

Aus dem Institut für Experimentelle Medizin, Sektion Maritime Medizin,
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Sektionsleiter Prof. Dr. med. Andreas Koch)
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

MÖGLICHE PRÄVENTION EINER GENOTOXIZITÄT VON HYPERBAREM SAUERSTOFF DURCH ADAPTATION ODER DAS XENOBIOTIKUM VITAMIN C

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

JESSICA MANGER

aus Hildesheim

Kiel 2018

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Ulrich Stephani

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Koch, Institut für Experimentelle Medizin/ Sektion Maritime Medizin

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Tholey, Institut für Experimentelle Medizin

Tag der mündlichen Prüfung: 06. März 2019

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 14. November 2018

gez.: Prof. Dr. med. Johann Roeder

Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	3
II.	Abkürzungsverzeichnis	5
1	Einleitung	7
1.1	Sauerstoff und oxidativer Stress	7
1.2	Hyperbare Oxigenierung als Modell zur Erzeugung und Untersuchung von oxidativem Stress	12
1.3	Oxidative DNA-Schädigung dargestellt im alkalischen Comet-Assay	16
1.4	Vitamin C als Antioxidans gegen oxidativen Stress	18
2	Zielsetzung der Arbeit	23
2.1	Quantifizierung von DNA-Schädigung durch hyperbaren Sauerstoff	23
2.2	Untersuchung der Adaptation an oxidativen Stress unter hyperbarer Oxigenierung	23
2.3	Untersuchung des antioxidativen Potentials von Vitamin C unter oxidativem Stress	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Probanden	24
3.2	Hyperbare Oxigenierung	25
3.3	Materialien	26
3.4	Probenvorbereitung und Messmethoden	26
3.4.1	Isolation der Versuchszellen	26
3.4.2	Vitalitätstest und Zellanzahlbestimmung mittels Trypanblau	27
3.4.3	Prä-/post-experimentelle Bestimmung der Zellvitalität und basalen DNA-Schädigung	28
3.4.4	Comet Assay	28
3.4.5	Statistische Auswertung und Analyse	29
3.5	Aufbau und Ablauf der Studie	30
3.5.1	Einfluss von hyperbarem Sauerstoff auf DNA-Schäden in Probanden	30
3.5.2	Adaptation des Organismus an eine hyperbare Sauerstoffexposition	30
3.5.3	Einfluss von VC auf DNA-Schäden in PBMCs während einer hyperbaren Oxigenierung	30
4	Ergebnisse	32
4.1	Einfluss von hyperbarem Sauerstoff im Humanmodell	32

4.2	Adaptation an die Exposition gegenüber hyperbarem Sauerstoff	33
4.2.1	Vergleichende Zusammenschau von Daten der vorliegenden sowie einer Parallelstudie.....	34
4.3	Einfluss von Vitamin C auf PBMCs unter hyperbarer Oxigenierung	36
5	Diskussion.....	40
5.1	Das Studienmodell	40
5.1.1	Probanden	40
5.1.2	Probenmaterial	41
5.1.3	Methodik	42
5.2	Die Ergebnisse.....	47
5.2.1	Quantifizierung des Einflusses von hyperbarem Sauerstoff auf Probanden	47
5.2.2	Untersuchung der Adaptation an die Exposition gegenüber hyperbarem Sauerstoff	48
5.2.3	Untersuchung des Einflusses von Vitamin C auf PBMCs unter hyperbarer Oxigenierung	50
5.3	Limitierung der Studie	57
5.4	Ausblick.....	58
6	Zusammenfassung	60
III.	Abbildungsverzeichnis	62
IV.	Literaturverzeichnis	64
V.	Anhang	84
A-1	Methodenentwicklung für die Untersuchungen des Einflusses von VC auf DNA-Schäden in PBMCs während einer hyperbaren Oxigenierung	84
A - 1.1	Methoden	84
A - 1.2	Ergebnisse	87
A - 1.3	Diskussion.....	94
A-2	Probandeninformation.....	99
A-3	Ethikvotum	111
A-4	Tailmoment und %Tail Intensity Auswertung.....	113
A-5	Weitere Ergänzungen	116
A - 5.1	HBO-Therapie / Sauerstofftoleranztest	116
A - 5.2	Verwendung von Endonukleasen bei der Durchführung des Comet Assays	116
A - 5.3	Transport von VC durch Zellmembranen	117

A - 5.4	Empfehlung zur Vitamin C-Zufuhr	118
A - 5.5	Berechnung der Wellgrößen.....	118
A - 5.6	Ergänzende Graphiken.....	120
A-6	Chemikalien, Materialien und Laborgeräte.....	123
A - 6.1	Chemikalien.....	123
A - 6.2	Materialien.....	123
A - 6.3	Laborgeräte	124
A-7	Herstellung der Puffer, Lösungen und Agarosegele	126
A-8	Danksagung	127
A-9	Publikationen.....	128

II. Abkürzungsverzeichnis

>	größer als
<	kleiner als
A.dest.	destilliertes Wasser
AA	Ascorbic acid (Ascorbinsäure)
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine serum albumin (Rinderalbumin)
CAT	Katalase
Cu ²⁺	zweiwertiges Kupferion
d	day (Tag)
DHA	Dehydro ascorbic acid (Dehydroascorbinsäure)
DK	Druckkammer
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DS	Double strand breaks (Doppelstrangbrüche)
e ⁻	Elektron
Fe ²⁺ , Fe ³⁺	zweiwertiges, dreiwertiges Eisenion
G-SH/ GS-SG	reduziertes, oxidiertes Gluthathion
h	hour/s (Stunde/n)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBO	Hyperbaric oxygen, Hyperbaric oxygen therapy (Hyperbare/r Sauerstoff(therapie))
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
i.v.	intravenös
IQR	Interquartilabstand (interquartile range)
KK	Kontrollkammer
kPa	Kilopascal

l	Liter
μ	Mikro, 10 ⁻⁶
M	Median
M	Mol
m	Milli, 10 ⁻³
min.	Minuten
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
O ₂ ⁻	Superoxidationionradikal
OH [•] , OH ⁻	Hydroxyl-Radikal, Hydroxyl-Anion
ODS	Osteogenic Disorder Shionogi
p	Partialdruck, z. B. pO ₂ , pCO ₂
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit bei Signifikanzanalyse
p*	adjustierter Signifikanzwert nach Bonferroni
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PG	Probandengruppe
π (Pi)	Mathematische Kreiszahl, π=3,14159...
(m)RNA	(Messenger) Ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
ROS	Reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
s	Steigung
SD	Standardabweichung
sec.	Sekunden
SOD	Superoxiddismutase
SS	Single strand breaks (Einzelstrangbrüche)
t _{1/2}	Halbwertszeit
TI	%Tail Intensity (prozentuale Intensität des Comet Tails)
TM	Tail Moment (Produkt aus Tail-Länge und der DNA-Fraktion im Comet Tail)
TRx ^{ox} / TRx ^{red}	oxidiertes, reduziertes Thioredoxin
u.a.	unter
UV	Ultraviolett
VC	Vitamin C
W	Woche(n)

1 Einleitung

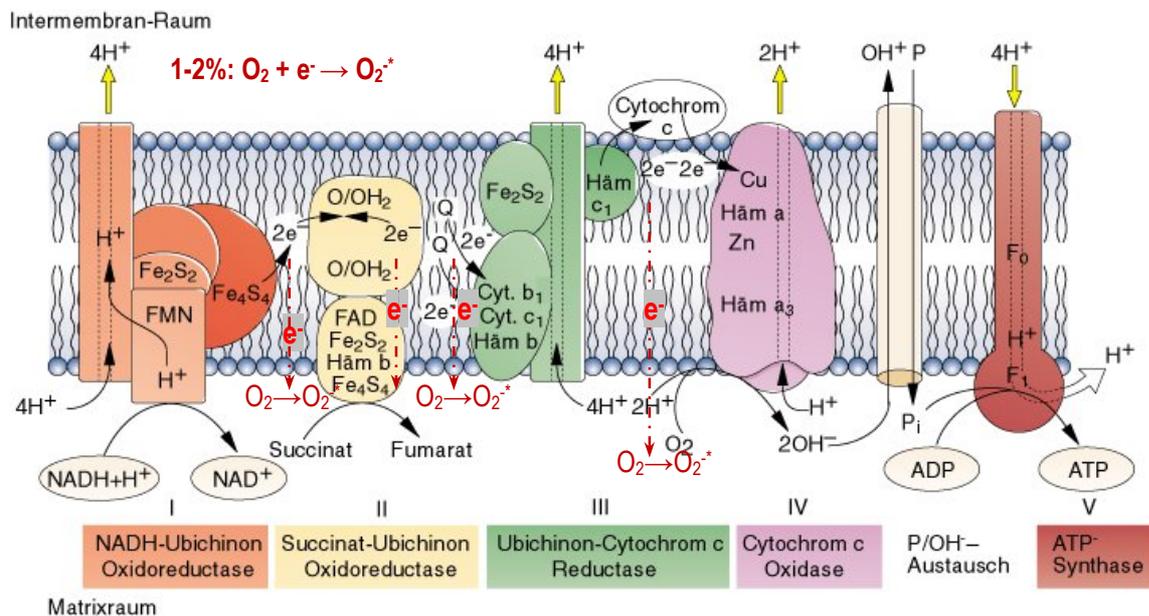
Viele Krankheiten und pathologische Befunde werden heute in der Medizin auf eine vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zurückgeführt, die mit ihren Schädigungsmechanismen unter dem Begriff „oxidativer Stress“ zusammengefasst wird. Aus diesem Grund wird die Bildung von ROS, die damit einhergehenden Schädigungen, die Abwehrmechanismen gegen ROS und die Anpassung des Organismus an ein erhöhtes Aufkommen von ROS fachübergreifend erforscht. Von entscheidener Bedeutung ist der oxidative Stress im Zusammenhang mit Hyperoxie, die im Rahmen von Sauerstoffbeatmung und besonders in der HBO^a-Therapie oder beim Tauchen auftritt. Oxidativer Stress kann nachweislich Zell- und DNA-Schädigung hervorrufen, die sowohl im Zellmodell als auch im menschlichen Organismus bestimmt werden können. Es gibt jedoch Hinweise, dass der menschliche Organismus durch Adaptationsprozesse diese Schädigung reduzieren kann. Dabei spielen Xenobiotika, beispielsweise das Vitamin C, eine mögliche Rolle. Die Hintergründe zu oxidativem Stress und Schutzmechanismen des menschlichen Organismus, die Möglichkeit der Induktion oxidativen Stresses z. B. zu Forschungszwecken und die Messung der oxidativen DNA-Schädigung sowie die Wirkweise des Xenobiotikums Vitamin C werden in Kapitel 1.1 bis 1.4 dargelegt.

1.1 Sauerstoff und oxidativer Stress

In den Mitochondrien (Zellorganellen) jedes Aerobiers spielt Sauerstoff als Elektronenakzeptor in der Atmungskette eine zentrale Rolle bei der Energiegewinnung (Erzeugung von ATP). Innerhalb der Atmungskette werden Elektronen zwischen den Enzymkomplexen I bis IV transferiert, bis schließlich das Enzym Cytochrom-Oxidase (Komplex IV der Atmungskette) durch die Übertragung von insgesamt vier Elektronen das Sauerstoffmolekül (O₂) zu Wasser (2 H₂O) reduziert. Bei der Übertragung von Elektronen zwischen den Komplexen werden Protonen in den Intermembranraum geschleust, die schließlich durch den Rückstrom über die ATP-Synthase für die Regeneration von ATP aus ADP verantwortlich sind (siehe Abbildung 1-1).

^a HBO (hyperbaric oxygen)-Therapie ist nach dem Beschluss European Consensus Conference 1994 in Lille (Frankreich) als Exposition von 100% Sauerstoff definiert, der unter Überdruckbedingungen von mindestens 2ATA (≈196kPa) und über einen Zeitraum von mindestens 60min geatmet wird.

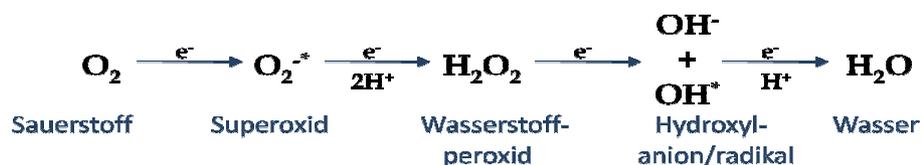
Abbildung 1-1 Entstehung von Superoxidradikalen ($O_2^{\cdot-}$) in 1-2% der Elektronenübertragungen (e^-) der Atmungskette (Abbildung nach Rassow et al. [1])



Entstehung und Eigenschaften von reaktiven Sauerstoffspezies

Unter Ruhebedingungen können bei der Elektronenübertragung in insgesamt ca. 1-2% [1][2][3] der Fälle „e-Leckströme“ auftreten. Dabei wird entweder nicht vollständig bis zum Wasser reduzierter Sauerstoff vom Komplex IV abgekoppelt oder es werden Elektronen von oder zwischen den einzelnen Komplexen direkt auf den Sauerstoff übertragen. Prinzipiell können an allen Enzymkomplexen der Atmungskette „e-Leckströme“ auftreten [2][4], doch konnten in verschiedenen Gewebetypen unterschiedliche Hauptübertragungsorte nachgewiesen werden. So wird zum Beispiel in den Mitochondrien des Herzens und der Lungen vor allem der Komplex III [4][5][6] oder im Gehirn der Komplex I für die e-Leckströme und damit für die ungewollte Übertragung von Elektronen auf den Sauerstoff verantwortlich gemacht [7][8]. Bei der Übertragung eines Elektrons auf Sauerstoff entsteht das relativ unreaktive Superoxidradikal ($O_2^{\cdot-}$), welches jedoch im Normalfall durch teilweise enzymkatalysierte Reaktionsschritte über Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser reduziert wird (siehe Abbildung 1-2). Auch eine direkte Übertragung von zwei oder mehr Elektronen auf O_2 ist denkbar, jedoch eher unwahrscheinlich [3][9].

Abbildung 1-2 Intermediate bei der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser



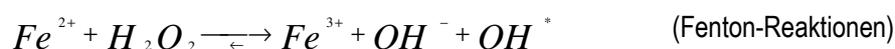
Aus der Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff können durch Reaktionsprozesse mit verschiedenen Molekülen zahlreiche unterschiedliche reaktive Verbindungen hervorgehen, die als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zusammengefasst werden. Die wichtigsten Vertreter dieser ROS sind in radikalische und nicht radikalische ROS unterschieden und mit spezifischen Halbwertszeiten als Indiz für ihre jeweilige "Reaktionsfreudigkeit" in der Tabelle (Abbildung 1-3) aufgeführt.

Abbildung 1-3 Übersicht über die wichtigsten Vertreter der Reaktiven Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies - ROS					
radikalische ROS		$t_{1/2}$	nicht-radikalische ROS		$t_{1/2}$
Hydroxyl-Radikal	OH^*	$10^{-9} - 10^{-10}$ sec	Wasserstoffperoxid	H_2O_2	10^4 sec. #
Superoxidanionradikal	O_2^*	10^4 sec*	Singulett-Sauerstoff	$^1\text{O}_2$	10 sec
Alkoxy-Radikal	RO^*	10^{-6} sec	Peroxynitrit	ONOO^-	1,3 sec
Peroxy-Radikal	RO_2^*	7 sec	Ozon ^b	O_3	Minuten

Die ROS sind mit Halbwertszeit angegeben, um einen Eindruck der Reaktionsfreudigkeit der einzelnen Strukturen zu vermitteln. Halbwertszeit beschreibt hier die Zeitspanne bis zur spontanen Umsetzung bzw. Reaktion. # hier ist die Zeitspanne bis zur enzymkatalysierten Reaktion angegeben. Die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) für die spontane Reaktion liegt im Bereich von Minuten (Abbildung nach Gröger [10] und Sies und Stahl [11])

Durch die Reaktionsfreudigkeit der ROS können andere Zellstrukturen wie DNA, Proteine und Lipide oxidiert und so in Struktur und Funktion beeinträchtigt werden [10][11][12]. Der Mechanismus der oxidativen Schädigung durch die einzelnen reaktiven Sauerstoffspezies und deren Reaktivität ist unterschiedlich. Ein ausgesprochen reaktiver und Vertreter der ROS ist das Hydroxyl-Radikal (OH^*). Das OH^* ist nicht nur ein Zwischenprodukt der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser, sondern kann z. B. auch durch Reaktion von H_2O_2 mit zweiwertigen Übergangsmetallen (z. B. Fe^{2+} , Cu^{2+}) induziert werden. Diese Reaktion kann sowohl durch gebundene zweiwertige Übergangsmetalle [13][14], als auch durch freie zweiwertige Metallionen katalysiert werden, wobei letztere Reaktion als Fenton-Reaktion bekannt ist [3][11][15][16].



Durch die Fenton-Reaktion und durch die Fähigkeit von Wasserstoffperoxid, frei durch Zellmembranen oder durch Aquaporine zu diffundieren, gewinnt das unreaktive Wasserstoffperoxid eine zentrale Bedeutung für die oxidative Schädigung durch ROS. Seine zelluläre Konzentration muss folglich unter physiologischen Bedingungen gering gehalten werden [3]. Das beim Ein-Elektron-Transfer aus Sauerstoff entstehende Superoxid wirkt vor allem indirekt oxidativ schädigend. Zunächst einmal kann O_2^* durch Elektronenübertragung zu H_2O_2 reduziert werden (siehe Abbildung 1-2). Weiterhin kann es mit Stickstoffmonoxid (NO^*) zu Peroxynitrit (ONOO^-) reagieren, welches vor allem im Zytosol pH-abhängig Protonen aufnimmt und so zur membrangängigen Peroxosalpersäure (ONOOH) reagieren kann, die ähnlich zytotoxisch wie das Hydroxylradikal (OH^*) wirkt. Zudem kann O_2^* Eisen aus Eisen-Schwefel-Proteinen herauslösen, sodass sich der Pool freien Eisens vergrößert, was wiederum die Fenton-Reaktion katalysiert [3][9][17][18][19][20][21].

Weitere Quellen für reaktive Sauerstoffspezies

Die Atmungskette in den Mitochondrien ist nicht die einzige, wohl aber eine sehr wichtige endogene Quelle für ROS im Körper [2][4]. Superoxid kann jedoch auch durch Elektronentransfer auf Sauerstoff bei Reaktionen verschiedener Enzyme, beispielsweise NADPH-Oxidasen oder Cytochrom P_{450} -abhängigen Oxigenasen anfallen [4][22][23][24][25] oder auch bei der intra- oder interzellulären Kommunikation [25][26][27]. Weitere endogene

^b Nur als Vergleichswert aufgeführt.

Quellen für ROS sind Phagozyten, wie Monozyten, Makrophagen oder neutrophile und eosinophile Granulozyten, die im Rahmen der Immunabwehr ROS zur Beseitigung von Bakterien oder andere Fremdkörper einsetzen [28][29]. Dabei werden nicht nur intrazellulär in diesen Immunzellen, sondern auch extrazellulär ROS freigesetzt.

