkubiert, um oxidative DNA-Schäden in den Leukozyten zu induzieren. Nach Benitez-Bribiesca &

Sanchez-Suarte [107] handelte es sich dabei hauptsächlich um Einzelstrangbrüche. Kontrollen wurden stattdessen in PBS inkubiert. Die Inkubation fand im Eiswasserbad statt, um eine Reparatur der oxidativ induzierten DNA-Strangbrüche zu verhindern [108]. Danach wurden die Gele 15 Min in Lyselösung (15 °C) gegeben und anschließend 5 Min in *Aqua demin.* (4 °C, 5 Min) gewaschen.

Die Objektträger wurden in eine horizontale Elektrophoresekammer (Harnischmacher Labortechnik, Kassel) gelegt und mit dem Elektrophoresepuffer (4 °C) bedeckt. Die Elektrophorese erfolgte für 4 Min bei 1,14 V/cm (Elektrodenabstand 34 cm). Als Netzgerät diente ein Power Supply E835 (Consort, Turnhout, Belgien).

Die Bedingungen wurden so gewählt, dass auch die Kometen der unbehandelten Zellen erkennbare Schweife aufwiesen. Dadurch wurde sichergestellt, dass alle H₂O₂ induzierten DNA-Strangbrüche durch eine weitere Migration der DNA in den Schweif bei einer späterer Untersuchung im Fluoreszenzmikroskop sichtbar werden. Typische Kometen von Zellen mit und ohne H₂O₂ Behandlung zeigt Abb. 2.

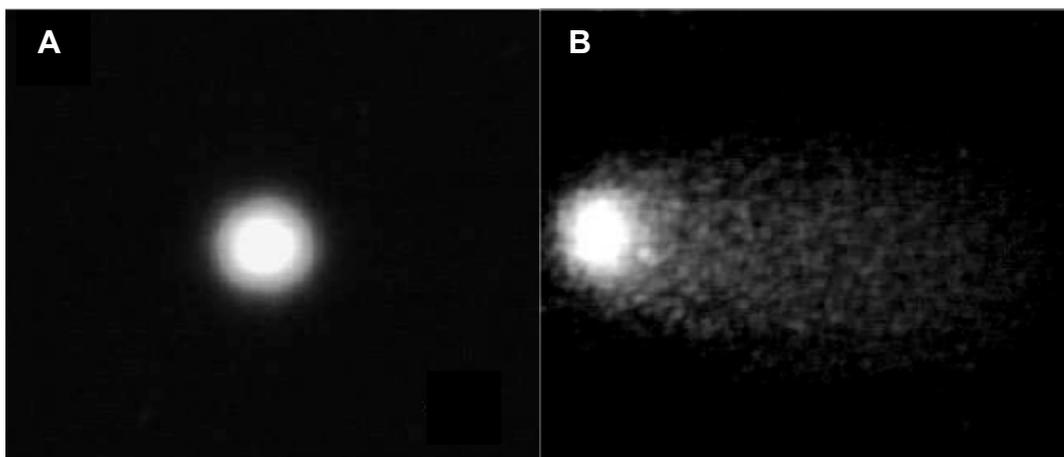


Abb 2: Zellkern nach Einzelzell-Gelelektrophorese und Anfärbung mit Propidiumiodid im Fluoreszenzmikroskop

400-fache Vergrößerung A: Unbehandelte Zellen, B: Nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid (300 µM, 20 Min, 4°C)

Die Gele wurden anschließend noch einmal 10 Min in *Aqua demin.* (4 °C) gewaschen und dann auf einer Wärmeplatte bei etwa 50 °C für 20-30 Min getrocknet. Die Präparate wurden bis zur Messung bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Messung der DNA-Schäden wurden die Mikrogele 10 Min in *Aqua bidest.* bei Zimmertemperatur rehydriert und die DNA durch Zugabe von 150 µL Propidiumiodid-

Lösung angefärbt. Nach 20 Min Inkubation im Dunkeln bei 4 °C wurden die Kometen bei 400-facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, Jena) ausgestattet mit einer 50 W-Quecksilberlampe und einem Filter zur Grünanregung, sichtbar gemacht. Die Fluoreszenz der Kerne wurde mit dem Bildverarbeitungsprogramm Comet Assay III quantifiziert. Pro Objektträger wurden 50 zufällig ausgewählte Zellkerne gemessen. Für die weiteren Berechnungen wurde das arithmetische Mittel der 50 Einzelwerte herangezogen. Von allen Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Bei Verlust einzelner Gele durch die Aufarbeitung wurde im verbleibenden Gel die doppelte Anzahl an Zellen gemessen.

Das Bildanalysesystem Comet Assay III (Perceptive Instruments, Suffolk, GB) bietet eine Reihe von Parametern, mit denen die Verteilung der DNA in Kopf und Schweif der Kometen beschrieben wird. In Abb. 3 ist ein Beispiel dargestellt, aus dem die Ermittlung der Tail Intensity deutlich wird.

In der Literatur werden üblicherweise die Länge des Schweifs (Tail Length), der prozentuale Anteil der DNA im Schweif (Tail Intensity, TI) oder das Tail Moment (TM), ein Produkt aus der Länge des Schweifs und dem Anteil der DNA im Schweif, angegeben.

Tail Intensity und Tail Moment in unbehandelten Zellen (TI₀, TM₀) spiegeln die endogenen, bereits im Körper vorliegenden DNA-Schäden wider. DNA-Strangbrüche, die durch *ex vivo* Behandlung mit H₂O₂ verursacht werden (TI₃₀₀, TM₃₀₀; exogene Strangbrüche), entsprechen der Differenz zwischen behandelten und unbehandelten Zellen [109]. Diese spiegeln die Resistenz von Zellen vs. oxidativem Stress wider [110].

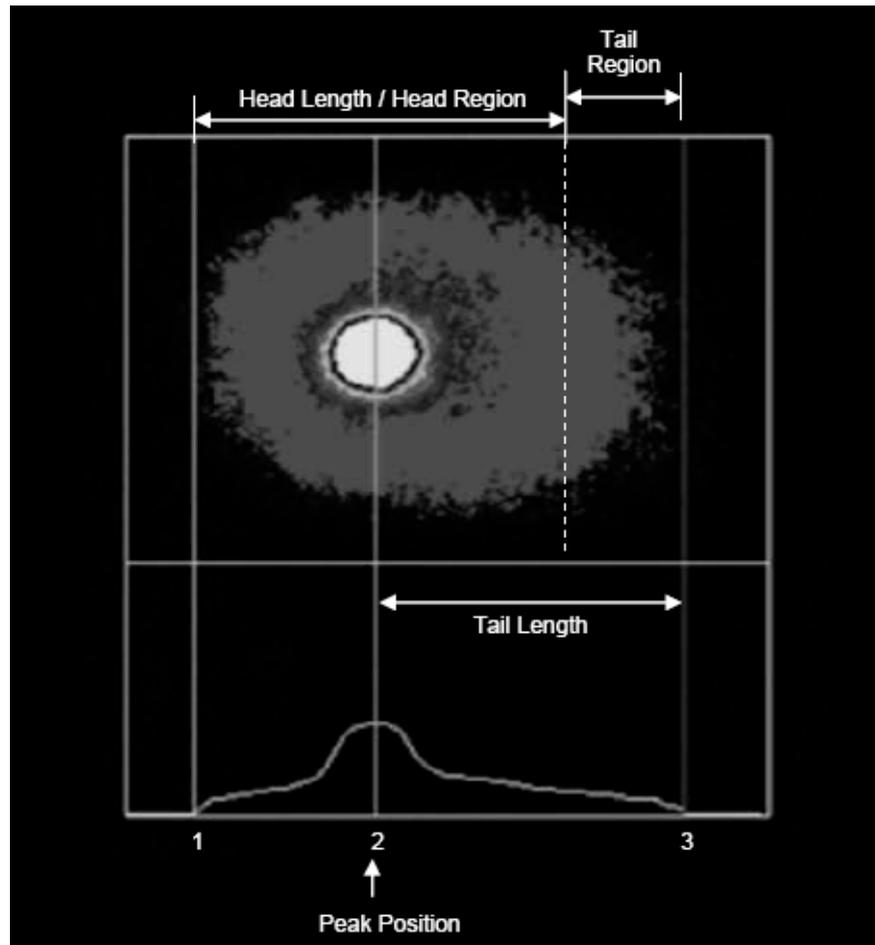


Abb 3: Bestimmung von Kopf- und Schweiflänge zur Ermittlung der Tail Intensity eines Zellkerns mit dem Comet Assay III-System (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Bianca Arendt)[111]

Die äußeren Linien begrenzen das Messfenster, in dem der Zellkern in Falschfarben dargestellt wurde. Die linke (1) und die rechte Linie (3) im Messfenster markieren die Ausdehnung des Kometen, die mittlere Linie (2) den Punkt der höchsten Fluoreszenz (Peak Position). Die Länge des Kopfes (Head Length) entspricht dem doppelten Abstand zwischen 1 und 2, die Länge des Schweifs (Tail Length) dem Abstand zwischen 2 und 3. Die Fluoreszenz innerhalb der Kopfregion spiegelt die Kopfregion (Head Intensity), die Punkte zwischen dem Ende der Kopfregion und dem Ende des Kometen die Schweifregion wider, die Summe der Punkte darin bildet die Schweifintensität (Tail Intensity).

3.9.2 8-Hydroxydesoxyguanosin

Zur Bestimmung der 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG) Spiegel in heparinisierem Plasma wurde das ELISA „New 8-OHdG“ Kit der Firma Gentaur (Brüssel, Belgien) verwendet. Das 8-OHdG der Probe bzw. des Standards bindet dabei an den Primärantikörper (8-OHdG-spezifischer monoklonaler Antikörper) und anschließend an den Sekundärantikörper (Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Antikörper), der mit einem Enzym konjugiert ist. Alle nicht gebundenen Antikörper werden durch Waschschriffe entfernt. Nach Zugabe des Substrats wird in einer enzymkatalysierten Reaktion ein Farbstoff gebildet. Die Extinktion ist proportional zur Konzentration des 8-OHdG in der Probe.

Anhand einer Eichgerade, bei der die Absorption gegen die logarithmierte Konzentration der Proben aufgetragen wird, kann mit Hilfe der Regressionsgleichung die 8-OHdG Konzentration der Probe berechnet werden. Der inter- und intra-Assay Variationskoeffizient beträgt < 15 %.

Die Plasmaproben wurden zunächst mit Microcon Zentrifugen Filtereinheiten (Porengröße 10 kDa) der Fa. Millipore (Eschborn) aufgereinigt. Durch Zentrifugieren (RT, 10 000 x g, 30 Min) wurden alle Plasmabestandteile > 10 kDa im Retentat zurückgehalten. Das Filtrat wurde für den ELISA-Test verwendet.

In die Wells der Mikrotiterplatte wurden gemäß der Anleitung des Herstellers jeweils 50 µl der mitgelieferten Standards sowie der Proben aufgetragen. Danach wurden 50 µl des Primärantikörpers in jede Vertiefung gegeben. Nach 60 Min Inkubation bei 37 °C wurde die Lösung in den Wells verworfen und es wurde in jedes Well 3 x 250 µl Waschlösung aufgetragen. Nach Entfernen der Flüssigkeit aus den Wells wurden jeweils 100 µl des Sekundärantikörpers aufgetragen und 60 Min bei 37 °C inkubiert. Auch dieser Inkubation folgten 3 Waschschriffe. Anschließend wurden jeweils 100 µl einer Substratlösung zugegeben und 15 Min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurden jeweils 100 µl eines Stoppreagens zugegeben.

Die Extinktion wurde bei 450 nm im ELISA-Reader (Tecan Sunrise, Fa. Tecan, Schweiz) gemessen.

3.9.3 Peroxide

Mit Hilfe des Testkits zur Messung der Peroxide (Totale Oxidative Kapazität (TOC), Labor Diagnostika Nord, Nordhorn) wurde die gesamte oxidative Kapazität im EDTA-Plasma gemessen. Der Nachweis erfolgte über eine Reaktion von Peroxiden in den Proben mit Peroxidase und die darauf folgende Färbung des chromogenen Substrates Tetramethylbenzidin.

In die Mikrotiterplatte wurden gemäß der Anleitung des Herstellers jeweils 10 µL der mitgelieferten Kontrollen und Standards sowie der Proben aufgetragen. Danach wurde das Reagenzgemisch A aus Substrat und Peroxidase-Lösung im Verhältnis 1:1 hergestellt. 200 µl dieser Mischung wurden in jedes Well gegeben. Nach 20 Min Inkubation bei 4 °C wurden jeweils 50 µl einer Stopplösung zugegeben und die Extinktion wurde bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen.

Die Bestimmung der TOC erfolgte über eine mitgeführte Standardreihe. Der erwartete Referenzbereich wurde als Richtwert angegeben und lag bei < 0,350 mmol/l. Der Variationskoeffizient betrug 4,9 %.

3.9.4 8-Isoprostane

Zur Bestimmung der 8-Isoprostankonzentration im Plasma wurde das ELISA-Testkit der Firma Cayman (Ann Arbor, Michigan, USA) verwendet.

Der Test basiert auf einem kompetitiven ELISA, bei dem 8-Isoprostane und 8-Isoprostan-Acetylcholinesterase (AChE) Konjugat um eine limitierte Anzahl von 8-Isoprostan-spezifischen Kaninchen-Antiserum Bindungsstellen konkurrieren. Die Menge der 8-Isoprostan-tracer, die an das Antiserum binden können, ist invers proportional zur Konzentration des 8-Isoprostans im Well. Dieser Kaninchenserum 8-Isoprostankomplex (frei oder Tracer) bindet an den monoklonalen anti-Kaninchen IgG Maus Antikörper, der an die Platte gebunden ist. Anschließend wird die Platte gewaschen und dabei nicht spezifisch gebundene Reagentien entfernt. Das Ellmann Reagenz (Substrat der Acetylcholinesterase) wird in der AChE-katalysierten Reaktion zu einem Produkt umgesetzt, dessen Extinktion proportional zur Menge der 8-Isoprosan-tracer ist, die gebunden haben, und somit invers proportional zum Gehalt an freien 8-Isoprostanen der Probe bzw. Standards. Der Variationskoeffizient der Methode beträgt ca. 10 %.

Die an Lipoproteine gebundenen Isoprostane wurden mit Hilfe einer Hydrolyse freigesetzt. Dazu wurden 0,4 ml Plasma mit 0,1 ml NaOH (10 M) und 4 µl Butylhydroxitoluol (BHT, 0,5 %) versetzt, geschüttelt und danach 2 Stunden bei 45 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben auf Eis wurde 0,2 ml HCl (10 M) zugegeben und wieder geschüttelt. Dabei bildete sich ein weißer Niederschlag. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten bei 14 000 RPM zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und bei mittlerer Stufe ca. 3 Stunden in einer Speedvac getrocknet. Das Lyophilisat wurde in 3 ml Acetat-Puffer (1 M) resuspendiert. Der pH-Wert betrug etwa 4,0.

Anschließend wurde eine Festphasenextraktion mit C-18 Kartuschen durchgeführt. Dazu wurden die Kartuschen mit 5 ml Methanol, danach mit 5 ml H₂O (ultra pure) gespült. Schließlich wurden 3 ml der hydrolysierten Proben aufgetragen und die Kartuschen wieder mit 5 ml H₂O (ultra pure) und 5 ml Hexan gespült. Die Elution erfolgte mit 5 ml Ethylacetat + 1 % Methanol unter Vakuum. Das Eluat wurde dann bei 37 °C unter Stickstoff eingedampft, in 0,5 ml Puffer gelöst und im ELISA eingesetzt.

Zunächst wurden 50 µl der jeweiligen Probe und Standards in Dreifachbestimmung auf die vorbeschichtete ELISA-Platte aufgetragen.

Die gesamte enzymatische Aktivität des AChE-gebundenen Tracers (Totale Aktivität, TA) wurde untersucht, indem 5 µl des Tracers in die entsprechenden Wells pipettiert wurden. Nicht-immunologische Bindungen des Tracers an die Platte (Nicht-spezifische Bindung, NSP) wurden durch Zugabe von 100 µl Puffer und 50 µl Tracer in die jeweiligen Wells kontrolliert. Die maximale Menge des Tracers, den das Antiserum in Abwesenheit der freien Analyten binden kann (Maximale Bindung, B₀), wurde durch Zugabe von 50 µl Puffer, 50 µl Tracer und 50 µl Antikörper untersucht. Für den Blankwert wurde im ersten Schritt nichts zugegeben.

Im nächsten Schritt wurde der 8-Isoprostan AChE Tracer zugefügt. Dabei wurden die Totale Aktivität Wells und die Blank Wells ausgelassen.

Im dritten Schritt wurde das 8-Isoprostan Antiserum zugegeben. 50 µl wurden in jedes Well pipettiert, außer in die folgenden Kontrollwells: Totale Aktivität, die nichtspezifischen Bindungen und in den Blank.

Anschließend inkubierte die Platte 18 Stunden bei Raumtemperatur.

Danach wurden die Wells geleert und jedes Well 5-mal mit Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss wurden 200 µl von Ellmanns Reagenz in jedes Well pipettiert und 5 µl des

3 Material und Methoden

Tracers zu den Totalen Aktivität Wells. Die Platte wurde nach 60 Minuten im ELISA-Reader bei 412 nm gemessen.

Verschiedene Kontrollen wurden durchgeführt, um die Validität des Tests zu bestimmen. Die Kontrollen wurden ebenso wie die Proben in 3 fach Bestimmung durchgeführt. Das Pippetierschema, das hierzu verwendet wurde, ist in Tab. 7 dargestellt.

Für die Auswertung wurde der Mittelwert der unspezifisch-gebundenen Wells (NSB) ermittelt und von dem der maximalen Bindung (B_0) subtrahiert. Die Differenz entspricht der korrigierten maximalen Bindung. Für die restlichen Wells wurde der Anteil der B/B_0 ermittelt. Dafür wurde der Mittelwert der NSB gemessenen Absorption von Standard S1 dividiert durch die korrigierte B_0 . Anschließend wurde mit 100 multipliziert um % B/B_0 zu erhalten. Genauso wurde für die Standards 2-8 verfahren.

Für die Regressionsgerade wurde % B/B_0 für die Standards S1-S8 gegen 8-Isoprostan-konzentration (pg/ml) halblogarithmisch aufgetragen und über die Regressionsgleichung wurde die 8-Isoprostan Konzentration der Probe/Standards ermittelt.

Tab 7: Pippetierschema des 8-Isoprostantests

	Puffer	Standard/Probe	Tracer	Antikörper
Leerwert	-	-	-	-
Totale Aktivität (TA)	-	-	5 µl	-
Nicht-spezifische Bindung (NSB)	100 µl	-	50 µl	-
Maximale Bindung (B_0)	50 µl	-	50 µl	50 µl
Standard/ Probe	-	50 µl	50 µl	50 µl

3.10 Inflammatorische Marker

Als mukosale Entzündungsmarker wurden die Transkriptspiegel von Myeloid Related Protein-14 (MRP-14) und Interleukin-8 (IL-8) am Institut für Immunologie, Universitätsklinik Heidelberg, mittels RT-PCR bestimmt [112]. Hierbei handelt es sich um Zytokine bzw. Mediatoren, die von aktivierten Monozyten/Makrophagen und Granulozyten bei aktivem Crohn in der entzündeten Mucosa verstärkt exprimiert werden. Bei diesen Markern wurde kürzlich eine signifikante Korrelation zwischen Anzahl der Transkripte und CDAI bzw. der endoskopischen Bewertung der Krankheitsaktivität festgestellt [113].

3.11 Deskriptive Parameter

3.11.1 Lebensqualität

Der Fragebogen zur Lebensqualität nach Guyatt *et al.* [114] besteht aus 32 Fragen aus vier Bereichen: Darmfunktion, emotionaler Status, systemische Symptome und soziale Funktionen. Die Antworten werden mit Punkten bewertet und aufsummiert. Die Gesamtpunktzahl reicht von 32-224. Je höher die Summe, desto besser ist die Lebensqualität. Bei Patienten in Remission liegt die Summe normalerweise bei 170-190 [115].

3.11.2 Subjective Global Assessment (SGA)

Das Subjective Global Assessment ist eine einfach durchzuführende Methode zur Einschätzung des Ernährungszustandes. Diese Methode wurde von Detsky *et al.* [116] entwickelt und an 202 Patienten mit gastrointestinalen Beschwerden validiert.

Auf Grundlage von Anamnese (Gewichtsveränderung, Nahrungszufuhr, gastrointestinale Symptome, Leistungsfähigkeit, Grunderkrankung) und klinischer Untersuchung (Unterhautfettgewebe, Muskelmasse, Ödeme) schätzt der Untersucher den Ernährungszustand des Patienten ein als:

SGA A = gut ernährt

SGA B = mäßig mangelernährt bzw. mit Verdacht auf Mangelernährung

SGA C = schwer mangelernährt

3.11.3 Präalbumin

Die Bestimmung der Präalbuminkonzentration erfolgte mit Hilfe der radialen Immundiffusion. Die Proben wurden auf Immundiffusionsplatten (The Binding Site, Birmingham, GB) aufgetragen, die in der Agarschicht ein Antiserum gegen Präalbumin enthielten. Nach 10-20 Min Inkubation der Probe wurden die Platten fest verschlossen und bei RT stehen gelassen. Nach 2-3 Tagen Diffusionszeit wurde der Durchmesser der Präzipitate abgelesen. Die Konzentration wurde anhand von Bezugswerttabellen ermittelt. Der Variationskoeffizient der Methode beträgt 0,72 %.

3.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Programmes SPSS, Version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) auf der Basis von nichtparametrischen Tests. Die Unterschiede vor und nach Intervention wurden mit dem Wilcoxon Test überprüft. Allen Untersuchungen wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt.

Soweit nicht anders vermerkt, wurden in Text und Tabellen das arithmetische Mittel (MW), Standardabweichungen (SD), Minimum (Min) und Maximum (Max) angegeben. Zur graphischen Darstellung wurden Boxplots verwendet, die wesentliche Informationen über die Verteilung und Streuung der Daten liefern und die auf dem Median, den Quartilen und Extremwerten basieren. Die Box stellt den Interquartilbereich dar, in dem 50 % der Werte liegen. Die von der Box ausgehenden Linien führen jeweils bis zum höchsten und bis zum niedrigsten Wert, ohne dass Ausreißer und Extremwerte berücksichtigt werden. Die horizontale Linie in der Box gibt die Lage des Medians wider. Ausreißer und Extremwerte sind als einzelne Datenpunkte dargestellt. Im Text, der die Werte der Boxplots enthält, wird der Median angegeben, sowie in Klammern die 5. und 95. Perzentile.

4 Ergebnisse

4.1 Probanden

Insgesamt nahmen 8 Probanden (intention to treat) an der Studie teil. Zwei Probandinnen wurden wegen mangelnder Compliance aus der Studie ausgeschlossen. 6 Probanden (per protocol) beendeten die Studie.

Allgemeine Merkmale zur Beschreibung des Probandenkollektivs sind in Tab. 8 aufgeführt.

Tab 8: Probandencharakteristika

		Interventionsgruppe
Probanden	n	8
Geschlecht	♂ / ♀	3 / 5
Raucher	R / NR	6/2
Alter (Jahre)	MW ± SD	38,5 ± 8,5
	Min-Max	22-47
Gewicht (kg)	MW ± SD	68,2 ± 17,1
	Min-Max	45-95
Größe (cm)	MW ± SD	174 ± 12
	Min-Max	158-193
BMI (kg/m ²)	MW ± SD	22,3 ± 4,1
	Min-Max	16,5-27,2
Compliance (%)	MW ± SD	90 ± 20

n = Anzahl, ♂ = männlich, ♀ = weiblich, R = Raucher, NR = Nichtraucher, MW = Mittelwert, SD = Standard-abweichung, Min = Minimum, Max = Maximum, BMI = Body Mass Index

4.2 Krankengeschichte der Probanden

Der CDAI lag durchschnittlich bei 176. Vier Patienten befanden sich vor der Intervention im akuten Schub, vier waren in Remission. Die Krankheitsdauer der Probanden betrug durchschnittlich 12,6 Jahre.

Bei den meisten MC-Patienten war entweder das Kolon oder das Ileum betroffen. In Tab. 9 sind der CDAI sowie krankheitsbezogene Daten dargestellt.

Tab 9: CDAI/ Krankheitsbezogene Daten

Daten	Ausprägung
CDAI (MW \pm SD, n = 8)	176 \pm 77
Krankheitsdauer (in Jahren), (MW \pm SD, n = 8)	12,6 \pm 8,9
Lokalisation der Erkrankung (n)	
○ Dünndarm (Duodenum/ Jejunum/ Ileum)	1/ 0/ 3
○ Kolon	4
Medikation (n)	
○ 5-ASA	6
○ Corticosteroide	8 (\bar{x} 30,63 mg/ d)
○ Antibiotika	1
Nahrungsmittelallergien/ Intoleranzen (n)	
○ Nahrungsmittelallergien	6
○ Laktoseintoleranz	4
○ Zöliakie	0

CDAI = Crohn's Disease Activity Index, 5-ASA = 5-Aminosalicysäure

Alle Patienten nahmen Corticosteroide, viele von ihnen zusätzlich 5-ASA Präparate. Ein Studienteilnehmer bekam Antibiotika.

Außerdem wiesen 6 Patienten Nahrungsmittelallergien auf, 4 hatten eine Laktoseintoleranz.