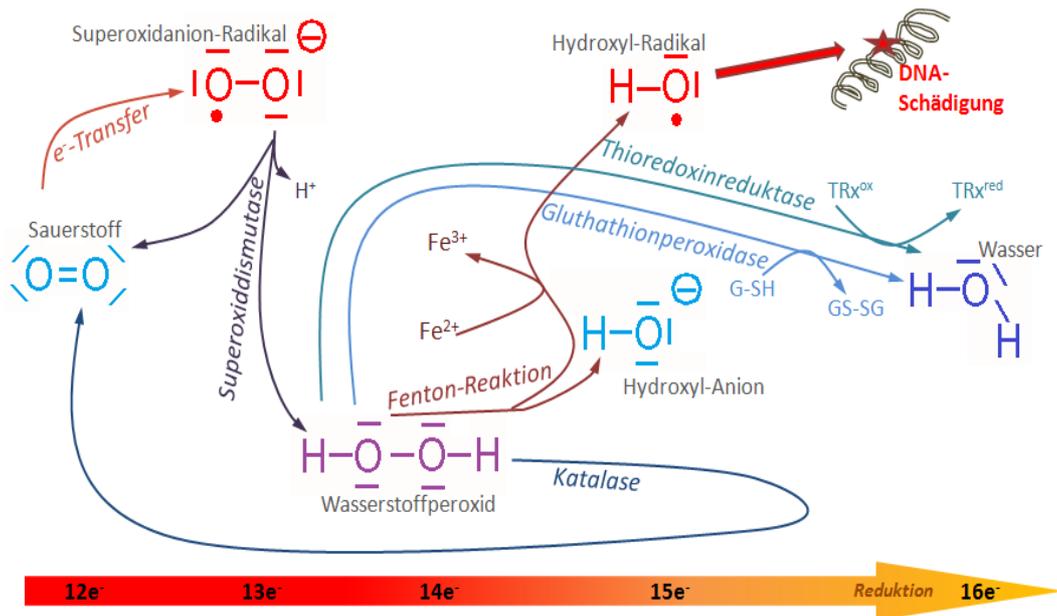
Neben diesen endogenen gibt es auch exogene Einflüsse wie z. B. das UV-Licht der Sonne, welches nach Eindringen in die Epidermis ROS induzieren kann. Gleichfalls wird der Inhalation von Zigarettenrauch oder Abgasen die Induktion von ROS zugeschrieben und bei der Entgiftung von Medikamente können ebenfalls ROS entstehen [30][31][32][33][34]. Auf diese und auf andere mehr oder weniger pathologische exogene Einflüsse, die zur Generation von ROS führen, wird in Kapitel 1.2 genauer eingegangen.

Schutzsysteme gegen ROS

Aufgrund der Vielzahl von Entstehungsmöglichkeiten von ROS wird nachvollziehbar, dass der Körper effektive Schutzsysteme entwickeln musste, um zelluläre Schäden durch ROS zu verhindern oder zu reparieren. Es gibt primäre, sekundäre und tertiäre Schutzsysteme: Zu den primären Systemen zählt z. B. das Melanin in der Epidermis, welches vor UV-Strahlung schützt und so die Induktion von ROS verhindern kann. Als sekundäre Schutzsysteme werden die Mechanismen bezeichnet, die in der Lage sind ROS gezielt zu entgiften. Zu ihnen zählen Enzyme wie Katalasen (CAT), Superoxiddismutasen (SOD) sowie Gluthathionperoxidasen (GPx) und Thioredoxinperoxidase (TPx). Weiterhin gibt es viele Moleküle, die eine direkte oder indirekte^c Wirksamkeit gegen Radikale aufweisen, wie z. B. Gluthathion, Bilirubin, Albumin oder Harnsäure. Zu den sekundären Schutzsystemen werden auch verschiedenste Nahrungsbestandteile gezählt, die indirekt, z. B. die Spurenelemente Kupfer und Zink als Bestandteil der SOD (Cu-Zn-SOD) oder direkt, z. B. als Radikalfänger (Scavenger), an der Entgiftung von Radikalen beteiligt sind. Auch die Vitamine C und E als essentielle Nahrungsbestandteile sowie einige Carotinoide können als Radikalfänger fungieren [1][3][10][11][12][35][36][37][38][39][40]. Unter tertiärem Schutzsystem werden die Mechanismen oder Reparaturenzyme zusammengefasst, die zur Beseitigung radikalinduzierter Schäden an Proteinen, Fettsäuren oder DNA dienen [41][42][43]. Die Gesamtheit der einsatzbereiten antioxidativen Schutzsysteme wird auch als antioxidativer Status [1][3][44][45][46][47][48] bezeichnet. Dieser antioxidative Status kann in Situationen hoher oxidativer Belastung vermindert oder im Sinne einer Anpassungsreaktion an hohe oxidative Belastung erhöht sein [16][44][45][46][49][50][51][52]. Abbildung 1-4 soll einen groben Überblick über einige zentrale Reaktionsprozesse um die Entstehung und Entgiftung von Sauerstoffradikalen Sauerstoff geben.

^c durch Reduktion oxidiert Strukturen

Abbildung 1-4 Enzyme der Sauerstoffentgiftung



Dargestellt sind die enzymkatalysierten Reaktionen, die zur Reduktion des molekularen Sauerstoffs zu Wasser führen. In jedem Fall kann die Reaktion abhängig von der Verfügbarkeit der Enzyme durch spontane Dismutation erfolgen. Auf dem rot-gelben Pfeil ist die Anzahl der Elektronen (e^-) des jeweils darüber befindlichen Moleküls vermerkt, um den Reduktionsverlauf zu verdeutlichen. (Auf Radikalfänger wird am Bsp. von VC im Folgenden eingegangen, weshalb sie aus Gründen der Übersicht in dieser Abbildung nicht eingetragen sind. (Abkürzungen siehe Kapitel II).

Aus physiologischer Sicht stehen die Entstehung und die Entgiftung von Radikalen im einem komplizierten Gleichgewicht zueinander, in der Regel ist jedoch eine basale Rate von Schädigungen wie z. B. DNA-Schädigung auch in gesunden Probanden nachweisbar [53][54].

Oxidativer Stress und seine Folgen

Wird dieses komplizierte Gleichgewicht z. B. durch vermehrtes Anfallen von reaktiven Sauerstoffspezies gestört, können die anfallenden Radikale nicht mehr „entgiftet“ werden, sodass es zur oxidativen Schädigung von Molekülen über Zellen bis zu ganzen Organen oder Organsystemen kommt. Dieser Zustand wird als oxidativer Stress bezeichnet. Darunter kommt es durch ungerichtete Radikalreaktionen z. B. zur Peroxidation von Lipiden u.a. Membranlipiden^d [55][56] oder zur oxidativen Schädigung von Proteinen. Schließlich können sich Oxidationsreaktionen auch genotoxisch auswirken, nämlich dann, wenn an DNA im Prozess der oxidativen Schädigung Strangbrüche [57][58][59], Basen- und Zuckeradduktionen [60] oder chemisch instabile apurinische oder apyrimidinische Stellen entstehen [61][62][63].

Folgen dieser oxidativen Schädigungsprozesse können verschiedenste Krankheiten sein, wobei die Liste derer, die mutmaßlich im Zusammenhang mit diesen Prozessen stehen, immer länger wird. Um eine Idee von den weitreichenden möglichen Folgen von oxidativer Schädigung unter oxidativem Stress zu vermitteln, seien hier einige Folgeschäden angesprochen: Den unerwünschten Reaktionsprozessen, die bei oxidativem Stress auftreten,

^d Folge: verminderte Membranviskosität. Dadurch wird u.a. die Aktivität membranständiger Enzyme gehemmt [55][56]

wird z. B. eine Beteiligung an Alterungsprozessen [2][64][65][66]^e und multiplen Krankheiten, wie beispielsweise Karzinomen [67][68] und neurodegenerativen Erkrankungen [69][70][71][72] zugeschrieben. Auch immunodefizitäre und inflammatorische Erkrankungen z. B. aus dem rheumatischen Kreis [73][74][75][76][77] oder kardiovaskuläre Erkrankungen [35][78][79][80][81] werden in der aktuellen Literatur im Zusammenhang mit oxidativem Stress gesehen. In der Akutmedizin spielen oxidative Schädigungsmechanismen z. B. nach Traumata [82][83] und Verbrennungen [84][85] eine Rolle. Darüber hinaus wird oxidativen Reaktionsprozessen eine maßgebliche schädigende Wirkung in Ischämie-Reperfusionsgeschehen bei Herzinfarkt oder Apoplex zugeschrieben [68], sowie eine Mitbeteiligung an posttraumatischen Komplikationen wie Sepsis [68][82] bis zum Multiorganversagen [84][86].

1.2 Hyperbare Oxigenierung als Modell zur Erzeugung und Untersuchung von oxidativem Stress

Wege der Entstehung und Induktion oxidativer Schädigung

Für die Erforschung der Wirkung und Wirkweise von ROS sowie möglicher therapeutischer oder präventiver Maßnahmen gegen oxidativen Stress wurden verschiedene Verfahren entwickelt, mit denen oxidativer Stress induziert werden kann. Einige dieser Verfahren werden für den klinischen-therapeutischen Einsatz erforscht oder befinden sich bereits in der Anwendung, wobei die Nutzung des toxischen Potentials der ROS im Vordergrund steht. Ein einfaches Beispiel für diese Doppelnutzung (in der Forschung und der klinischen Medizin) ist die UV-Strahlung, der der Organismus zudem auch natürlicher Weise ausgesetzt ist (vgl. Kapitel 1.1). UV-Strahlung wird in der photodynamischen Therapie eingesetzt zur Therapie verschiedener auch maligner Hauterkrankungen^f [87][88]. Gleichfalls kann unter Experimentalbedingung UV-Licht zur Untersuchung von oxidativem Stress angewandt werden [89][90][91]. Ähnliches ist der Fall bei radioaktiver Strahlung: diese kommt als terrestrische oder Höhenstrahlung natürlicherweise vor [92], wird aber auch zur Radiotherapie und zur Induktion von ROS zu Forschungszwecken verwendet [93][94]. Chemotherapeutika werden ebenfalls einerseits zur Tumorthherapie [95] und andererseits zur Erforschung oxidativen Stresses eingesetzt [96][97]. Genauso können Endotoxine, die auch unter natürlichen Bedingungen vorkommen, zur experimentellen Induktion von ROS verwendet werden [98]. Keine klinische sondern allein experimentelle Anwendung findet die direkte Applikation von Wasserstoffperoxid [96][99][100][101].

Mit der Applikation reinen (hyperbaren) Sauerstoffs soll in der vorliegenden Studie eine vergleichsweise „schonende und physiologische“ Möglichkeit zur Erzeugung von ROS genutzt werden. Denn durch dieses Verfahren werden durch Elektronenübertragung auf das reichlich vorhandene O₂ über e-Leckströme in der Atmungskette O₂^{*}, und hieraus weitere ROS induziert. Nebeneffekte, die bei der direkten Applikation H₂O₂ (als ein Vertreter der ROS) vorkommen, können somit ausgeschlossen werden. Weiterhin können auch Nebeneffekte ausgeschlossen werden, die durch direkte Reaktion des Schädigungsagens mit Zellstrukturen zustande kommen,

^e aus "Diet and oxidative damage to DNA: the importance of ascorbate as an antioxidant." Woodall AA, Ames BN (1997) in "Vitamin C in Health and Disease"[66]

^f Hierzu wird eine Vorbehandlung mit einem Photosensitizer durchgeführt.

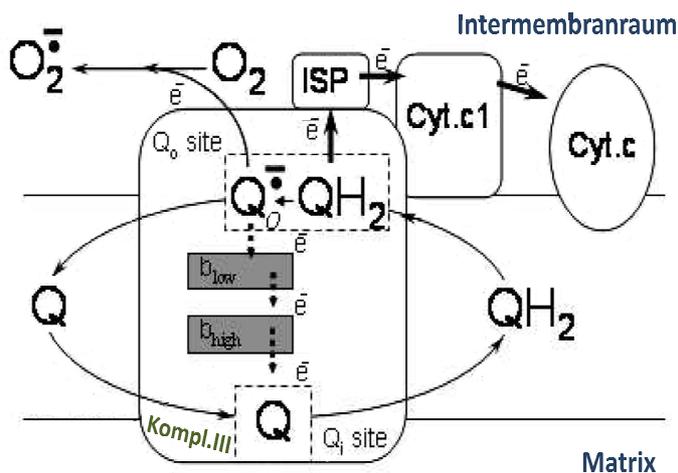
die beispielsweise bei der Applikation von Chemikalien (z. B. Chemotherapeutika) oder hochenergetischer Strahlung zu erwarten sind. Zudem ermöglicht die Applikation von Sauerstoff eine genaue Dosierung, da Verteilungs- und Diffusionseffekte gering sind, denn reiner Sauerstoff induziert partialdruckabhängig in linearer Weise sowohl Superoxid-Radikale als auch Wasserstoffperoxid⁹ [6][49][102][103][104][105]. Da (hyperbarer) Sauerstoff in der klinischen Anwendung vergleichsweise geringe Nebenwirkungen bei guter klinischer Wirksamkeit hat, findet er beispielsweise im Rahmen der HBO-Therapie (vgl. Kapitel A - 5.1) Anwendung, obwohl hyperbarer Sauerstoff deutlich mehr oxidativen Stress induziert als normobarer Sauerstoff (vgl. nächster Absatz). Auch beim Tauchen wird hyperbarer Sauerstoff in "physiologischer" Weise (zumeist in Form eines Gasgemisches) verwendet.

Hyperbare Oxigenierung zur Untersuchung von oxidativem Stress

Für die Untersuchungen der vorliegenden Studie wurde das Verfahren der Applikation supraatmosphärischen Sauerstoffs (hyperbare Oxigenierung) gewählt, da die lineare Abhängigkeit der Sauerstofflöslichkeit vom Sauerstoffpartialdruck eine relativ genaue Dosierung des gelösten Sauerstoffs sowohl im Blut und im Extravasalgewebe des Probanden als auch im Kulturmedium ermöglicht. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der zusätzliche gelöste Sauerstoff frei durch Zellmembranen diffundieren kann und somit auch in die Mitochondrien und zu den Komplexen der Atmungskette gelangt. Entsprechend kann die hyperbare Oxigenierung sowohl *in vivo*, in kombinierten *in vivo/ex vivo* Ansätzen (Sauerstoffbelastung *in vivo* mit folgenden Untersuchungen an Blutzellen *ex vivo*) [106][51][107][15][108][109], als auch in *ex vivo* Experimenten [16][50] angewandt werden, was ein Vergleich von Ergebnissen vereinfacht. Prinzipiell ähnelt der Mechanismus der Induktion von ROS durch die hyperbare Oxigenierung wie gesagt der Entstehung von ROS unter physiologischen Bedingungen (vgl. Kapitel 1.1): Durch die physikalische Lösung großer Mengen molekularen Sauerstoffs kommt es in den Mitochondrien besonders häufig zur Übertragung von Elektronen auf den Sauerstoff durch die e-Leckströme der Atmungskette. Als Hauptübertragungsort für Elektronen unter hyperbaren Bedingungen wird der Q-Zyklus (Abbildung 1-5) diskutiert. Die Bezeichnung Q-Zyklus beschreibt den Zyklus der Übertragung von Elektronen zwischen den Komplexen I bis III der Atmungskette durch das Coenzym Q (Ubichinon), bei der Protonen zur ATP-Produktion in den Intermembranraum geschleust werden. Gleichzeitig erfolgt ein Elektronenübertragungszyklus zwischen Ubichinon und dem Komplex III, in dem Elektronen "kreisen" und so zur Translokation von zusätzlichen Protonen beitragen [1][2][3][110] (die Translokation von Protonen ist aus Übersichtsgründen nicht in der Graphik eingetragen). Aus diesem "Elektronenpool" kommt es unter hyperbaren Bedingung vermehrt zur Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff und somit zur intramitochondrialen Erhöhung von ROS [3][4][111][110][112].

⁹ Für den Einsatz in Intensivmedizin überwiegt trotzdem der therapeutische Nutzen von hochdosiertem Sauerstoff

Abbildung 1-5 Superoxidentstehung am Q-Zyklus



Die Abbildung illustriert den Mechanismus der Superoxid ($O_2^{\bullet -}$)-Entstehung zwischen Ubichinon (Coenzym Q) und Komplex III (Kompl.III, Succinat-Ubichinon-Reduktase) der Atmungskette. Die Reaktion beginnt mit der Oxidation von Ubichinol (QH_2) durch Übertragung eines Elektrons (e^-) an das Rieseke-Protein (ISP), ein Eisen-Schwefel-Protein mit sehr starkem Reduktionspotential. Von dort wird es weiter zum Cytochrom c1 (Cyt.c1) und zum Cytochrom c (Cyt. c) transferiert, welches es an Komplex IV der Atmungskette (Cytochrom c-Oxidase, nicht dargestellt) weitergibt. Das verbleibende Semichinon (Q_o^{\bullet}) ist sehr instabil, weshalb es ein zweites e^- an eine Reaktionskette mit sehr niedrigem Reaktionspotential überträgt. An dieser Stelle erfolgt, vor allem unter hyperbarem Sauerstoffpartialdruck, ein e^- -Transfer auf Sauerstoff und $O_2^{\bullet -}$ entsteht.

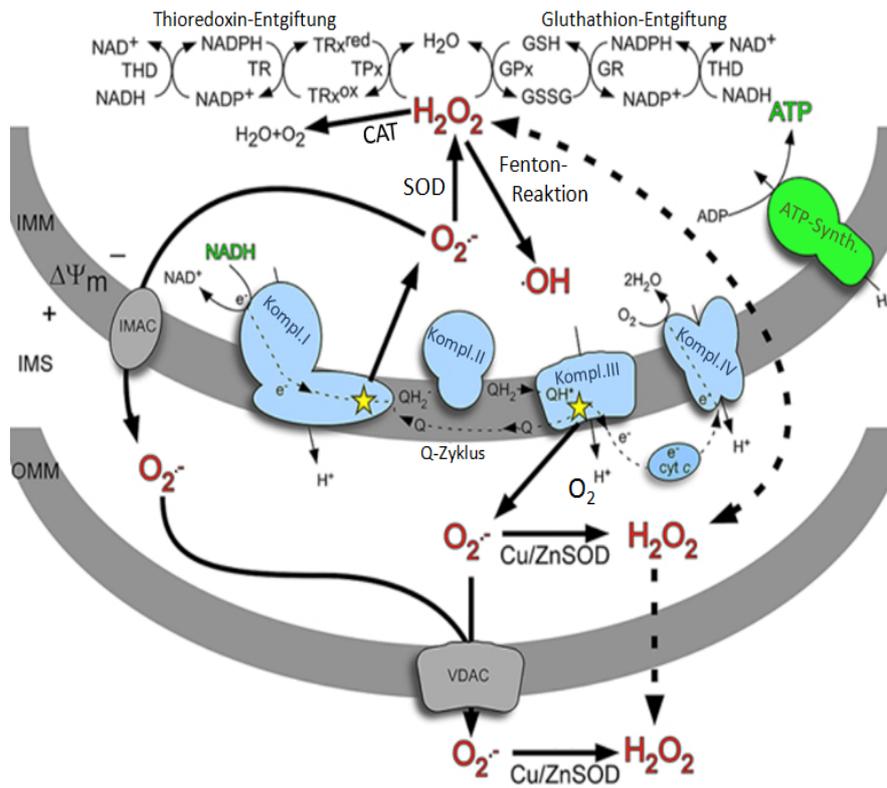
Physiologischer Weise erfolgt die Übertragung des zweiten e^- auf die beiden Cytochrome b_{low} und b_{high} , die das e^- an die Q_i -Seite des Komplex III befördern, wo es auf Ubichinon (Q) übertragen wird und das relativ stabile Q_i^{\bullet} entsteht. Für die vollständige Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol sind zwei Oxidationsreaktionen an der Q_o -Seite notwendig. (Abbildung nach Stowe et al. und Andreyev et al. [3][110])

Im Folgenden wird der Mechanismus beschrieben, wie hyperbare Sauerstoffbedingungen eine intramitochondriale Erhöhung reaktiver Sauerstoffspezies bewirken und damit eine oxidative DNA-Schädigung im Zellkern induzieren: Durch Elektronenübertragung entstehen in der Mitochondrienmatrix und im Intermembranraum ROS, vor allem Superoxid. Durch spontane Dismutation oder enzymatische Reduktion (durch SOD) wird Superoxid in Wasserstoffperoxid umgewandelt, welches wiederum vor allem durch Katalasen, Gluthathionperoxidasen und Thioredoxinreduktasen zu Wasser umgesetzt wird. Wird dieses System, z. B. unter hyperbaren Sauerstoffbedingungen überfordert, kommt es zum Ausstrom von Superoxid über spezielle Ionenkanäle in der inneren und äußeren Mitochondrienmembran (IMAC, VDAC^h) ins Zytosol. Das ladungsneutrale H_2O_2 diffundiert dem Konzentrationsgradienten folgend frei durch die Mitochondrienmembranen und gelangt ebenfalls ins Zytosol (vgl. Abbildung 1-6).