4.3 Nutritive Aufnahme von Antioxidantien

Einen Überblick über die durchschnittliche Energie- und Nährstoffaufnahme in der 2. Studienwoche gibt Tab. 10. Die Energieaufnahme lag im Mittel bei 2277 ± 1054 kcal/d, die Cholesterolaufnahme bei 352 ± 143 mg/d. Täglich wurden im Durchschnitt $1026 \pm 716,5$ μ g/d Retinol, 1 ± 1 mg Carotin, 8 ± 3 mg Tocopherol, 69 ± 42 mg Ascorbinsäure und 10 ± 5 mg Zink aufgenommen. Die Selenaufnahme der verzehrten Nahrungsmittel konnte leider nicht bestimmt werden, weil im Bundeslebensmittelschlüssel keine Daten zu Selengehalten in Lebensmitteln aufgeführt werden.

Tab 10: Mittlere nutritive Energie- und Nährstoffaufnahme während der Intervention (n = 6)

Parameter	Durchschnittliche Aufnahme / Tag
Energie (kcal)	2277 ± 1054
Cholesterol (mg)	353 ± 143
Vitamin A (μ g)	1026 ± 717
Carotin (μ g)	1100 ± 950
Vitamin E (mg)	8 ± 3
Vitamin C (mg)	69 ± 42
Zink (mg)	10 ± 5

Antioxidantienstatus in Plasma und Mucosa

4.3.1 Vitamin A, E und β -Carotin

Die Konzentration von Vitamin A nahm, wie in Abb. 4 dargestellt, von 4,8 μM (2,4-7,0 μM) auf 10,0 μM (7,8-14,3 μM) signifikant zu ($p = 0,028$).

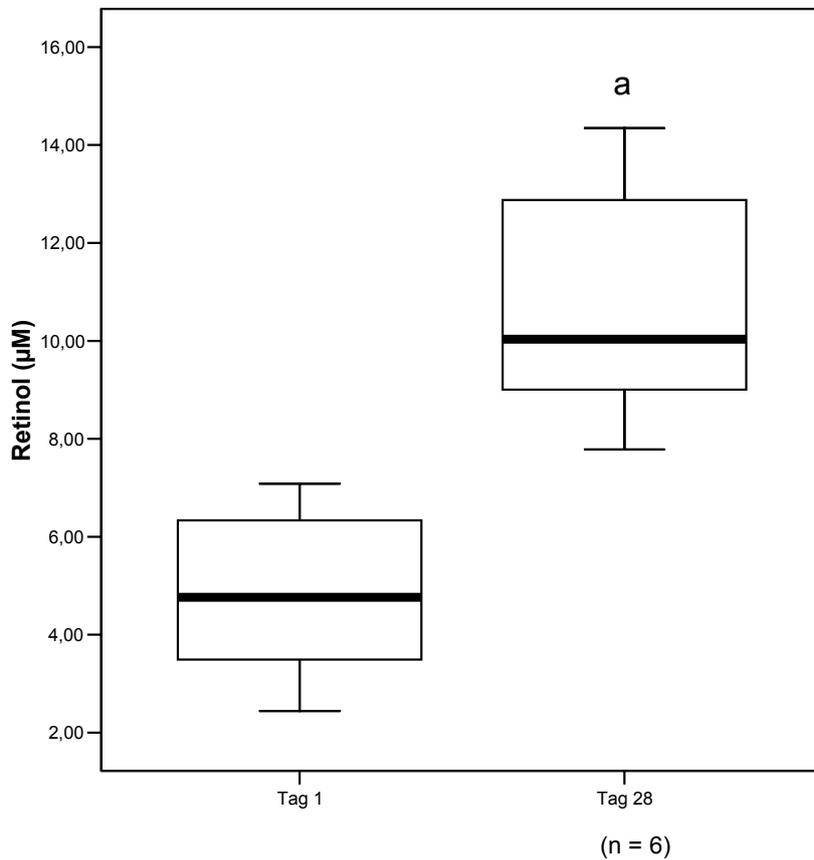


Abb 4: Retinolkonzentration im Plasma vor und nach 4-wöchiger Gabe des Trinkpräparates

a: statistisch signifikant versus Tag 1 ($p = 0,028$)

4 Ergebnisse

Der α -Tocopherolspiegel im Plasma lag zu Beginn bei durchschnittlich $39,4 \mu\text{M}$ ($7,9$ - $69,5 \mu\text{M}$). Nach der Intervention betrug er $99,1 \mu\text{M}$ ($42,2$ - $180,2 \mu\text{M}$). Der Anstieg um durchschnittlich $59,7 \mu\text{mol/l}$ war statistisch signifikant ($p = 0,028$). Der korrigierte Tocopherolspiegel (Abb. 5) lag vor Intervention bei $10,7 \mu\text{M/mM}$ Cholesterol ($1,4$ - $14,5 \mu\text{M/mM}$ Cholesterol) und stieg signifikant auf $19,5 \mu\text{mol/mmol}$ Cholesterol ($7,0$ - $33,0 \mu\text{M/mM}$ Cholesterol) an ($p = 0,043$).

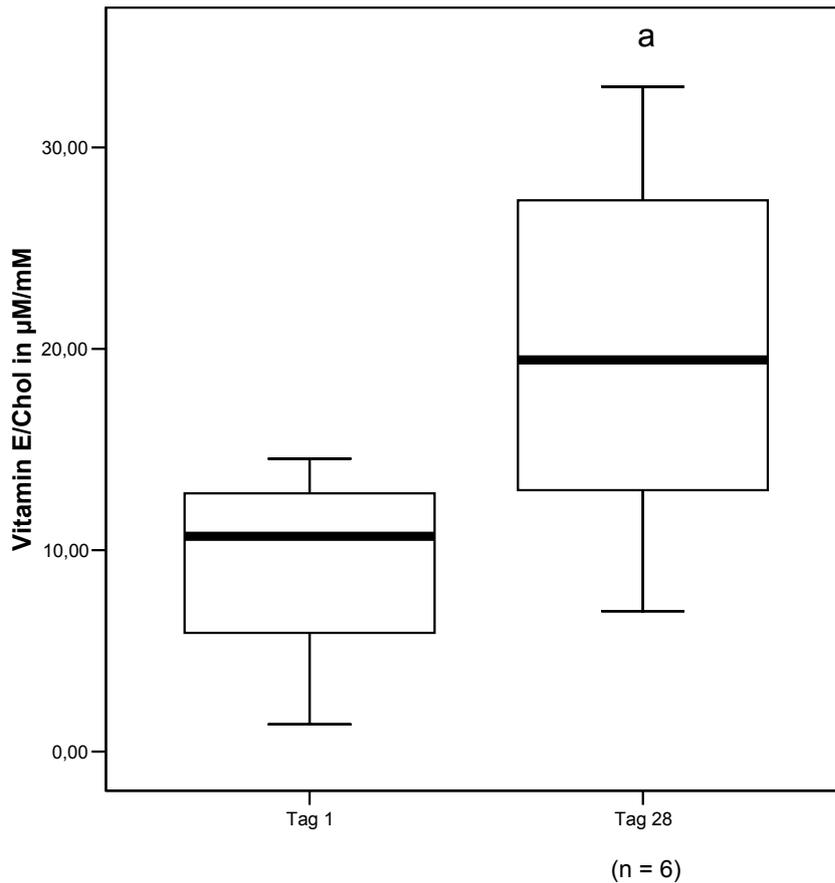


Abb 5: Korrigierter α -Tocopherolspiegel im Plasma vor und nach 4-wöchiger Gabe des Trinkpräparates

a: statistisch signifikant versus Tag 1 ($p = 0,043$)

4 Ergebnisse

Die Konzentration von β -Carotin im Plasma nahm nach der Supplementierung des Prüfpräparates gegenüber dem Ausgangswert von $0,2 \mu\text{M}$ ($0,1$ - $1,1 \mu\text{M}$) auf $1,8 \mu\text{M}$ ($0,5$ - $2,2 \mu\text{M}$) signifikant zu ($p = 0,028$) und ist in Abb. 6 dargestellt.

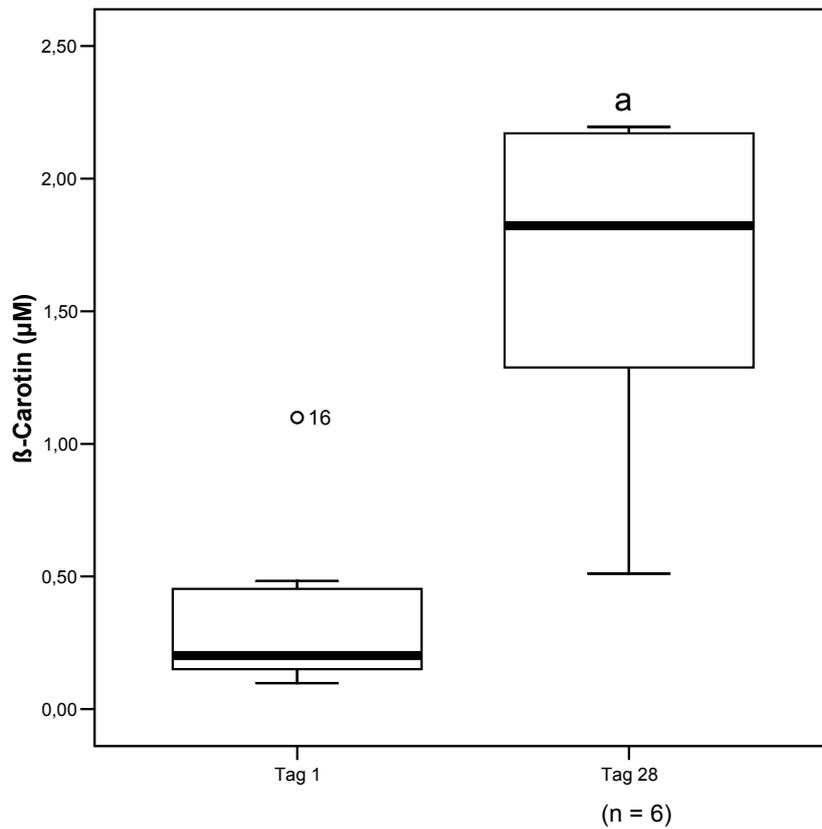


Abb 6: β -Carotinkonzentration im Plasma vor und nach 4-wöchiger Gabe des Trinkpräparates

a: statistisch signifikant versus Tag 1 ($p = 0,028$)

4.3.2 Vitamin C

Es wurde, wie in Abb. 7 dargestellt, eine statistisch signifikante Steigerung des L-Ascorbinsäurespiegels im Plasma von 37,2 μM (9,2-58,1 μM) auf 52,5 μM (36,5-87,2 μM) nach Einnahme des Trinksupplementes beobachtet ($p = 0,028$).

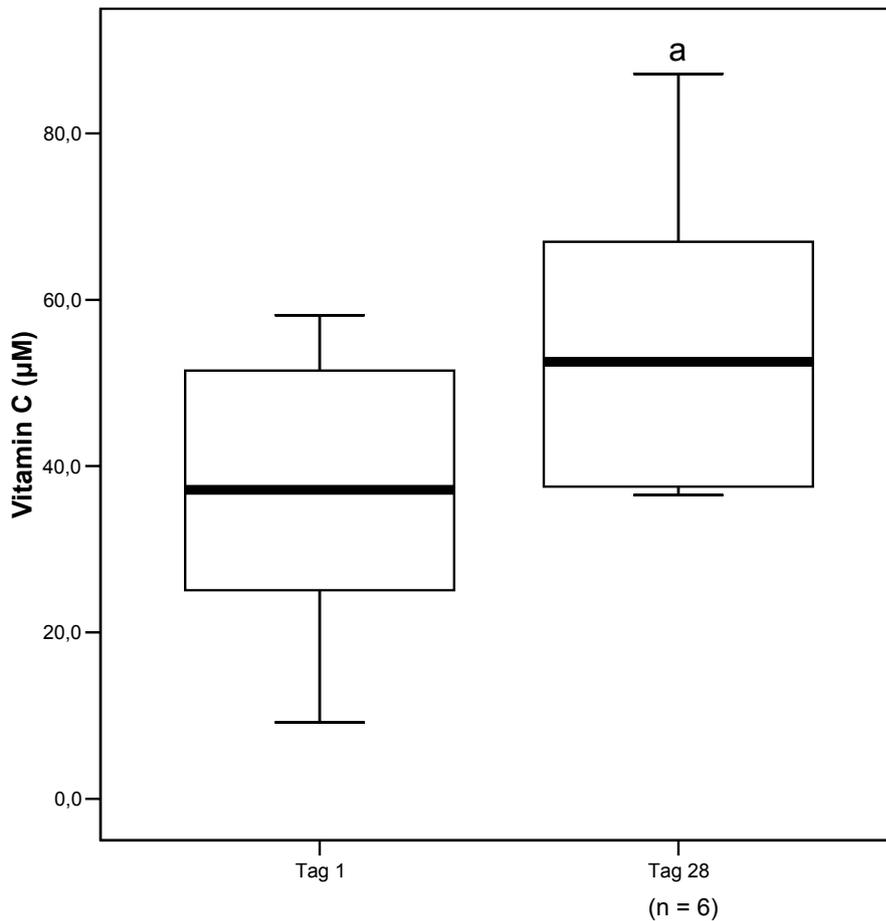


Abb 7: Vitamin C Konzentration im Plasma vor und nach 4-wöchiger Gabe des Trinkpräparates

a: statistisch signifikant versus Tag 1 ($p = 0,028$)

4.3.3 Selen und Zink

Es wurde ein statistisch signifikanter Anstieg der Plasmakonzentration von Selen nach Konsum des Trinkpräparates beobachtet ($p = 0,021$). Vor Studienbeginn betrug der Selen Plasmaspiegel $69,0 \mu\text{g/l}$ ($59\text{-}98 \mu\text{g/l}$) und nach der Intervention $121,0 \mu\text{g/l}$ ($73\text{-}154 \mu\text{g/l}$). Der Zink Plasmaspiegel lag vor der Intervention bei $9,3 \mu\text{mol/l}$ ($8,2\text{-}14,4 \mu\text{M}$), nach der Intervention bei $13,1 \mu\text{mol/l}$ ($8,7\text{-}13,5 \mu\text{M}$) und blieb somit unverändert. Die Selen- und Zinkspiegel im Plasma sind in Abb. 8 dargestellt.

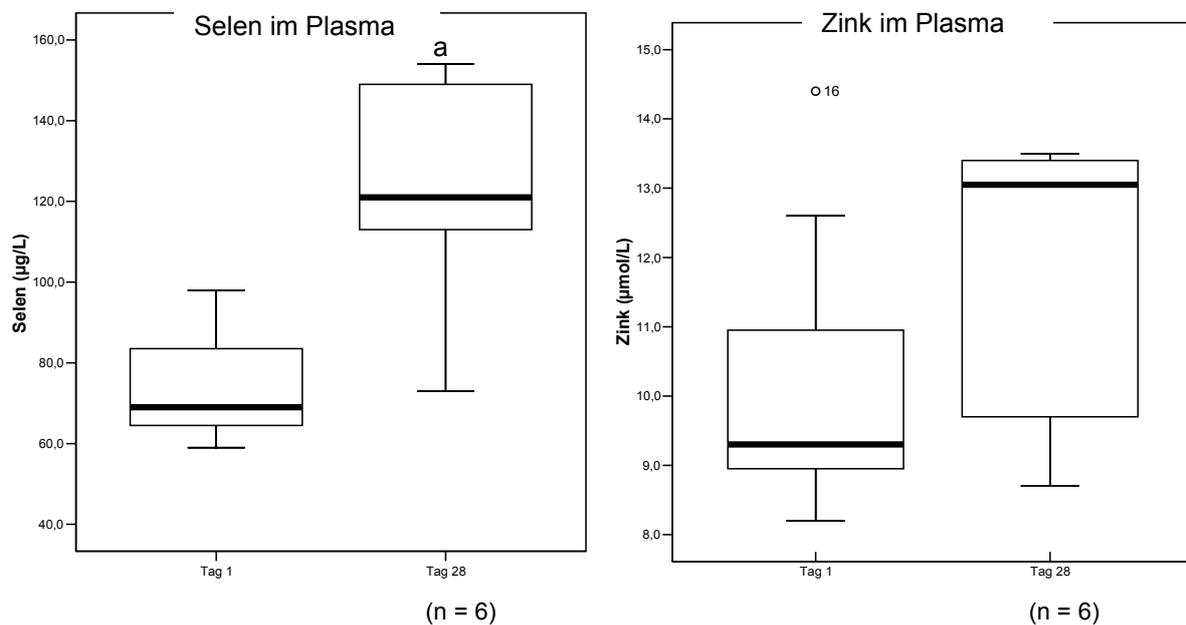


Abb 8: Selen- und Zinkspiegel im Plasma vor und nach 4-wöchiger Intervention

a: statistisch signifikant versus Tag 1 ($p = 0,021$)

4.3.4 Glutamin und Glutathion

Glutamin

Die Glutaminkonzentration im Plasma lag vor der Intervention bei 606,6 μM (149-857 μM) und nach der Intervention bei 587,5 μM (495-722 μM) (Abb. 9). Es wurde keine signifikante Veränderung nachgewiesen.

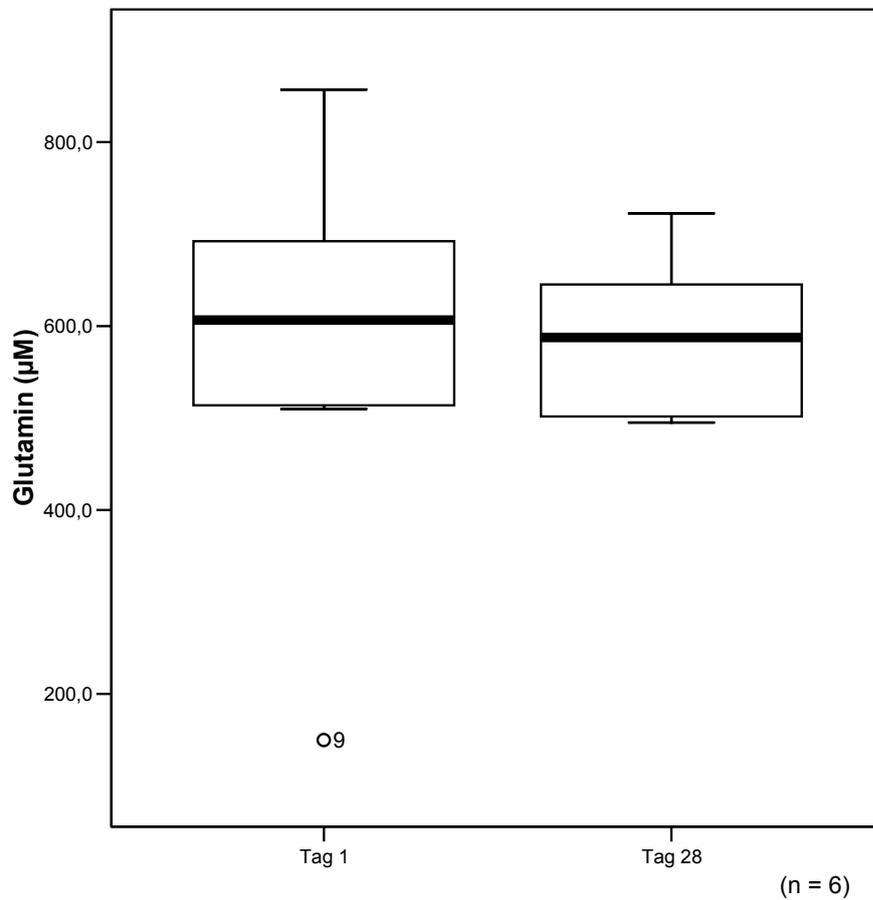


Abb 9: Glutaminkonzentration im Plasma vor und nach 4-wöchiger Intervention

Glutathion

Der Plasmaspiegel des Gesamtglutathions lag vor der Intervention bei $3,7 \pm 1,3 \mu\text{mol/l}$ und nach der Intervention bei $5,6 \pm 3,4 \mu\text{mol/l}$ und war nicht signifikant unterschiedlich.

Die Glutathionkonzentration der makroskopisch unauffälligen Darmmucosa (Rektum) lag vor Intervention bei $7,8 \mu\text{mol/g}$ ($6,1-10,4 \mu\text{mol/g}$) und nach Intervention bei $8,3 \mu\text{mol/g}$ ($0-16,3 \mu\text{mol/g}$). Dieser Unterschied war nicht signifikant. Die Mucosaproben der entzündeten Darmabschnitte hatten vor Intervention einen Glutathiongehalt von $4,4 \mu\text{mol/g}$ ($0,7-5,6 \mu\text{mol/g}$), nach der Intervention von $7,18 \mu\text{mol/g}$ ($6,0-14,5 \mu\text{mol/g}$) ($p = 0,043$). Die Mucosaproben aus den entzündeten Arealen wiesen vor der Intervention niedrigere Glutathiongehalte auf als die makroskopisch unauffälligen ($p = 0,018$). Nach der Intervention war kein Unterschied zwischen entzündeter und nicht entzündeter Mucosa nachweisbar (Abb. 10).

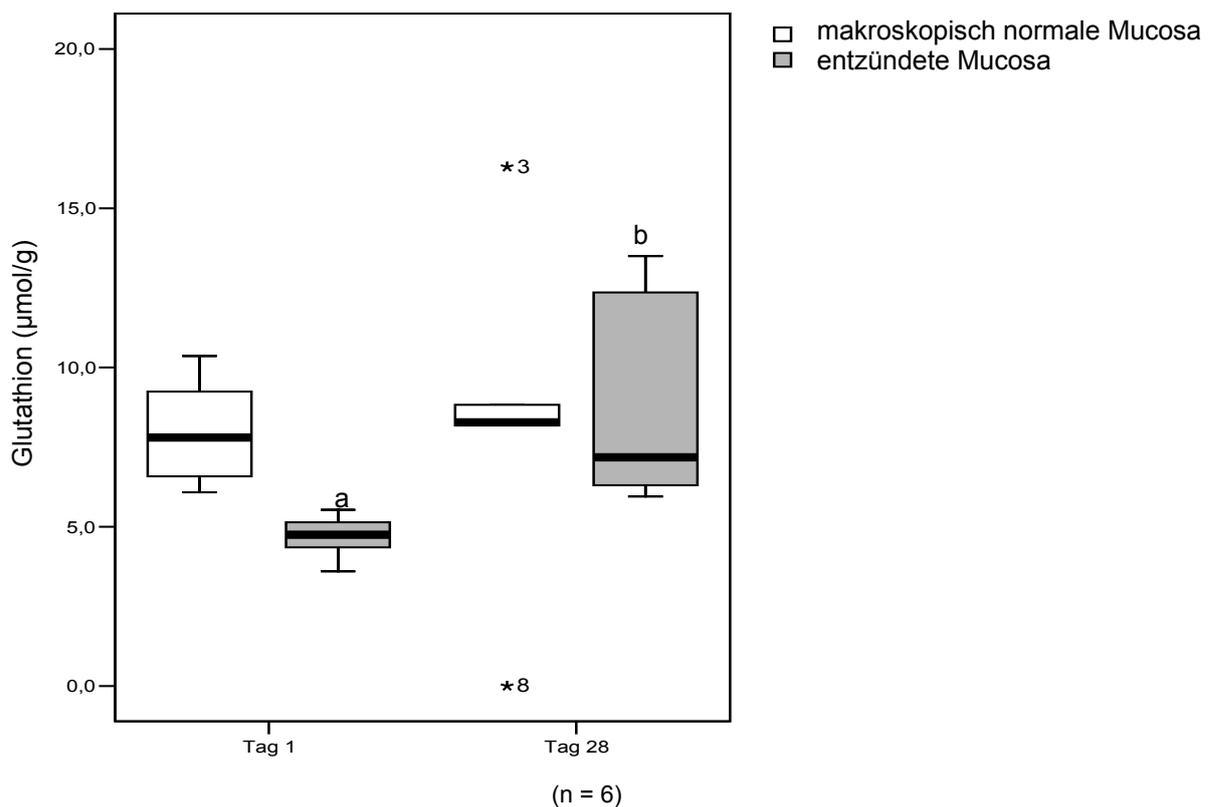


Abb 10: Gesamtglutathiongehalte entzündeter und nicht entzündeter Mucosa vor und nach 4-wöchiger Intervention

MR = makroskopisch unauffällige Mucosa aus Rektum, MX = entzündete Mucosa a: MX statistisch signifikant versus MR ($p = 0,018$), b: statistisch signifikant versus Tag 1 ($p = 0,043$)

4.3.5 Harnsäure

Der Harnsäurespiegel im Plasma veränderte sich während der Intervention nicht signifikant. Er lag vor der Intervention bei $4,1 \pm 1,4$ mg/dl ($n = 8$) und nach der Intervention bei $4,6 \pm 1,2$ mg/dl ($n = 6$).

4.3.6 Antioxidative Kapazität im Plasma

Die antioxidative Kapazität im Plasma nahm nach 4-wöchiger Intervention von 1,36 mM (1,28-1,62 mM) auf 1,54 mM (1,41-1,83 mM) um 0,18 mM Troloxäquivalente zu (Abb. 11). Dieser Anstieg war signifikant ($p = 0,027$).