^h IMAC - Inner membrane anion channel (schleust eine Vielzahl organischer und anorganischer Anionen) [113][114][115]

VDAC - Voltage-dependent anion channel (schleust einige Anionen, Metabolite wie ATP/ADP, P_i und einige Kationen, z.B. Ca^{2+} , K^+) [113][114][115]

Abbildung 1-6 Mechanismus der Entstehung von Superoxid und Wasserstoffperoxid in Mitochondrien



Die Abbildung dient als Übersicht über die Zusammenhänge der beschriebenen mitochondrialen ROS-Entstehung. Im Zentrum steht die Atmungskette, an der Sauerstoff (nicht dargestellt) unter hyperbaren Bedingungen vor allem am Q-Zyklus durch Elektronenübertragung (e^-) zu Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) reagiert. Dieses gelangt über Transporter ins Zytosol oder wird zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt, welches via Diffusion aus der Zelle gelangt. Gleichfalls ist die Giftung von H_2O_2 durch Fenton-Chemie (mittels eines freien zweiwertigen Eisens; nicht dargestellt) und die Entgiftung von ROS durch Katalasen (CAT) und Superoxiddismutasen (SOD) sowie über Thioredoxin und Glutathion abgebildet. (nach Batty et al. [115])

Eine weitere Möglichkeit der Erhöhung von ROS im Zytosol ist die so genannte ROS-induzierte Freisetzung von ROS. Dabei kann ein sehr hohes Aufkommen von ROS eine spontane Depolarisation von Mitochondrien induzieren, die zur weiteren Freisetzung von ROS führt [3][116][117]. In jedem Fall kommt es sauerstoffpartialdruckabhängig zur Anreicherung von ROS im Zytosol, wo die dort befindlichen Enzyme die ROS abbauen können. Gleichfalls verteilen sich die ROS konzentrationsabhängig im Zytosol, von wo aus H_2O_2 weiter frei in Zellorganellen, unter anderem in den Zellkern, diffundieren kann. Im Zellkern kommt es durch Reaktion von H_2O_2 mit dem DNA-assoziierten Eisen zur Bildung des hochaggressiven Hydroxylradikals (Fenton Reaktion, vgl. Kapitel 1.1). Hydroxylradikale können die DNA schädigen, indem sie Elektronen von Zucker- oder Baseneinheiten abstrahieren oder sich an ungesättigte Basen addieren, wobei sie (bevorzugt an Adenin und Guanin) DNA-Strangbrüche induzieren [43][63].

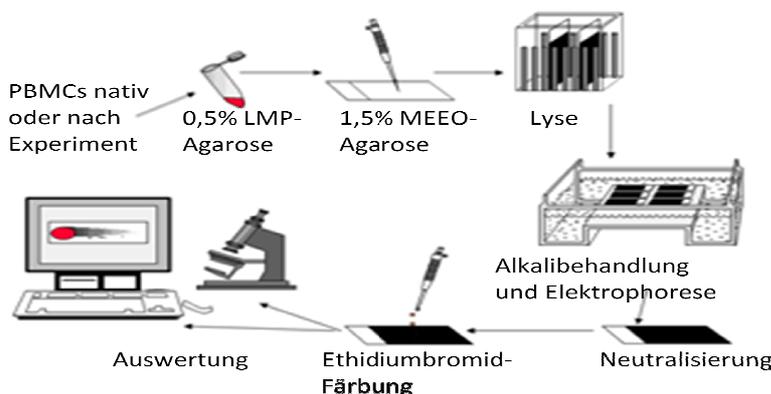
Aufgrund der beschriebenen Reaktionsweisen führt eine Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks bei der hyperbaren Oxygenierung zur Erhöhung der ROS und damit zu vermehrter DNA-Schädigung. Diesen direkten Zusammenhang konnten Witte et al. [16] anhand von DNA-Schädigung in peripheren mononukleären Zellen (PBMC) mittels Comet Assay nachweisen.

1.3 Oxidative DNA-Schädigung dargestellt im alkalischen Comet-Assay

Zur Auswertung der oxidativen DNA-Schäden wird neben anderen mikroanalytischen Messverfahren (z. B. GCMS) die Methode "Comet Assay" verwendet (siehe Abbildung 1-7). Der Comet Assay, oder SCGE (=Single Cell Gel Electrophoresis) ist eine in der Wissenschaft (insbesondere an Lymphozyten) häufig verwendete Technik der Mikroelektrophorese, mit der DNA-Schädigung in Form von Strangbrüchen visualisiert und quantifiziert werden kann [118]. Am häufigsten wird die alkalische Variante des Comet Assays verwendet [103][109][119][120][121][122][123] [124]. Für die Durchführung des Comet Assays werden die zu untersuchenden Zellen in ein Agarosegel eingebettet, auf einen Objektträger aufgetragen und über Nacht lysiert. Bei der Lyse werden durch den hohen Salzgehalt (2,5 M NaCl) der Lyselösung die Histone aus den Zellen entfernt und die Nukleosomen (Einheit von DNA und einem Histonoktamer) zerstört. Strangbrüche führen dabei zu einer Relaxation und somit zur beginnenden Entwindung der DNA [61]. Vor der Elektrophorese wird die DNA im alkalischen Milieu des Elektrophoresepuffers unter Lichtausschluss denaturiert (25 min). Der hohe pH-Wert ($\text{pH} > 13$) ermöglicht den Doppelsträngen dabei, sich zu separieren [61]. Die Elektrophorese findet in einem speziellen Tank statt, in dem die Objektträger horizontal positioniert sind. Die Zellen werden einem elektrischen Feld ausgesetzt, in dem negativ geladene DNA-Fragmente zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen wird durch deren Größe und durch die Dichte der Agarose beeinflusst [125].

Die Auswertung der DNA-Wanderung in den elektrophoretisierten Versuchszellen erfolgt an der Bildschirmprojektion des Gesichtsfelds eines Fluoreszenzmikroskops. Hierzu interagiert das Licht einer Quecksilberdampfflamme mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, der kurz vor der Auswertung auf den Probenobjektträger aufgetragen wird und zwischen den Nukleinbasen der DNA interkaliertⁱ, sodass lediglich DNA-Bestandteile sichtbar werden [127]. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist somit vor allem von der Größe und Dichte der DNA bzw. DNA-Fragmente abhängig (vgl. Kapitel 5.1.3).

Abbildung 1-7 Schematische Darstellung des Comet Assay-Protokolls

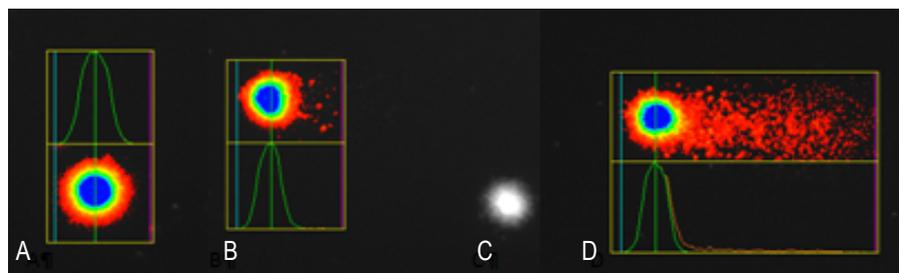


PBMCs werden nach Entnahme venösen Vollbluts separiert. Nativ und im Anschluss an das jeweilige Experiment wird der Comet Assay zur Quantifizierung der DNA-Schädigung durchgeführt. Dabei werden die Zellen in Agarose (LMP-Low Melting Point Agarose und MEO-mittlere Elektrodensomose-Agarose) eingebettet. Anschließend erfolgt die Lyse und Denaturierung der DNA unter alkalischen Bedingungen. Die Quantifizierung der DNA-Schädigung erfolgt nach Einfärbung der DNA unterm Fluoreszenzmikroskop. (Schematische Darstellung nach Speit und Hartmann [120])

ⁱ Interkalation: Einlagerung von Molekülen in chemische Verbindungen ohne deren Struktur wesentlich zu verändern [126]. Bei der Interkalation von Ethidiumbromid in DNA wird die Tertiärstruktur partiell verlängert bzw. leicht aufgewunden, Primär- und Sekundärstruktur werden jedoch nicht verändert.

Im fluoreszenzmikroskopischen Bild (siehe Abbildung 1-8) stellen sich Zellkerne ohne DNA-Strangbrüche (A, C) als regelmäßige runde gleichmäßig leuchtende Strukturen dar. Zellkerne mit DNA-Strangbrüchen erinnern bei der Betrachtung an "Kometen" (B, C). Der "Kopf" ("Head") des Kometen ist der verbliebende Zellkernrest, auf den in der Regel die größte Farbintensität des Kometen entfällt. Der "Schweif" ("Tail") bildet die DNA-Fragmente ab, die sich unter der Elektrophorese vom Kern entfernt haben.

Abbildung 1-8 Lymphozyten im Fluoreszenzbild (400fache Vergrößerung)



Interpretation des Fluoreszenzbildes mittels "Ja/Nein"-Klassifikation: A, C: intakte Zellen ("nein"), B, D: DNA-geschädigte Zellen ("ja"). A, B, D sind markiert zur Auswertung mit der Comet Assay IV-Software.

Zur Auswertung der Mikroanalyse werden unterschiedliche Techniken verwendet. Meistens werden softwaregestützte Analysen durchgeführt (hier: Comet Assay IV Software), wobei jeder einzelnen Zelle verschiedene Parameter zugeordnet werden. Die entscheidenden Parameter sind dabei "Tail Length" und "%Tail Intensity" bzw. "%Tail-DNA", die die Strecke der am weitesten gewanderten DNA-Fragmente ("Tail Length") und deren Dichte im "Comet-Tail" im Gegensatz zum Kern abbilden ("%Tail Intensity"). Zur Auswertung der DNA-Schädigungsintensität wird entweder "%Tail Intensity" [105][128] oder das "Tailmoment" verwendet [68][16][102]. Letzteres ist ein Produkt aus "Tail Length" und "%Tail Intensity" [129], kann jedoch auf verschiedene Weise berechnet werden. Deshalb kann das Tailmoment nicht als valider Vergleichsparameter zwischen den Ergebnissen unterschiedlicher Arbeitsgruppen betrachtet werden [61]. Da es dennoch häufig verwendet wird, soll es auch in der vorliegenden Arbeit als zusätzlicher Parameter angegeben werden. Der aussagekräftigste Parameter ist allerdings die "%Tail Intensity"[61], da dieser Parameter am ehesten proportional zur Frequenz der DNA-Brüche ist.

In der Regel werden zusätzlich zur softwaregestützten Auswertung visuelle Scores herangezogen (vgl. Kapitel 5.1.3). Bei der in der vorliegenden Studie verwendeten Methode des visuellen Scorings wurde anhand der Bildaufnahme eines Zellkerns beurteilt, ob ein DNA-Schaden vorhanden ist, oder nicht. Auf diese Weise erfolgte eine binäre "Ja/Nein"-Klassifikation (vgl. Abbildung 1-8). Der Prozentsatz der geschädigten Zellen aus den DNA-Bildaufnahmen von 200 untersuchten Zellen wurde als quantitativer Parameter zur Beurteilung von DNA-Schädigung herangezogen. Diese visuelle Scoring-Methode postulierten Witte et al. [16] als aussagekräftige Auswertmethode.

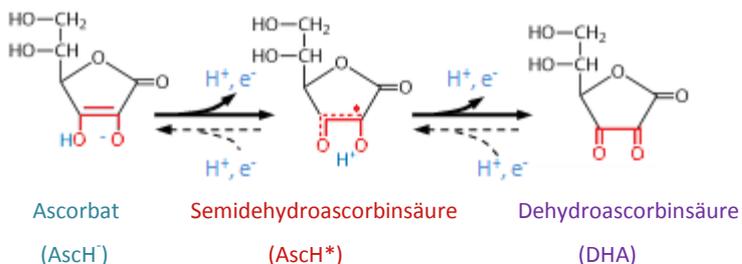
^j % Tail Intensity und % Tail DNA beschreibt denselben Parameter. In der vorliegenden Studie wurde in Anlehnung an die verwendete Comet Assay IV Software der Begriff "%Tail Intensity" verwendet.

1.4 Vitamin C als Antioxidans gegen oxidativen Stress

Als mögliches Antioxidans gegen oxidative DNA-Schädigung wurde in der vorliegenden Studie das Vitamin C untersucht werden. Vitamin C ist als natürliches Antioxidans in Nahrungsmitteln und auch künstlich als Nahrungsergänzungsmittel oder als Antioxidationsmittel in Nahrungsmitteln bekannt und gehört zu den effektivsten und am intensivsten untersuchten Nahrungsmittel-Antioxidantien [35][36][100][130]. Als essentieller Baustein in biochemischen Prozessen^k wie z. B. dem sekundären Schutzsystem der Abwehr oxidativer Schädigung (siehe Kapitel 1.1), wird es in der Medizin im Zusammenhang mit der antioxidativen Kapazität (Gesamtheit einsatzbereiter Schutzsysteme) [131] häufig diskutiert.

Die Bezeichnung Vitamin C (VC) steht für die L-(+)-Ascorbinsäure (AA) und deren Derivate, welche qualitativ die biologische Wirkung der L-Ascorbinsäure besitzen. Durch Dissoziation wird AA pH-Wert-abhängig in seine ionisierte biologisch aktive Form, das Ascorbat-Monoanion (AscH^-), umgewandelt, wobei AA unter den physiologischen Bedingungen des Blutplasmas zu >99% ionisiert vorliegt [132][133]. Die chemisch korrekte Bezeichnung 2,3-Endiol-L-Gluconsäure- γ -Lacton (2,3-Didehydro-L-Threohexano-1,4-Lacton) [12] beschreibt die Struktur des Moleküls, aus der Rückschlüsse auf dessen Funktion gezogen werden können. Der Lacton-Ring, genauer die zwei enolisch verknüpften Hydroxy-Gruppen des VC-Moleküls (in Abbildung 1-9 rot gekennzeichnet), sind dabei maßgeblich: Bei dem teilweisen bis vollständigen Umbau dieser Verbindung hin zur Diketon-Verbindung bzw. der Rückreaktion können reversibel ein bis zwei Elektronen aufgenommen bzw. abgegeben werden. Diese Elektronen stehen für Oxidations- und Reduktionsreaktionen zur Verfügung, sodass theoretisch sowohl pro- als auch antioxidative Reaktionen möglich sind.

Abbildung 1-9 Enol- bzw. Diketon-Verbindung des Vitamin C



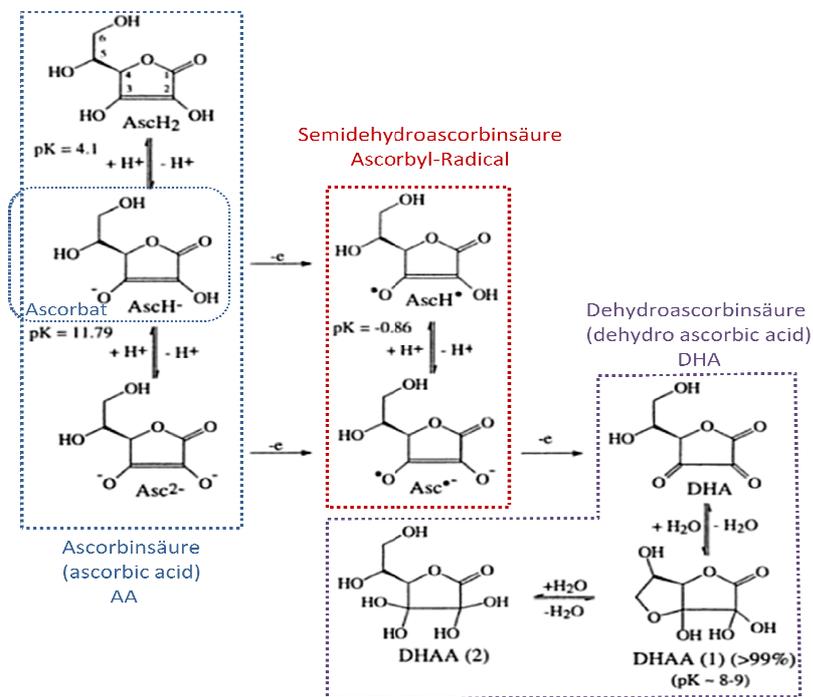
Das Vitamin C-Molekül kann aufgrund seiner zwei enolisch verknüpften Hydroxyl-Gruppen, die teilweise oder vollständig zur Diketon-Verbindung umstrukturiert werden können, reversibel Elektronen (e^-) aufnehmen und abgeben. Auf diese Weise kann es sowohl als Reduktions- als auch als Oxidationsmittel fungieren. Die für die e^- -Aufnahme bzw. -Abgabe verantwortlichen Enol- bzw. Ketonverbindungen sind in rot gekennzeichnet. (Abbildung nach Rassow et al [1])

In der Forschung werden je nach Fragestellung verschiedene VC-Derivate eingesetzt oder liegen abhängig vom jeweiligen pH-Wert des Untersuchungsmediums vor. Um eine Übersicht über die verschiedenen VC-Derivate zu geben und um die Einordnung der einzelnen Begrifflichkeiten im Zusammenhang mit diesem Vitamin zu ermöglichen, sind in Abbildung 1-10 alle relevanten VC-Derivate dargestellt. Es kann abhängig von den jeweiligen pH-Bedingungen und Reaktionsmöglichkeiten jede Struktur in die jeweils folgende umgewandelt werden. Kommt es jedoch zur Hydrolyse des Lactonrings von DHA, entsteht irreversibel das Abbauprodukt 2,3-Diketogluconsäure,

^k Beispiele weiterer biochemischer Prozesse, die VC benötigen: Produktion von Kollagen, Neurotransmittersynthese, Eisenstoffwechsel, Entgiftungsreaktionen von z.B. Schadstoffen oder Medikamenten [1][12][33][34][100]

welche zu Oxalat und L-Threonsäure gespalten oder zu Kohlenstoff, Xylose und Xylulose decarboxyliert wird [12][134][135][136].