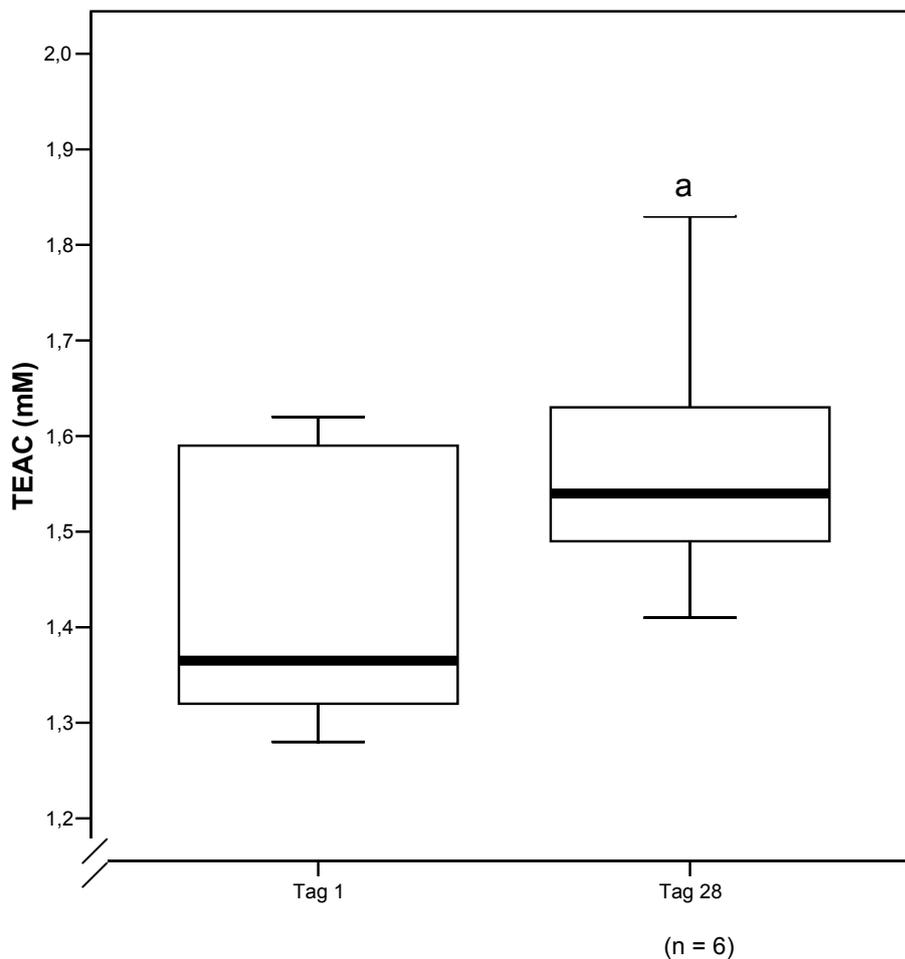


Abb 11: Antioxidative Kapazität im Plasma vor und nach 4-wöchiger Intervention

a: statistisch signifikant versus Tag 1

4.4 Oxidative Stressmarker in Plasma und Leukozyten

4.4.1 DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten

Das Ausmaß der endogenen DNA-Strangbrüche (TI_0 , TM_0) war nach der Intervention im Vergleich zu Studienbeginn unverändert. Die Tail Intensity lag zu Studienbeginn bei 6,4 % (2,1-12,7 %) und nach der Intervention bei 7,5 % (4,5-8,6 %) ($p = 0,173$). Das Tail Moment (TM_0) der endogenen Strangbrüche betrug vor der Intervention 2,3 (0,6-3,2) und nach der Intervention 2,0 (1,3-2,8) ($p = 0,599$).

Bei den H_2O_2 induzierten DNA-Strangbrüchen (TI_{300} , TM_{300}) wurden ebenfalls keine signifikanten Änderungen beobachtet. Die Tail Intensity, die nach H_2O_2 Belastung gemessen wurde, lag zu Studienbeginn bei 4,8 % (0-8,4 %) und nach der Intervention bei 1,8 % (0-10,2 %) ($p = 0,753$). Das H_2O_2 induzierte Tail Moment betrug vor der Intervention 0,4 (0-1,85) und nach der Intervention 0,64 (2,1-12,7) ($p = 0,345$).

Die oben angegebenen Werte sind in Abb. 12 als Boxplots graphisch dargestellt.

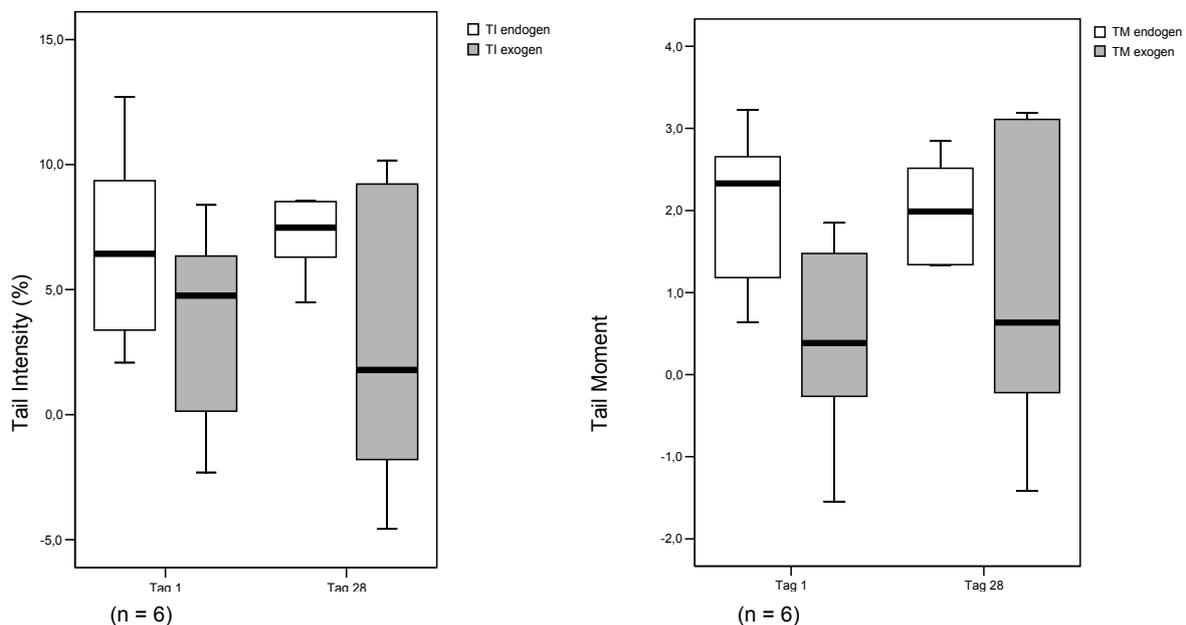


Abb 12: Endogene DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten als Tail Intensity (TI) bzw. als Tail Moment (TM) vor und nach 4-wöchigem Konsum des Trinkpräparates

4.4.2 8-Hydroxydesoxyguanosin

Die Konzentration von 8-OHdG im Plasma lag vor der Intervention bei $3,8 \pm 2$ ng/ml ($n = 8$) und nach der Intervention bei $2,7 \pm 0,9$ ng/ml ($n = 6$). Es waren keine signifikanten Veränderungen nachweisbar ($p = 0,249$).

4.4.3 Peroxide

Die Konzentration an Peroxiden im Plasma nahm nach der 4-wöchigen Einnahme des Prüfpräparates im Vergleich zu Studienbeginn signifikant ab ($p = 0,043$). Die Konzentration der Peroxide lag zu Studienbeginn bei 0,46 mM (0,1-0,6 mM) und nach der Intervention bei 0,32 mM (0,1-0,5 mM). In Abb. 13 ist die Konzentration der Peroxide im Plasma vor und nach Intervention dargestellt.

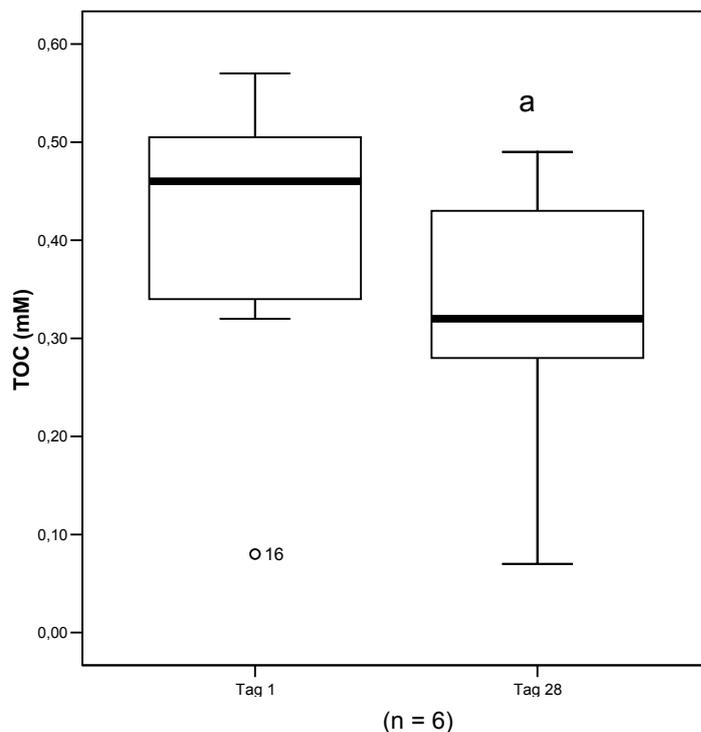


Abb 13: Peroxide im Plasma vor und nach Intervention (mM)

a: statistisch signifikant versus Tag 1 ($p = 0,043$)

4.4.4 8-Isoprostane

Die Konzentration der Isoprostane lag vor der Intervention bei $16,72 \pm 6,7$ pg/ml ($n = 8$) und nach der Intervention bei $18,3 \pm 5,5$ pg/ml ($n = 6$). Es war keine signifikante Veränderung nachweisbar ($p = 0,917$).

4.5 Inflammatorische Marker

In der Mucosa wurden die Entzündungsmarker IL-8 und MRP-14 untersucht. Der Transkriptspiegel von IL-8 in den entzündeten Gewebestellen lag vor der Intervention bei 2516 ± 4043 und nach der Intervention bei 5614 ± 12131 Transkripte/ μ l cDNA. In den makroskopisch normalen Rektumproben waren vor der Intervention 300 ± 692 Transkripte/ μ l cDNA nachweisbar und nach der Intervention 38 ± 50 Transkripte/ μ l cDNA. Die Transkriptspiegel vor und nach der Intervention waren weder in den entzündeten Gewebeproben noch in den Rektumproben signifikant unterschiedlich.

Die Transkriptspiegel von MRP-14 der entzündeten Gewebestellen lagen vor der Intervention bei 4268 ± 3774 Transkripte/ μ l cDNA und nach der Intervention bei 12161 ± 22189 Transkripte/ μ l cDNA. Bei den makroskopischen normalen Rektumproben lagen die Transkriptspiegel an Tag 1 bei 346 ± 386 Transkripte/ μ l cDNA und an Tag 28 bei 565 ± 738 Transkripte/ μ l cDNA. Auch diese Veränderungen waren nicht signifikant.

Die Spiegel der Entzündungsmarker in der Mucosa vor und nach der Intervention sind in Tab. 11 dargestellt.

Tab 11: Entzündungsmarker IL-8 und MRP-14 vor und nach Intervention (Transkripte/ μ l cDNA)

	Tag 1 (n = 8)	Tag 28 (n = 6)	p
IL-8 (entzündet)	2516 ± 4043	5614 ± 12131	0,5
IL-8 Rektum (makroskopisch normal)	300 ± 692	38 ± 50	0,180
MRP-14 (entzündet)	4268 ± 3774	12161 ± 22189	0,5
MRP-14 Rektum (makroskopisch normal)	346 ± 386	565 ± 738	1,0

IL-8=Interleukin 8, MRP-14=Myeloid Related Protein-14

Die makroskopisch normalen Rektumproben des MRP-14 wiesen signifikant geringere Transkriptspiegel auf als die Proben der entzündeten Mucosa ($p = 0,018$).

4.6 Deskriptive Parameter

4.6.1 Lebensqualität

Die Lebensqualität der Probanden war vor der Intervention mit durchschnittlich 128 Punkten (72-177 Punkte) signifikant geringer als nach der Intervention mit 170 Punkten (97-197 Punkte) ($p = 0,027$), wie in Abb. 14 dargestellt.

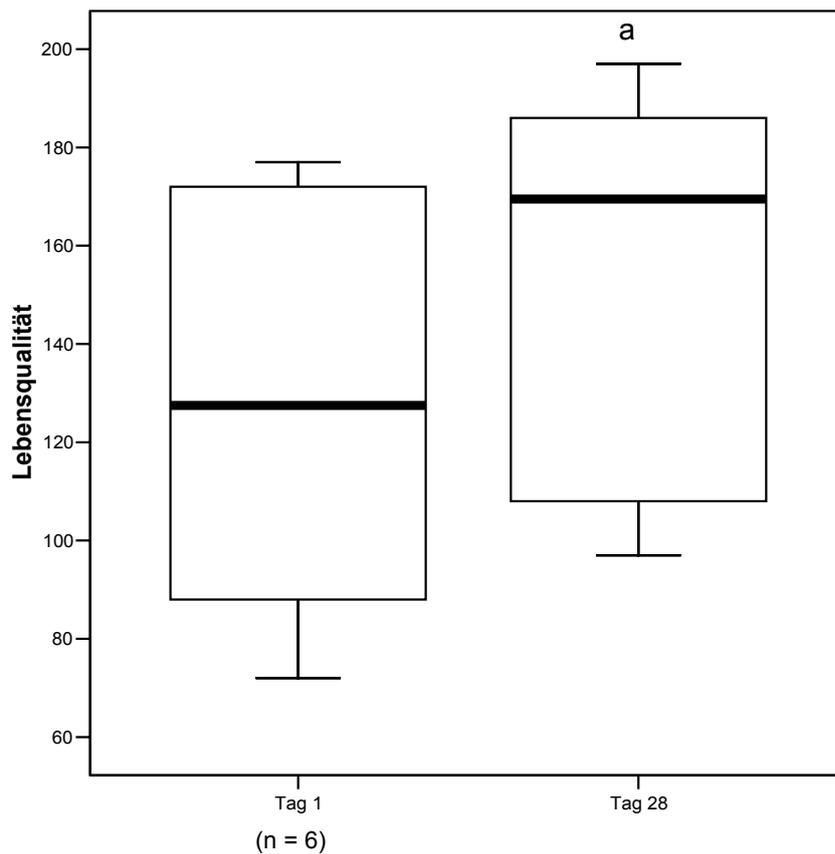


Abb 14: Einschätzung der Lebensqualität vor und nach Intervention bestimmt nach Guyatt *et al.* [117]

a: statistisch signifikant zu Tag 1 ($p = 0,027$)

4.6.2 Ernährungszustand

Laut SGA waren 4 Probanden normal ernährt, 3 mit Risiko zur Mangelernährung und 1 Patient war mangelernährt (n = 8). Betrachtet man hingegen den Präalbuminspiegel im Plasma, liegen 3 Probanden im unteren Referenzbereich < 150 mg/l, was auf ein mäßiges Defizit bezüglich Proteinversorgung hinweisen kann [118].

4.6.3 Präalbumin

Der Präalbuminspiegel im Plasma betrug zu Beginn der Studie durchschnittlich 184 ± 95 mg/l (n = 8), veränderte sich nicht signifikant und lag nach der Intervention bei 300 ± 63 mg/l (n = 6).

5 Diskussion

5.1 Studiendesign und Methoden

Viele Studien zeigen, dass MC-Patienten signifikant niedrigere Konzentrationen von Vitamin- und Spurenelementen im Plasma aufweisen als Gesunde und oxidative Stressmarker erhöht sind. Diese Störung des pro-/ antioxidativen Gleichgewichtes ist klinisch relevant, da die Expression von Entzündungsmarkern *in vitro* durch oxidativen Stress erhöht [119] und durch Zugabe von Antioxidantien *in vitro* verringert wird [85].

Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob der vierwöchige Konsum eines Trinksupplementes mit hohem Gehalt an Antioxidantien und Glutamin den antioxidativen Status steigern, den oxidativen Stress verringern, den Entzündungsprozess bei MC-Patienten vermindern kann und Einfluss auf die Lebensqualität hat. Dieser Zeitraum wurde gewählt, da nach Supplementation ähnlicher Dosen von Vitamin C und E über 4 Wochen eine signifikante Verbesserung des antioxidativen Status sowie eine Abnahme der oxidativen Stressmarker beobachtet wurde [39].

Um eine ausreichende Anzahl an Patienten als Studienteilnehmer zu gewinnen, die die Teilnahme Kriterien erfüllten und compliant waren, wurde die Intervention im Rahmen einer bizenrischen prospektiven Pilotstudie mit unkontrolliertem Design durchgeführt. In der vorliegenden Studie wurden in zwei klinischen Zentren über den Zeitraum von 14 Monaten 8 MC-Patienten konsekutiv rekrutiert.

Nutritive Aufnahme von Antioxidantien

Das 3-Tage Ernährungsprotokoll zeigt, wie hoch der Anteil der Antioxidantien war, die mit der Nahrung aufgenommen wurden, und in welchem Maße diese zur Gesamtaufnahme beigetragen hat. Diese Information hilft, die Wirksamkeit des Supplements auf den Antioxidantienspiegel im Plasma und oxidative Stressmarker abzuschätzen. Das ausgewählte Protokoll liefert repräsentative Daten zur Energie- und Nährstoffaufnahme [120].

Antioxidativer Status

Um zu überprüfen, ob sich durch die Supplementation der antioxidative Status verbessert, wurden vor und nach der Intervention verschiedene Substrate im Plasma quantifiziert, die mit dem Trinksupplement aufgenommen wurden (Vitamin C, E, β -Carotin, Selen, Zink, Glutamin). Zusätzlich wurde Glutathion in Plasma und Mucosa sowie die antioxidative Kapazität im Plasma bestimmt.

Da Tocopherol zusammen mit Lipoproteinen im Plasma vorliegt und da der Tocopherol Plasmaspiegel die höchste Korrelation mit der Cholesterolkonzentration zeigt ($r = 0,94$), wurde der Tocopherolstatus anhand des Tocopherol-Cholesterol Ratios beurteilt [53, 121]. Eine Messung der Plasmakonzentrationen von Ascorbinsäure und β -Carotin mittels HPLC lässt eine valide Aussage über die Versorgung mit beiden Nährstoffen zu. Die Messung des Retinolspiegels im Plasma allein ist nur bedingt aussagefähig, da Retinol homöostatisch geregelt wird [122]. Ein Retinolmangel im Plasma kommt daher selten vor, sollte aber in der vorliegenden Studie ausgeschlossen werden.

Die Messung von Selen im Plasma mittels AAS stellt eine standardisierte Methode zur Bestimmung der Selenversorgung dar. Selen hat als Cofaktor der GPx für die Beurteilung des antioxidativen Status eine wichtige Bedeutung.

Die Zinkkonzentration im Plasma wird häufig zur Beurteilung eines Zinkmangels herangezogen, obwohl sie nur begrenzt aussagefähig ist [123]. Da die Zinkkonzentration im Blut homöostatisch reguliert wird, verändert sich der Plasmazinkspiegel nur bei Erschöpfung der Zinkreserven [124]. Dennoch ist der Zinkspiegel im Plasma oder Serum ein häufig verwendeter Parameter, der unter kontrollierten experimentellen Bedingungen als Indikator für den Zinkstatus verwendet wird [124].

Zum Nachweis von Glutamin im Plasma wurde die OPA Methode nach Fuerst *et al.* [95] verwendet, die sich zur Beurteilung der Glutaminkonzentration im Plasma als spezifisch, sensitiv und reproduzierbar erwiesen hat. Die Glutathionkonzentration in Plasma und Mucosa wurde mittels etablierten HPLC-Verfahren gemessen [97].

Die antioxidative Kapazität diente als Parameter für den extrazellulären antioxidativen Status im Plasma. Dieser wird dadurch besser wiedergegeben als durch die Messung der einzelnen Antioxidantien im Plasma, da auch unbekannte Verbindungen sowie Synergieeffekte zur Gesamtwirkung beitragen können. Generell gibt es verschiedene Möglichkeiten die antioxidative Kapazität zu bestimmen. Der TEAC ist eine Standardmethode zur Messung der antioxidativen Kapazität [125], mit der man bei Patienten mit oxidativem Stress nach Gabe von Antioxidantien Effekte nachweisen konnte [126]. Zudem ist sie einfach durchführbar und kostengünstig.

Oxidativer Stress

Bei der Beurteilung des oxidativen Stresses ist es wichtig, verschiedene Parameter zu untersuchen, um eine verlässliche Aussage machen zu können. Die DNA-Strangbrüche in Leukozyten sowie das 8-OHdG ermöglichen eine Aussage über den Redoxstatus in der Zelle bzw. die Resistenz der DNA gegenüber ROS-induzierten Strangbrüchen. Da ROS, insbesondere Peroxylradikale, Doppelbindungen in Membranlipiden angreifen können, wurde die Lipidperoxidation im Plasma durch Messung der 8-Isoprostane quantifiziert. Außerdem wurden zusätzlich die Gesamtperoxide im Plasma nachgewiesen.

Der Comet Assay stellt eine sensitive Methode zur Quantifizierung oxidativer DNA-Schäden dar [127]. Während DNA-Strangbrüche in unbehandelten Zellen das Gleichgewicht zwischen auftretenden Schäden und Reparaturmechanismen *in vivo* widerspiegeln, wird bei *ex vivo* Behandlung mit H₂O₂ die intrazelluläre Radikalfängerkapazität erfasst [128]. Die exogenen DNA-Schäden reflektieren den Schutz vor DNA-Schäden durch nicht-enzymatische Antioxidantien, da die enzymatischen Antioxidantien einschließlich der Reparaturenzyme bei 4 °C inaktiviert sind [110, 128, 129]. Giovannelli *et al.* [106] stellten fest, dass die Verwendung von Vollblut im Comet Assay zur Messung von DNA-Schäden in peripheren Leukozyten günstiger ist als der Einsatz von Subpopulationen, weil die Dichtegradientenisolation Artefakte hervorruft. Artefakte durch Isolation einzelner Zelltypen können daher ausgeschlossen werden.

8-OHdG ist ein DNA Addukt, das durch spezifische Endonukleasen eliminiert werden kann, die auch in polymorphonukleären Leukozyten vorkommen [130]. Oxidierte Basen aus den Zellen liegen zunächst im Plasma vor, bevor sie über den Urin ausgeschieden werden, und stellen somit die Schadensrate der DNA dar [131]. Erhöhte 8-OHdG Spiegel im Plasma können aus einem defizitären antioxidativen Schutz der DNA in der Mucosa resultieren. 8-OHdG ist selbst mutagen [132]. In der vorliegenden Studie wurde ein ELISA Testkit zur Messung von 8-OHdG im Plasma eingesetzt. Eine Bestimmung von 8-OHdG mittels HPLC ist der Goldstandard. Eine Untersuchung von Moller & Loft [133] zeigte, dass der Korrelationskoeffizient bei optimierten ELISA Tests zwischen HPLC und ELISA Verfahren relativ hoch war ($r = 0,88$), so dass alternativ auch ELISA Verfahren verwendet werden können.

Der TOC-Test ist ein sensitives ELISA Verfahren, mit dem Gesamtperoxide im Plasma nachgewiesen werden können. Eine Quantifizierung aller Peroxide (Lipid- und Hydroperoxide) ist sinnvoll, um das Ausmaß des oxidativen Stresses im Plasma insgesamt bewerten zu können.

Die Messung von Isoprostanen gilt als Goldstandard zur Erfassung von oxidativem Stress *in vivo*. Aktuelle Untersuchungen machen deutlich, dass Isoprostane der verlässlichste Marker für Lipidperoxidation sind [134-138] und im Hinblick auf Spezifität den TBARS überlegen sind [139, 140]. Sie kommen unter physiologischen Bedingungen in geringen Konzentrationen in Plasma und Urin vor. Die genaueste und sensitivste Methode zum Nachweis der Isoprostane ist die GC-MS [69]. In der vorliegenden Studie wurde jedoch aus praktischen Gründen ein ELISA Testkit verwendet, das eng mit dem GC/MS Verfahren korreliert ($r = 0,99$), so dass valide Daten zu erwarten sind.

Inflammatorische Marker

Das Spektrum der chronisch-entzündlichen Erkrankungen reicht von meist segmentalen Prozessen mit minimalen systemischen Reaktionen bis hin zu heftiger Erkrankung mit starken gastroenterologischen Symptomen und systemischen Manifestationen [112]. Eine systemische Entzündung, die durch erhöhte CRP und ESR Spiegel angezeigt wird, ist daher nur ein indirekter Hinweis auf die inflammatorische Aktivität im Darm. Daher wurden in der vorliegenden Studie lokale Entzündungsmarker in den betroffenen Darmabschnitten untersucht. Die Quantifizierung der Transkriptspiegel proinflammatorischer Cytokine in der Mucosa durch RT-PCR stellt eine einfache und objektive

Methode dar, die verlässliche Ergebnisse liefert. Diese Bestimmung der mRNA Transkriptspiegel von IL-8 und MRP-14 dient zur Abschätzung der inflammatorischen Aktivität und ist geeignet zur Verlaufskontrolle bei Patienten mit Morbus Crohn [141] sowie zur Beurteilung der Wirksamkeit einer diätetischen Maßnahme [142]. Um beurteilen zu können inwieweit die Intervention zu einer Abnahme der mukosalen Entzündung führt, wurden die IL-8 und MRP-14 Transkriptspiegel in der entzündeten Mucosa gemessen. Zusätzlich wurde die Bestimmung in makroskopisch unauffälligen Darmabschnitten (Rektum) als Kontrolle durchgeführt.

Lebensqualität

Mit Hilfe der Durchführung des IBDQ Fragebogens vor und nach der Intervention sollte überprüft werden, ob durch die Supplementation eine Besserung der klinischen Symptome und der Lebensqualität erreicht werden kann. Der IBDQ ist ein validierter Fragebogen zur Lebensqualität, bei dem eine Punktschätzung ermittelt wird, die mit dem CDAI korreliert ($r = 0,74$) [143, 144]. Da der IBDQ kurzfristige Änderungen der Symptomatik und dadurch bedingten Einschränkungen im alltäglichen Leben abfragt [144], ist er ein besonders geeigneter Marker, um die Wirkung einer Intervention auf die Lebensqualität in klinischen Studien beurteilen zu können [145].

Ernährungsstatus

In der vorliegenden Arbeit wurde das SGA ermittelt, da es ein guter Marker zur Einschätzung des Ernährungsstatus ist und sich als prognostischer Marker bei chirurgisch-internistischen und geriatrischen Patienten erwiesen hat [146].

Da Präalbumin zur Beurteilung des Vitamin A Status mitbestimmt wurde und ebenfalls ein Marker zur Einschätzung des Ernährungszustandes ist, wurde Präalbumin zusätzlich zum SGA zur Beurteilung des Ernährungszustandes herangezogen.

5.2 Antioxidantiver Status in Plasma und Mucosa

In einigen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die Plasmaspiegel von Vitamin E, Vitamin A, β -Carotin und Vitamin C bei MC-Patienten (Rezidiv und Remission) signifikant geringer sind im Vergleich zu Gesunden [29, 30, 52-56]. In der vorliegenden Studie sollte deshalb festgestellt werden, ob durch die Gabe des Trinksupplementes die Spiegel der Antioxidantien ansteigen.

Die Konzentration von Tocopherol im Plasma war in der vorliegenden Studie nach vierwöchiger Intervention signifikant höher als zu Studienbeginn (Abb. 5). Morrissey *et al.* [147] geben als Grenzwert für einen Mangel 2,2 μmol α -Tocopherol/mmol Cholesterol an. In dieser Studie lag der α -Tocopherol-Cholesterol Quotient bei 9,1 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ vor Intervention und bei 20,0 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ nach der Intervention. Es gibt keine vergleichbaren Studien, bei denen Tocopherol auf Cholesterol bezogen wurde. Bei MC-Patienten kommt Hypocholesterinämie infolge einer geringeren LDL-Konzentration vor [58].

In einer Interventionsstudie von Aghdassi *et al.* [39] erhielten MC-Patienten in Remission über 4 Wochen 537 mg Tocopherol/d. Nach der Intervention war ein signifikanter Anstieg des Tocopherolspiegels im Plasma nachweisbar. Diese Studie ist sehr gut vergleichbar mit der vorliegenden Studie, da die Patienten eine ähnlich hohe Tocopheroldosis erhielten (500 mg α -Tocopherol/d) und die Studiendauer bei beiden Studien 4 Wochen betrug. Bei Aghdassi *et al.* war der Anstieg von Tocopherol im Plasma von 26,5 μM auf 69,1 μM (+ 160 %) etwas geringer als in dieser Studie, in der ein Anstieg von 37,5 μM auf 105 μM gemessen wurde (+ 185 %). Es ist unklar, weshalb die absoluten Tocopherol Plasmaspiegel bei Aghdassi *et al.* geringer waren als in der vorliegenden Studie. Weiterhin ist unklar, weshalb der Anstieg in der vorliegenden Studie höher war, zumal die Patienten bei Aghdassi *et al.* in Remission waren und somit höhere Plasmaspiegel zu erwarten gewesen wären, während in der vorliegenden Studie die meisten Probanden im Rezidiv waren. Da der Cholesterolspiegel bei MC-Patienten häufig geringer ist als bei Gesunden, wäre es sinnvoll, die Tocopherolspiegel auf Cholesterol zu beziehen, wie es in der vorliegenden Studie gemacht wurde, um eine valide Aussage zu erhalten.

Zwei weitere Untersuchungen stammen von Trebble *et al.* [90] und Geerling *et al.* [87]. In beiden Studien war die tägliche Tocopheroldosis deutlich geringer als in den bereits genannten Studien. Bei Geerling *et al.* nahmen die Probanden 8 mg Vitamin E/d über 3 Monate zu sich und bei Trebble *et al.* 30 mg/d über eine Dauer von 6 Monaten.

Treble *et al.* untersuchten MC-Patienten im akuten Schub und Geerling *et al.* MC-Patienten in Remission. Bei Geerling zeigte sich nach 3 Monaten trotz der geringen Dosis ein Anstieg der Tocopherolkonzentration im Plasma, bei Treble *et al.* war kein Anstieg der Plasmakonzentration nachweisbar. Die im Vergleich zu anderen Studien relativ niedrige Dosis war bei Patienten im akuten Stadium in der Studie von Treble *et al.* wahrscheinlich zu gering, um einen messbaren Anstieg der Vitamin E Konzentration im Plasma hervorzurufen. In Remission war sie offenbar ausreichend, so dass der Plasmaspiegel bei Geerling *et al.* anstieg.

Nach vierwöchiger Gabe des Trinkpräparates stieg der Retinol Plasmaspiegel in der vorliegenden Studie signifikant an (Abb. 4). Dieser Anstieg könnte auf den β -Carotinhalt des Trinkpräparates zurückzuführen sein, da β -Carotin im Organismus zur Vitamin A Synthese herangezogen wird. Mit dem Prüfpräparat wurden in der Studie von Geerling *et al.* täglich 0,38 mg Retinol Äquivalente/d zugeführt. Die Retinolspiegel im Plasma wurden nicht bestimmt. In der Interventionsstudie von Treble *et al.* enthielt das Prüfpräparat 150 μ g β -Carotin. Ein Anstieg von β -Carotin und/oder Retinol wäre eventuell zu erwarten gewesen, es wurden jedoch weder der β -Carotinspiegel noch der Retinolspiegel im Plasma untersucht.

Die Vitamin A Serumkonzentration korreliert mit der Konzentration von Retinol-bindendem Protein und Präalbumin, die im Verhältnis 1:1:1 im Plasma vorliegen [148]. Da sowohl der Retinol- als auch der Präalbuminspiegel bei dem untersuchten Probandenkollektiv zu Studienbeginn im Normbereich lagen und der Retinolspiegel nach der Intervention signifikant angestiegen ist, hat vermutlich eine Absorption des β -Carotins sowie eine Umsetzung zu Retinol stattgefunden.

Der β -Carotinspiegel stieg in der vorliegenden Studie nach 4-wöchiger Intervention signifikant an (Abb. 6). Die tägliche β -Carotinaufnahme lag mit 10 mg/d deutlich über der β -Carotindosis, die das Prüfpräparat in der Studie von Treble *et al.* enthielt (150 μ g/d). Bei Treble *et al.* wurde kein Anstieg des β -Carotin Plasmaspiegels festgestellt, was sicherlich auf die geringe Dosierung des Präparates zurückzuführen ist. Auch Geerling *et al.* und Aghdassi *et al.* stellten keine Veränderung des β -Carotin- und Retinolspiegels fest. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da das Supplement in der Studie von Aghdassi *et al.* kein β -Carotin enthielt.

Die vorliegende Studie ist die einzige, in der sich nach Supplementierung von β -Carotin ein signifikanter Anstieg von β -Carotin im Plasma zeigte.

Es erfolgte die Supplementation über 4 Wochen, die Dosierung des Trinksupplementes war vergleichsweise hoch (1500 mg Vitamin C, 500 mg Vitamin E, 10 mg β -Carotin, 300 μ g Selen, 20 mg Zink/d) und das Probandenkollektiv setzte sich gemäß CDAI aus Remissions- und Rezidivpatienten zusammen. Da die Studie nicht placebo-kontrolliert durchgeführt wurde, kann der Anstieg der Antioxidantien nicht mit Sicherheit auf das Trinkpräparat zurückgeführt werden. Aufgrund der hohen Dosierung scheiden andere Erklärungsmöglichkeiten jedoch aus.

Vitamin C ist das bedeutendste nutritive wasserlösliche Antioxidans im Plasma. In vielen Studien wurde ein signifikant niedrigerer Vitamin C Plasmaspiegel bei MC-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen gemessen [13, 30, 32, 52, 55, 76].

Nach Gabe des hochdosierten Trinkpräparates (Aufnahme 1500 mg Vitamin C/d) stieg die Vitamin C Konzentration im Plasma signifikant an (Abb. 7). Einen signifikanten Anstieg der Ascorbinsäurekonzentration im Plasma beobachteten auch Aghdassi *et al.* [39] nach 4-wöchiger und Geerling *et al.* [87] nach 12-wöchiger Gabe eines Vitaminpräparates bzw. einer Formula. Bei Aghdassi *et al.* war die täglich zugeführte Vitamin C Dosis mit 1000 mg/d deutlich höher als die von Geerling *et al.* mit 40 mg/d. Es scheint, dass sowohl durch eine hohe Dosierung über 4 Wochen als auch durch eine niedrige Dosierung über 12 Wochen ein signifikanter Effekt erzielt werden kann. Es bleibt jedoch unklar, ob diese Effekte auch bei einem Mischkollektiv (Remission- und Rezidivpatienten) wie in der vorliegenden Studie erzielt worden wären, da beide oben genannten Untersuchungen mit Patienten in Remission durchgeführt wurden.

Treble *et al.* [90] stellten keine signifikante Zunahme der Ascorbinsäure im Plasma fest. Dass bei Treble *et al.* [90] die tägliche Ascorbinsäuredosis mit 90 mg/d noch über der von Geerling verwendeten Dosis lag und die Interventionsdauer mit 6 Monaten sogar noch länger war, ist wahrscheinlich mit dem hohen Bedarf im Vergleich zur Remission zu erklären.

Aghdassi *et al.* beobachteten einen Anstieg des Ascorbinsäurespiegels von 52,6 auf 89,7 μ mol/l (+ 70 %) bei Nichtrauchern. In der vorliegenden Studie wurden vor Intervention 36,9 und nach Intervention 55,6 μ mol/l Vitamin C im Plasma festgestellt (+ 50%). Vermutlich war der Anstieg des Vitamin C Gehalts im Plasma in dieser Studie geringer, weil 75 % der Probanden Raucher waren und dadurch bedingt reduzierte Antioxidantiengehalte im Plasma aufweisen [149].

Deshalb ist der stärkere Anstieg bei Aghdassi *et al.* wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Probanden in Remission waren und zudem generell höhere Plasma Ascorbinsäurespiegel aufwiesen. Die geringeren Ascorbinsäurespiegel zu Beginn der Studie könnten in der vorliegenden Studie auf eine geringere Aufnahme von Ascorbinsäure mit der Nahrung zurückzuführen sein, da MC-Patienten häufig Unverträglichkeiten bei dem Konsum von Obst und Gemüse aufweisen. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist, dass bei Patienten, v.a. bei Rauchern, im akuten Schub der Bedarf an Antioxidantien höher ist als bei Patienten in Remission.

Ein Verlust von L-Ascorbinsäure durch die Lagerung der Proben kann in der vorliegenden Studie ausgeschlossen werden, da dem Plasma sofort nach der Gewinnung Metaphosphorsäure zugesetzt wurde. Dieser Zusatz verhindert eine Autoxidation und stellt somit einen Erhalt der L-Ascorbinsäure nach Blutentnahme sicher [150]. Ein Zusatz von Metaphosphorsäure wurde bei Aghdassi *et al.* nicht beschrieben, ein Lagerungsverlust von Ascorbinsäure ist jedoch unwahrscheinlich aufgrund der hohen Konzentrationen, die gemessen wurden.

Ein Vergleich der Ascorbinsäuredaten in verschiedenen Studien ist schwierig, da die Verfahren zur Vitamin C Bestimmung sehr unterschiedlich sind. Deshalb ist es üblich, für jede Analytik die spezifischen Referenzwerte anzugeben. In dieser Studie liegen die von Speek *et al.* [151] angegebenen Referenzwerte für die verwendete Methode bei 17-79 $\mu\text{mol/l}$. So betrachtet, zeigen die L-Ascorbinsäurespiegel, dass die Baseline-Werte zu Studienbeginn im unteren Drittel des Referenzbereichs lagen und nach der Intervention im mittleren Bereich. Bei den anderen Untersuchungen wurden keine Aussagen hierzu gemacht.

Selen und Zink

Zahlreiche Studien belegen, dass MC-Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe einen niedrigeren Plasma-Selenstatus haben [30, 60, 74, 75, 79]. Da Selen Cofaktor der GPx ist, trägt es indirekt zum antioxidativen Schutz des Körpers bei. Mit Ausnahme von Wendland *et al.* [32] wurde in allen Studien festgestellt, dass die Selenkonzentration bei MC-Patienten im akuten Schub im Vergleich zu Gesunden signifikant reduziert ist [29, 30, 75, 152].

In der vorliegenden Studie wurde wie erwartet ein signifikanter Anstieg der Selenkonzentration im Plasma beobachtet (Abb. 8). Es existiert eine Interventionsstudie von Geerling *et al.* [87], in der die Selenkonzentration sowie die GPx-Aktivität nach 3-monatiger Gabe eines selenhaltigen Präparates bei MC-Patienten untersucht wurde. Dort konnte kein signifikanter Anstieg der GPx-Aktivität und des Plasmaselens festgestellt werden [87].

In der vorliegenden Studie lag der Selenspiegel im Plasma vor der Intervention bei 74,6 µg/l und nach der Intervention bei 121,8 µg/l. Das entspricht einem Anstieg von 63 %. Bei Geerling *et al.* lag der Selenspiegel vor Intervention bei 72,4 µg/l und nach der Intervention bei 75,6 µg/l (+ 4 %). Der Anstieg von Selen im Plasma in der vorliegenden Studie ist wahrscheinlich durch die deutlich höhere Dosis bedingt, die täglich mit dem Trinkpräparat aufgenommen wurde (300 µg/d). Verglichen mit der Dosis des Prüfpräparates bei Geerling *et al.* [87] fällt auf, dass dieses mit 12,4 µg/d nur ca. 4,1 % der Menge enthielt, die im Trinkpräparat der vorliegenden Studie enthalten ist. Zudem trägt es in Hinblick auf den Schätzwert für die Selenzufuhr von 30-70 µg nur unwesentlich zur wünschenswerten Zufuhr bei [153].

Dieser Anstieg im Plasma ist günstig zu bewerten, da ein niedriger Selenspiegel sowie eine geringe GPx-Aktivität akute und chronische Entzündungen im mukosalen Epithel auslösen bzw. verstärken könnte [154]. Bisher konnten bei Patienten mit Morbus Crohn allerdings keine Korrelationen zwischen Plasmaselen, dem CDAI und Entzündungsmarkern festgestellt werden [152].

Studien, in denen der Zinkspiegel von MC-Patienten im Plasma im Vergleich zu Gesunden untersucht wurde, zeigten widersprüchliche Ergebnisse [74, 155-163]. Der Zinkgehalt im Plasma veränderte sich in der vorliegenden Studie nach Supplementierung von 20 mg Zink/d nicht signifikant (Abb. 8). Diese Beobachtung machten auch Geerling *et al.* [87] nach 3-monatiger Supplementation einer zinkhaltigen Formula (4,6 mg Zink/d).

Die Zinkdosis war wahrscheinlich in beiden Studien zu gering, um einen Anstieg des Plasmazinkspiegels zu erreichen. Verglichen mit den Referenzwerten von 7 bzw. 10 mg/d (D-A-CH Referenzwert 2000) sind 4,6 mg sehr wenig. Die mit dem Präparat zugeführten 20 mg/d entsprechen dem doppelten der empfohlenen Zufuhrmengen, was beispielsweise im Vergleich mit den im Präparat enthaltenen Vitamin C und E Dosen vergleichsweise gering ist.

Im Gegensatz dazu beobachteten Mulder *et al.* [157] und Sturniolo *et al.* [89] nach Zink-supplementierung einen Anstieg des Zinkspiegels im Plasma. In der Interventionsstudie von Sturniolo *et al.* erhielten 12 Morbus Crohn Patienten 8 Wochen lang 330 mg Zink/d und bei Mulder *et al.* wurde eine Zinksupplementation mit 300 mg Zinkaspartat/d (= 60 mg elementares Zink) über 4 Wochen durchgeführt. Vermutlich ist der Anstieg der Serumkonzentration bei Sturniolo *et al.* und Mulder *et al.* durch die höhere Dosierung (330 mg/d bzw. 60 mg/d) zu erklären. Sehr hohe Zinkgaben wie bei Sturniolo *et al.* und Mulder *et al.* können die Plasma Zinkkonzentration kurzfristig auch bei Patienten ohne Zinkmangel stark anheben, bis der Zinkplasmaspiegel reguliert wird und absinkt [124].

Daher ist es verständlich, dass nach einer vierwöchigen Aufnahme einer Zinkdosis, die dem 2-fachen des D-A-CH Referenzwertes entspricht, kein Anstieg im Plasma nachgewiesen werden konnte.

Einige Studien haben bei MC-Patienten einen Zinkmangel im Plasma beobachtet: Naber *et al.* [164] bei 68 %, Krus *et al.* [165] bei 34 % und Sjogren *et al.* [166] hingegen nur bei 17 % der untersuchten MC-Patienten. Vermutlich sind diese unterschiedlichen Ergebnisse durch die sehr heterogenen Probandenkollektive zu erklären. Leider wurden hierzu keine genaueren Angaben gemacht. In der vorliegenden Studie hatten 5 der 8 Probanden vor der Intervention einen Plasmaspiegel < 10 µM und nach der Intervention waren es noch 2 der 6 Probanden, deren Plasmaspiegel unter dem Referenzbereich lagen.

Da Zink an Plasmaproteine gebunden transportiert wird [167], kann die Serumzinkkonzentration aufgrund von akuter Entzündung oder Hypoalbuminämie absinken. So kann wahrscheinlich der niedrige Plasmazinkgehalt, der bei einigen Studien festgestellt wurde, durch einen Abfall des Serumalbumins bedingt sein und somit eine Abnahme der Zinkkonzentration im Serum erklären. Dieser Abfall im Serum ist also Folge der Entzündung und bleibt asymptomatisch [164, 168]. Da in der vorliegenden Studie die Albuminspiegel im Plasma nicht untersucht wurden, kann diesbezüglich keine Aussage gemacht werden. Eine Malabsorption von Zink ist unwahrscheinlich, da Zink im oberen Dünndarm absorbiert wird und bei MC-Patienten meist das terminale Ileum oder das Kolon betroffen sind.

Glutamin

Glutamin ist ein primäres Energiesubstrat und Stickstoffdonor für Enterozyten und Kolozyten, die eine hohe Zellteilungsrate aufweisen. Eine Glutaminsupplementation beeinflusst damit die Integrität der Mucosa [169]. Glutamin ist zudem Bestandteil von Glutathion [170]. In der vorliegenden Studie wurden mit dem Supplement täglich 30 g synthetische Glutamindipeptide als Glutaminquelle mit hoher Bioverfügbarkeit zugeführt. Wie in Abb. 9 dargestellt veränderte sich der Glutamin Plasmaspiegel nicht signifikant und lag sowohl vor als auch nach der Intervention im Referenzbereich (438-827 μM) [171].

Das steht in Einklang mit den Ergebnissen von Den Hond *et al.* [172], die bei einer 4-wöchigen Supplementation von 21 g Glutamin/d bei einem gemischten Kollektiv aus Rezidiv- und Remissionspatienten ebenfalls keine signifikante Änderung des Glutaminspiegels im Plasma feststellen konnten.

Da sowohl in der vorliegenden Studie als auch in der Untersuchung von Den Hond *et al.* die Glutaminkonzentrationen im Referenzbereich lagen, ist fraglich, ob bei MC-Patienten ein zusätzlicher Bedarf an Glutamin vorliegt.

Eine Untersuchung von Boureille *et al.* [173] belegt, dass es keinen Bedarf für Glutaminsupplementation bei Patienten, die in Remission sind und einen guten Ernährungsstatus haben, gibt, da die Umsatzrate des Glutamins im Normalbereich lag [173]. Es wurde jedoch nicht ausgeschlossen, dass MC-Patienten im akuten Schub einen höheren Bedarf haben. In einer Studie von Akobeng *et al.* [174] wurde der Einfluss einer glutaminangereicherten Diät bei Kindern mit aktivem Morbus Crohn untersucht. Es zeigte sich, dass in der Gruppe, die eine glutaminangereicherte Diät zu sich nahm, keine Veränderung des pädiatrischen CDAI (PCDAI) festgestellt werden konnte, während in der Niedrig-Glutamingruppe der PCDAI sank. Bei Den Hond *et al.* [172] wurde der CDAI durch die Glutaminsupplementation ebenfalls nicht beeinflusst. Zusätzlich konnte auch keine Veränderung der intestinalen Permeabilität beobachtet werden.

In der vorliegenden Studie wurde der CDAI nur zu Studienbeginn erfasst. Die Lebensqualität, die mittels IBDQ ermittelt wurde, korreliert negativ mit dem CDAI ($r = 0,67$) [143, 144]. Da die Lebensqualität signifikant gestiegen ist, ist es wahrscheinlich, dass der CDAI gesunken ist. Allerdings ist kein klarer Bezug zu Glutamin möglich, da Glutamin nur eine Komponente des Supplementes war und die Studie nicht placebo-

kontrolliert durchgeführt wurde. Effekte durch die Medikation auf die Lebensqualität bzw. den CDAI sind nicht auszuschließen.

Glutathion

Glutathion verhindert die Oxidation von Sulfhydrylgruppen in Proteinen und regeneriert das Tocopheryl-Radikal. Glutathionmangel begünstigt oxidativen Stress, indem dieser die Expression proinflammatorischer Cytokine stimuliert [171]. Daher spielt dieser eine wichtige Rolle in der Pathogenese vieler Erkrankungen, u. a. bei Morbus Crohn [175].

Vor der Supplementation wies kein Proband eine Glutathionkonzentration im Plasma unterhalb des Referenzwertes von 2,88 $\mu\text{mol/l}$ auf und die Konzentration blieb unverändert. Da die Methode zum Nachweis von Glutathion sehr sensitiv und spezifisch ist, hat scheinbar kein Anstieg des Spiegels im Plasma stattgefunden.

Es gibt keine Untersuchungen, in denen der Glutathionspiegel im Plasma bei erwachsenen MC-Patienten gemessen wurde. Das kann darauf zurückzuführen sein, dass Glutathion nur in geringen Mengen extrazellulär (2-20 $\mu\text{mol/l}$) und in ca. 500-facher Konzentration intrazellulär vorliegt (0,5-10 mmol/l) [175].

Die Tatsache, dass Cystein die limitierende Aminosäure für die Glutathionsynthese ist [176, 177], könnte erklären, wieso sich die Glutathionsynthese in der vorliegenden Studie nicht verändert hat. Da die Glutathionspiegel vor der Intervention im Normalbereich lagen (2,88-3,25 $\mu\text{mol/l}$) [178] und bei Hoffenberg durch kompensatorische Steigerung des antioxidativen Status erhöht waren, war ein Anstieg nicht zu erwarten. Es ist jedoch unklar, wie gut beide Untersuchungen miteinander vergleichbar sind, da bei Hoffenberg *et al.* [13] reduziertes Glutathion gemessen wurde.

Da Glutathion intrazellulär das wichtigste zelluläre Antioxidans ist, das physiologischerweise als Redoxpuffer den antioxidativen Status in der Mucosazelle aufrechterhält [170], wurde in der vorliegenden Studie der Glutathiongehalt in der Mucosa gemessen. Hierbei wiesen die Proben der entzündeten Mucosa zu Studienbeginn signifikant geringere Glutathiongehalte auf als die Proben der makroskopisch normalen Darmabschnitte (Abb. 10).

Im Gegensatz dazu konnten Kruidenier *et al.* [81] sowie Miralles-Barrachina *et al.* [27] keine signifikanten Unterschiede im Glutathiongehalt bei entzündeter im Vergleich zu

nicht-entzündeter Mucosa von MC-Patienten nachweisen, obwohl in diesen Studien ausschließlich Patienten im akuten Schub untersucht wurden.

Da Mangelernährung die mukosale Glutathionkonzentration beeinflusst [27] und der Anteil der Mangelernährten in der vorliegenden Studie höher war als bei Miralles-Barrachina *et al.* (50 % vs. 39 %), könnte dieser Aspekt die Unterschiede im GSH-Gehalt in entzündeten vs. nicht-entzündeten Darmabschnitten in der vorliegenden Studie erklären.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass nach Einnahme des Trinkpräparates der Gesamtglutathiongehalt der entzündeten Mucosaproben signifikant gesteigert werden konnte. Es gibt keine Interventionsstudien, in denen der Glutathiongehalt in der Mucosa gemessen wurde.

Da Glutamin Bestandteil des Glutathions ist und Glutamingaben den Glutathiongehalt in der Mucosa beeinflussen kann der Anstieg des Glutathions in der Mucosa auf der Supplementation basieren. Auch wenn Glutamin für den Glutathionanstieg verantwortlich sein könnte [179, 180], können die Veränderungen nicht mit letzter Sicherheit auf das Supplement zurückgeführt werden.

Iantomasi *et al.* [181] und Sido *et al.* [71] stellten bei Morbus Crohn Patienten fest, dass der GSH-Gehalt in der Mucosa signifikant niedriger war als bei Gesunden, die GSSG-Werte jedoch erhöht waren. Um den Redoxstatus noch besser einschätzen zu können, sollte das Ratio oxidiertes/ reduziertes Glutathion zusätzlich zum Gesamtglutathion ermittelt werden [182].