Abbildung 1-10 Nomenklatur der VC-Derivate¹

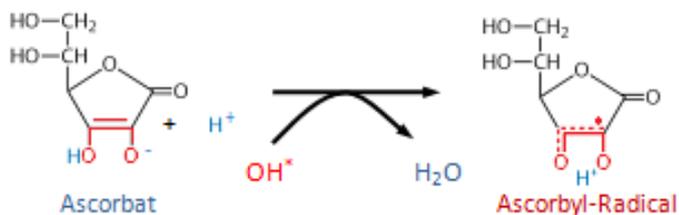


Vitamin C liegt abhängig vom pH-Wert und vom Oxidations- bzw. Reduktionszustand in verschiedenen Derivaten vor. Die Abbildung soll diese Derivate und den reaktiven Zusammenhang aufzeigen sowie einen Überblick über die in der Wissenschaft verwendeten Begrifflichkeiten geben. Alle dargestellten Reduktionsreaktionen sind auch als Oxidationsreaktionen möglich. (Abbildung nach Buettner et al. [66])

Antioxidative Eigenschaften von VC

Die reduzierende also antioxidative Wirkung entfaltet das Vitamin C in aqueoser (wässriger) Phase vor allem durch die direkte Reduktion von ROS, die als Quenching ($\text{AscH} + \text{X}^{\bullet} \longrightarrow \text{AscH}^{\bullet} + \text{XH}$ [12]) bezeichnet wird. VC agiert somit als Radikal-Scavenger [3][10][39][48][137][138][139]. Beispielhaft ist für diese Reaktion in Abbildung 1-11 die Reaktion von Ascorbat mit einem Hydroxylradikal zu einem Ascorbyl-Radikal und Wasser dargestellt. In einer möglichen Folgereaktion reagieren dann zwei Ascorbyl-Radikale zu DHA und AA [35][95][140]. Das unter physiologischen Bedingungen relativ instabile DHA kann durch Cystein oder Thiolverbindungen zu AA reduziert werden [48][137].

Abbildung 1-11 Quenching-Reaktion von Vitamin C und einem Hydroxyl-Radikal



Vitamin C (Ascorbat) überträgt ein Elektron (e^-) an ein Hydroxyl-Radikal, sodass Wasser und ein Ascorbyl-Radikal entstehen. Diese Reaktion wird als Quenching-Reaktion bezeichnet. Ascorbat fungiert dabei als Radikal-Scavenger.

Ein weiterer reduzierender Wirkmechanismus des C-Vitamins ist die Fähigkeit, andere antioxidativ wirksame Substanzen, wie beispielsweise Vitamin E (α -Tocopherol) oder Carotinoide zu regenerieren, womit es indirekt

¹ aus "The vitamin C radical and its reactions" von Bors W., Buettner GR. (1997) in "Vitamin C in Health and Disease" [66]

auch in lipophiler Phase antioxidative Wirksamkeit hat [35][38][98][141][142] (vgl. Kapitel 5.2.3). Dieser Mechanismus ist vermutlich ursächlich für die lipoprotektive Wirkung von VC [143][144]. Weiterhin konnten auch proteingeprotective Effekte [98][145] von VC nachgewiesen werden. Diese beruhen größtenteils auf der Radikalentgiftung und damit dem Schutz des Aminosäurerüsts und aktiver Proteinkomponenten (z. B. dem aktiven Zentrums aus Metallionen (Fe^{2+} und Cu^{2+}) u.a. im Hämoglobin) vor radikalinduzierten Oxidationsreaktionen. [1][12][139]. Vielfach wurde die protektive Wirkung des VC auch im Zusammenhang mit oxidativer DNA-Schädigung *in vivo* und *ex vivo* beschrieben. Da in der vorliegenden Studie schwerpunktmäßig diese mögliche Schädigungsform untersucht wurde, soll hier kurz die aktuelle Literatur dargelegt werden:

In vivo konnten Yamaguchi et al. [145] anhand VC-defizienter Ratten^m nachweisen, dass VC-Fütterung die Entstehung von Bilirubinmetaboliten (Abfallprodukte der antioxidativen Reaktion von Bilirubin) verminderte während gleichzeitig die nachweisbare Hämoxxygenase-1ⁿ-mRNA abnahm. Shang et al. [146] konnten nachweisen, dass eine VC-reiche Diät das Wachstumshemmnis, welches durch Exposition mit hyperbarem Sauerstoff in Meerschweinchen induziert wird, nahezu relativieren kann. Podmore et al. [147] konnten in Probanden bei erhöhter VC-Plasma-Konzentration (durch erhöhte orale VC-Aufnahme) einen Rückgang von Parametern ROS-assoziiierter DNA-Schädigung zeigen. Dasselbe fanden Levine et al. [148] in ihrer placebokontrollierten prospektiven Reanalyse der genannten Arbeit von Podmore et al. Einen etwas anderen Ansatz verfolgten Bader et al. [107][149], die einen Rückgang der VC-Konzentration im Blut nach hyperbarer Sauerstoffbelastung beschrieben, was eine "Aktivität" von VC im Zusammenhang mit oxidativem Stress beweist. Rehmann et al. [150] postulierten sogar einen reziproken Zusammenhang zwischen VC-Plasmakonzentration und oxidativer Baseline-DNA-Schädigung. Bei der Metaanalyse zahlreicher (>1500) arbeitsmedizinischer Untersuchungen an Arbeitern, die mutagenen Stoffen ausgesetzt waren, konnten Sram et al. [34] anhand zytogenetischer Untersuchungen peripherer Lymphozyten zeigen, dass eine prophylaktische Gabe von VC (in Form von AA) DNA-Veränderungen reduzieren kann. Dieses Ergebnis kann durch die Beteiligung von VC an Entgiftungsreaktionen begründet sein und/oder erklärt sich durch die Reduktion der durch mutagene Stoffe hervorgerufenen Radikalschädigungen. In einer anderen Metaanalyse mit ähnlich vielen Untersuchungen an Polizisten konnte aufgezeigt werden, dass DNA-Schädigung durch oxidative Belastung durch Luftverschmutzung mittels VC-Supplementierung vermindert werden kann [33]. Nagy et al. [32] konnten im *ex vivo* Ansatz bestätigen, dass Bestandteile von u. a. Dieselabgasen zu einer Erhöhung von oxidativem Stress und damit einhergehender DNA-Schädigung führen. Der entscheidende Messparameter war in dieser Studie die mittels Comet Assay dargestellte DNA-Schädigung, genauso wie in zwei weiteren aktuellen Studien, die ebenfalls die städtische Luftverschmutzung als Schädigungsinduktor evaluierten [30][31]. Yong et al. [92] postulierten, dass nach erhöhter Aufnahme von Nahrungsmittelantioxidantien in Blutzellen von Piloten, die berufsbedingt einer vermehrt ionisierender Strahlung ausgesetzt sind [151], eine geringere Rate von Chromosomenaberration nachzuweisen ist. In der Studie von Dusinská et al. [152] wurde ebenfalls beschrieben, dass nach erhöhter Aufnahme von Nahrungsmittelantioxidantien (u. a. VC) weniger

^m Scurvy-prone ODS (Osteogenic Disorder Shionogi)-od/od-Ratten: diese Ratten sind im Gegensatz zum Wildtyp nicht in der Lage, VC zu synthetisieren (siehe auch A - 5.3)

ⁿ Hämoxxygenase-1 gehört zu den Heat Shock-Proteinen und wird unter oxidativem Stress vermehrt exprimiert

Chromosomenschäden messbar sind. Untersucht wurden in dieser Studie Lymphozyten von Herzinfarktpatienten, die im Rahmen des Ischämiegeschehens erhöhter oxidativer Belastung ausgesetzt waren. In beiden Studien hatten die Probanden über einen Zeitraum von mehreren Wochen durch entsprechende Ernährung bzw. Supplementation hohe Einträge an Vitamin C und anderen Nahrungsmittelantioxidantien aufgenommen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern signifikant niedrigere VC-Spiegel aufweisen. Dies wurde auf den Verbrauch von VC durch Reaktion mit ROS zurückgeführt, die bei Rauchern in supraphysiologischem Maß^o vorliegen [153]. Duarte und Lunec [130] schlossen aus der Beurteilung von über zwanzig Interventionsstudien, dass VC oxidative DNA-Schädigung verhindern kann, sowie möglicherweise zur Prävention von Krebs oder kardiovaskulären Erkrankungen^p eingesetzt werden könnte. Gey [154] legte sich nach dem Review zahlreicher Studien über Antioxidantien (unter anderen VC) sogar auf Mindestplasmakonzentrationen fest, die zum Schutz vor kardiovaskulären Erkrankungen notwendig seien (>50µM im Fall von VC).

Ex vivo konnte z. B. anhand von gereinigter DNA und isolierten Nuklei eine Reduktion von ROS-assoziiertes DNA-Schädigung durch VC bestätigt werden [90][155][156]. Lutsenko et al. [157] beschrieben, dass VC dosisabhängig durch H₂O₂ induzierte DNA-Veränderungen vermindern kann. Kontek et al. [59] konnten diesen Effekt von VC anhand des Comet Assays an Magenkarzinomzellen nachweisen, wobei in diesen Experimenten bei geringeren VC-Dosen ein größerer protektiver Effekt erzielt wurde. Noroozi et al. [158] fanden, ebenfalls mittels Comet Assay und dem gleichen Schädigungsagens (H₂O₂) eine zunehmende DNA-protective Wirkung von VC mit steigender Konzentration in Lymphozyten. Dasselbe beschrieben auch Crott und Fenech [159] in ihren *ex vivo* Untersuchungen genauso wie in kombinierten *in vivo* / *ex vivo* Untersuchungen, in denen Probanden mit VC supplementiert wurden und anschließend deren Zellen (Blutzellen, häufig PBMCs/Lymphozyten) einem oxidativen Stressreiz ausgesetzt wurden. Frei et al. [36] konnten in ihren Untersuchungen zur Wirksamkeit von VC gegen oxidativen Stress am Beispiel der Lipidperoxidation nicht nur die Wirksamkeit von VC belegen. Sie konnten auch zeigen, dass VC als erstes und effektivstes Antioxidans des Blutplasmas (im Vergleich zu Urat, Bilirubin, α-Tocopherol, Thiol-Proteinen) die Lipidperoxidation bis zu seinem Verbrauch verhindert. Dass VC auch *in vivo* ein wirksames Antioxidans ist, lässt sich aus dem Rückgang der Bilirubinmetabolite nach VC-Gabe im Tiermodell schließen [145]^q.

Neben Crott und Fenech führten auch andere Autoren kombinierte *in vivo* / *ex vivo* Studien anhand von verschiedenen Blutzellen (häufig PBMCs/Lymphozyten) durch. Beispielsweise stellten Brennan et al. [160] bei Inkubation von Lymphozyten aus VC-supplementierten Probanden (1000 mg/d) mit H₂O₂ fest, dass durch VC-Supplementierung konzentrationsabhängig DNA-Schädigung reduziert werden kann. Auch Brevik et al. [161] inkubierten Lymphozyten mit H₂O₂. Sie beobachteten, dass nach Aufnahme von Kiwi-Früchten ca. 30% weniger DNA-Strangbrüche als in der Vergleichsgruppe auftraten und führten dieses Ergebnis auf die Wirkung von VC zurück.

^o siehe Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (BZgA) 2014

^p Viele Tumorerkrankungen und kardiovaskuläre Erkrankungen stehen im Zusammenhang mit oxidativem Stress (siehe Kapitel 1.1)

^q Diese Studie ist unter "*in vivo*" in diesem Kapitel schon aufgeführt und wird an dieser Stelle nur aus Vergleichsgründen erwähnt.

Prooxidative Effekte von VC

Im Gegensatz dazu konnten **ex vivo** auch prooxidative Effekte [162] von VC gefunden werden, die in der Literatur häufig als paradoxe Wirkung beschrieben werden, weil VC dabei als Elektronenakzeptor fungiert. Eine prooxidative Reaktionsweise von VC *ex vivo* konnten beispielsweise die Arbeitsgruppen um Drouin et al. [163], Fischer-Nielsen et al. [155] und Hu und Shih [164] aufzeigen. Sie fanden, dass VC zusammen mit freien Metallionen in isolierter DNA und isolierten Nuklei DNA-Strangbrüche und Basenmodifikationen induziert. Auch im Zellmodell konnte, unter anderem anhand von humanen Lymphozyten, eine mögliche prooxidative Wirkung von VC bestätigt werden [96][165][166]. Bergström et al. [167][168] fanden eine verminderte Vitalität ihrer Versuchszellen nach Exposition gegenüber VC (in Form von AA). In derselben Arbeit wurde weiterhin eine Erhöhung oxidativer Parameter durch verschiedene Ascorbat-Verbindungen sowie durch AA plus Metallionen beschrieben. Es gilt jedoch darauf hinzuweisen, dass die Untersuchungen von Bergström et al. anhand von HL-60-Leukämiezelllinien vorgenommen wurden. Auch Kontek et al. [59], die mit HT29 Adenokarzinomzellen experimentierten, beschrieben eine Verminderung der Vitalität ihrer Versuchszellen durch VC. Jedoch konnten Blasiak et al. [169] in Lymphozyten keine Vitalitätsminderung nach Inkubation mit VC feststellen. Gleichfalls fanden auch Singh et al. [165] nach achtstündiger Inkubation von Lymphozyten mit VC keine schädigenden Effekte des Vitamins, wobei der Endpunkt in letzterer Studie das Absterben von Zellen in Kultur war. Die Verminderung der Vitalität ist dabei, genauso wie die DNA-Schädigung, in der Regel auf die oxidative Schädigung durch die Fenton-Chemie (siehe Kapitel 1.2) zurückzuführen [40][101][170]. **In vivo** konnten zwar vereinzelt Parameter möglicher oxidativer (DNA)-Schädigung festgestellt werden [171], doch insgesamt zeigen die Forschungsergebnisse auch unter Anwesenheit von Metallionen keine Induktion oxidativer DNA-Schädigung durch VC [150][172][173]. Dasselbe konkludieren Carr und Frei [101] nach umfassender Revision entsprechender Studien. In abschließender Beurteilung der Wirkung von Vitamin C im Zusammenhang mit oxidativem Stress ist daher festzuhalten, dass Vitamin C *in vivo* und *ex vivo* vor DNA-Schädigung schützen kann, wenn die Fenton-Chemie als Ursache prooxidativer Effekte ausgeschlossen ist.

2 Zielsetzung der Arbeit

2.1 Quantifizierung von DNA-Schädigung durch hyperbaren Sauerstoff

Es ist beschrieben, dass hyperbarer Sauerstoff oxidative Schädigung induziert (siehe Kapitel 1). Die Wirkung von hyperbarem Sauerstoff auf gesunde Probanden ist bislang jedoch noch wenig untersucht, denn die derzeit vorliegenden Ergebnisse beziehen sich überwiegend auf Untersuchungen *in vitro*, an Patienten mit Vorerkrankungen oder an Versuchstieren. Untersuchungen an gesunden Humanprobanden sind jedoch notwendig um zu klären, in wieweit Sauerstoff als wirksames Therapeutikum bei unterschiedlichen medizinischen Indikationen (HBO-Therapie) oder beim Tauchen in Abwägung der Nebenwirkungen eingesetzt werden kann. Daher sollte in dieser Arbeit zunächst die Intensität oxidativer DNA-Schädigung durch Sauerstoffüberdruckexposition in einem sehr homogenen Probandenkollektiv von gesunden männlichen Probanden derselben Altersgruppe und Lebenssituation quantifiziert werden. Dazu wurden die PBMCs dieser Probanden untersucht, bevor und nachdem sie einen Sauerstofftoleranztest (maximale Sauerstoffbelastung) absolviert hatten.

2.2 Untersuchung der Adaptation an oxidativen Stress unter hyperbarer Oxigenierung

Neben Untersuchungen zur Induktion oxidativer Schädigung durch oxidativen Stress werden in der Literatur auch Hinweise auf mögliche Adaptationseffekte genannt. Da diese Adaptationseffekte perspektivisch als "antioxidativer Schutz" genutzt werden könnten, sollte in der vorliegenden Studie die Adaptationskapazität des Organismus nach repetitiver hyperbarer Sauerstoffexposition untersucht werden. Dabei sollte überprüft werden, ob die PBMCs wiederholt Hyperoxie-exponierter Probanden (aktive Sauerstofftaucher) eine größere Resistenz gegenüber hyperbarer Sauerstoffexposition *ex vivo* aufweisen, als PBMCs eines Probandenkollektivs ohne Sauerstoffüberdruckexposition (Nichttaucher). Die Untersuchung erfolgte während einer fünf wöchigen Tauchpause, wobei den Probanden einmal pro Woche eine Blutprobe zur Untersuchung entnommen wurde. Es sollte erfasst werden, ob und in welcher Weise der mögliche adaptive Schutz gegenüber oxidativer Schädigung einer Abnahme unterworfen ist, bzw. wie lange ein sauerstoffüberdruckinduzierter adaptiver Schutz erkennbar ist.

2.3 Untersuchung des antioxidativen Potentials von Vitamin C unter oxidativem Stress

Dem oxidativen Stress wird aufgrund der Reaktionen von ROS mit verschiedensten Molekülen eine Beteiligung an multiplen Erkrankungen zugeschrieben. Deshalb wird nach Möglichkeiten gesucht, die Entstehung von ROS zu vermindern bzw. ROS zu eliminieren. In diesem Zusammenhang wurde vielfach die antioxidative Wirkung von VC untersucht. Denn VC ist in unterschiedlichen antioxidativen Wirkmechanismen involviert und stellt gleichzeitig eine relativ leicht veränderbare Komponente des antioxidativen Schutzsystems des Organismus dar. In Bezug auf VC wurden jedoch nicht nur antioxidative, sondern auch prooxidative Effekte gefunden. In der vorliegenden Studie sollte daher zunächst ein klar definiertes *ex vivo* Modell entwickelt werden, um den (konzentrationsabhängigen) Effekt von VC im Zusammenhang mit oxidativer DNA-Schädigung zu untersuchen. Anschließend sollten die möglichen pro- und/oder antioxidativen Wirkkomponenten des C-Vitamins genauer definiert werden. Ziel dieser Untersuchungen war es, zu ergründen, ob VC perspektivisch als potentiell klinisch geeignetes Antioxidans zur Prävention hyperbar-hyperoxisch induzierter DNA-Schädigung (oder sogar generell bei oxidativem Stress) eingesetzt werden könnte.