Nutritive Aufnahme von Antioxidantien

In der vorliegenden Arbeit wurde die nutritive Aufnahme von Antioxidantien mit der Nahrung anhand der Zufuhr über Lebensmittel erhoben, um den Anteil der nutritiven Aufnahme an der gesamten Zufuhr zu ermitteln (Tab. 10). Die Energieaufnahme der Frauen und Männer lag mit durchschnittlich 1521 kcal bzw. 2236 kcal um 50 % bzw. 33 % unterhalb der Richtwerte für die Altersgruppe der 25-50 Jährigen (2400 kcal für Frauen, 2900 kcal für Männer) der gemeinsamen Referenzwerte der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Ernährung (D-A-CH, 2000).

Dies ist wahrscheinlich auf eine geringe Nahrungsaufnahme zurückzuführen, bedingt durch die gastrointestinalen Beschwerden, und nicht auf eine Unterschätzung der

Verzehrmengen (Underreporting). Dieser Vermutung wird von D'Odorico *et al.* [29] gestützt, die festgestellt haben, dass MC-Patienten weniger Energie aufgenommen haben als Gesunde.

Die Aufnahme der Vitamine A, E und β -Carotin sowie des Mineralstoffs Zink aus Nahrungsmitteln entsprach mit Ausnahme von Vitamin C der empfohlenen Zufuhr (Tab. 10). Die Vitamin C Zufuhr lag mit 69 mg etwa 1/3 unterhalb der Empfehlungen von 100 mg. Da MC-Patienten im akuten Schub Obst und Gemüse häufig nicht vertragen und daher weniger verzehren [29], meiden die Betroffenen Lebensmittel, die wesentlich zur Vitamin C Aufnahme beitragen. Daher ist eine Zufuhr unterhalb der Empfehlungen plausibel.

Die Zufuhr dieser Nährstoffe war mit dem Trinkpräparat deutlich höher als die tägliche Aufnahme mit der Nahrung (Vitamin C 22-fach, Vitamin E 66-fach, β -Carotin 10-fach, Zink 2-fach). Deshalb können Veränderungen beim antioxidativen Status sowie bei der antioxidativen Kapazität auf die Aufnahme des Supplements zurückgeführt werden.

Antioxidative Kapazität

Um beurteilen zu können, ob sich der antioxidative Status verändert hat, wurden in der vorliegenden Studie nicht nur die einzelnen Substrate gemessen, sondern auch die antioxidative Kapazität, welche die synergistische Wirkung im Plasma widerspiegelt.

Um die Wirkung des Trinksupplements beurteilen zu können, ist es wichtig, einen möglichen Einfluss von Harnsäure auf den TEAC ausschließen zu können (Harnsäure trägt mit 19,3 % zum TEAC bei) [183]. Deshalb wurde in der vorliegenden Studie der Harnsäurespiegel vor und nach der Intervention gemessen. Da sich der Harnsäurespiegel nicht signifikant veränderte, kann eine Änderung des TEAC durch Harnsäure ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Studie war die antioxidative Kapazität im Plasma nach der 4-wöchigen Supplementation im Vergleich zum Ausgangswert signifikant höher (+13 %, siehe Abb. 11). Da Vitamin C und E im Plasma zusammen 5 % des TEAC ausmachen [125, 184] und beide Spiegel um 50 % bzw. 185 % signifikant angestiegen sind, ist der Anstieg des TEAC zu erwarten gewesen. Auch aufgrund der Beobachtung, dass die antioxidative Kapazität im Plasma bei gesunden Erwachsenen höher ist als bei MC-Patienten (TEAC Gesunde: $1,68 \pm 0,08$ mM [185] vs. MC-Patienten vorliegende Studie:

1,36 ± 0,4 mM) - was auch von Genser *et al.* [57] mittels TRAP nachgewiesen wurde - ist eine Zunahme der antioxidativen Kapazität plausibel.

Im Unterschied zur vorliegenden Studie konnten Geerling *et al.* [87] keine signifikante Veränderung der antioxidativen Kapazität im Plasma vor und nach einer 3-monatigen Supplementation bei MC-Patienten feststellen. Dies ist wahrscheinlich damit zu erklären, dass die täglich mit dem Präparat aufgenommene Dosis (40 mg Vitamin C, 8 mg Vitamin E, 0,38 mg Vitamin A, 4,6 mg Zink, 12,4 µg Selen) bei Geerling *et al.* nur für Vitamin C 3 % und für Vitamin E 2 % der Dosis, die mit Intestamin in der vorliegenden Studie zugeführt wurde, betrug. Betrachtet man die absoluten Mengen der Antioxidantien, fällt auf, dass 40 mg Vitamin C und 8 mg Vitamin E [87] unterhalb der Mengen liegen, die durchschnittlich pro Tag in Deutschland verzehrt werden [186]. Die Zufuhr durch das Supplement stellt somit einen unerheblichen Anteil dar. Abgesehen davon waren die Patienten bei Geerling *et al.* in Remission und unterschieden sich bezüglich der antioxidativen Kapazität nicht von Gesunden [87], während es sich in der vorliegenden Studie um Patienten in Remission und Rezidiv handelte. Untersuchungen zeigen, dass MC-Patienten in Remission einen höheren antioxidativen Status [54] und wahrscheinlich eine höhere antioxidative Kapazität haben als im akuten Schub, dies könnte die unterschiedlichen Ergebnisse begründen.

Auch wenn ein Anstieg des TEAC aufgrund des gestiegener Plasmaspiegel von Vitamin E, Vitamin C und β -Carotin durch die Supplementierung in der vorliegenden Studie plausibel zu sein scheint, ist zu bedenken, dass Albumin zu 28 % zum TEAC im Plasma beiträgt [187, 188]. Der hohe Beitrag endogener Antioxidantien zum TEAC kann nachweisbar einen Anstieg der antioxidativen Kapazität im Plasma bewirken [189]. Da der Albuminspiegel in der vorliegenden Studie nicht untersucht wurde, kann ein möglicher Anstieg von Albumin als Ursache nicht ausgeschlossen werden. In welchem Ausmaß der Anstieg von Selen (über die GPx Aktivität), β -Carotin oder weiterer Substanzen mit antioxidativer Wirkung, die nicht gemessen wurden, zur Steigerung des TEAC beigetragen haben, ist unklar. Alle Patienten nahmen während der Studie 5-Aminosalicylate ein, die antioxidativ wirken. Da die Medikation während der Studie konstant gehalten wurde, kann jedoch ein Einfluss auf Unterschiede in der antioxidativen Kapazität ausgeschlossen werden.

Ein Anstieg der antioxidativen Kapazität sollte den Schutz vor oxidativem Stress verbessern. Allerdings ist die klinische Bedeutung bezüglich des gestiegenen TEAC in

der vorliegenden Studie schwer abzuschätzen, da das im TEAC induzierte ABTS Radikal nicht im Organismus vorkommt und daher die antioxidative Kapazität *in vivo* nicht zwingend abbildet [190].

Da im Körper diverse Radikale vorkommen, wird von Prior & Cao [125] der Einsatz verschiedener Methoden zur Erfassung der antioxidativen Kapazität im Plasma empfohlen, die sich vor allem in der Oxidationsquelle unterscheiden [189]. Die Messung der antioxidativen Kapazität gegenüber physiologisch relevanten Radikalen (Hydroxyl-, Peroxyl- und Peroxynitrit) war geplant, konnte jedoch aufgrund methodischer Schwierigkeiten nicht durchgeführt werden.

5.3 Oxidative Stressmarker in Plasma und Leukozyten

Durch reaktive Sauerstoffspezies werden vor allem Leukozyten oder Membranlipide angegriffen. Da ein Anstieg des antioxidativen Status zu erwarten war, wurden in der vorliegenden Studie Biomarker ausgewählt, die sowohl das Ausmaß an oxidativem Schaden an der DNA (in Plasma und Leukozyten) als auch den Grad der Lipidperoxidation im Plasma messen.

In der vorliegenden Studie zeigte sich lediglich bei den Peroxiden im Plasma eine signifikante Abnahme im Vergleich zu Studienbeginn. Alle anderen Parameter (DNA-Strangbrüche in Leukozyten, 8-Isoprostane und 8-OHdG im Plasma) blieben unverändert. Das ist erstaunlich, da der antioxidative Status signifikant gestiegen ist.

DNA Strangbrüche

Um zu überprüfen, inwieweit sich Veränderungen des Antioxidantiengehaltes und der antioxidativen Kapazität im Plasma auf zellulärer Ebene auswirken, wurden DNA-Schäden in peripheren Leukozyten mit der SCGE gemessen.

In der vorliegenden Studie blieben die endogenen und exogenen Strangbrüche unverändert (Abb. 12). Vergleichbare Untersuchungen von DNA-Strangbrüchen mittels Comet Assay bei MC-Patienten existieren bislang nicht.

Auch wenn Artefakte, die durch Isolation von Zellen auftreten, aufgrund der Verwendung von Vollblut ausgeschlossen werden können, kann möglicherweise die heterogene Ausstattung der unterschiedlichen Zelltypen bezüglich Katalase und Superoxiddis-

mutase den hohen Variationskoeffizienten in der vorliegenden Studie (24 %) erklären [191, 192].

In einigen Interventionsstudien an Gesunden wurde nach Supplementation von Antioxidantien eine erhöhte Resistenz gegenüber H_2O_2 induzierten Strangbrüchen festgestellt, die endogenen DNA-Schäden blieben jedoch unverändert [129, 193-195]. In anderen Untersuchungen wurden keine Effekte auf endogene und exogene DNA-Schäden beobachtet [196-198]. Deshalb wird vermutet, dass der antioxidative Schutz dieser Probanden ausreichend war, um mononukleäre Blutzellen vor ROS zu schützen [197, 199]. Untersuchungen zeigen, dass vorwiegend bei Mangelernährung oder einem erhöhten Maß an oxidativem Stress eine Supplementierung von Antioxidantien mit einer Abnahme von DNA-Schäden einhergeht [200, 201] und dass bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen mehr Schäden vorliegen als bei Gesunden [202]. Deshalb war in der vorliegenden Studie eine Abnahme der exogenen DNA-Strangbrüche zu erwarten.

Die vorliegende Studie zeigt, dass bei MC-Patienten durch Gabe eines Trinkpräparates, das reich an Antioxidantien ist, der antioxidative Status sowie die antioxidative Kapazität im Plasma verbessert werden kann. Jedoch sagen diese Parameter nichts über den zellulären Redoxstatus aus, der für das Ausmaß der Einzelstrangbrüche relevant ist. Es ist daher zu vermuten, dass der zelluläre Redoxstatus durch die Intervention unverändert blieb und auch keine Änderungen von DNA-Schäden eingetreten sind.

Eine weitere Erklärung bietet die *in vitro* Studie von Singh [203], in der nach Zugabe von 25-50 μM Na-Ascorbat – d.h. bei Konzentrationen im physiologischen Bereich - ein gesteigerter oxidativer DNA-Schaden in Leukozyten festgestellt wurde. Dies wurde auf die prooxidativen Effekte von Ascorbinsäure zurückgeführt. Möglicherweise wurden die antioxidativen Effekte durch die Supplementation von 1500 mg Ascorbinsäure kompensiert. Eine Untersuchung von Szeto & Benzie [204] zeigte jedoch, dass die Zugabe von Ascorbinsäure und α -Tocopherol *ex vivo* in Konzentrationen von 0-200 μM bei Lymphozyten weder einen DNA protektiven noch bei höherer Dosierung einen prooxidativen Effekt hervorruft.

Da die Messung der Strangbrüche *in vivo* eine Momentaufnahme vom Gleichgewicht zwischen Schäden und Reparatur darstellt [110], ist eine Bewertung möglicher Veränderungen schwierig. Eine Quantifizierung der DNA-Schäden *in vivo* ist daher nur zur Berechnung der exogenen DNA-Schäden als Differenz von behandelten und unbehan-

delten Zellen zu empfehlen. In weiteren Studien sollte aufgrund der zelltypspezifischen Sensitivität der DNA gegenüber Strangbrüchen [106] bei der mikroskopischen Analyse zwischen Leukozytenpopulationen differenziert werden. Da die Unterschiede zwischen endogenen und exogenen Schäden marginal waren und bei H₂O₂ Behandlung mehr Strangbrüche zu erwarten sind als bei unbehandelten Zellen, sollte in künftigen Studien die Elektrophoresedauer verlängert werden. Außerdem könnten die Sensitivität und Spezifität des Comet Assay durch Zugabe von Reparaturinhibitoren eventuell noch verbessert werden [201, 205].

Um die Bedeutung der antioxidativen Vitamine für die endogenen DNA-Strangbrüche abschätzen zu können, wäre eine Messung der intrazellulären Konzentrationen sinnvoll. Zudem sollte der Redoxstatus (GSH) intrazellulär bestimmt werden, da nur so eine Aussage über oxidativen Stress *in vivo* möglich ist [206].

8-Hydroxydesoxyguanosin

8-OHdG ist ein DNA Addukt, das durch spezifische Endonukleasen eliminiert werden kann, die auch in polymorphonukleären Leukozyten vorkommen [130]. Oxidierte Basen aus den Zellen liegen zunächst im Plasma vor bevor sie über den Urin ausgeschieden werden und stellen somit die Schadensrate der DNA dar [131]. Gesteigerte 8-OHdG Spiegel im Plasma können aus einem defizitären antioxidativen Schutz der DNA in der Mucosa resultieren. 8-OHdG ist selbst mutagen [132].

D'Odorico *et al.* [29] stellten mittels HPLC unabhängig von der Krankheitsaktivität bei 37 MC-Patienten (Rm und Rv) im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöhte 8-OHdG Spiegel in Leukozyten fest. Lih-Brody *et al.* [15] wiesen höhere mukosale 8-OHdG Konzentrationen bei MC-Patienten im Vergleich zu Gesunden nach. Da der 8-OHdG Spiegel in Zellen das Gleichgewicht zwischen 8-OHdG Bildung und Elimination darstellt, deuten diese Studien auf eine Verschiebung des Gleichgewichtes bei Patienten mit Morbus Crohn hin. In Hinblick darauf war zu erwarten, dass erhöhte 8-OHdG Konzentrationen auch im Plasma von MC-Patienten vorliegen. Es existieren keine Untersuchungen, in denen die Konzentration von 8-OHdG im Rahmen einer vergleichbaren Interventionsstudie bei MC-Patienten untersucht wurde.

In der vorliegenden Studie blieb der 8-OHdG Spiegel im Plasma unverändert (Kapitel 4.5.2). Aufgrund der Beobachtungen von D'Odorico *et al.* [29], die keine Korrelation

zwischen 8-OHdG in Leukozyten und den Vitaminen A, E und dem β -Carotinspiegel im Plasma feststellten, scheinen diese Antioxidantien im Plasma jedoch nicht maßgeblich zum Schutz der DNA vor oxidativem Stress beizutragen. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse von Prieme *et al.* [207] gestützt, die nach Supplementation von 500 mg Ascorbinsäure und 200 mg Tocopherol / Tag bei gesunden Rauchern, welche ebenfalls unter oxidativem Stress leiden, über zwei Monate ebenfalls keine Veränderungen der 8-OHdG Spiegel im Urin zeigten. Da der zelluläre Redoxstatus primär durch das intrazelluläre GSH-GSSG Ratio bestimmt wird [170] und nicht durch die Konzentration antioxidativer Pro-/ Vitamine im Plasma, sind diese Ergebnisse nachvollziehbar. Das würde auch erklären weshalb der 8-OHdG Spiegel trotz eines Anstieges des mukosalen Glutathionspiegels in den entzündeten Darmabschnitten unverändert blieb (Abb. 10).

Andererseits ist zu bedenken, dass die Standardabweichung mit 30-40 % relativ hoch war und die Fallzahl sehr gering. Deshalb ist das Ergebnis bezüglich des 8-OHdG fragwürdig. Zudem gibt es keine experimentellen Daten, die die Existenz einer Verbindung zwischen Leukozyten und anderen Geweben betreffend oxidativer DNA Schäden untersuchen [208].

Peroxide

In der vorliegenden Studie nahm die Konzentration der Peroxide (Lipid- und Hydroperoxide) im Plasma ab (Kapitel 4.5.3). Bei Aghdassi *et al.* [39], die im Unterschied zu der vorliegenden Studie ausschließlich den Lipidperoxidspiegel untersuchten, wurde nach 4-wöchiger Supplementation von Antioxidantien (1000 mg Vitamin C, 536 mg Vitamin E) ebenfalls eine signifikante Abnahme bei MC-Patienten beobachtet. Allerdings waren die Patienten bei Aghdassi *et al.* in Remission und Nichtraucher.

Wegen der fehlenden Kontrollgruppe ist es schwierig, die Abnahme der Peroxide im Plasma auf die Supplementation zurückzuführen. Auf der anderen Seite zeigt die doppelblinde, randomisierte und kontrollierte Studie von Aghdassi *et al.*, die in vielen Merkmalen (z.B. Interventionsdauer, Dosis) ähnlich ist, vergleichbare Ergebnisse. Da sich der antioxidative Status der fett- und wasserlöslichen Antioxidantien nach Gabe der hochdosierten Antioxidantien verbessert hat, ist eine Abnahme der Peroxide im Plasma verständlich.

In der vorliegenden Studie nahmen 6 der 8 Probanden zu Studienbeginn 5-ASA Präparate ein, die antioxidativ wirken [209]. Die Tatsache, dass jedoch selbst bei Einnahme von 5-ASA Präparaten die Pentankonzentration im Expirationsvolumen erhöht war [32], lässt vermuten, dass die Wirkung von 5-ASA *in vivo* marginal ist. Abgesehen davon wurde die Medikation während der Intervention konstant gehalten, so dass eine Abnahme der Peroxide in der vorliegenden Studie durch die Medikation unwahrscheinlich ist.

Daher kann die Abnahme der Peroxide im Plasma wahrscheinlich auf die Wirkung des Trinksupplementes zurückgeführt werden.

Isoprostane

Isoprostanspiegel sind in Plasma und Urin bei MC-Patienten im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht [32, 39, 210].

In der vorliegenden Studie veränderte sich die Isoprostankonzentration im Plasma nicht signifikant (Kapitel 4.5.4), während bei Aghdassi *et al.* [39] nach Supplementierung vergleichbarer Dosen von Vitamin C (1000 mg/d) und Vitamin E (560 mg/d) über 4 Wochen eine Abnahme der Isoprostane nachgewiesen wurde.

Da die fettlöslichen Antioxidantien im Plasma (β -Carotin und Tocopherol) vor Lipidperoxidation schützen und ihre Konzentration in der vorliegenden Studie angestiegen ist, wäre eine Abnahme der Isoprostankonzentration wie bei Aghdassi *et al.* zu erwarten gewesen.

Auffällig ist, dass die Isoprostanspiegel im Plasma bei Aghdassi *et al.* zur Baseline im Mittel bei 200-300 pg/ml lagen und nach der Intervention bei 100-200 pg/ml. In der vorliegenden Studie waren die Isoprostanspiegel im Durchschnitt deutlich geringer (17 ± 7 pg/ml vor und 18 ± 6 pg/ml nach Intervention). Die Lipidperoxidation ist bei Rauchern [211] und im akuten Schub [210] erhöht. Bei Patienten im akuten Schub wurden höhere Isoprostanspiegel festgestellt als bei Patienten in Remission [32]. Da in der vorliegenden Studie 75 % der Probanden Raucher waren und die meisten im akuten Schub – bei Aghdassi *et al.* nahmen ausschließlich Nichtraucher in Remission teil – sind höhere Isoprostanspiegel zu erwarten als bei Aghdassi *et al.*

Durch Hydrolyse werden die mit Lipoproteinen veresterten Isoprostane freigesetzt und mit den freien Isoprostanen im Plasma (ca. 50 %) nachgewiesen [69, 212]. In Hinblick auf die Hydrolyse, die in der vorliegenden Studie durchgeführt wurde, wären höhere

Konzentrationen als bei Aghdassi *et al.* zu erwarten gewesen, da veresterte und freie Isoprostane erfasst wurden.

Die F2-Isoprostanklasse besteht aus diversen Substanzen [213]. Aus der Veröffentlichung von Aghdassi *et al.* geht nicht hervor, welche Substanzen gemessen wurden, da dort nur generell der Nachweis von F2-Isoprostanen erwähnt wird, ohne diese Angabe zu spezifizieren. Aufgrund der o.g. Argumente ist zu vermuten, dass bei Aghdassi *et al.* diverse Substanzen der F2-Isoprostanklasse nachgewiesen wurden und daher in dieser Studie der Isoprostanspiegel ungefähr um den Faktor 10 höher liegt als in der vorliegenden Studie, bei der nur 8-Isoprostane gemessen wurden. Möglicherweise hat bei Aghdassi *et al.* der Plasmaspiegel von anderen Substanzen der F2-Isoprostanklasse abgenommen, die in der Summe zu einer signifikanten Veränderung geführt haben.

Vergleichende Messungen von Isoprostanen im Plasma von Gesunden zeigten 6-fach geringere Konzentrationen als bei den MC-Patienten der vorliegenden Studie zur Baseline (3 pg/ml vs. 17 pg/ml). Da das Plasma gesunder Probanden noch geringere Konzentrationen aufweist (3 pg/ml), die um ein Vielfaches unterhalb des vom Hersteller genannten Referenzbereiches liegen (40-100 pg/ml) [214], ist ein systematischer Fehler in der vorliegenden Studie nicht auszuschließen. Dieser könnte auch die im Vergleich zu Aghdassi *et al.* geringeren Isoprostanspiegel erklären. Isoprostane stellen aufgrund ihrer Stabilität im Probenmaterial einen verlässlichen Marker für Lipidperoxidation dar [138], so dass Lagerverluste als Ursache für die niedrigen Isoprostanspiegel in der vorliegenden Studie ausgeschlossen werden können.

Die Tatsache, dass die Peroxide im Plasma abgenommen haben und sich die Isoprostane nicht verändert haben ist nicht als Widerspruch zu sehen, weil die Peroxide eine Substanzgruppe aus Hydro- und einer Vielzahl von Lipidperoxiden umfassen, wogegen die Isoprostane nur eine spezifische Substanzklasse unter den Lipidperoxiden darstellen.

5.4 Inflammatorische Marker

Untersuchungen von Stallmach *et al.* [113] zeigten, dass Biopsien von entzündeten Darmabschnitten bei MC-Patienten verglichen mit Biopsien von nicht-entzündeten Darmabschnitten signifikant höhere Transkriptspiegel von IL-1, IL-8 und MRP-14 auf-

wiesen [215]. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Expression dieser Gene eng mit der Pathogenese der mukosalen Entzündung und der Gewebeerstörung assoziiert ist.

MRP-14 ist ein calciumbindendes Protein, das von humanen Monozyten/ Makrophagen und Granulozyten nach Aktivierung von Protein Kinase C sezerniert wird. Der Transkriptspiegel von MRP-14 ist bei akuter Entzündung erhöht [216]. Bei MC-Patienten wurden im Vergleich zu Gesunden in nicht-entzündeten Mucosaproben höhere mRNA Spiegel von MRP-14 nachgewiesen [217]. Die Expression von MRP-14 korreliert mit der Krankheitsaktivität bei entzündlichen Darmerkrankungen ($r = 1$) [112].

Interleukin-8 wirkt als Chemotaxin und aktiviert polymorphonukleäre Neutrophile, die in großer Anzahl in intestinalen Läsionen bei MC-Patienten nachzuweisen sind. In Studien zeigten sich bei MC-Patienten signifikant erhöhte IL-8 mRNA Konzentrationen im Vergleich zu Gesunden [215, 218-220]. Eine erhöhte Expression von TH-1 assoziierten Cytokinen wie IL-8 wurde hauptsächlich in chronischen Läsionen von MC-Patienten beobachtet und korreliert ebenfalls mit dem CDAI ($r = 1$) [112, 218, 221, 222].

In der vorliegenden Studie veränderten sich die Transkriptspiegel von IL-8 und MRP-14 nicht signifikant. Da die Transkriptspiegel von IL-8 und MRP-14 in Remission geringer sind als im akuten Schub [142] und 6 der 8 Probanden nach der Intervention in Hinblick auf den IBDQ die Remission erreicht haben, wäre eine Abnahme der Transkriptspiegel zu erwarten gewesen. Auf der anderen Seite zeigte eine Untersuchung von Yamamoto *et al.*, dass MC-Patienten auch ohne Normalisierung der Cytokinspiegel die Remission erreichen können [142]. Da die Standardabweichungen der untersuchten Transkriptspiegel sehr hoch waren (bis zu 182 %), möglicherweise bedingt durch das heterogene Probandenkollektiv, ist die untersuchte Fallzahl ($n = 8$) zu gering, wodurch potentielle Effekte durch die Intervention überlagert worden sein könnten. Deshalb kann die Aussagekraft dieser Ergebnisse nicht beurteilt werden.

Bisher existiert eine *in vitro* Untersuchung von Reimund *et al.* [85], bei der nach Zugabe von Antioxidantien (Butylhydroxyanisol, Tetrahydropyran und Nordihydroguaiaretische Säure (5 μM) zu Zellkulturen von Peripheren Mononucleären Zellen und Mucosagewebe eine Abnahme der IL-1 und IL-6 Konzentration beobachtet wurde. Ob diese Effekte auch durch Supplementierung von Antioxidantien bei MC-Patienten erreicht werden können, sollte in der vorliegenden Studie geklärt werden. Diese Frage kann aufgrund des unkontrollierten Studiendesigns nicht beantwortet werden.

5.5 Klinische Parameter

Lebensqualität

Es sollte mit Hilfe des IBDQ überprüft werden, ob durch die Intervention eine Besserung der klinischen Symptome und der Lebensqualität erzielt werden konnte.

Zu Beginn der Studie waren gemäß des IBDQ 5 von 8 Patienten (62 %) im akuten Stadium ihrer Erkrankung, das als Punktesumme < 170 definiert ist [145]. Dieses Ergebnis deckt sich nahezu mit dem CDAI, wonach vor der Intervention 50 % der Patienten im akuten Schub waren. Nach der Intervention hatten 3 der 6 Patienten einen IBDQ > 170 und erzielten damit die Remission.

In der vorliegenden Studie war die Lebensqualität nach der Intervention signifikant höher als vor der Intervention. Da die Punktesumme des IBDQ mit dem CDAI korreliert [223, 224], kann davon ausgegangen werden, dass der Anstieg der Lebensqualität auf eine Besserung der klinischen Symptome zurückzuführen ist. Diese Veränderung kann jedoch nicht ausschließlich auf die Intervention zurückgeführt werden, weil alle Patienten medikamentös u. a. mit Cortison behandelt wurden, das die Entzündung verringert und damit die Beschwerden und eine Verbesserung der Lebensqualität erwarten lässt.

Vergleichbare Interventionsstudien, bei denen der IBDQ nach einer diätetischen Intervention gemessen wurde, liegen nicht vor, da die Validierungsphase der verschiedenen Länder erst seit kurzem abgeschlossen ist. Der IBDQ wird bisher in Medikationsstudien oder als Screeninginstrument in Querschnittstudien verwendet.

Ernährungszustand

In dieser Studie waren gemäß SGA 50 % der Probanden gut ernährt, 50 % zeigten ein Risiko für Mangelernährung bzw. waren mangelernährt. Norman *et al.* [225] stellten dagegen fest, dass 8 % der hospitalisierten Patienten mit chronisch-entzündlichen Darm-erkrankungen ein Risiko für Mangelernährung aufwiesen (SGA B), bzw. mangelernährt waren (SGA C). Der 6-fach höhere Anteil der Patienten mit Mangelernährung bzw. Risiko für Mangelernährung in der vorliegenden Studie könnte durch das Krankheitsstadium bedingt sein. In der vorliegenden Studie waren 62 % der Patienten (gemessen anhand CDAI) im akuten Schub, in dem eine bedarfsgerechte Energie- und Nährstoffzufuhr häufig nicht möglich ist [29]. Bei Norman *et al.* wurden keine Angaben zum Krankheitsstadium gemacht. Auch wenn der SGA ein subjektiver Parameter ist, führt

die Einschätzung des Ernährungsstatus mittels SGA in 91 % der Fälle zum gleichen Ergebnis [226]. Die Subjektivität des SGA kann daher die unterschiedlichen Ergebnisse nicht erklären.

Betrachtet man hingegen den Präalbuminspiegel im Plasma als Indikator für den Ernährungszustand, liegen 3 Probanden im unteren Referenzbereich < 150 , der auf ein mäßiges Defizit bezüglich Proteinversorgung hinweist [118].

Diese Patienten waren jedoch mit einer Ausnahme nach SGA nicht mangelernährt. Dies ist andererseits nicht als Widerspruch zu sehen, da der Präalbuminspiegel einen kurzfristigen Proteinmangel (> 2 Tage) anzeigt [118], während der SGA Symptome berücksichtigt, die in Folge eines mehrwöchigen Protein-/ Energiemangels entstehen [226]. Da der SGA nicht als Verlaufsparemeter geeignet ist, wurde der Ernährungszustand nach der Intervention nur anhand von Präalbumin eingeschätzt. Hierbei zeigte keiner der Patienten mehr einen Präalbuminspiegel im defizitären Bereich, auch wenn der durchschnittliche Präalbuminspiegel nicht signifikant angestiegen ist.

In einigen Untersuchungen stellte man keine Korrelation bei kritisch Kranken zwischen Präalbumin und dem Ernährungszustand (BMI und SGA) fest [227, 228]. In Hinblick auf die kurze Halbwertszeit des Präalbumins sowie die alleinige Abhängigkeit der Proteinversorgung ist jedoch fraglich, inwiefern Präalbumin als Marker zur Beurteilung des Ernährungszustandes bei MC-Patienten herangezogen werden kann.

5.6 Schlussbetrachtung

Die vorliegende Arbeit sollte zeigen, ob der vierwöchige Konsum eines Trinksupplementes mit hohem Gehalt an Antioxidantien und Glutamin den antioxidativen Status verbessern, den oxidativen Stress verringern und den Entzündungsprozess in der Mucosa bei Patienten mit aktivem Morbus Crohn vermindern kann.

Mit dem Trinksupplement wurden u. a. Vitamin C, E, β -Carotin und Selen in einer Dosis zugeführt, die einem Vielfachen der D-A-CH Referenzwerte entspricht. Da die Plasmaspiegel der meisten Antioxidantien, die im unteren Normbereich lagen und durch die Einnahme des Trinksupplementes (mit Ausnahme von Zink) auf Konzentrationen im mittleren bis oberen Referenzbereich angestiegen sind, scheint die zugeführte Dosis adäquat gewesen zu sein. Die zugeführte Tagesdosis an Antioxidantien lag unterhalb

einer kritischen Dosis, bei der gesundheitsschädliche Effekte zu befürchten sind [153, 229].

Da die mit dem Trinksupplement zugeführte Dosis an Mikronährstoffen um ein Vielfaches höher war als die mit der Nahrung aufgenommenen Mengen, kann die Verbesserung des antioxidativen Status (Vitamin A, C, E, β -Carotin und Selen) im Plasma auf die Einnahme des Trinksupplementes zurückgeführt werden.

Der Anstieg der antioxidativen Kapazität im Plasma ist in Hinblick auf den verbesserten antioxidativen Status plausibel. Ein Einfluss von Harnsäure auf den Anstieg des TEAC konnte ausgeschlossen werden. Albumin liefert unter den Antioxidantien den höchsten Beitrag zum TEAC im Plasma [125], wurde aber in der vorliegenden Studie nicht untersucht und sollte in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden, um ausschließen zu können, dass Veränderungen des TEAC nicht durch Änderungen von Albumin bedingt sind.

Glutamin ist das bevorzugte Energiesubstrat für Enterozyten und Kolonozyten [171] und Precursor von Glutathion. Die Konzentration von Glutamin im Plasma blieb unverändert. Da 50 % der Patienten laut SGA mangelernährt waren oder ein Risiko für Mangelernährung hatten und die Energiezufuhr wahrscheinlich nicht bedarfsgerecht war, wurde das Glutamin wahrscheinlich zur Energiegewinnung verwendet. Vermutlich wurde ein Teil des Glutamins zur Glutathionsynthese herangezogen, was auch den Anstieg der Glutathionkonzentration in der entzündeten Mucosa erklären könnte.

Aufgrund der Beobachtung, dass weder DNA-Strangbrüche *in vivo* und *ex vivo* noch 8-OHdG im Plasma abnahmen, ist zu vermuten, dass der Anstieg der Antioxidantien im Plasma nicht zu einer Veränderung des zellulären Redoxstatus geführt hat. Auch wenn Glutathion den zellulären Redoxstatus bestimmt [170] und eine Zunahme des Glutathiongehaltes in der Mucosa festgestellt werden konnte, ist dies nicht als Widerspruch zu sehen, weil der Redoxstatus vielmehr vom GSH-GSSG Ratio bestimmt wird als von Gesamtglutathion [230].

Als oxidative Stressmarker im Plasma wurden Peroxide und 8-Isoprostane gemessen. Im Gegensatz zu den zellulären Biomarkern für oxidativen Stress (8-OHdG, DNA-Strangbrüche) konnte eine Abnahme der Peroxide beobachtet werden. Dieser Effekt ist plausibel, da sich der antioxidative Status und die antioxidative Kapazität im Plasma insgesamt verbessert haben. Die Tatsache, dass sich die 8-Isoprostane als spezieller Marker für Lipidperoxidation nicht verändert haben, steht nicht im Gegensatz zu der Ab-

nahme der Gesamtperoxide, da die 8-Isoprostane nur eine kleine Substanzgruppe innerhalb einer Vielzahl von Lipidperoxidationsprodukten darstellen [138].

Da die Genexpression vom zellulären Redoxstatus abhängt [231] und die Transkriptspiegel von IL-8 und MRP-14 in der Mucosa unverändert blieben, ist zu vermuten, dass sich der zelluläre Redoxstatus nicht verändert hat. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Redoxstatus von vielen unbekanntenen Größen moduliert wird [131] um oxidativen Stress zu kompensieren. Da die Krankheitsaktivität mit der mukosalen Entzündung assoziiert ist [112] und die Lebensqualität, die auch die Krankheitsaktivität reflektiert [224], angestiegen ist, wäre mit der Steigerung der Lebensqualität indirekt eine Abnahme der Transkriptspiegel zu erwarten gewesen.

Ein Nachteil dieser Studie ist das unkontrollierte Studiendesign, das die Aussagekraft generell einschränkt. Während eine Verbesserung des antioxidativen Status im Plasma trotz des unkontrollierten Designs wahrscheinlich ist, und daher auch eine direkte Wirkung auf die Gesamtperoxide im Plasma haben könnte, hängen die übrigen Parameter (DNA Strangbrüche, Oxidation von DNA Basen, Expression inflammatorischer Cytokine/ Chemokine) vom zellulären Redoxstatus ab [232], der nicht untersucht wurde. Eine Korrelation zwischen Peroxidationsprodukten im Plasma und DNA-Einzelstrangbrüchen wurde von Dotan *et al.* [233] nicht festgestellt. Ob eine Verbesserung des antioxidativen Status im Plasma Auswirkungen auf den Redoxstatus in der Zelle hat, bleibt unklar. Die Hypothese, dass Antioxidantien freie Radikale quenchen und somit oxidativen Stress vermindern, ist wahrscheinlich zu einfach. Viele zelluläre Prozesse wie die Regulation der Genexpression, und intrazelluläre Signalwege werden durch den zellulären Redoxstatus in einem komplexen Austausch moduliert. Die Konsequenzen, die eine Supplementation mit Antioxidantien bewirken könnte, sind noch nicht abschließend geklärt worden [131].

Abgesehen davon ist aufgrund der hohen Standardabweichung sowie des hohen Variationskoeffizienten bei den Parametern für oxidativen Stress (DNA-Strangbrüchen, 8-OHdG, Peroxiden, Isoprostanen) und bei den Transkriptspiegeln von IL-8 und MRP-14 eine Bewertung dieser Daten bei der geringen Fallzahl sowie dem heterogenen Probandenkollektiv nur eingeschränkt möglich.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass eine hochdosierte Gabe von Antioxidantien und Glutamin den antioxidativen Status zumindest im Plasma verbessern kann. Ob damit tatsächlich eine Abnahme der oxidativen Stressmarker und des Entzündungsprozesses

in der Darmmucosa erzielt werden kann, kann mit dieser Pilotstudie nicht beantwortet werden. Deshalb sind weitere Studien mit kontrolliertem Design und einer adäquaten Fallzahl wünschenswert.

Diese Studie hat gezeigt, dass der Erfolg einer Interventionsstudie von der Compliance der Patienten abhängt. In der vorliegenden Studie war die Rekrutierung geeigneter Probanden mit guter Compliance schwierig, so dass die Fallzahl sehr gering war, keine Kontrollgruppe mitgeführt werden konnte und auch bei den Teilnahmekriterien Kompromisse getroffen werden mussten. Die Bereitschaft, sich einer Koloskopie zu unterziehen, die zur Gewinnung der Biopsien notwendig war, schränkte das Probandenkollektiv ein. Wenn in weiterführenden Untersuchungen mukosale Biopsien gewonnen werden, was aus wissenschaftlicher Sicht wünschenswert ist, z. B. zur Messung von antioxidativem Status, Redoxstatus und lokalem Entzündungsgeschehen in der Mucosa, müsste eine Multicenterstudie durchgeführt werden, da eine adäquate Fallzahl bei einer Mono-/ Bicenterstudie nicht realisiert werden kann. Andernfalls müsste sich eine Interventionsstudie auf systemische Marker beschränken, die laut Vermeire *et al.* [234] und Solem *et al.* [235] bezüglich Praktikabilität bzw. Compliance eine gute Alternative sind und gut mit mukosalen Markern korrelieren [235].

In Hinblick auf die starke individuelle Streuung bei Markern für oxidativen Stress und Entzündung ist ein homogenes Probandenkollektiv bezüglich Krankheitsaktivität und Raucherstatus anzustreben.

Wie in der vorliegenden Studie bereits realisiert scheint es wichtig, in weiteren Studien neben dem antioxidativen Status, der antioxidativen Kapazität zur Abschätzung der Bioverfügbarkeit und der oxidativen Stress- und Entzündungsmarker die Lebensqualität und den Ernährungszustand zu ermitteln. Darüber hinaus empfiehlt sich eine Bestimmung des GSH/GSSG-Ratio als Indikator für den Redoxstatus, der eine zentrale Rolle für die Expression inflammatorischer Gene spielt, sowie des CRP und des CDAI vor und nach Intervention.

Auch wenn aus den Ergebnissen dieser Studie bezüglich oxidativem Stress und mukosaler Entzündung keine Empfehlungen zur Supplementierung von MC-Patienten abgeleitet werden können, wäre diese wegen der Verbesserung des antioxidativen Status in Erwägung zu ziehen.

6 Zusammenfassung

Studien haben gezeigt, dass MC-Patienten im Vergleich zu Gesunden geringere Konzentrationen an antioxidativen Vitaminen im Plasma aufweisen. Verbindungen, die bei der Oxidation von Lipiden und DNA entstehen, sind in erhöhten Konzentrationen nachweisbar, was eine erhöhte Belastung des Organismus mit ROS anzeigt (oxidativer Stress). Da oxidativer Stress durch verstärkte Genexpression inflammatorischer Cytokine den chronischen Entzündungsprozess stimuliert, sollte in dieser Studie untersucht werden, ob durch Gabe eines Trinksupplementes mit hohem Gehalt an Antioxidantien und Glutamin der antioxidative Status verbessert, der oxidative Stress reduziert, die Entzündung in der Mucosa verringert und die Lebensqualität gesteigert werden kann.

Hierzu wurde eine Interventionsstudie mit 8 Patienten (5 Frauen, 3 Männer, CDAI 163 ± 73) aus 2 klinischen Zentren (Marienhospital Essen, Medizinische Klinik Bonn) zwischen Januar 2005 und März 2006 durchgeführt. Die Probanden erhielten 4 Wochen lang 2 x täglich 200 ml Intestamin[®] trink (Fresenius Kabi, Bad Homburg) zusätzlich zur Basismedikation. Hiermit wurden täglich 1500 mg Vitamin C, 500 mg Vitamin E, 10 mg β -Carotin, 300 μ g Selen, 20 mg Zink, 30 g Glutamin (als Dipeptid) zugeführt.

Vor und nach Intervention wurden Blutproben und Biopsien aus der entzündeten sowie der makroskopisch normalen Mucosa gewonnen. Die Konzentration von Vitamin A, C, E und β -Carotin, Selen und Zink, Glutamin, Glutathion sowie die antioxidative Kapazität wurden im Plasma gemessen. Oxidativer Stress wurde mittels DNA-Strangbrüchen in Leukozyten, sowie der Spiegel von 8-OHdG, Peroxiden und 8-Isoprostanen im Plasma bestimmt. In den Biopsien wurden die Glutathiongehalte sowie die Transkriptspiegel von IL-8 und MRP-14 analysiert. Die Aufnahme der nutritiven Antioxidantien wurde mit einem standardisierten 3-Tage Ernährungsprotokoll ermittelt. Die Einnahme des Supplementes sowie Medikation und Beschwerden wurden in einem Patiententagebuch dokumentiert. Die Lebensqualität wurde mit Hilfe des IBDQ quantifiziert.

Von den 8 Patienten beendeten 6 die Studie. Nach 4-wöchiger Intervention waren die Spiegel von Vitamin A, C, E, β -Carotin, Selen und die antioxidative Kapazität im Plasma gestiegen. Dies belegt einerseits die gute Compliance sowie die hohe Bioverfügbarkeit der im Präparat enthaltenen Substanzen. Da der Beitrag des Trinksupplementes zur Gesamtaufnahme um ein Vielfaches über der nutritiven Aufnahme von Antioxidantien

lag, ist die Verbesserung des antioxidativen Status im Plasma auf die Einnahme des Trinksupplementes zurückzuführen.

Die Abnahme der Gesamtperoxide im Plasma ist nachvollziehbar, da sich der antioxidative Status verbessert hat. Es ist unklar, weshalb alle anderen Spiegel oxidativer Stressmarker (DNA-Strangbrüche in Leukozyten, 8-OHdG, 8-Isoprostane im Plasma) nicht abgenommen haben. Möglicherweise hat sich der Redoxstatus in der Zelle trotz einer Zunahme der antioxidativen Kapazität im Plasma nicht verbessert. Dies könnte das Ausbleiben von Effekten auf zelluläre Stressmarker (DNA-Strangbrüche, 8-OHdG) erklären. Da die 8-Isoprostane lediglich eine Subgruppe innerhalb der F2-Isoprostane und damit innerhalb der Lipidperoxidationsmarker darstellen, ist das Ausbleiben von Effekten nicht in Widerspruch zur Abnahme der Gesamtperoxide im Plasma zu sehen. Aufgrund der geringen Fallzahl und der hohen Streuung ist eine Bewertung streng genommen nicht möglich.

Mit der Einnahme des glutaminhaltigen Trinksupplementes stieg der Glutathiongehalt in der entzündeten Mucosa an und erreichte Gehalte der makroskopisch unauffälligen Mucosa. Da der Gesamtglutathiongehalt nicht den zellulären Redoxstatus reflektiert, kann damit nicht zwingend ein antiinflammatorischer Effekt assoziiert werden. Eine Reduktion der mukosalen Transkriptspiegel von IL-8 und MRP-14 wurde nicht beobachtet. Allerdings war die Standardabweichung auch hier relativ hoch, evtl. bedingt durch die unterschiedliche Krankheitsaktivität. Um valide Aussagen bezüglich oxidativer Stress- und Entzündungsmarker treffen zu können, ist ein kontrolliertes Studiendesign sowie ein homogeneres Probandenkollektiv erforderlich.

Der Anstieg der Lebensqualität reflektiert auch eine Abnahme der Beschwerden, kann jedoch aufgrund der Basismedikation und des unkontrollierten Designs nicht auf das Trinksupplement zurückgeführt werden.

Trinksupplemente mit hohem Gehalt an Antioxidantien und Glutamin können bei MC-Patienten den antioxidativen Status im Plasma und möglicherweise auch in der entzündeten Mucosa verbessern. Da über eine verminderte Expression inflammatorischer Gene günstige Effekte auf den Krankheitsverlauf zu erwarten sind, wäre es wünschenswert, diesen Therapieansatz in einer placebokontrollierten Studie mit einer adäquaten Fallzahl auf seine Wirksamkeit hin zu untersuchen.

Literatur

1. Adler G: Morbus Crohn-Colitis ulcerosa. Berlin, Springer Verlage, 1996, vol 2.
2. Malchow H, Daiss W: [Therapy of Crohn's disease]. *Dtsch Med Wochenschr* 1984;109(47):1811-6.
3. Lehmann FS: [Pathophysiology of inflammatory bowel disease]. *Ther Umsch* 2003;60(3):127-32.
4. Korzenik JR, Dieckgraefe BK: Is Crohn's disease an immunodeficiency? A hypothesis suggesting possible early events in the pathogenesis of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000;45(6):1121-9.
5. Best WR, Bectel JM, Singleton JW, Kern F, Jr.: Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976;70(3):439-44.
6. Podolsky DK: Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002;347(6):417-29.
7. van Staa TP, Card T, Logan RF, Leufkens HG: 5-Aminosalicylate use and colorectal cancer risk in inflammatory bowel disease: a large epidemiological study. *Gut* 2005;54(11):1573-8.
8. Allgayer H, Hofer P, Schmidt M, Bohne P, Kruis W, Gugler R: Superoxide, hydroxyl and fatty acid radical scavenging by aminosalicylates. Direct evaluation with electron spin resonance spectroscopy. *Biochem Pharmacol* 1992;43(2):259-62.
9. Blazovics A, Kovacs A, Lugasi A, Hagymasi K, Biro L, Feher J: Antioxidant defense in erythrocytes and plasma of patients with active and quiescent Crohn disease and ulcerative colitis: a chemiluminescent study. *Clin Chem* 1999;45(6 Pt 1):895-6.
10. Dryden GW, Jr., Deaciuc I, Arteel G, McClain CJ: Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy. *Curr Gastroenterol Rep* 2005;7(4):308-16.
11. Halliwell B: Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem Soc Trans* 1996;24(4):1023-7.
12. Salganik RI: The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *J Am Coll Nutr* 2001;20(5 Suppl):464S-472S; discussion 473S-475S.
13. Hoffenberg EJ, Deutsch J, Smith S, Sokol RJ: Circulating antioxidant concentrations in children with inflammatory bowel disease. *Am J Clin Nutr* 1997;65(5):1482-8.
14. Turrens JF, Boveris A: Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 1980;191(2):421-7.
15. Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, Reddy GM, Cerchia R, Kahn E, Weissman GS, Katz S, Floyd RA, McKinley MJ, Fisher SE, Mullin GE: Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1996;41(10):2078-86.
16. Keshavarzian A, Sedghi S, Kanofsky J, List T, Robinson C, Ibrahim C, Winship D: Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: analysis by chemiluminescence probe. *Gastroenterology* 1992;103(1):177-85.
17. Halliwell B: Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? *Drugs* 1991;42(4):569-605.
18. Berg D, Youdim MB, Riederer P: Redox imbalance. *Cell Tissue Res* 2004;318(1):201-13.

19. Kruidenier L, Verspaget HW: Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16(12):1997-2015.
20. Halliwell B, Cuttleridge J: *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, 1999.
21. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(17):7915-22.
22. Sokol RJ, Hoffenberg EJ: Antioxidants in pediatric gastrointestinal disease. *Pediatr Clin North Am* 1996;43(2):471-88.
23. Lubec G: The hydroxyl radical: from chemistry to human disease. *J Investig Med* 1996;44(6):324-46.
24. Kehler J: Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1989;23:21-27.
25. Frei B, Stocker R, Ames BN: Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(24):9748-52.
26. Grisham MB: Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1994;344(8926):859-61.
27. Miralles-Barrachina O, Savoye G, Belmonte-Zalar L, Hochain P, Ducrotte P, Hecketsweiler B, Lerebours E, Dechelotte P: Low levels of glutathione in endoscopic biopsies of patients with Crohn's colitis: the role of malnutrition. *Clin Nutr* 1999;18(5):313-7.
28. Buffinton GD, Doe WF: Altered ascorbic acid status in the mucosa from inflammatory bowel disease patients. *Free Radic Res* 1995;22(2):131-43.
29. D'Odorico A, Bortolan S, Cardin R, D'Inca R, Martines D, Ferronato A, Sturniolo GC: Reduced plasma antioxidant concentrations and increased oxidative DNA damage in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001;36(12):1289-94.
30. Geerling BJ, Badart-Smook A, Stockbrugger RW, Brummer RJ: Comprehensive nutritional status in patients with long-standing Crohn disease currently in remission. *Am J Clin Nutr* 1998;67(5):919-26.
31. Holmes EW, Yong SL, Eiznhamer D, Keshavarzian A: Glutathione content of colonic mucosa: evidence for oxidative damage in active ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1998;43(5):1088-95.
32. Wendland BE, Aghdassi E, Tam C, Carrrier J, Steinhart AH, Wolman SL, Baron D, Allard JP: Lipid peroxidation and plasma antioxidant micronutrients in Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 2001;74(2):259-64.
33. Sies H: *Oxidative Stress*. London, Academic Press, 1985.
34. Keshavarzian A, Banan A, Farhadi A, Komanduri S, Mutlu E, Zhang Y, Fields JZ: Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;52(5):720-8.
35. Qiao L, Braunstein J, Golling M, Schurmann G, Autschbach F, Moller P, Meuer S: Differential regulation of human T cell responsiveness by mucosal versus blood monocytes. *Eur J Immunol* 1996;26(4):922-7.
36. Grisham MB, Granger DN: Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig Dis Sci* 1988;33(3 Suppl):6S-15S.
37. McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, Doe WF: Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1996;98(1):136-41.
38. Bala G, Czerwionka-Szaflarska M, Drewa G, Mierzwa G: An evaluation of the impact of supplementation with antioxidant vitamins on oxidation stress parameters in children with chronic recurrent gastroduodenitis. *Med Sci Monit* 2002;8(1):CR14-8.