3 Material und Methoden

3.1 Probanden

Rechtliche und ethische Aspekte

Alle Probanden waren Soldaten der deutschen Marine und nahmen im Rahmen arbeitsmedizinischer Untersuchungen an dieser Studie teil. Jeder Proband erhielt die Probandeninformationsbögen (siehe A-2) sowie eine mündliche und schriftliche Aufklärung und hat nach mindestens 24 h Bedenkzeit sein freiwilliges Einverständnis zur Teilnahme sowie zu den Bedingungen der Studie schriftlich erklärt. Ein Rücktritt von der Studie war jederzeit und ohne Angabe von Gründen möglich. Die Studie wurde mit Zustimmung der Ethikkommission der Christan Albrechts Universität zu Kiel durchgeführt (A-3). Sämtliche Mitarbeiter der Arbeitsgruppe unterlagen der ärztlichen Schweigepflicht. Die Probanden wurden anonymisiert geführt und die gewonnenen Daten wurden ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet. An der Studie nahmen drei unterschiedliche Probandenkollektive teil (A-C). Alle Probanden waren ausgeruht, nüchtern und ohne Alkoholkonsum am Vorabend.

Probandengruppe A (PG A)

Die Probanden der Gruppe A (n = 14) waren Kampfschwimmer-Anwärter der deutschen Marine, die im Rahmen ihrer Tauchtauglichkeitsuntersuchung (Mischgastaucher-Verwendungsfähigkeits-Untersuchung) einen Sauerstofftoleranztest in der Druckkammer des Schiffahrtmedizinischen Instituts der Marine in Kronshagen absolvierten. Ihnen wurde vor und nach der Exposition mit hyperbarem Sauerstoff (100% Sauerstoff, 280 kPa Umgebungsdruck^r, 30 Minuten) je 18 ml (zwei 9 ml Lithium-Heparin Blutentnahmeröhrchen) venöses Vollblut entnommen. Während der Sauerstoffexposition wurden, zusätzlich zur routinemäßig angebrachten Sauerstoffelektrode, drei weitere O₂-Elektroden angebracht (siehe Kapitel 3.5.1)

Probandengruppe B (PG B)

Bei den Probanden der Gruppe B (n = 7) handelt es sich um Kampfschwimmer der deutschen Marine, die über einen Zeitraum von drei Monaten im Rahmen von Tauchgängen mit Sauerstoff-Kreislaufgeräten repetitiv hyperbarem Sauerstoff ausgesetzt waren. Der maximale Sauerstoffpartialdruck lag bei durchschnittlich 160 kPa^s und die Dauer der Tauchgänge betrug zwischen 50 bis 120 Minuten. 24 Stunden nach dem letzten Sauerstofftauchgang sowie im Verlauf von fünf Wochen wurde den Probanden wöchentlich 18 ml (zwei 9 ml Lithium-Heparin Blutentnahmeröhrchen) venöses Vollblut entnommen.

Probandengruppe C (PG C)

Die Probanden der Gruppe C (n = 124) wurden im Rahmen einer jährlichen routinemäßigen arbeitsmedizinischen Tauchtauglichkeitsuntersuchung (TUKV^t) für Soldaten der deutschen Marine im Schiffahrtmedizinischen Institut der Marine in Kronshagen angeworben. Zusätzlich zu den routinemäßig entnommenen Blutröhrchen wurden für die Studie 18 ml (zwei 9 ml Lithium-Heparin Blutentnahmeröhrchen) venöses Vollblut entnommen. Es wurden nur gesunde männliche Teilnehmer ausgewählt, die Nichtraucher waren, nie mit hyperbarem Sauerstoff belastet

^r entspricht 18m Tauchtiefe

^s durchschnittliche Tauchtiefe 7m

^t Taucher- und Kampfschwimmerverwendungsfähigkeitsuntersuchung

wurden und seit mindestens fünf Jahren keiner herausragenden physischen Belastung (z. B. Leistungssport) ausgesetzt waren.

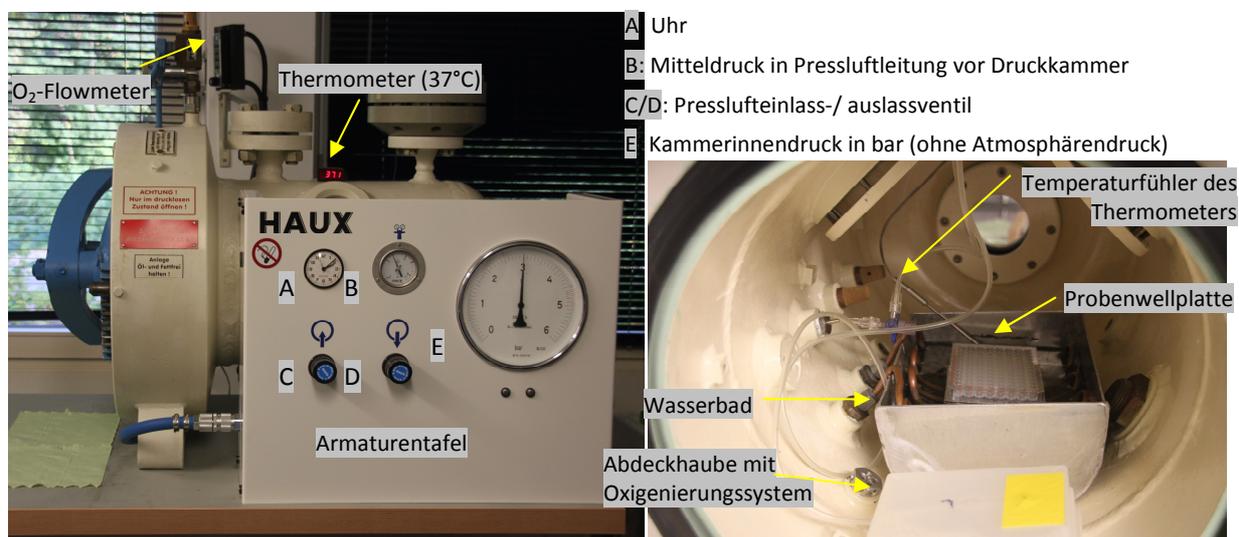
3.2 Hyperbare Oxigenierung

In den experimentellen Untersuchungen, die dieser Arbeit zu Grunde liegen, wurde oxidativer Stress sowohl *in vivo* (in der Probanden-/Behandlungsdruckkammer Haux Hydro 2000) als auch *ex vivo* (Experimentaldruckkammer, Haux) durch hyperbaren Sauerstoff induziert.

Experimentaldruckkammer

Für die *ex vivo* Experimente wurde eine Experimentaldruckkammer verwendet, die mit einer speziellen Abdeckhaube mit Oxigenierungssystem ausgestattet wurde, welches eine kontinuierliche druckunabhängige Sauerstoffbegasung der Proben ermöglichte (siehe Abbildung 3-1). Innerhalb der Kammer wurde auf möglichst konstante physiologische Umgebungsbedingungen geachtet, z. B. wurden die Wellplatten mit Zellsuspension durch ein Wasserbad (welches auch die Luftfeuchte aufrechterhielt) auf physiologische von 37°C temperiert (überwacht durch ein Thermometer). Durch Verwendung der Abdeckhaube und das Befüllen lediglich der innenliegenden Wells der kleineren 96-Well-Platten sowie die Einstellung eines moderaten AirFlows (2 l / min) wurde die Osmolarität des Versuchsmediums konstant gehalten [16]^u. Zusätzlich orientierten sich die Geschwindigkeiten der Abtauch- und Auftauchzeit an denen, die auch für Probanden/Patienten eingehalten werden, um die Zellen äquivalent zu belasten und Einflüsse schneller Druckänderung auszuschließen.

Abbildung 3-1 Experimentaldruckkammer Außen- (links) und Innenansicht (rechts)

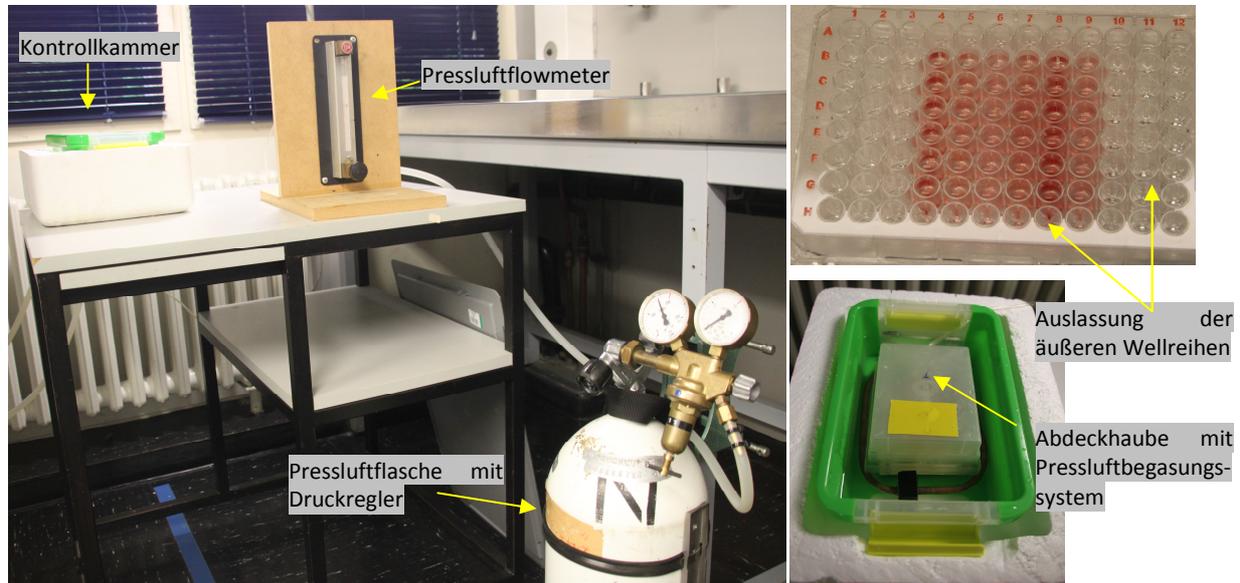


Neben der Experimentaldruckkammer wurde eine zweite Kammer entwickelt, die als Kontrollkammer diente. In dieser überdrucklosen Kammer wurden die Versuchszellen unter sonst identischen Bedingungen (Temperatur,

^u Eine Veränderung der Osmolarität könnte die Entstehung oxidativer Schädigung beeinflussen [16].

Probenmaterial- und medium, Air-Flow) unter normobaren Bedingungen aus einem Pressluftsystem ($PO_2 = 20,942\%$, $PCO_2 = 0,038\%$ ^v, $N_2 = 78,084\%$, $101,325 \text{ kPa}$ ^w) begast (Abbildung 3-2).

Abbildung 3-2 Kontrollkammer mit Deckel und Pressluftsystem (links) und bestückte 96-Well-Platte sowie geöffnete Kontrollkammer mit Blick auf die Abdeckhaube in Wasserbad (rechts)



3.3 Materialien

Alle Versuchsmaterialien und -chemikalien sowie die verwendeten Geräte sind im Anhang unter A-6 aufgeführt. Die Herstellung der verwendeten Puffer und Lösungen ist unter A-7 beschrieben.

3.4 Probenvorbereitung und Messmethoden

3.4.1 Isolation der Versuchszellen

Die frisch gewonnenen Blutproben wurden zur Antikoagulation heparinisiert, maximal 30 Minuten (PG A, C) bzw. nach ca. 2 h (PG B) gekühlt transportiert und unmittelbar danach aufbereitet. Zur Gewinnung von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs^x) wurde das Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll (Dichte $1,077 \text{ g/ml}$) aufgetrennt. Dazu wurde ein Leukosep®-Röhrchen^y zunächst mit Ficoll (3ml) und nach kurzer Zentrifugation (1000 rpm , 22°C , 1 min) mit frischem Vollblut der Blutproben befüllt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (600 rpm , 22°C , 10 min ohne Bremse) entstanden entsprechend ihrer Dichte fünf Schichten: von unten nach oben Erythrozyten, Granulozyten, Ficoll, PBMCs und Plasma (siehe Abbildung 3-3).

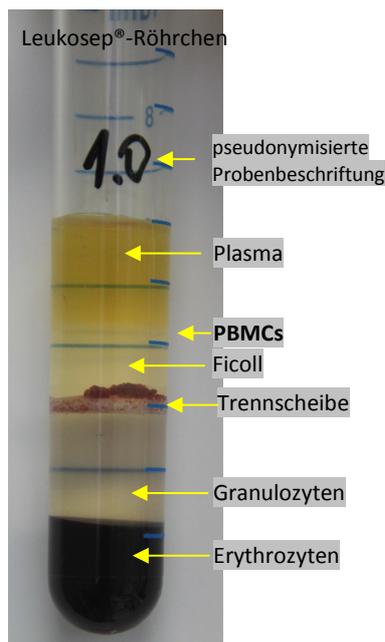
^v Weitere Spurengase sind nicht aufgeführt, da sie keine Relevanz für die Untersuchungen haben.

^w Druck abhängig von Höhe über NN, Angabe für Meereshöhe (Kiel liegt auf durchschnittlich 5 m über NN), Luftdruck liegt bei $1.018,2 \text{ hPa}$ (nach Angaben des Geomar Kiel)

^x dabei handelt es sich vornehmlich um Lymphozyten und Monozyten

^y Zentrifugationsröhrchen mit Trennscheibe

Abbildung 3-3 Aufgetrenntes Vollblut nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation



Die PBMCs wurden mit einer Pasteurpipette abgesaugt und zweimal mit 8 ml 7°C kaltem PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen (400 rpm, 7°C, 10 min) und in 2 ml RPMI (37°C) resuspendiert. Anschließend wurden die PBMCs aliquotiert und unter sterilen Bedingungen in Wellplatten überführt.

3.4.2 Vitalitätstest und Zellanzahlbestimmung mittels Trypanblau

Um in den Experimenten möglichst nur vitale Zellen zu untersuchen und eine gleiche Zellkonzentration (Zellanzahl/ml) einzustellen, wurde jede Probe präexperimentell auf die Vitalität der Zellen und die Zellanzahl in der Zellsuspension mit dem Trypanblau-Ausschlusstest [16][59][167][168][174][169] untersucht. Hierzu wurden jeweils 20 µl der Zellsuspension im Verhältnis von 1:5 mit 0,4%tiger Trypanblau-Färbelösung versetzt und sofort (aufgrund der Zytotoxizität des Trypanblaus nach wenigen Minuten [175]) in der Neubauer-improved Zellzählkammer mikroskopisch ausgewertet. Die Zellanzahl und -vitalität wurden nach folgenden Formeln bestimmt und die Zellkonzentration wurde anschließend durch entsprechende Zugabe von RPMI adjustiert:

1. Zellanzahl

$$\frac{\text{Summe aller gezählten Zellen } (S_0)}{\text{Anzahl ausgezählter Großquadrate}} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Färbelösung} * \text{Umrechnungsfaktor Zählkammer}$$

$$= \frac{S_0}{4} * 5^{-1} * 10^4 = \frac{\text{Zellenanzahl}}{\text{ml}}$$

2. Zellvitalität

$$\frac{\text{Anzahl vitaler Zellen } (S_v)}{[\text{Anzahl vitaler } (S_v) + \text{avitaler } (S_a) \text{ Zellen}]} = \text{Vitalität in \%}$$

Die Wells der 96-Well-Platten wurden mit 200 µl Zellsuspension einer Zellkonzentration von 1×10^6 PBMCs/ml, die der 24-Well-Platten mit 1ml Zellsuspension einer Zellkonzentration von 1×10^5 PBMCs/ml befüllt. Die errechnete Zellvitalität wurde prä- und postexperimentell zum Ausschluss von Proben mit atypisch geringer Zellvitalität verwendet.

3.4.3 Prä-/post-experimentelle Bestimmung der Zellvitalität und basalen DNA-Schädigung

Vor der Verwendung der PBMCs für Zellexperimente wurde die *in vivo* bestehende oder im Prozess der Entnahme und Aufbereitung der *nativen* PBMCs entstehende basale DNA-Schädigung (Basislevel) der PBMCs der Probandengruppe C sowie deren Zellvitalität untersucht. Im Sinne einer möglichst präzisen Bestimmung dieses Basislevels wurden alle entsprechenden Kontrolldaten der Vorversuche ($n = 136$) hierfür verwendet. Die Auswertung ergab präexperimentell eine mittlere Zellvitalität von $>98\%$, postexperimentell von 97% , sowie eine mittlere DNA-Schädigungsdichte von $1,091 \pm 1,059\%$ Comets/200 Zellen. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde das Basislevel der Zell- und DNA-Schädigung festgelegt, die jede Probe präexperimentell (nativ) maximal aufweisen durfte, sowie die Zellvitalität, die jede postexperimentelle Probe erreichen musste: Alle PBMCs, die eine präexperimentelle Zellvitalität von $<97\%$ oder eine DNA-Schädigung aufwiesen, die die Summe aus Mittelwert und doppelter Standardabweichung überstieg ($1,091 + 1,059 \cdot 2 = 3,209\%$ Comets/200 Zellen), wurden nachträglich von der Auswertung ausgeschlossen. Die präexperimentelle DNA-Schädigung (nativ-Probe) der jeweiligen Probe wurde in der Auswertung als Kontrollwert verwendet. Postexperimentell wurden Proben mit einer Zellvitalität von $<96\%$ von der Auswertung ausgeschlossen.

3.4.4 Comet Assay

Der Comet Assay ist ein bewährtes und viel verwendetes (vgl. Kapitel 1.3) Verfahren zur Quantifizierung der DNA-Schäden oxidativ belasteter Zellen (vielfach Leukozyten). In dieser Arbeit wurde die alkalische Variante des Comet Assay verwendet (siehe auch Kapitel 1.3 und 5.1.3). Dabei wurden die Versuchszellen im direkten Anschluss an das Experiment in ein Agarosegel eingebettet und auf einen Objektträger aufgetragen. Nach der Lyse über Nacht erfolgte die Denaturierung der DNA im alkalischen Milieu des Elektrophoresepuffers (25 min, 4°C , $\text{pH} < 13$, unter Lichtausschluss). Anschließend wurde die fragmentierte DNA in einem elektrischen Feld aufgetrennt (25 min, 25 V, 300 mA) und nach der Neutralisation^z der Proben erfolgte die lichtfreie Trocknung und Lagerung der Probenobjektträger bis zur Auswertung.

Auswertung des Comet Assays

Zur Auswertung wurden die auf dem Objektträger befindliche DNA bzw. DNA-Fragmente mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (50 μl einer 20%igen Ethidiumbromid-Lösung) eingefärbt und in einem abgedunkelten Raum im Wellenlängenbereich von 515-560nm mit einer Quecksilberdampflampe sichtbar gemacht. Die Untersuchung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop (400-fache Vergrößerung, Sperrfilter bei 590 nm) mit angeschlossenem Computer, in dem die DNA-Bilder mittels einer Software (CA IV®) analysiert wurden. Unbeschädigte DNA stellte sich dabei als runder Nukleus dar, wohingegen die DNA-Fragmente beschädigter DNA durch das elektrische Feld zu einem Schweif geformt wurden (Comet) mit einem Nukleus, der teilweise nur noch unvollständig sichtbar war. Von der Software wurden von jedem analysierten Bild folgende Daten erhoben: "Head Length", "%Head Intensity", "Tail Length", "%Tail Intensity", "Tailmoment", "Tail Migration", "totale Fläche", "mittleres Grau-Level", "totale Intensität". In der Auswertung wurden nur die allgemein üblichen Parameter "Tail

^z 3x5min Inkubation mit Neutralisationspuffer; anschließend wurde der Neutralisationspuffer mit A.dest. entfernt und die Objektträger wurden 5min in Ethanol inkubiert, um eine bessere Trocknung zu gewährleisten.