39. Aghdassi E, Wendland BE, Steinhart AH, Wolman SL, Jeejeebhoy K, Allard JP: Antioxidant vitamin supplementation in Crohn's disease decreases oxidative stress. a randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol* 2003;98(2):348-53.
40. Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB, Verspaget HW: Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol* 2003;201(1):28-36.
41. Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320(6):365-76.
42. Middleton SJ, Shorthouse M, Hunter JO: Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet* 1993;341(8843):465-6.
43. Grisham MB, Yamada T: Neutrophils, nitrogen oxides, and inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* 1992;664:103-15.
44. Harris ML, Schiller HJ, Reilly PM, Donowitz M, Grisham MB, Bulkley GB: Free radicals and other reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease: cause, consequence or epiphenomenon? *Pharmacol Ther* 1992;53(3):375-408.
45. Singer II, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mumford RA, Riehl TE, Stenson WF: Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1996;111(4):871-85.
46. Banan A, Fields JZ, Decker H, Zhang Y, Keshavarzian A: Nitric oxide and its metabolites mediate ethanol-induced microtubule disruption and intestinal barrier dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;294(3):997-1008.
47. Kubes P, McCafferty DM: Nitric oxide and intestinal inflammation. *Am J Med* 2000;109(2):150-8.
48. Grisham MB, MacDermott RP, Deitch EA: Oxidant defense mechanisms in the human colon. *Inflammation* 1990;14(6):669-80.
49. Oriishi T, Sata M, Toyonaga A, Sasaki E, Tanikawa K: Evaluation of intestinal permeability in patients with inflammatory bowel disease using lactulose and measuring antibodies to lipid A. *Gut* 1995;36(6):891-6.
50. Muller MJ, Schmidt LU, Korber J, von zur Muhlen A, Canzler H, Schmidt FW: Reduced metabolic efficiency in patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1993;38(11):2001-9.
51. Gardiner KR, Halliday MI, Barclay GR, Milne L, Brown D, Stephens S, Maxwell RJ, Rowlands BJ: Significance of systemic endotoxaemia in inflammatory bowel disease. *Gut* 1995;36(6):897-901.
52. Fernandez-Banares F, Abad-Lacruz A, Xiol X, Gine JJ, Dolz C, Cabre E, Esteve M, Gonzalez-Huix F, Gassull MA: Vitamin status in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1989;84(7):744-8.
53. Kuroki F, Iida M, Tominaga M, Matsumoto T, Hirakawa K, Sugiyama S, Fujishima M: Multiple vitamin status in Crohn's disease. Correlation with disease activity. *Dig Dis Sci* 1993;38(9):1614-8.
54. Bousvaros A, Zurakowski D, Duggan C, Law T, Rifai N, Goldberg NE, Leichtner AM: Vitamins A and E serum levels in children and young adults with inflammatory bowel disease: effect of disease activity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;26(2):129-35.
55. Geerling BJ, v Houwelingen AC, Badart-Smook A, Stockbrugger RW, Brummer RJ: The relation between antioxidant status and alterations in fatty acid profile in patients with Crohn disease and controls. *Scand J Gastroenterol* 1999;34(11):1108-16.
56. Tuzun A, Erdil A, Inal V, Aydin A, Bagci S, Yesilova Z, Sayal A, Karaeren N, Dagalp K: Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Biochem* 2002;35(7):569-72.

57. Genser D, Kang MH, Vogelsang H, Elmadfa I: Status of lipidsoluble antioxidants and TRAP in patients with Crohn's disease and healthy controls. *Eur J Clin Nutr* 1999;53(9):675-9.
58. Levy E, Rizwan Y, Thibault L, Lepage G, Brunet S, Bouthillier L, Seidman E: Altered lipid profile, lipoprotein composition, and oxidant and antioxidant status in pediatric Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 2000;71(3):807-15.
59. Sampietro GM, Cristaldi M, Cervato G, Maconi G, Danelli P, Cervellione R, Rovati M, Porro GB, Cestaro B, Taschieri AM: Oxidative stress, vitamin A and vitamin E behaviour in patients submitted to conservative surgery for complicated Crohn's disease. *Dig Liver Dis* 2002;34(10):696-701.
60. Reimund JM, Hirth C, Koehl C, Baumann R, Duclos B: Antioxidant and immune status in active Crohn's disease. A possible relationship. *Clin Nutr* 2000;19(1):43-8.
61. Halliwell B: Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* 1997;55(1 Pt 2):S44-9; discussion S49-52.
62. Burton GW, Ingold KU: beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 1984;224(4649):569-73.
63. Halliwell B: The antioxidant paradox. *Lancet* 2000;355(9210):1179-80.
64. Gutteridge JM: Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 1994;91(2-3):133-40.
65. Yamada T, Grisham MB: Role of neutrophil-derived oxidants in the pathogenesis of intestinal inflammation. *Klin Wochenschr* 1991;69(21-23):988-94.
66. Packer JE, Slater TF, Willson RL: Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 1979;278(5706):737-8.
67. Bode AM, Cunningham L, Rose RC: Spontaneous decay of oxidized ascorbic acid (dehydro-L-ascorbic acid) evaluated by high-pressure liquid chromatography. *Clin Chem* 1990;36(10):1807-9.
68. Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H: Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother* 1999;53(4):169-80.
69. Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, Conti M, Legrand A: Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000;3(5):373-84.
70. Halliwell B, Wasil M, Grootveld M: Biologically significant scavenging of the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid. Implications for antioxidant protection in the inflamed rheumatoid joint. *FEBS Lett* 1987;213(1):15-7.
71. Sido B, Hack V, Hochlehnert A, Lipps H, Herfarth C, Droge W: Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;42(4):485-92.
72. Fang YZ, Yang S, Wu G: Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002;18(10):872-9.
73. Aw TY: Intestinal glutathione: determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;204(3):320-8.
74. Hinks LJ, Inwards KD, Lloyd B, Clayton B: Reduced concentrations of selenium in mild Crohn's disease. *J Clin Pathol* 1988;41(2):198-201.
75. Rannem T, Ladefoged K, Hylander E, Hegnhøj J, Jarnum S: Selenium status in patients with Crohn's disease. *Am J Clin Nutr* 1992;56(5):933-7.
76. Dubey SS, Sinha KK, Gupta JP: Vitamin C status, glutathione and histamine in gastric carcinoma, tuberculous enteritis and non-specific ulcerative colitis. *Indian J Physiol Pharmacol* 1985;29(2):111-4.

77. Imes S, Pinchbeck B, Dinwoodie A, Walker K, Thomson AB: Vitamin A status in 137 patients with Crohn's disease. *Digestion* 1987;37(3):166-70.
78. Campos FG, Waitzberg DL, Teixeira MG, Mucerino DR, Kiss DR, Habr-Gama A: Pharmacological nutrition in inflammatory bowel diseases. *Nutr Hosp* 2003;18(2):57-64.
79. Jacobson S, Plantin LO: Concentration of selenium in plasma and erythrocytes during total parenteral nutrition in Crohn's disease. *Gut* 1985;26(1):50-4.
80. Buffinton GD, Doe WF: Depleted mucosal antioxidant defences in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 1995;19(6):911-8.
81. Kruidenier L, Kuiper I, Van Duijn W, Mieremet-Ooms MA, van Hogezaand RA, Lamers CB, Verspaget HW: Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 2003;201(1):17-27.
82. Morgenstern I, Raijmakers MT, Peters WH, Hoensch H, Kirch W: Homocysteine, cysteine, and glutathione in human colonic mucosa: elevated levels of homocysteine in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2003;48(10):2083-90.
83. Kruidenier L, Kuiper I, van Duijn W, Marklund SL, van Hogezaand RA, Lamers CB, Verspaget HW: Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 2003;201(1):7-16.
84. Grimble RF: Nutritional antioxidants and the modulation of inflammation: theory and practice. *New Horiz* 1994;2(2):175-85.
85. Reimund JM, Allison AC, Muller CD, Dumont S, Kenney JS, Baumann R, Duclos B, Poindron P: Antioxidants inhibit the in vitro production of inflammatory cytokines in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur J Clin Invest* 1998;28(2):145-50.
86. Thomson A, Hemphill D, Jeejeebhoy KN: Oxidative stress and antioxidants in intestinal disease. *Dig Dis* 1998;16(3):152-8.
87. Geerling BJ, Badart-Smook A, van Deursen C, van Houwelingen AC, Russel MG, Stockbrugger RW, Brummer RJ: Nutritional supplementation with N-3 fatty acids and antioxidants in patients with Crohn's disease in remission: effects on antioxidant status and fatty acid profile. *Inflamm Bowel Dis* 2000;6(2):77-84.
88. Trebble TM, Stroud MA, Wootton SA, Calder PC, Fine DR, Mullee MA, Moniz C, Arden NK: High-dose fish oil and antioxidants in Crohn's disease and the response of bone turnover: a randomised controlled trial. *Br J Nutr* 2005;94(2):253-61.
89. Sturniolo GC, Di Leo V, Ferronato A, D'Odorico A, D'Inca R: Zinc supplementation tightens "leaky gut" in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7(2):94-8.
90. Trebble TM, Arden NK, Wootton SA, Calder PC, Mullee MA, Fine DR, Stroud MA: Fish oil and antioxidants alter the composition and function of circulating mononuclear cells in Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 2004;80(5):1137-44.
91. Best WR, Bechtel JM, Singleton JW, Kern F, Jr.: Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976;70(3):439-44.
92. Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R: Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res* 1994;307(1):323-33.
93. Vuilleumier JP, Keller HE, Gysel D, Hunziker F: Clinical chemical methods for the routine assessment of the vitamin status in human populations. Part I: The fat-soluble vitamins A and E, and beta-carotene. *Int J Vitam Nutr Res* 1983;53(3):265-72.

94. Steffan J: Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma und Leukozyten mit HPLC/UV und HPLC/EC: Methodenentwicklung, Validierung und Anwendung Universität Paderborn, 1999.
95. Furst P, Pollack L, Graser TA, Godel H, Stehle P: Appraisal of four pre-column derivatization methods for the high-performance liquid chromatographic determination of free amino acids in biological materials. *J Chromatogr* 1990;499:557-69.
96. Graser TA: Bestimmung von freien Aminosäuren in biologischem Material mittels HPLC. Automatisierung und Anwendungsmöglichkeiten der Vorsäulen-Derivatisierung mit 0-Phthaldialdehyd Universität Hohenheim, 1987.
97. Kuhn KS, Krasselt AI, Furst P: Glutathione and glutathione metabolites in small tissue samples and mucosal biopsies. *Clin Chem* 2000;46(7):1003-5.
98. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A: A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)* 1993;84(4):407-12.
99. Kassie F, Parzefall W, Knasmüller S: Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res* 2000;463(1):13-31.
100. Ostling O, Johanson KJ: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;123(1):291-8.
101. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175(1):184-91.
102. Bauch T, Bocker W, Mallek U, Müller WU, Streffer C: Optimization and standardization of the "comet assay" for analyzing the repair of DNA damage in cells. *Strahlenther Onkol* 1999;175(7):333-40.
103. Collins A, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslova K, Vaughan N: Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen* 1997;30(2):139-46.
104. Aruoma OI: Antioxidant actions of plant foods: use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy. *Free Radic Res* 1999;30(6):419-27.
105. Moller P, Loft S: Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2002;76(2):303-10.
106. Giovannelli L, Pitozzi V, Riolo S, Dolara P: Measurement of DNA breaks and oxidative damage in polymorphonuclear and mononuclear white blood cells: a novel approach using the comet assay. *Mutat Res* 2003;538(1-2):71-80.
107. Benitez-Bribiesca L, Sanchez-Suarez P: Oxidative damage, bleomycin, and gamma radiation induce different types of DNA strand breaks in normal lymphocytes and thymocytes. A comet assay study. *Ann N Y Acad Sci* 1999;887:133-49.
108. Collins AR, Ma AG, Duthie SJ: The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res* 1995;336(1):69-77.
109. Riso P, Pinder A, Santangelo A, Porrini M: Does tomato consumption effectively increase the resistance of lymphocyte DNA to oxidative damage? *Am J Clin Nutr* 1999;69(4):712-8.
110. Loft S, Poulsen HE: Antioxidant intervention studies related to DNA damage, DNA repair and gene expression. *Free Radic Res* 2000;33 Suppl:S67-83.
111. Arendt BM: Auswirkungen eines moderaten Konsums von nativem oder entalkoholisierendem Rotwein auf antioxidative Parameter im Blut und DNA-

- Strangbrüche in peripheren Leukozyten gesunder Proband/inn/en - Ergebnisse einer Interventionsstudie Universität Bonn, 2003.
112. Stallmach A, Giese T, Schmidt C, Ludwig B, Mueller-Molaian I, Meuer SC: Cytokine/chemokine transcript profiles reflect mucosal inflammation in Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis* 2003.
 113. Stallmach A, Zeitz M: Immunsuppression bei Morbus Crohn. *Deutsches Ärzteblatt* 2003;100(43):A2787-2792.
 114. Guyatt G, Mitchell A, Irvine EJ, Singer J, Williams N, Goodacre R, Tompkins C: A new measure of health status for clinical trials in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989;96(3):804-10.
 115. Sostegni R, Daperno M, Scaglione N, Lavagna A, Rocca R, Pera A: Review article: Crohn's disease: monitoring disease activity. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17 Suppl 2:11-7.
 116. Detsky AS, McLaughlin JR, Baker JP, Johnston N, Whittaker S, Mendelson RA, Jeejeebhoy KN: What is subjective global assessment of nutritional status? *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1987;11(1):8-13.
 117. Guyatt G, Mitchell A, Irvine EJ, Singer J, Williams N, Goodacre R, Tompkins C: A new measure of health status for clinical trials in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989;96(3):804-10.
 118. Suter P: Checkliste Ernährung. Stuttgart, Thieme, 2005, vol 2. Auflage.
 119. Isozaki Y, Yoshida N, Kuroda M, Takagi T, Handa O, Kokura S, Ichikawa H, Naito Y, Okanoue T, Yoshikawa T: Effect of a novel water-soluble vitamin E derivative as a cure for TNBS-induced colitis in rats. *Int J Mol Med* 2006;17(3):497-502.
 120. Luhrmann PM, Herbert BM, Gaster C, Neuhauser-Berthold M: Validation of a self-administered 3-day estimated dietary record for use in the elderly. *Eur J Nutr* 1999;38(5):235-40.
 121. Hesecker H, Kohlmeier M, Schneider R: [Lipid adjustment of alpha-tocopherol concentrations in plasma]. *Z Ernährungswiss* 1993;32(3):219-28.
 122. Blomhoff R: Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr Rev* 1994;52(2 Pt 2):S13-23.
 123. O'Dell BL: Role of zinc in plasma membrane function. *J Nutr* 2000;130(5S Suppl):1432S-6S.
 124. Roth HP, Kirchgessner M: [Diagnosis of zinc deficiency]. *Z Gerontol Geriatr* 1999;32 Suppl 1:I55-63.
 125. Cao G, Prior RL: Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem* 1998;44(6 Pt 1):1309-15.
 126. Arendt BM, Boetzer AM, Lemoch H, Winkler P, Rockstroh JK, Berthold HK, Spengler U, Goerlich R: Plasma antioxidant capacity of HIV-seropositive and healthy subjects during long-term ingestion of fruit juices or a fruit-vegetable-concentrate containing antioxidant polyphenols. *Eur J Clin Nutr* 2001;55(9):786-92.
 127. Collins AR, Horvathova E: Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochem Soc Trans* 2001;29(Pt 2):337-41.
 128. Duthie SJ, Ma A, Ross MA, Collins AR: Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res* 1996;56(6):1291-5.
 129. Riso P, Pinder A, Santangelo A, Porrini M: Does tomato consumption effectively increase the resistance of lymphocyte DNA to oxidative damage? *Am J Clin Nutr* 1999;69(4):712-8.

130. Chung MH, Kasai H, Jones DS, Inoue H, Ishikawa H, Ohtsuka E, Nishimura S: An endonuclease activity of *Escherichia coli* that specifically removes 8-hydroxyguanine residues from DNA. *Mutat Res* 1991;254(1):1-12.
131. Poulsen HE: Oxidative DNA modifications. *Exp Toxicol Pathol* 2005;57 Suppl 1:161-9.
132. Kuchino Y, Mori F, Kasai H, Inoue H, Iwai S, Miura K, Ohtsuka E, Nishimura S: Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* 1987;327(6117):77-9.
133. Moller P, Loft S: Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damaged DNA. *Free Radic Biol Med* 2006;41(3):388-415.
134. Morrow JD, Roberts LJ, 2nd: The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol* 1996;51(1):1-9.
135. Milne GL, Musiek ES, Morrow JD: F2-isoprostanes as markers of oxidative stress in vivo: an overview. *Biomarkers* 2005;10 Suppl 1:S10-23.
136. Musiek ES, Yin H, Milne GL, Morrow JD: Recent advances in the biochemistry and clinical relevance of the isoprostane pathway. *Lipids* 2005;40(10):987-94.
137. Morrow JD, Minton TA, Mukundan CR, Campbell MD, Zackert WE, Daniel VC, Badr KF, Blair IA, Roberts LJ, 2nd: Free radical-induced generation of isoprostanes in vivo. Evidence for the formation of D-ring and E-ring isoprostanes. *J Biol Chem* 1994;269(6):4317-26.
138. Musiek ES, Yin H, Milne GL, Morrow JD: Recent advances in the biochemistry and clinical relevance of the isoprostane pathway. *Lipids* 2005;40(10):987-94.
139. Janero DR, Burghardt B: Analysis of cardiac membrane phospholipid peroxidation kinetics as malondialdehyde: nonspecificity of thiobarbituric acid-reactivity. *Lipids* 1988;23(5):452-8.
140. Moore K, Roberts LJ, 2nd: Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 1998;28(6):659-71.
141. Schmidt C, Giese T, Ludwig B, Menges M, Schilling M, Meuer SC, Zeuzem S, Stallmach A: Increased cytokine transcripts in pouchitis reflect the degree of inflammation but not the underlying entity. *Int J Colorectal Dis* 2006;21(5):419-26.
142. Yamamoto T, Nakahigashi M, Umegae S, Kitagawa T, Matsumoto K: Impact of elemental diet on mucosal inflammation in patients with active Crohn's disease: cytokine production and endoscopic and histological findings. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11(6):580-8.
143. Irvine EJ, Feagan B, Rochon J, Archambault A, Fedorak RN, Groll A, Kinnear D, Saibil F, McDonald JW: Quality of life: a valid and reliable measure of therapeutic efficacy in the treatment of inflammatory bowel disease. Canadian Crohn's Relapse Prevention Trial Study Group. *Gastroenterology* 1994;106(2):287-96.
144. Janke KH, Klump B, Steder-Neukamm U, Hoffmann J, Hauser W: [Validation of the German Version of the Inflammatory Bowel Disease Questionnaire (Competence Network IBD, IBDQ-D)]. *Psychother Psychosom Med Psychol* 2006.
145. Hlavaty T, Persoons P, Vermeire S, Ferrante M, Pierik M, Van Assche G, Rutgeerts P: Evaluation of short-term responsiveness and cutoff values of inflammatory bowel disease questionnaire in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(3):199-204.
146. Barbosa-Silva MC, Barros AJ: Indications and limitations of the use of subjective global assessment in clinical practice: an update. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006;9(3):263-9.
147. Morrissey PA, Sheehy PJ, Gaynor P: Vitamin E. *Int J Vitam Nutr Res* 1993;63(4):260-4.

148. Goodman DS: Vitamin A transport and retinol-binding protein metabolism. *Vitam Horm* 1974;32:167-80.
149. van Antwerpen L, Theron AJ, Myer MS, Richards GA, Wolmarans L, Booyesen U, van der Merwe CA, Sluis-Cremer GK, Anderson R: Cigarette smoke-mediated oxidant stress, phagocytes, vitamin C, vitamin E, and tissue injury. *Ann N Y Acad Sci* 1993;686:53-65.
150. Duthie GG: Determination of activity of antioxidants in human subjects. *Proc Nutr Soc* 1999;58(4):1015-24.
151. Speek AJ, Schrijver J, Schreurs WH: Fluorometric determination of total vitamin C in whole blood by high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization. *J Chromatogr* 1984;305(1):53-60.
152. Ringstad J, Kildebo S, Thomassen Y: Serum selenium, copper, and zinc concentrations in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 1993;28(7):605-8.
153. Deutsche Gesellschaft für Ernährung: Empfehlungen für die Nährstoffzufuhr, Umschau, 1995.
154. Chu FF, Esworthy RS, Doroshov JH: Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Radic Biol Med* 2004;36(12):1481-95.
155. Sturniolo GC, Mastropaolo G, Naccarato R: Zinc concentrations. *Gastroenterology* 1980;79(1):185-6.
156. Fernandez-Banares F, Mingorance MD, Esteve M, Cabre E, Lachica M, Abad-Lacruz A, Gil A, Humbert P, Boix J, Gassull MA: Serum zinc, copper, and selenium levels in inflammatory bowel disease: effect of total enteral nutrition on trace element status. *Am J Gastroenterol* 1990;85(12):1584-9.
157. Mulder TP, van der Sluys Veer A, Verspaget HW, Griffioen G, Pena AS, Janssens AR, Lamers CB: Effect of oral zinc supplementation on metallothionein and superoxide dismutase concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1994;9(5):472-7.
158. Ainley C, Cason J, Slavin BM, Wolstencroft RA, Thompson RP: The influence of zinc status and malnutrition on immunological function in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1991;100(6):1616-25.
159. Goode HF, Rathbone BJ, Kelleher J, Walker BE: Monocyte zinc and in vitro prostaglandin E2 and interleukin-1 beta production by cultured peripheral blood monocytes in patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1991;36(5):627-33.
160. Terwolbeck K, Purrmann J, Kuhn S, Haas A, Lombeck I: Zinc in lymphocytes--the assessment of zinc status in patients with Crohn's disease. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1992;6(2):117-21.
161. Chu FF, Esworthy RS, Doroshov JH: Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Radic Biol Med* 2004;36(12):1481-95.
162. Hocke M, Winnefeld K, Bosseckert H: Zinc concentration in serum and leucocytes in chronic inflammatory diseases. *J Trace Elem Med Biol* 1995;9(2):112-6.
163. Valberg LS, Flanagan PR, Kertesz A, Bondy DC: Zinc absorption in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1986;31(7):724-31.
164. Naber TH, van den Hamer CJ, Baadenhuysen H, Jansen JB: The value of methods to determine zinc deficiency in patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1998;33(5):514-23.

165. Kruis W, Rindfleisch GE, Weinzierl M: Zinc deficiency as a problem in patients with Crohn's disease and fistula formation. *Hepatogastroenterology* 1985;32(3):133-4.
166. Sjogren A, Floren CH, Nilsson A: Evaluation of zinc status in subjects with Crohn's disease. *J Am Coll Nutr* 1988;7(1):57-60.
167. Hendricks KM, Walker WA: Zinc deficiency in inflammatory bowel disease. *Nutr Rev* 1988;46(12):401-8.
168. Valberg LS, Flanagan PR, Kertesz A, Bondy DC: Zinc absorption in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1986;31(7):724-31.
169. Senkal M, Hummel T, Steinfort C, Deska T, Alteheld B, Stehle P, Zumtobel V: early gut feeding with conditionally indispensable pharmaconutrients is metabolically safe and well tolerated in postoperative cancer patients - a pilot study. 2004.
170. Wernerman J, Hammarqvist F: Modulation of endogenous glutathione availability. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1999;2(6):487-92.
171. Senkal M, Haaker R, Deska T, Hummel T, Steinfort C, Zumtobel V, Alteheld B, Stehle P: Early enteral gut feeding with conditionally indispensable pharmaconutrients is metabolically safe and is well tolerated in postoperative cancer patients--a pilot study. *Clin Nutr* 2004;23(5):1193-8.
172. Den Hond E, Hiele M, Peeters M, Ghooys Y, Rutgeerts P: Effect of long-term oral glutamine supplements on small intestinal permeability in patients with Crohn's disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1999;23(1):7-11.
173. Bourreille A, Humbert B, Maugere P, Galniche JP, Darmaun D: Glutamine metabolism in Crohn's disease: a stable isotope study. *Clin Nutr* 2004;23(5):1167-75.
174. Akobeng AK, Miller V, Stanton J, Elbadri AM, Thomas AG: Double-blind randomized controlled trial of glutamine-enriched polymeric diet in the treatment of active Crohn's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30(1):78-84.
175. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND: Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004;134(3):489-92.
176. Jahoor F, Jackson A, Gazzard B, Philips G, Sharpstone D, Frazer ME, Heird W: Erythrocyte glutathione deficiency in symptom-free HIV infection is associated with decreased synthesis rate. *Am J Physiol* 1999;276(1 Pt 1):E205-11.
177. Lyons J, Rauh-Pfeiffer A, Yu YM, Lu XM, Zurakowski D, Tompkins RG, Ajami AM, Young VR, Castillo L: Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(10):5071-6.
178. Schroeder J, Alteheld B, Stehle P, Cayeux MC, Chioloro RL, Berger MM: Safety and intestinal tolerance of high-dose enteral antioxidants and glutamine peptides after upper gastrointestinal surgery. *Eur J Clin Nutr* 2005;59(2):307-10.
179. Wessner B, Strasser EM, Spittler A, Roth E: Effect of single and combined supply of glutamine, glycine, N-acetylcysteine, and R,S-alpha-lipoic acid on glutathione content of myelomonocytic cells. *Clin Nutr* 2003;22(6):515-22.
180. Johnson AT, Kaufmann YC, Luo S, Todorova V, Klimberg VS: Effect of glutamine on glutathione, IGF-I, and TGF-beta 1. *J Surg Res* 2003;111(2):222-8.
181. Iantomasi T, Marraccini P, Favilli F, Vincenzini MT, Ferretti P, Tonelli F: Glutathione metabolism in Crohn's disease. *Biochem Med Metab Biol* 1994;53(2):87-91.
182. Jonas CR, Gu LH, Nkabyo YS, Mannery YO, Avissar NE, Sax HC, Jones DP, Ziegler TR: Glutamine and KGF each regulate extracellular thiol/disulfide redox

- and enhance proliferation in Caco-2 cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285(6):R1421-9.
183. Ghiselli A, Natella F, Guidi A, Montanari L, Fantozzi P, Scaccini C: Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr Biochem* 2000;11(2):76-80.
184. Schofield D, Braganza JM: Shortcomings of an automated assay for total antioxidant status in biological fluids. *Clin Chem* 1996;42(10):1712-4.
185. Müller N, Schlüter V, Scharfhausen J, Ellinger S, Alteheld B, Ulrich-Merzenich G, Vetter H, Berthold HK, Stehle P: Bolus ingestion of white or green tea stabilizes the extracellular pro-/ antioxidant balance but does not protect from H₂O₂-induced DNA strand breaks in leukocytes: 10th Karlsruhe Nutrition Congress, 2006, pp 70-71.
186. Adolf T, Schneider R, Eberhardt W, Hartmann S, Herwig A, Hesecker H, Hünchen K, Kübler W, Matiaske B, Moch K, Rosenbauer J: Ergebnisse der Nationalen Verzehrsstudie (1985-1988) über die Lebensmittel- und Nährstoffaufnahme in der Bundesrepublik Deutschland. Niederkleen, Wissenschaftlicher Verlag Dr. Fleck, 1995.
187. Cao Y, Feng Z, Hoos A, Klimberg VS: Glutamine enhances gut glutathione production. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1998;22(4):224-7.
188. Woodford FP, Whitehead TP: Is measuring serum antioxidant capacity clinically useful? *Ann Clin Biochem* 1998;35 (Pt 1):48-56.
189. Woodford FP, Whitehead TP: Is measuring serum antioxidant capacity clinically useful? *Ann Clin Biochem* 1998;35 (Pt 1):48-56.
190. Prior RL, Cao G: In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* 1999;27(11-12):1173-81.
191. Kinnula VL, Soini Y, Kvist-Makela K, Savolainen ER, Koistinen P: Antioxidant defense mechanisms in human neutrophils. *Antioxid Redox Signal* 2002;4(1):27-34.
192. Pietarinen-Runtti P, Lakari E, Raivio KO, Kinnula VL: Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278(1):C118-25.
193. Collins BH, Horska A, Hotten PM, Riddoch C, Collins AR: Kiwifruit protects against oxidative DNA damage in human cells and in vitro. *Nutr Cancer* 2001;39(1):148-53.
194. Porrini M, Riso P: Lymphocyte lycopene concentration and DNA protection from oxidative damage is increased in women after a short period of tomato consumption. *J Nutr* 2000;130(2):189-92.
195. Porrini M, Riso P, Brusamolino A, Berti C, Guarnieri S, Visioli F: Daily intake of a formulated tomato drink affects carotenoid plasma and lymphocyte concentrations and improves cellular antioxidant protection. *Br J Nutr* 2005;93(1):93-9.
196. Moller P, Loft S, Alfthan G, Freese R: Oxidative DNA damage in circulating mononuclear blood cells after ingestion of blackcurrant juice or anthocyanin-rich drink. *Mutat Res* 2004;551(1-2):119-26.
197. Moller P, Vogel U, Pedersen A, Dragsted LO, Sandstrom B, Loft S: No effect of 600 grams fruit and vegetables per day on oxidative DNA damage and repair in healthy nonsmokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12(10):1016-22.
198. Riso P, Visioli F, Grande S, Guarnieri S, Gardana C, Simonetti P, Porrini M: Effect of a tomato-based drink on markers of inflammation, immunomodulation, and oxidative stress. *J Agric Food Chem* 2006;54(7):2563-6.

199. van den Berg R, van Vliet T, Broekmans WM, Cnubben NH, Vaes WH, Roza L, Haenen GR, Bast A, van den Berg H: A vegetable/fruit concentrate with high antioxidant capacity has no effect on biomarkers of antioxidant status in male smokers. *J Nutr* 2001;131(6):1714-22.
200. Loft S, Poulsen HE: Antioxidant intervention studies related to DNA damage, DNA repair and gene expression. *Free Radic Res* 2000;33 Suppl:S67-83.
201. Halliwell B: Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am J Clin Nutr* 2000;72(5):1082-7.
202. Guetens G, De Boeck G, Highley M, van Oosterom AT, de Bruijn EA: Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2002;39(4-5):331-457.
203. Singh NP: Sodium ascorbate induces DNA single-strand breaks in human cells in vitro. *Mutat Res* 1997;375(2):195-203.
204. Szeto YT, Benzie IF: Effects of dietary antioxidants on human DNA ex vivo. *Free Radic Res* 2002;36(1):113-8.
205. Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R: The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 1997;375(2):183-93.
206. Duthie GG: Determination of activity of antioxidants in human subjects. *Proc Nutr Soc* 1999;58(4):1015-24.
207. Prieme H, Loft S, Nyyssonen K, Salonen JT, Poulsen HE: No effect of supplementation with vitamin E, ascorbic acid, or coenzyme Q10 on oxidative DNA damage estimated by 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion in smokers. *Am J Clin Nutr* 1997;65(2):503-7.
208. Foksinski M, Gackowski D, Rozalski R, Olinski R: Cellular level of 8-oxo-2'-deoxyguanosine in DNA does not correlate with urinary excretion of the modified base/nucleoside. *Acta Biochim Pol* 2003;50(2):549-53.
209. McKenzie SM, Doe WF, Buffinton GD: 5-aminosalicylic acid prevents oxidant mediated damage of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in colon epithelial cells. *Gut* 1999;44(2):180-5.
210. Cracowski JL, Bonaz B, Bessard G, Bessard J, Anglade C, Fournet J: Increased urinary F2-isoprostanes in patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002;97(1):99-103.
211. Aghdassi E, Allard JP: Breath alkanes as a marker of oxidative stress in different clinical conditions. *Free Radic Biol Med* 2000;28(6):880-6.
212. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ, 2nd: Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* 1995;332(18):1198-203.
213. Montuschi P, Mondino C, Koch P, Barnes PJ, Ciabattoni G: Effects of a leukotriene receptor antagonist on exhaled leukotriene E4 and prostanoids in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118(2):347-53.
214. Wang Z, Ciabattoni G, Creminon C, Lawson J, Fitzgerald GA, Patrono C, Maclouf J: Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F2 alpha excretion in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275(1):94-100.
215. Daig R, Andus T, Aschenbrenner E, Falk W, Scholmerich J, Gross V: Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1996;38(2):216-22.
216. Schmid KW, Luger N, Stoll R, Brinkbaumer P, Winde G, Domschke W, Bocker W, Sorg C: Immunohistochemical demonstration of the calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 and their heterodimer (27E10 antigen) in Crohn's disease. *Hum Pathol* 1995;26(3):334-7.

217. Autschbach F, Giese T, Gassler N, Sido B, Heuschen G, Heuschen U, Zuna I, Schulz P, Weckauf H, Berger I, Otto HF, Meuer SC: Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Virchows Arch* 2002;441(5):500-13.
218. Nielsen OH, Rudiger N, Gaustadnes M, Horn T: Intestinal interleukin-8 concentration and gene expression in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1997;32(10):1028-34.
219. MacDermott RP: Chemokines in the inflammatory bowel diseases. *J Clin Immunol* 1999;19(5):266-72.
220. Ajuebor MN, Swain MG: Role of chemokines and chemokine receptors in the gastrointestinal tract. *Immunology* 2002;105(2):137-43.
221. Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Watanabe K, Tateishi H, Nishiyama T, Saiki T, Ikeda H, Tsuruta O, Tanikawa K: IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1994;96(3):432-6.
222. Daig R, Andus T, Aschenbrenner E, Falk W, Scholmerich J, Gross V: Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1996;38(2):216-22.
223. Irvine EJ, Feagan B, Rochon J, Archambault A, Fedorak RN, Groll A, Kinnear D, Saibil F, McDonald JW: Quality of life: a valid and reliable measure of therapeutic efficacy in the treatment of inflammatory bowel disease. Canadian Crohn's Relapse Prevention Trial Study Group. *Gastroenterology* 1994;106(2):287-96.
224. Janke KH, Klump B, Steder-Neukamm U, Hoffmann J, Hauser W: [Validation of the German Version of the Inflammatory Bowel Disease Questionnaire (Competence Network IBD, IBDQ-D)]. *Psychother Psychosom Med Psychol* 2006.
225. Norman K, Kirchner H, Lochs H, Pirlich M: Malnutrition affects quality of life in gastroenterology patients. *World J Gastroenterol* 2006;12(21):3380-5.
226. Schütz T, Plauth M: Subjective Global Assessment - eine Methode zur Erfassung des Ernährungszustandes. *Aktuel Ernaehr Med* 2005;30:43-8.
227. Lim SH, Lee JS, Chae SH, Ahn BS, Chang DJ, Shin CS: Prealbumin is not sensitive indicator of nutrition and prognosis in critical ill patients. *Yonsei Med J* 2005;46(1):21-6.
228. Singh H, Watt K, Veitch R, Cantor M, Duerksen DR: Malnutrition is prevalent in hospitalized medical patients: are housestaff identifying the malnourished patient? *Nutrition* 2006;22(4):350-4.
229. Bässler KH, Golly I, Loew D, Pietrzik K: *Vitaminlexikon*, Gustav Fischer, 1997, vol 2.
230. Yao JK, Leonard S, Reddy R: Altered glutathione redox state in schizophrenia. *Dis Markers* 2006;22(1-2):83-93.
231. Liu H, Colavitti R, Rovira, II, Finkel T: Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res* 2005;97(10):967-74.
232. Droge W: Redox regulation in anabolic and catabolic processes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006;9(3):190-5.
233. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I: Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2004;43(3):200-27.
234. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P: C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10(5):661-5.
235. Solem CA, Loftus EV, Jr., Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ: Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic,

histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11(8):707-12.

Anhang

Anhang A

Aufnahme

Klinik Nr.

--	--

Proband Nr.

--	--	--

Allgemeine Patientendaten (I)

Datum

__ . __ . 2004

Geschlecht

männlich weiblich

Geburtsdatum

__ . __ . ____

Aufnahme

Ambulant
 Stationär (Notambulanz / Chirurgie / Innere Medizin)
 Sonstige: _____

Vorverweildauer

_____ Tage

Staatsangehörigkeit

deutsch
 andere _____

Geburtsland

Deutschland
 anderes Land _____

Aufnahme

Klinik Nr.

--	--

Proband Nr.

--	--	--

Allgemeine Patientendaten (II)

Körperliche Situation

	ICD-10-Code
Aufnahme- / Arbeitsdiagnose	_____ . ____
Nebendiagnosen bei Aufnahme	_____ . ____
_____	_____ . ____
_____	_____ . ____
_____	_____ . ____

Medikamente

_____	_____
Stück/Tag	_____
_____	_____
Stück/Tag	_____
_____	_____
Stück/Tag	_____

- 5-ASA ja nein
- Antibiotika ja nein
- Immunsuppressiva ja nein
- Keine Medikation ja nein

- Einnahme von Corticosteroiden ja nein, nicht seit _____
- CDAI < 150 150-250 > 250

Wie lange besteht die Krankheit schon? Diagnose? _____

Welche Darmabschnitte sind hauptsächlich befallen? Kolon Dünndarm Ileum Sonstige

- Dünndarmresektion ja nein
- Kurzdarmsyndrom ja nein

Allergien / Unverträglichkeiten

- Bestehen Nahrungsmittelallergien oder Intoleranzen? ja nein
- Besteht eine Lactoseintoleranz? ja nein
- Besteht eine Zöliakie / Sprue? ja nein

Ergebnis der Biopsie:

- Abszesse ja nein
Stenosen ja nein
Fissuren ja nein

Besonderheiten _____

Biopsie entnommen aus: Rektum sonstige Abschnitte, welche _____

Klinische Einschätzung

- unterernährt
 normal ernährt
 überernährt

Anthropometrie

aktuelles Gewicht _____, ____ kg
Größe _____, ____ cm (stehend / liegend / nicht gemessen / Ausweis)
BMI _____

Labor

Albumin (neph.) (g/dL) _____%	_____	Creatinin (mg/dL)	_____
Leukozyten (TSD)	_____	Harnstoff (mg/dL)	_____
Erythrozyten (Mio.)	_____	Cholesterin (mg/dL)	_____
Hämoglobin (g/dL)	_____	Gesamtprotein (g/dL)	_____
Hämatokrit (L/L)	_____	Cholinesterase (u/L)	_____
Thrombozyten (TSD)	_____	Natrium (mval/L)	_____
Lymphozyten (%)	_____	Kalium (mval/L)	_____
abs. Lymphozytenzahl (TSD/ μ l)	_____	Calcium (mval/L)	_____
Blutglucose (mg/dL)	_____	CRP (mg/dL)	_____
_____	_____	Harnsäure _____	_____

B. Untersuchung (0 = normal, 1+ = gering; 2+ = mäßig, 3+ = ausgeprägt)

- ___ Verlust von subkutanem Fettgewebe (Trizeps, Brust)
- ___ Muskelatrophie (Quadrizeps, Deltoideus)
- ___ Knöchelödem
- ___ Präsakrale Ödeme (Anasarka)
- ___ Aszites

C. Subjektive Einschätzung des Ernährungszustandes

- A = gut ernährt
- B = mäßig mangelernährt oder mit Verdacht auf Mangelernährung
- C = schwer mangelernährt

Aufnahme **Klinik Nr.** **Proband Nr.**

Üblicher Umgang mit Ernährungsproblemen (I)

Dokumentation des Ernährungszustands in der Krankenakte

- nein ja
- klinische Einschätzung: gut schlecht mittelmäßig
 adipös Stammfettsucht kachektisch
- Gewicht vor Intervention: _____ kg
- Gewicht nach Intervention: _____ kg
- Körpergröße _____ cm
- sonstiges _____

Dokumentation von Ernährungsproblemen / Risikofaktoren in der Krankenakte

- nein ja
- Appetit: o.B. / _____
- Gewicht vor der Einweisung: o.B. zu ab _____ kg seit: _____
- Genussmittelkonsum (Alkohol, Rauchen)
- Schwierigkeiten bei Lebensmitteleinkauf und/oder Zubereitung
- sonstiges _____
- _____
- _____

Durchgeführte Therapiemaßnahmen

- Ernährungsberatung nein ja
- Diätverordnung nein ja _____
- Ernährungsmedizin. Intervention nein ja
- wenn ja: Art: total parenteral supportiv parenteral
 total enteral supportiv enteral
 supportiv oral (Trinknahrung)
- Menge _____ kcal / Tag
- Dauer _____ Anzahl Tage

Anhang B

Tagebuch

4-wöchige monozentrische Doppelblindstudie im placebokontrollierten Parallelgruppenvergleich zur Untersuchung eines Trinksupplementes, das reich an Antioxidantien ist, bei Morbus Crohn Patienten, die sich im leicht akuten Schub ihrer Erkrankung befinden, auf antioxidativen Status, sowie Stress- und Entzündungsmarker

Angaben zur Person

Vorname

Nachname

Adresse

Tel (privat)

Tel (dienstl)

Angehörige

Name

Familiäre Beziehung

Tel (privat)

Angaben zum Hausarzt

Name

Telefon:

Kontakt in Notfällen

Diese/r Patient nimmt an einer klinischen Prüfung teil.

Wenn Sie im Notfall medizinische Hilfe benötigen, rufen Sie bitte folgende Tel-Nr. an:

Telefon:

Oder

Und fragen Sie nach

Oder

Bei Routinefragen wenden Sie sich bitte an:

Telefon:

Über dieses Tagebuch

Wie Sie wissen, wurden Sie gebeten, an einer klinischen Studie teilzunehmen, die Ihre Behandlung des Morbus Crohn unterstützen kann.

Bitte lesen Sie diese Anweisungen sorgfältig durch und fragen Sie, wenn Sie etwas nicht verstehen, oder unsicher sind.

Um festzustellen, ob die Behandlung wirksam ist, müssen die Ärzte, die sich um Sie kümmern, wissen, wie Sie sich täglich fühlen. Dies gelingt Ihnen am besten, wenn Sie jeden Tag kurz notieren, wie es Ihnen geht.

Um Ihnen diese Aufgabe zu erleichtern, erhalten Sie von uns dieses Tagebuch, in dem Sie alles notieren können. Sie müssen lediglich am Ende eines Tages ein paar Fragen beantworten und dieses Tagebuch bei jedem Klinikbesuch mitbringen.

Einnahme von Medikamenten während der Studie

Wenn Sie Azathioprin, 6-Mercaptopurin, Methotrexat, Langzeitmittel gegen Infektionen, Sulfasalazin, Mesasalazin, Olsalazin, Balsalazid oder ähnliche 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) Analoge oder ein vergleichbares Mittel zur Behandlung des Morbus Crohn einnehmen, müssen Sie dafür sorgen, dass die Dosis dieser Arzneimittel im Studienverlauf nicht geändert wird.

Es ist wichtig, dass Sie alle Medikamente, die Sie bei Studienbeginn regelmäßig eingenommen haben, auch während der Studie in unveränderter Dosierung, wenn vom Arzt nicht anders verordnet, einnehmen.

Wenn Sie jedoch zu irgendeinem Zeitpunkt die Dosis ihres Standardmedikaments ändern oder aus einem beliebigen Grund ein anderes Medikament einnehmen, ist es wichtig, dass Sie die Ärzte darüber informieren. Deshalb möchten wir Sie bitten, auch alle anderen Medikamente einzutragen, die Sie einnehmen.

Auch zu diesen Punkt haben wir ein paar Beispiele aufgeführt, die zeigen, wie Sie diese Angaben machen sollen.

Die Tabelle auf der nächsten Seite dient Ihren privaten Zwecken.

Datum	Name des Medikaments	Wie viel und wie oft	Warum haben Sie es eingenommen?
8.-10. April	Paracetamol	2 Tabletten pro Tag, bei Bedarf	Kopfschmerzen
15. April	Temazepam	1 Tablette nachts	Konnte nicht schlafen

Ausfüllen des Tagebuchs

Vor dem Schlafengehen müssen Sie jeden Tag sechs Fragen beantworten.

In Ihrer Antwort sollten Sie die letzten 24 Stunden berücksichtigen. Bitte schreiben Sie Ihre Antworten für jeden Tag in die richtige Spalte.

Die erste Frage soll herausfinden, wie oft Sie im Laufe des jeweiligen Tages flüssigen oder sehr weichen Stuhlgang hatten. Wenn Sie das Tagebuch mit sich führen, können Sie am Ende des Tages eine Zahl notieren, z. B. 8

Die zweite Frage befasst sich mit Bauchschmerzen. Hier geht es darum, ob Sie Bauchschmerzen hatten und wenn ja wie stark. Bitte verwenden Sie zur Bewertung der Stärke eine Zahl von 0-3. 0 bedeutet keine Schmerzen und 3 starke Schmerzen.

Die dritte Frage soll herausfinden, wie Sie sich fühlen. Auch hier müssen sie zur Bewertung eine Zahl eintragen. 0 bedeutet, dass es Ihnen gut ging und 4, dass es Ihnen extrem schlecht ging.

Die vierte Frage befasst sich mit Fieber. Wenn Sie sich fiebrig fühlen, müssen Sie abends Ihre Temperatur messen und die gemessene Temperatur eintragen. Wenn Sie nicht genau wissen, wie das geht, kann Ihnen Ihr Arzt behilflich sein. Bitte kreuzen Sie das entsprechende Kreuzchen für °C (Celsius) oder °F (Fahrenheit) an.

Die fünfte Frage wurde aufgenommen, weil wir wissen müssen, ob Sie Medikamente gegen Ihren Durchfall einnehmen mussten. Hier müssen Sie einfach mit JA oder NEIN antworten. Falls Sie Medikamente gegen Durchfall einnehmen, dann müssen Sie dasselbe Medikament während der gesamten Studie weiter nehmen.

Die sechste Frage ist sehr wichtig, weil wir unbedingt wissen müssen, ob Sie daran gedacht haben, das Produkt 2 x täglich zu sich zu nehmen. Bitte seien Sie ganz ehrlich und tragen Sie bei der 2-maligen Einnahme des Präparates eine 2 ein, wenn Sie das Präparat nur 1 x an diesem Tag zu sich genommen haben, eine 1 und wenn Sie es völlig vergessen haben, eine 0.

Beginn des Tagebuchs (z.B. Tag 1) . .200

Tag Monat Jahr

Anzahl flüssiger oder sehr weicher Stühle	Montag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag	Freitag	Samstag	Sonntag
Bauchschmerzen? Keine = 0 Leicht = 1 Mäßig = 2 Schwer = 3							
Allgemeines Wohlbefinden? Allgemein gut = 0 Etwas unter Durchschnitt = 1 Schlecht = 2 Sehr schlecht = 3 Extrem schlecht = 4							
Abendliche Temperaturmessung, wenn Sie sich fiebrig fühlen? °C °F							
Loperamid, Diphenoxylat/Atropin* oder Codeinphosphat eingenommen? JA oder NEIN							
Intestamin oral eingenommen? Morgens und abends = 2 Nur 1 x täglich = 1 Gar nicht eingenommen = 0							

* auch bekannt als Lomotil, Di-Atro, Logen, Lonox, Reasec, Eldox, Diarphen, Tropergen, Protector, Co-phenotrope, Retardin

Datum von Montag . .200

Tag Monat Jahr

Anzahl flüssiger oder sehr weicher Stühle	Montag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag	Freitag	Samstag	Sonntag
Bauchschmerzen? Keine = 0 Leicht = 1 Mäßig = 2 Schwer = 3							
Allgemeines Wohlbefinden? Allgemein gut = 0 Etwas unter Durchschnitt = 1 Schlecht = 2 Sehr schlecht = 3 Extrem schlecht = 4							
Abendliche Temperaturmessung, wenn Sie sich fiebrig fühlen? °C °F							
Loperamid, Diphenoxylat/Atropin* oder Codeinphosphat eingenommen? JA oder NEIN							
Intestamin oral eingenommen? Morgens und abends = 2 Nur 1 x täglich = 1 Gar nicht eingenommen = 0							

* auch bekannt als Lomotil, Di-Atro, Logen, Lonox, Reasec, Eldox, Diarphen, Tropergen, Protector, Co-phenotrope, Retardin

Datum von Montag . .200

Tag Monat Jahr

Anhang

Anzahl flüssiger oder sehr weicher Stühle	Montag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag	Freitag	Samstag	Sonntag
Bauchschmerzen? Keine = 0 Leicht = 1 Mäßig = 2 Schwer = 3							
Allgemeines Wohlbefinden? Allgemein gut = 0 Etwas unter Durchschnitt = 1 Schlecht = 2 Sehr schlecht = 3 Extrem schlecht = 4							
Abendliche Temperaturmessung, wenn Sie sich fiebrig fühlen? °C °F							
Loperamid, Diphenoxylat/Atropin* oder Codeinphosphat eingenommen? JA oder NEIN							
Intestamin oral eingenommen? Morgens und abends = 2 Nur 1 x täglich = 1 Gar nicht eingenommen = 0							

* auch bekannt als Lomotil, Di-Atro, Logen, Lonox, Reasec, Eldox, Diarphen, Tropergen, Protector, Co-phenotrope, Retardin

Datum von Montag . .200

Tag Monat Jahr

Anhang

Anzahl flüssiger oder sehr weicher Stühle	Montag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag	Freitag	Samstag	Sonntag
Bauchschmerzen? Keine = 0 Leicht = 1 Mäßig = 2 Schwer = 3							
Allgemeines Wohlbefinden? Allgemein gut = 0 Etwas unter Durchschnitt = 1 Schlecht = 2 Sehr schlecht = 3 Extrem schlecht = 4							
Abendliche Temperaturmessung, wenn Sie sich fiebrig fühlen? °C °F							
Loperamid, Difenoxylat/Atropin* oder Codeinphosphat eingenommen? JA oder NEIN							
Intestamin trink eingenommen? Morgens und abends = 2 Nur 1 x täglich = 1 Gar nicht eingenommen = 0							

* auch bekannt als Lomotil, Di-Atro, Logen, Lonox, Reasec, Eldox, Diarphen, Tropergen, Protector, Co-phenotrope, Retardin

Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieses Projektes beigetragen haben:

Prof. Dr. Peter Stehle, der immer den Überblick behalten und als Doktorvater die Arbeit betreut hat

Prof. Dr. Roland Goerlich und Prof. Dr. Frank Lammert für die Übernahme des Koreferates

Dr. Sabine Ellinger, die durch ihre grenzenlose Begeisterung spannenden fachliche Diskussionen entfacht hat, wodurch sie wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat, sowie für die kritische Beurteilung des Manuskripts

Prof. Dr. Andreas Stallmach und Prof. Dr. Frank Lammert für die Betreuung des Projektes als Prüfärzte

Dr. Thomas Giese für die Bestimmung der mukosalen Transkriptspiegel der Cytokine

Adelheid Schuch, Christel Bierschbach und Erika Blatzheim für die Hilfe bei der Analytik und die guten Tipps im Labor

Tomislav Balen für die Hilfe bei PC-Problemen aller erdenklichen Art

Dr. Bianca Arendt für die Einweisung in den Comet Assay

Dr. Manfred Mielenz für die stets freundliche Hilfe und endlose Geduld bei Problemen mit dem Mikroskop

Fresenius Kabi für die Bereitstellung des Trinksupplementes

Dr. Benzing für die gute Zusammenarbeit mit Fresenius Kabi

ESPEN für den Forschungspreis, ohne den die Studie nicht realisierbar gewesen wäre

Dr. Stephanie Lesser und Susanne Kern für die schnelle und kritische Begutachtung des Manuskripts

Meiner Familie, die immer an mich geglaubt hat und ganz besonders meinem lieben Mann Thorsten Roggenbuck, der mich bei allen Problemen tatkräftig unterstützt und mich immer in meiner Arbeit bestärkt hat

Und natürlich den Patientinnen und Patienten, ohne die diese Studie nicht möglich gewesen wäre