Moment" (TM) und die "%Tail Intensity" (TI) berücksichtigt. Der Schwerpunkt der Auswertetechnik lag jedoch auf dem besser diskriminierbaren binären visuellen "Ja-Nein"-Verfahren, in dem die prozentuale Anzahl der geschädigten Zellen unabhängig von der Schwere des DNA-Schadens in einer "Ja"-Aussage ausgewertet wurde. Die softwaregestützten Parameter wurden zum Vergleich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (siehe Kapitel A-4) für die zentralen Aussagen der Studie zusätzlich angegeben. Pro Objektträger wurden jeweils 200 Zellkerne visuell und softwaregestützt ausgewertet.

3.4.5 Statistische Auswertung und Analyse

Datenaufbereitung: Für die **visuelle Bestimmung** der Anzahl der DNA-geschädigten Zellen, wurde pro Objektträger 200 Zellen ausgewertet, wobei die beobachteten Zellen mit DNA-Schädigung ("Ja"-Aussage) ins Verhältnis (%) zu Zellen ohne DNA-Schädigung ("Nein"-Aussage) gesetzt wurden. Die Ergebnisse dieser binären visuellen Auswertung wurden in den Untersuchungen ohne VC als Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) angegeben bzw. dargestellt. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurden einige Datensätze zusätzlich als Median mit Interquartilranges (IQR, 25/75er Perzentilen) als Boxplots (Boxes: Median und 25/75er Perzentilen, Whiskers: 5/95er Perzentilen) oder Graphik der Mediane mit IQR (25/75er Perzentilen) dargestellt. Aufgrund der relativ großen Varianzen und der häufig nicht normalverteilten Datensätze wurden die Ergebnisse der Untersuchungen mit VC sämtlich als Median mit IQR (25/75er Perzentilen) angegeben (Median {25/75er Perzentilen}) und als Boxplots (Boxes: Median und 25/75er Perzentilen, Whiskers: 5/95er Perzentilen) dargestellt. Für die **Tailmoment- und %Tail Intensity-Analysen** wurden für jeden Objektträger die entsprechenden Mittelwerte aus 200 evaluierten Zellen softwaregestützt bestimmt und als Grundlage für weitere statistische Berechnungen verwendet.

Analyseverfahren: Eine Normalverteilung von Datensätzen wurde anhand des Shapiro-Wilk-Tests überprüft. Signifikanzanalysen zwischen Datensätzen wurden anhand des (un)gepaartem Student's-T-Tests bzw. des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests^{aa} oder des Mann-Whitney-U Tests abhängig von der Normalverteilung der Daten vorgenommen. Die graphische Analyse erfolgte durch Bestimmung der linearen Regression der Graphen der Mittelwerte bzw. Mediane, wobei die Linearitäten (r^2) und die Unterschiede der Steigungen ermittelt wurden. Waren die Steigungen der Graphen nicht signifikant unterschiedlich, wurde überprüft, ob die Graphen signifikant verschiedene y-Achsen-Abschnitte aufwiesen, um eine parallele Unterscheidung zu erkennen. Eine Signifikanz wurde angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ war. Bei multiplen Vergleichen wurde das Signifikanzniveau mit Hilfe der Bonferroni-Methode adjustiert. Berechnungen und statistische Analysen wurden mit Hilfe von Excel®- und Prism®-Softwares durchgeführt.

^{aa} Wilcoxon signed-rang test

3.5 Aufbau und Ablauf der Studie

3.5.1 Einfluss von hyperbarem Sauerstoff auf DNA-Schäden in Probanden

In diesem Versuchsteil wurde untersucht, in wie weit eine einmalige Belastung mit hyperbarem Sauerstoff (30 min.; $pO_2 = 280$ kPa) zu DNA-Schäden führt. Dazu wurden die Blutproben der Probandengruppe A (siehe Kapitel 3.1) ($n = 14$) verwendet. Den Probanden wurde am Vortag des Sauerstofftoleranztests (Kontrollblut) und am Untersuchungstag im direkten Anschluss an den Sauerstofftoleranztest Blut entnommen. Die Aufbereitung und Auswertung der Blutproben erfolgte nach dem in Kapitel 3.4 beschriebenen Schema.

Zusätzlich wurde über vier Sauerstoffelektroden auf der Hautoberfläche (über dem M. Trapezius (Pars descendens) sowie am linken Bein über M. quadriceps femoris, M. triceps surae und M. tibialis anterior) die Sauerstoffsättigung abgeleitet. Mit dieser Technik sollte untersucht werden, ob es in den einzelnen Hautarealen zu Beginn der Sauerstoffbelastung zu einem zeitlich versetzten Anstieg der Sauerstoffsättigung kommt. Weiterhin sollte untersucht werden, ob besser durchblutete Hautareale (über Muskulatur) einen anderen Verlauf der Sauerstoffsättigung zeigen, als weniger gut durchblutete Hautareale (Haut über M. tibialis anterior bzw. Tibiavorderkante).

3.5.2 Adaptation des Organismus an eine hyperbare Sauerstoffexposition

Dieser Versuchsteil diente zur Prüfung, ob PBMCs nach O_2 -Expositionsphase *in vivo* eine größere Resistenz gegenüber einer weiteren hyperbaren Sauerstoffexposition *ex vivo* aufweisen. Weiterhin sollte bestimmt werden, ob bzw. in welcher Weise diese mögliche Adaptation im Verlauf von fünf Wochen nach der letzten Sauerstoffexposition abnimmt. Für diese Untersuchung wurde den Probanden der Probandengruppe B (siehe Kapitel 3.1) ($n = 7$) 24h nach dem letzten Tauchgang und im Verlauf von fünf Wochen einmal wöchentlich Blut entnommen und wie beschrieben (siehe Kapitel 3.4) aufbereitet. Die PBMCs wurden in 96-Well-Platte aliquotiert und pro Proband wurden sechs Proben in der Experimentaldruckkammer^{bb} (Kapitel 3.2) hyperbarem Sauerstoff (400 kPa, 1-6 h) ausgesetzt. Im Verlauf des Experiments wurden nach Ablauf jeder vollen Stunde der Expositionszeit die PBMCs aus je einem Well pro Proband entnommen und auf DNA-Schädigung untersucht.

3.5.3 Einfluss von VC auf DNA-Schäden in PBMCs während einer hyperbaren Oxygenierung

In diesem Teil der Studie sollte untersucht werden, ob eine Zugabe von VC zum Probenmedium die Zell- und/oder DNA-Schädigung in PBMCs, die durch Applikation von hyperbarem Sauerstoffs entsteht, reduzieren kann. Hierzu musste in Vorversuchen eine Methode etabliert werden, mit der PBMCs unter Ausschluss bzw. Beachtung möglichst aller Stör- und Einflussgrößen (z. B. Waschschritte oder pH-Wert des Nährmediums) mit Vitamin C inkubiert und anschließend in der Experimentaldruckkammer hyperbarem Sauerstoff ausgesetzt werden konnten (siehe Kapitel A-1). Zu jedem Versuch wurden Kontrolldaten in der Kontrollkammer (siehe Kapitel 3.2) erhoben, um Proben, die unter diesen Kontrollbedingungen sehr abweichende DNA-Schädigung aufwiesen, identifizieren

^{bb} Da es sich bei dieser Untersuchung um eine Verlaufsuntersuchung mit stündlicher Untersuchung von Probenmaterial handelte, wurde die Kontrollkammer in diesen Versuchen nicht verwendet und als Kontrolle die basale DNA-Schädigung des jeweiligen Probanden verwendet.

und aus der Auswertung ausschließen zu können. Weiterhin wurden die Kontrolldaten teilweise zur Beurteilung der Versuchsergebnisse herangezogen.

Da sich in den Vorversuchen zwei mögliche Wirkweisen von VC abgezeichnet hatten (siehe Kapitel A-1), wurden zwei Protokolle verfolgt:

1. DNA-Schädigung unter VC-Einfluss in Abhängigkeit von der Intensität der oxidativen Belastung

Zum einen sollte die VC-Wirkung in Abhängigkeit von der Intensität der oxidativen Belastung bestimmt werden. Hierzu wurden PBMCs der Probandengruppe C in eine 24-Well-Platten aliquotiert, mit 0, 50, 100, 200 und 400 μM VC dotiert und nach dreistündiger Vorinkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO_2 , 21% O_2 , 74% N_2) unmittelbar einer Sauerstoffüberdruckbehandlung in der Experimentaldruckkammer bei 400 kPa (n = 18) bzw. 500 kPa (n = 34) unterzogen, wobei das VC jeweils im Probenmedium belassen wurde. Die Auswertung erfolgte nach Herauswaschen des VCs mittels Comet Assay (vgl. Kapitel 3.4).

2. Einfluss von VC auf DNA-Schädigung unter hyperbarer Oxigenierung

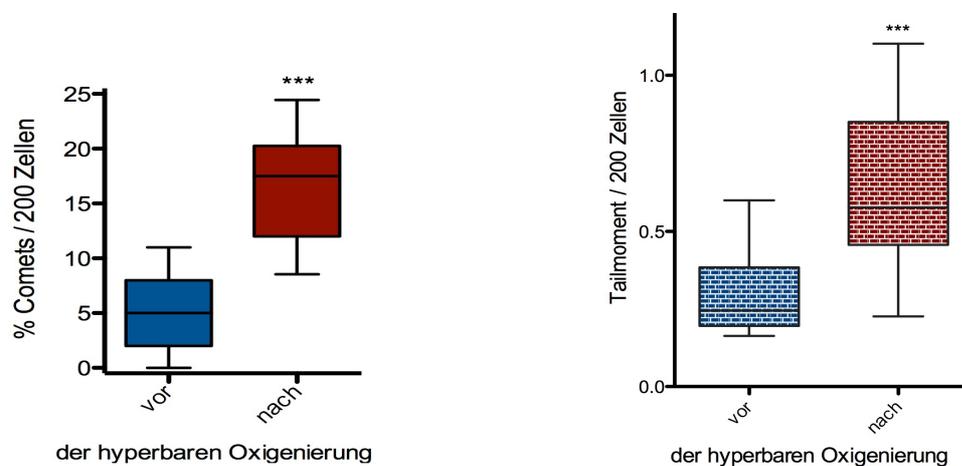
Zum anderen sollte unter verschiedenen VC-Konzentrationen ermittelt werden, welchen Einfluss VC im Probenmedium auf PBMCs hat. Im Experiment wurde die Zellsuspension in eine 24-Well-Platte aliquotiert (n = 24), mit 0, 50, 100, 200 und 400 μM VC dotiert. Nach dreistündiger Vorinkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO_2 , 21% O_2 , 74% N_2) wurde das VC herausgewaschen und die Zellsuspension mit frischem Puffer aufgefüllt. Anschließend wurden die PBMCs (n = 24) der Sauerstoffüberdruckbehandlung in der Experimentaldruckkammer (500 kPa, 3 h) unterzogen, da sich herausgestellt hatte, dass sich eine höhere Effektivität von VC unter dieser höheren oxidativen Belastung zeigt. Nach einem Waschschrift wurden die Daten mittels Comet Assay (vgl. Kapitel 3.4) ausgewertet. Zum Vergleich mit/ ohne VC im Probenpuffer während der hyperbaren Oxigenierung wurden die 500 kPa-Daten des vorhergehenden Versuchs herangezogen.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von hyperbarem Sauerstoff im Humanmodell

In diesem Versuchsteil sollte ermittelt werden, in wieweit DNA-Schäden in PBMCs durch einmalige Belastung des menschlichen Organismus mit hochdosiertem Sauerstoff induziert werden. Dazu wurden PBMCs von Probanden (PG A), die im Rahmen eines Sauerstofftoleranztests (280 kPa; 30 Minuten) ausgesetzt wurden, jeweils vor und nach der Sauerstoffbelastung auf DNA-Schäden untersucht (siehe Abbildung 4-1). Die Untersuchung zeigte, dass in den PBMCs vor Belastung (Kontrolle) sowohl nach visueller als auch nach softwaregestützter (TM, TI) Auswertung hoch signifikant ($p < 0,001$) weniger DNA-Schäden vorhanden waren, als in den PBMCs nach Belastung (TI siehe Kapitel A-1).

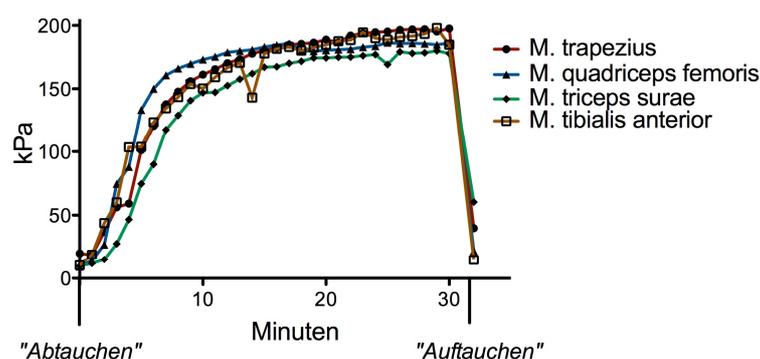
Abbildung 4-1 DNA-Schädigung in PBMCs vor und nach hyperbarer Oxigenierung *in vivo*



O₂-Belastung: 280 kPa, 30 min; dargestellt ist jeweils der Median sowie die 25/75% und 5/95% Perzentilen, jeweils pro 200 ausgewertete Zellen; n=14; links: visuelles Scoring; $p < 0,0001$, rechts: softwaregestützte Tailmoment-Auswertung; $p < 0,0001$

Während des Sauerstofftoleranztests wurde die Sauerstoffsättigung der Hautoberfläche über vier Messsonden minütlich aufgezeichnet (siehe Kapitel 3.5.1). Abbildung 4-2 zeigt die Mediane der jeweiligen Sauerstoffsättigung über einen Zeitraum von 30 min. Der Graph der Aufsättigung mit Sauerstoff verläuft jeweils annähernd sigmoidal. Die Lokalisation des Messareals war dabei nicht ausschlaggebend für die Geschwindigkeit der Aufsättigung oder die maximalen Höhe der Sauerstoffsättigung.

Abbildung 4-2 Verlauf der Aufsättigung mit Sauerstoff über verschiedenen Hautarealen während der hyperbaren Oxigenierung

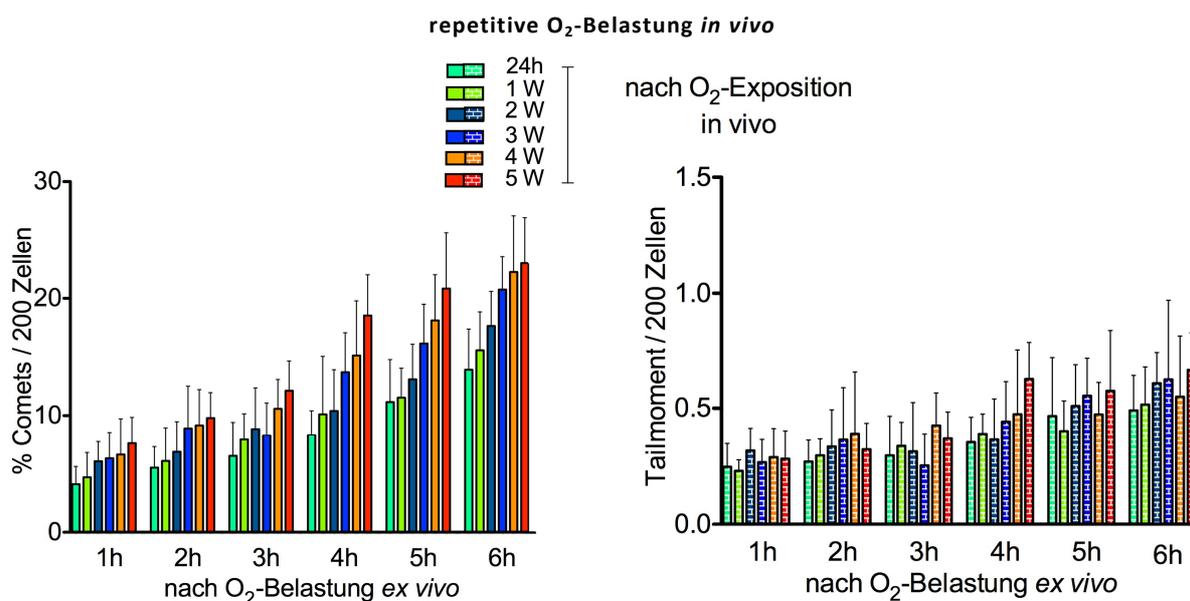


Sauerstoffbelastung: 280 kPa, 30 min; dargestellt ist der Median der Sauerstoffsättigung abgeleitet über vier unterschiedliche Messsonden von Beginn ("Abtauchen") bis Ende ("Auftauchen") eines in der Probandendruckkammer simulierten Tauchgangs (ca. 18m), n=14

4.2 Adaptation an die Exposition gegenüber hyperbarem Sauerstoff

In diesem Teil der Studie wurde untersucht, ob und in wie weit der menschliche Organismus Schutz- und Reparaturmechanismen gegen den von Sauerstoff induzierten oxidativen Stress ausbildet und in wie weit diese Mechanismen zu einer messbaren Verringerung von DNA-Schäden bei erneuter Exposition führen. Hierzu wurde Probanden (PG B), die über einen Zeitraum von drei Monaten im Rahmen von wöchentlich acht Tauchgängen mit Sauerstoff-Kreislauffauchgeräten (max. 160 kPa/min, 90 min) repetitiv hyperbarem Sauerstoff ausgesetzt waren, 24 Stunden nach der letzten O₂-Exposition und im Verlauf von fünf Wochen wöchentlich Blut entnommen. Nach der Anfertigung von Nativproben wurden die PBMCs jeweils über einen Zeitraum von 6 Stunden einem Sauerstoffdruck von 400 kPa ausgesetzt, wobei stündlich die DNA-Schädigung gemessen wurde (Comet Assay). Die Konzentration der mittleren DNA-Schädigung nahm zu, je länger die letzte hyperbare Sauerstoffbelastung zurück lag. Zusätzlich stieg die DNA-Schädigung mit der O₂-Expositionszeit in der Druckkammer an (siehe Abbildung 4-3). Die Daten der softwaregestützten (TM/TI) Auswertung zeigten ebenfalls eine Zunahme der DNA-Schädigung in Abhängigkeit von der O₂-Expositionszeit (siehe Abbildung 4-3 für TM, A-4 für TI).

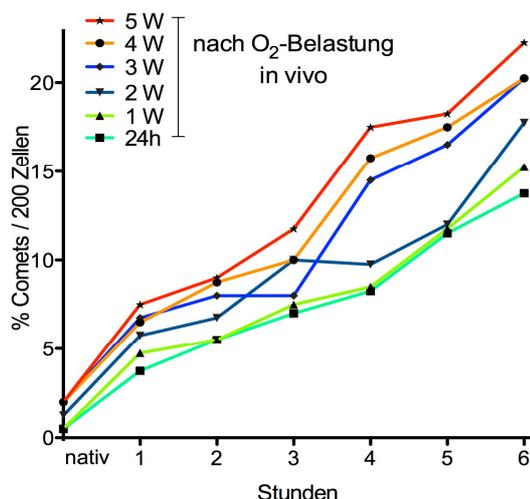
Abbildung 4-3 Vulnerabilität von PBMCs gegenüber hyperbarer Oxigenierung *ex vivo* im Anschluss an



PBMCs von Probanden, die über 3 Monate repetitiv hyperbarer Oxigenierung ausgesetzt waren, wurden *ex vivo* erneut hyperbarer Oxigenierung ausgesetzt, um die Vulnerabilität gegenüber erneutem oxidativen Stress zu ermitteln (Untersuchungsintervall: 24 h bis 5 W wöchentlich), Sauerstoffbelastung *ex vivo* 400 kPa (1-6 h); dargestellt ist jeweils MW + SD; n=7, links: visuelles Scoring, rechts: softwaregestützte Tailmoment-Auswertung

Zur Veranschaulichung der Zunahme der DNA-Schädigung mit der Expositionszeit *ex vivo* sowie dem Abstand zur letzten *in vivo* Belastung sind die entsprechenden Mediane der prozentualen Konzentration der DNA-Schäden in PBMCs graphisch dargestellt (Abbildung 4-4). Die einzelnen Graphen steigen annähernd linear an: $r^2_{24h} > 0,9831$, $r^2_{1W} > 0,9607$, $r^2_{2W} > 0,9268$, $r^2_{3W} > 0,9506$, $r^2_{4W} > 0,9798$, $r^2_{5W} > 0,9768$. Die Linearität der Graphen, die aus den Daten der Untersuchungen in sehr geringem (24 h und 1 W) bzw. sehr großem (4 W und 5 W) zeitlichen Abstand zur letzten *in vivo* Exposition entstanden sind, ist größer als die der 2 W und 3 W-Graphen. In diesem Übergangsbereich (2 W bis 3 W) ist die Höhe der DNA-Schädigung in den jeweiligen Datensätzen vergleichsweise inhomogen ist.

Abbildung 4-4 Median der DNA-Schädigung in PBMCs nach hyperbarer Oxigenierung *ex vivo* im Anschluss an repetitive O₂-Belastung *in vivo*



Darstellung der Mediane der Ergebnisse der Untersuchung der Vulnerabilität von PBMCs gegenüber hyperbarer Oxigenierung *ex vivo* (400 kPa, 1-6 h) im Anschluss (nach 24h bis 5 W wöchentlich) an drei monatige oxidative Belastungsphase; n = 7, jeweils 200 ausgewertete Zellen (aus Gründen der Übersicht ohne Interpercentilranges); visuelles Scoring; Linearität der Graphen: $r^2_{24h} = 0,9831$, $r^2_{w1} = 0,9607$, $r^2_{w2} = 0,9268$, $r^2_{w3} = 0,9506$, $r^2_{w4} = 0,9798$, $r^2_{w5} = 0,9768$. Signifikant unterschiedliche Steigungen: $p_{24h/3W} = 0,0287$, $p_{24h/4W} = 0,00235$, $p_{24h/5W} = 0,00098$, unterschiedlich im Sinne einer Parallelverschiebung $p_{24h/2W} = 0,01231$; n = 7

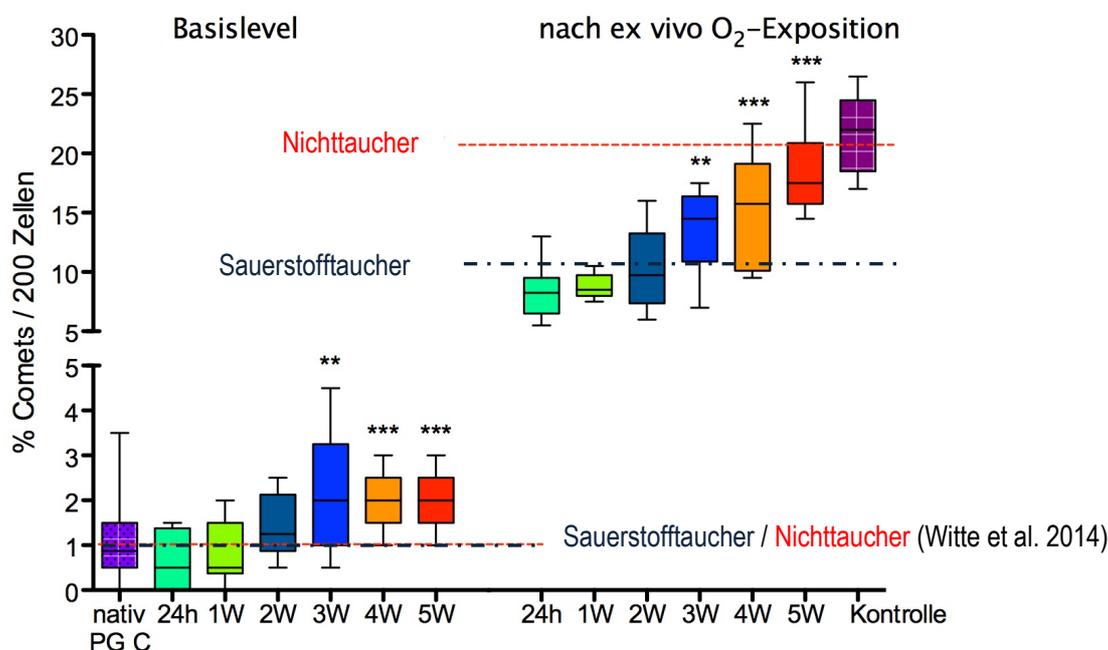
Die Steigung des Graphen 24 h nach dem letzten Tauchgang mit Kreislauffauchgerät ist signifikant kleiner als nach 3 Wochen ($p = 0,022$) und nach 4 und 5 ($p < 0,001$) Wochen nach letzter Sauerstoffbelastung *in vivo*. Zwischen 24 h und einer Woche nach letzter Belastung ergab sich kein signifikanter Unterschied der Steigungen, jedoch verlaufen die Graphen bei unterschiedlichen y-Achsenabschnitten ($b_{24h} = 1,085$ und $b_{1W} = 2,071$) signifikant parallel ($p = 0,0036$). Für die softwaregestützte Auswertung ergaben sich in der Linearitätsprüfung der einzelnen Graphen für TM-Daten: $r^2_{24h} > 0,9508$, $r^2_{1W} > 0,9531$, $r^2_{2W} > 0,8660$, $r^2_{3W} > 0,8026$, $r^2_{4W} > 0,9439$, $r^2_{5W} > 0,8668$ und für TI-Daten: $r^2_{24h} > 0,9033$, $r^2_{1W} > 0,9723$, $r^2_{2W} > 0,8578$, $r^2_{3W} > 0,7628$, $r^2_{4W} > 0,9038$, $r^2_{5W} > 0,7910$. Der Graph der mittleren DNA-Schädigung 24 h nach letzter *in vivo* Exposition unterscheidet sich in der TM bzw. TI-Auswertung von dem 4 W-Graphen ($p_{TM} = 0,0004$ bzw. $p_{TI} = 0,0063$) und 5 W-Graphen ($p_{TM} = 0,0026$ bzw. $p_{TI} = 0,0034$) im Sinne einer Parallelverschiebung. Bei allen weiteren Testungen ergaben sich keine Signifikanzen (TM, TI siehe Kapitel A-4).

4.2.1 Vergleichende Zusammenschau von Daten der vorliegenden sowie einer Parallelstudie

Die Ergebnisse der Untersuchung der Adaptation an die Exposition gegenüber hyperbarem Sauerstoff (vgl. Kapitel 4.2) sollen mit den Ergebnissen von Witte et al. [16] verglichen werden. Witte et al. untersuchten die Vulnerabilität von PBMCs von "Nichttauchern" und "Sauerstofftauchern", die einem Sauerstoffüberdruck von 400 kPa über mehrere Stunden ausgesetzt wurden. Als "Sauerstofftaucher" wurden Probanden betrachtet, die regelmäßig mit Sauerstoff-Kreislaufgeräten tauchten und deren letzter Tauchgang weniger als 21 Tage zurück lag. Die Bestimmung der DNA-Schädigung erfolgte, wie in der vorliegenden Studie, mittels Comet Assay mit demselben visuellen Scoring-Verfahren. Es wurden Vergleichsdaten vor und nach vierstündiger hyperbarer Oxigenierung betrachtet, dargestellt sind die Mediane aus dieser Untersuchung bzw. die Mittelwerte von Witte et al. (siehe Abbildung 4-5). Die übrigen eingetragenen Vergleichsdaten ("nativ PG C" bzw. "Kontrolle", lila) sind im Rahmen

von Untersuchungen der vorliegenden Studie entstanden (siehe Kapitel 3.4.3 bzw. A - 1.2. Absatz IV) und zeigen die DNA-Schädigung in PBMCs von Nichttauchenden Probanden (PG C) nativ bzw. nach vierstündiger Exposition gegenüber 400 kPa hyperbarer Oxigenierung.

Abbildung 4-5 Adaptation an oxidativen Stress



Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Untersuchung der Vulnerabilität von PBMCs gegenüber hyperbarer Oxigenierung *ex vivo* (4 h, 400 kPa) im Anschluss (nach 24h bis 5 W wöchentlich) an drei monatige oxidative Belastungsphase sowie den Ergebnissen von Witte et al., links: Basislevel der DNA-Schädigung, rechts: DNA-Schädigung nach hyperbarer Oxigenierung in der Experimentaldruckkammer; Probanden: PG C sind Probanden ohne vorherige hyperbare Sauerstoffexposition: nativ PG C (n = 136, vgl. Kapitel 3.1); Kontrolle: Vergleichswert aus dieser Studie: oxidative DNA-Schädigung nach 4-stündiger hyperbarer Oxigenierung (400kPa, siehe Kapitel 3.4.3 bzw. A - 1.2. Absatz IV); PBMCs nach hyperbarer Oxigenation *in vitro* (4 h, 400 kPa) ohne *in vivo* O₂-Exposition (n=6, vgl. Abbildung 6-6); *aus Witte et al.*: "Nichttaucher" (n = 12), "Sauerstofftaucher" regelmäßige hyperbare Sauerstoffbelastung, zuletzt vor <21 Tagen, übrige PG B: 24 h bis 5 Wochen nach Sauerstoffbelastung *in vivo* mit, durchschnittlich 160 kPa über 50 bis 120 min. mindestens 7 Mal pro Woche (W), n=7; dargestellt ist jeweils der Median sowie die 25/75% und 5/95% Perzentilen jeweils pro 200 ausgewertete Zellen, bei Witte et al. der Mittelwert; Signifikanzen: links: $p_{24h/3W} = 0,0031$, $p_{24h/4W} < 0,0001$, $p_{24h/5W} < 0,0001$ (Sterne), $p^* = 0,00714$; $p_{5W/24h} < 0,0001$, $p_{5W/1W} < 0,0001$, $p_{5W/2W} = 0,0299$; $p^* = 0,00714$ rechts: $p_{24h/3W} = 0,0014$, $p_{24h/4W} = 0,0008$, $p_{24h/5W} < 0,0001$ (Sterne); $p^* = 0,00714$ (Sterne), ($p_{5W/24h} < 0,0001$, $p_{5W/1W} < 0,0001$, $p_{5W/2W} < 0,0001$, $p_{5W/3W} = 0,0035$, $p^* = 0,00714$)

Diese Graphik stellt noch einmal deutlich den quantitativen Unterschied der DNA-Schädigung in PBMCs vor und nach hyperbarer Oxigenierung heraus, der sowohl in dieser Studie als auch in der von Witte et al. [16] gefunden wurde. Weiterhin zeigen die Ergebnisse beider Studien, dass in PBMCs von zuvor *in vivo* hyperbar sauerstoffbelasteter Probanden die DNA-Schädigung unter *ex vivo* hyperbarer Sauerstoffbelastung weniger stark ansteigt, als in denen von nicht sauerstoffbelasteten Probanden.

Zwischen den Datensätzen die in der vorliegenden Studie erhoben worden sind, wurden folgende Signifikanztestungen vorgenommen:

Native PBMCs - Basislevel (Abbildung 4-5, links)

Die basale DNA-Schädigung nimmt mit dem Abstand zur letzten *in vivo* Sauerstoffexposition zu. Werden die Messpunkte 24 h nach letzter *in vivo* O₂-Exposition mit den übrigen Messzeitpunkten verglichen, zeigen sich

gegenüber den Werten nach 3, 4 und 5 Wochen signifikante Unterschiede: $p_{24h/3W} = 0,0031$, $p_{24h/4W} < 0,0001$, $p_{24h/5W} < 0,0001$ (Sterne, $p^* = 0,00714$). Nimmt man die basale DNA-Schädigung nach 5 Wochen als normale basale DNA-Schädigung in der PG B an (entsprechend einer Untersuchung vor Beginn der Tauchgänge), zeigt sich die basale DNA-Schädigung bis nahezu 2 Wochen nach letzter *in vivo* O₂-Exposition signifikant niedriger als "ohne" vorherige O₂-Exposition ($p_{5W/24h} < 0,0001$, $p_{5W/1W} < 0,0001$, $p_{5W/2W} = 0,0299$; $p^* = 0,00714$).

DNA-Schädigung nach ex vivo O₂-Exposition (Abbildung 4-5, rechts)

Auch die DNA-Schädigung in den PBMCs nach *ex vivo* hyperbarer Sauerstoffbelastung nimmt mit größerem Abstand zur letzten *in vivo* Sauerstoffbelastung zu. Dabei zeigt sich die DNA-Schädigung 3, 4 und 5 Wochen gegenüber 24h nach letzter *in vivo* O₂-Exposition signifikant größer ($p_{24h/3W} = 0,0014$, $p_{24h/4W} = 0,0008$, $p_{24h/5W} < 0,0001$, $p^* = 0,00714$, Sterne). Werden Signifikanzanalysen zwischen 24h bis 4 Wochen gegenüber 5 Wochen als "fiktivem Kontrollwert"^{cc} vorgenommen, zeigt sich die DNA-Schädigung in den PBMCs bis drei Wochen nach letzter *in vivo* Exposition als signifikant niedriger ($p_{5W/24h} < 0,0001$, $p_{5W/1W} < 0,0001$, $p_{5W/2W} < 0,0001$, $p_{5W/3W} = 0,0035$, $p^* = 0,00714$).

Vergleich der Datensätze der verschiedenen Studien

Aus der Abbildung 4-5 lässt sich ablesen, dass die mittlere basale DNA-Schädigung in PBMCs von nicht sauerstoffexponierten Probanden (PG C) $1,091 \pm 1,059\%$ Comets/200Zellen ("nativ PG C", vgl. Kapitel 3.3, lila) nahezu mit der von Witte et al. [16] bestimmten basalen DNA-Schädigung in "Nichttauchern" ($MW \approx 1\%$ Comets/200Zellen) übereinstimmt^{dd}. Die DNA-Schädigung nach hyperbarer Oxigenierung liegt bei "Nichttauchern" und bei PG C ("Kontrolle") höher als bei Probanden der PG B. PBMCs von Sauerstofftaucher weisen nach entsprechender hyperbarer Oxigenierung bei Witte et al. in etwa so viele DNA-Schäden auf, wie die von Probanden der PG B 2-3 Wochen nach letzter Sauerstoffexposition *in vivo*. Signifikanztestungen können aufgrund des Vergleichs von Medianen und Mittelwerten nicht erhoben werden.

4.3 Einfluss von Vitamin C auf PBMCs unter hyperbarer Oxigenierung

In diesem Versuchsabschnitt sollte untersucht werden, ob Vitamin C die Entstehung von DNA-Schäden durch hyperbaren Sauerstoff beeinflusst. Hierzu wurden zum einen Untersuchungen bei verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken durchgeführt. Zum anderen sollte ermittelt werden, wie sich verschiedene VC-Konzentrationen auf die Höhe der DNA-Schädigung auswirken, wenn das VC nach Inkubation (vor der oxidativen Belastung) herausgewaschen bzw. im Probenmedium belassen wird.

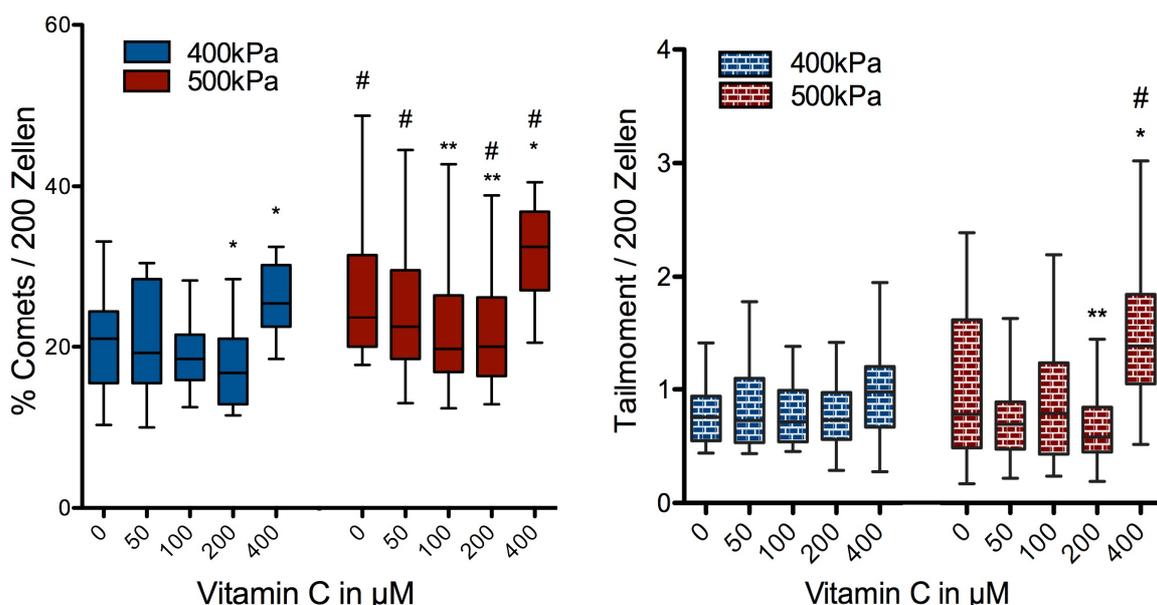
^{cc} Hier wird zur Signifikanztestungen angenommen, dass nach 5 Wochen der Effekt einer vorherigen *in vivo* Sauerstoffexposition nicht mehr vorhanden ist. Der korrekte Kontrollwert ist möglicherweise abweichend. Die Analyse wird nicht mit dem Kontrollwert aus PG C vorgenommen, da es sich dabei um ein anderes Probandengut handelt.

^{dd} Dass die basale DNA-Schädigung der PG B nach 3-5 Wochen nach letzter *in vivo* O₂-Exposition höher liegt als der Vergleichswert von Witte et al., ist am ehesten in der hier längeren Transportzeit begründet (vgl. Kapitel 3.3). Daraus folgend müsste für den Datensatz dieser Untersuchung ein Kontrollfaktor berücksichtigt werden, der diesen Fehler korrigiert. Aufgrund der geringen quantitativen Höhe dieses Fehlers im Vergleich zur DNA-Schädigung nach *ex vivo* O₂-Exposition wurde dies jedoch nicht in der Auswertung berücksichtigt.

1. DNA-Schädigung unter VC-Einfluss in Abhängigkeit von der Intensität der oxidativen Belastung

In Abbildung 4-6 sind Ergebnisse aus Versuchen mit hyperbarer Oxigenierung unmittelbar nach Inkubation mit VC im Probenmedium zusammengefasst, die bei einem pO_2 von 400 kPa (blau, $n = 22$) und 500 kPa (rot, $n = 34$) durchgeführt wurden. Die Daten sind in Form von Medianen als Boxplots (Whiskers geben jeweils 5 und 95-Perzentilenpaare an) als binäre visuelle (*links*) und softwaregestützte Tailmoment-Auswertung (*rechts*) dargestellt (TI und weitere Graphiken unter Kapitel A-4 und A - 5.6). Signifikanzen wurden zunächst zwischen dem Kontrollwert (0 μM VC) und dem Wert der jeweiligen VC-Konzentrationen ermittelt und gekennzeichnet (*Sterne*). In den Versuchen mit einem pO_2 von 400 kPa zeigt sich eine sukzessive Abnahme der DNA-Schädigung bei den VC-Konzentrationen 50, 100 und 200 μM gegenüber dem Kontrollwert (0 μM VC), wobei eine signifikante Abnahme der DNA-Schadenskonzentration bei visuellem Scoring nur zwischen dem Kontrollwert und einer VC Konzentration von 200 μM nachweisbar ist ($p_{0/200\mu\text{MVC}} = 0,0246$). In den Versuchen mit einer Sauerstoffbelastung von 500kPa sind die Ergebnisse ähnlich, wobei eine signifikante Abnahme der DNA-Schädigung bei 100 und 200 μM ($p_{0/100\mu\text{MVC}} = 0,0029$, $p_{0/200\mu\text{MVC}} = 0,0051$) gegenüber dem Kontrollwert (0 μM VC) nachzuweisen ist ($p^*_{400\text{kPa}} = 0,0023$, $p^*_{500\text{kPa}} = 0,0015$). Der Einsatz von 400 μM VC führt beim visuellen Scoring bei einem Sauerstoffpartialdruck von 400 kPa ($p_{0/400\mu\text{MVC}} = 0,0171$) ebenso wie bei 500 kPa ($p_{0/400\mu\text{MVC}} = 0,0183$) zu einer signifikanten Steigerung der DNA-Schädigung gegenüber dem Kontrollwert (0 μM VC). Der Vergleich zwischen den Versuchen mit unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken (400 und 500 kPa) zeigt, dass bei einem pO_2 von 500 kPa bei jeder VC-Konzentration (mit Ausnahme von 100 μM VC Werten) signifikant (*Rauten*) höhere Konzentrationen von DNA-Schädigung nachzuweisen waren, als bei 400 kPa (400/500 kPa: $p_{0\mu\text{MVC}} = 0,0130$, $p_{50\mu\text{MVC}} = 0,0401$, $p_{200\mu\text{MVC}} = 0,0107$, $p_{400\mu\text{MVC}} = 0,0016$).

Abbildung 4-6 DNA-Schädigung in PBMCs nach hyperbarer Oxigenierung in Abhängigkeit von der VC-Konzentration und der oxidativen Belastung



Dargestellt ist jeweils der Median sowie die 25/75% und 5/95% Perzentilen jeweils pro 200 ausgewertete Zellen, Signifikanzanalysen: (*Sterne*) jeweils zum Kontrollwert (0 μM VC) ($p^*_{400\text{kPa}} = 0,0023$, $p^*_{500\text{kPa}} = 0,0015$); (*Rauten*) jeweils zwischen 400 und 500 kPa; $n_{400\text{kPa}} = 18$, $n_{500\text{kPa}} = 34$, *links*: visuelles Scoring, 400 kPa: $p_{0/200\mu\text{MVC}} = 0,0246$, $p_{0/400\mu\text{MVC}} = 0,0171$, 500 kPa: $p_{0/100} = 0,0029$, $p_{0/200} = 0,0051$, $p_{0/400\mu\text{MVC}} = 0,0183$, 400/500 kPa: $p_{0\mu\text{MVC}} = 0,0130$, $p_{50\mu\text{MVC}} = 0,0445$, $p_{100\mu\text{MVC}} = 0,1223$, $p_{200\mu\text{MVC}} = 0,0107$, $p_{400\mu\text{MVC}} = 0,0016$, *rechts*: softwaregestützte Tailmoment-Auswertung $p_{400\mu\text{MVC}} = 0,0065$

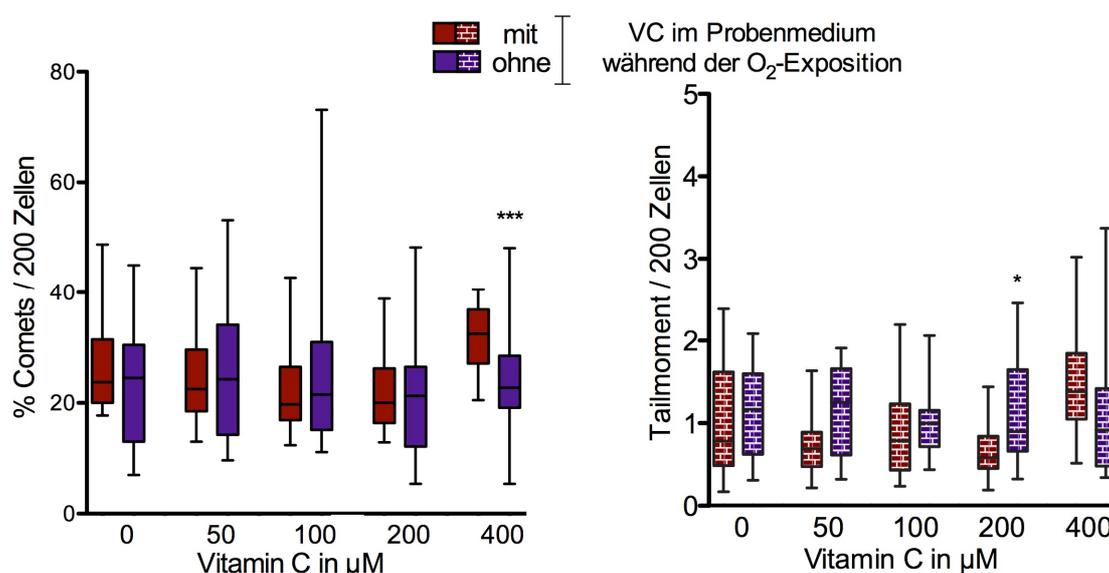
In der Tailmoment-Auswertung ergab sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zum jeweiligen Kontrollwert (0 μM VC) nur bei 200 μM VC ($p_{0/200\mu\text{MVC}} = 0,0049$) und 500 kPa ($p^*_{400\text{kPa}} = 0,0023$, $p^*_{500\text{kPa}} = 0,0015$). Eine Abnahme der DNA-Schädigung mit steigender VC-Konzentration bis 200 μM VC war jedoch auch hier (mit Ausnahme des 100 μM -Medians bei 500 kPa) gegeben (Median TM: 400 kPa: $M_{0\mu\text{MVC}} = 0,7560\{0,549/0,939\}$, $M_{50\mu\text{MVC}} = 0,7261\{0,532/1,098\}$, $M_{100\mu\text{MVC}} = 0,7141\{0,540/0,991\}$, $M_{200\mu\text{MVC}} = 0,7198\{0,559/0,973\}$; 500 kPa: $M_{0\mu\text{MVC}} = 0,7821\{0,486/1,621\}$, $M_{50\mu\text{MVC}} = 0,6935\{0,475/0,891\}$, $M_{100\mu\text{MVC}} = 0,7883\{0,430/1,233\}$, $M_{200\mu\text{MVC}} = 0,5806\{0,450/0,843\}$). Ebenso war zu erkennen, dass bei 400 kPa weniger DNA-Schäden induziert wurden, als bei 500 kPa ($p_{400/500\text{kPa}, 400\mu\text{MVC}} = 0,0064$), sowie dass bei 400 μM VC mehr DNA-Schädigung induziert wurde, als ohne VC (0 μM VC) ($p_{0/400\mu\text{MVC}, 500\text{kPa}} = 0,0244$). Die TI-Auswertung (siehe A-4) lieferte vergleichbare Ergebnisse. Signifikanzen ergaben sich bei der TI-Auswertung jeweils zu Kontrollwert (0 μM VC) bei 200 und 400 μM VC ($p_{0/200\mu\text{MVC}} = 0,0128$, $p_{0/400\mu\text{MVC}} = 0,0313$; $p^*_{400\text{kPa}} = 0,0023$, $p^*_{500\text{kPa}} = 0,0015$) und zwischen 400 und 500 kPa ($p_{200\mu\text{MVC}} = 0,0311$, $p_{400\mu\text{MVC}} = 0,0064$) (vgl. A-4 Abbildung 6-9).

Aus den Daten der Kontrollkammeruntersuchungen ergaben sich keine Unterschiede nach Zugabe von VC verschiedener Konzentrationen gegenüber der Kontrollgruppe bei 0 μM VC. Der Median der DNA-Schädigung nach Exposition lag unabhängig von der VC-Konzentration zwischen 3,5 und 5% Comets/200 Zellen (Median{25/75% Perzentilen} $M_{0\mu\text{MVC}} = 4,0\{2,5/5,5\}$, $M_{50\mu\text{MVC}} = 4,0\{3,5/6,5\}$, $M_{100\mu\text{MVC}} = 3,5\{2,0/7,5\}$, $M_{200\mu\text{MVC}} = 5,0\{3,0/7,0\}$, $M_{400\mu\text{MVC}} = 3,5\{1,125/6,125\}$ % Comets/200 Zellen).

2. DNA-Schädigung in VC-gesättigten PBMCs mit/ohne VC-Einfluss während der oxidativen Belastung

In Abbildung 4-7 ist die DNA-Schädigung dargestellt, die jeweils nach Exposition gegenüber hyperbarem Sauerstoff mit (rot, $n = 34$) bzw. ohne (lila, $n = 24$) VC im Probenmedium jeweils nach Vorinkubation mit VC (3 h) induziert wurde (TI und weitere Graphiken unter Kapitel A-4 und A - 5.6).

Abbildung 4-7 DNA-Schädigung durch hyperbare Oxigenierung in Abhängigkeit von der VC-Konzentration im Probenmedium während der Sauerstoffbelastung bzw. nach alleiniger Vorinkubation mit VC



Sauerstoffbelastung ex vivo 500 kPa, dargestellt sind jeweils der Median sowie die 25/75% und 5/95% Perzentilen jeweils pro 200 ausgewertete Zellen. Signifikanzanalysen (Sterne) wurden zwischen den jeweiligen Paarungen mit gleicher VC-Konzentration vorgenommen; links: visuelles Scoring, $p_{400\mu\text{MVC}} = 0,0003$, $n = 34$ rechts: softwaregestützte Tailmoment-Auswertung $p_{200\mu\text{MVC}} = 0,0210$, $n = 24$

Wie auch schon in den Vorversuchen zu beobachten war, wurde auch in dieser Untersuchung bis 200 μM VC grundsätzlich weniger DNA-Schädigung induziert, wenn das VC während der Untersuchung im Probenmedium belassen wurde. Dieser Unterschied war in dieser Untersuchung für die softwaregestützte Auswertung signifikant (TM-Auswertung: $p_{200\mu\text{MVC"mit"/"ohne}} = 0,0210$, TI-Auswertung: $p_{50\mu\text{MVC"mit"/"ohne}} = 0,0007$, $p_{100\mu\text{MVC"mit"/"ohne}} = 0,0054$, $p_{200\mu\text{MVC"mit"/"ohne}} < 0,0001$). Im Gegensatz dazu zeigt sich bei 400 μM "mit" VC im Probenmedium während der O_2 -Belastung eine höhere DNA-Schädigung als nach Auswaschen des VC vor der Sauerstoffexposition. Dieses Ergebnis wird sowohl in der visuellen, als auch in der softwaregestützten (TM/TI) Auswertung deutlich. Signifikanz besteht bei der visuellen Auswertung ($p = 0,0003$).

5 Diskussion

Die vorliegende Studie befasste sich mit der schädigenden Wirkung von oxidativem Stress auf die Integrität der DNA isolierter peripherer mononukleärer Zellen (PBMC), die beim Tauchen mit Sauerstoff-Kreislauftauchergeräten und bei der Exposition von Probanden im Humanmodell oder PBMCs im *ex vivo* Experiment gegenüber hyperbarem Sauerstoff auftritt. Zur Visualisierung und Quantifizierung der DNA-Schädigung wurde der alkalische Comet Assay verwendet.

Zunächst wurde die durch maximale Belastung mit hyperbarem Sauerstoff *in vivo* induzierte DNA-Schädigung quantifiziert, um die potentielle Gefährdung, die von oxidativem Stress durch Sauerstoffüberdruck ausgeht, zu bestimmen. Hieran anschließend wurden zwei Hypothesen untersucht, die zur Reduktion von DNA-Schäden bei wiederholter Exposition gegenüber hyperbarer Hyperoxie beitragen könnten: Zum Einen wurde an Hyperoxie-gewöhnten Probanden (Tauchern) überprüft, ob bei ihnen eine eigenständige Adaptationsfähigkeit des Körpers an Hyperoxie zur Verminderung von DNA-Schädigung beiträgt. Zum Anderen wurde in einem *ex vivo* Ansatz untersucht, ob das Xenobiotikum Vitamin C unter den Bedingungen einer extremen Hyperoxie als ROS-Scavenger problemlos einsetzbar ist und somit eventuell auch bei Hyperoxie-Exponierten zur Minderung von DNA-Schädigung beitragen kann. Ein spezieller Fokus lag hier auf der Frage, ob unter diesen extremen Bedingungen konzentrationsabhängig auch prooxidative Effekte des Vitamin C kritisch berücksichtigt werden müssen, die dann in paradoxer Weise nicht nur die erwünschten Scavenger-Eigenschaften vermissen lassen, sondern sogar zur Zunahme von DNA-Schäden führen können.

5.1 Das Studienmodell

5.1.1 Probanden

Die Messung von DNA-Schäden am Probanden wird sowohl durch individuelle Größen als auch durch zahlreiche externe Faktoren beeinflusst. Neben dem Probandenalter [2][64][65][128][176][177] spielen Faktoren wie die Ernährung (z. B. Aufnahme von Antioxidantien) [83][161] oder die Art und Intensität sportlicher Belastung^{ee} [15][119][178][179] eine wichtige Rolle. Weiterhin beeinflussen Vorerkrankungen der Probanden [52][180][147][181] oder das Rauchen [153][180][182] und die sonstigen Umgebungs- und Lebensbedingungen die Reaktion des Organismus gegenüber oxidativer Belastung erheblich. Um möglichst nur die Reaktion des Organismus des Probanden auf den oxidativen Stress zu betrachten zu können, müssen sowohl die intraindividuellen Größen (z. B. Alter, Vorerkrankungen) als auch externe Einflussgrößen (z. B. Ernährung, körperliche Belastung) so gering wie möglich gehalten werden. Dieses kann durch eine umfassende Homogenität des Probandenkollektivs erreicht werden. Für diese Studie wurden aus diesem Grund ausschließlich männliche junge (20-30 Jahre) nicht rauchende Probanden zugelassen. Weiterhin konnten gesundheitsbedingte Störgrößen durch eine umfassende berufsbedingte medizinische Vorsorgeuntersuchungen ausgeschlossen werden (TUKV).

^{ee} Bei sportlicher Belastung wird in der Atmungskette vermehrt ATP produziert, sodass bei "physiologischen" Elektronenleckströmen von 1-2% (siehe 1.1) quantitativ eine höhere Belastung durch ROS besteht.

Die Probanden der Probandenkollektive A und B (siehe Kapitel 3.1) befanden sich zusätzlich in derselben Lebenssituation (vor Beginn der Ausbildung bzw. am Ende der Ausbildung), sodass Unterschiede externer Störgrößen minimiert werden konnten. Bei Probandengruppe B handelte es sich zudem um eine Gruppe von Probanden, die denselben Tagesablauf (z. B. Wach-/Schlafphasen), dieselbe sportliche Belastung (Sport, Tauchgänge) und die gleiche Ernährung (gemeinsames Essen in der Kantine) hatten, sodass hier externe Einflussgrößen (Ernährung, sportliche Belastung, Tageszeitpunkt der Blutabnahme usw.) noch weiter eingeschränkt werden konnten.

5.1.2 Probenmaterial

Für die Experimente wurde die Zellpopulation der peripheren mononukleären Zellen (PBMCs), also vornehmlich Monozyten und Lymphozyten, aus dem Blut der genannten Probanden verwendet. Diese Zellpopulation wurde ausgewählt, da sie durch vielfache Verwendung in ähnlichen Humanstudien für Versuche mit oxidativem Stress etabliert wurde [96][158][50][109][118][183]. Bereits in der Literatur vorhandene Daten ermöglichten daher eine vergleichende Validierung der eigenen Ergebnisse. Der Einsatz von PBMCs für die zu untersuchenden Fragestellungen wurde unter Abwägung verschiedener Überlegungen entschieden: Beispielsweise haben PBMCs zahlreiche Vorteile gegenüber gleichfalls häufig in ähnlichen Fragestellungen verwendeten unphysiologischen Versuchszellen (z. B. Tumorzellen) oder nicht humanen Zellen [168][184]. Entscheidend für diese Studie war zunächst einmal die Annahme, dass PBMCs nach Entnahme ausreichend lange vital bleiben und sich unter applizierten Reizen (z. B. Vitamin C, hyperbarer Sauerstoff) *ex vivo* genauso oder sehr ähnlich verhalten, wie *in vivo*. Demgegenüber agieren Tumorzellen *in vivo* (in Tumorpatienten) nicht wie physiologische Zellen oder können, im Gegensatz zu physiologischen Zellen, *ex vivo* gehalten werden, was nahe legt, dass sie unter Experimentalbedingungen nicht wie physiologische Zellen reagieren [184]. Weitere entscheidende Punkte gegen die Verwendung von Tumorzellen in der vorliegenden Studie waren u.a. die deutlich höhere DNA-Reparaturkapazität von z. B. HeLa-Zellen gegenüber Lymphozyten [99][100] sowie die unterschiedliche Reaktion verschiedener Tumorzelllinien im Zusammenhang mit VC. Viele Tumorzelllinien nehmen unangeregelt viel VC auf [185], wohingegen die VC-Aufnahme in z. B. Lymphozyten einer Sättigungskinetik unterworfen ist [173][186][187]. Möglicherweise ist dies ein Grund, weshalb VC in der Lage ist, Tumorzellen zu schädigen oder sogar abzutöten [184][188][189]. Für physiologische Zellen ist VC hingegen nicht schädlich [189], was Putschala et al. [190] in ihrem aktuellen umfassenden Review von 13 *ex vivo* und 4 *in vivo* Studien bestätigen. Auch auf Grundlage dieser Überlegungen verwendeten z. B. Al-Shmgani et al. physiologische animalische (bovine) an Stelle von pathologischen humanen Zellen für ihre Untersuchungen mit Vitamin C und E im Hyperoxiemodell [105]. Bei der Verwendung animalischer Zellen ist wiederum zu berücksichtigen, dass sich die physiologischen Stoffwechseleigenschaften der Versuchstiere deutlich von denen des Menschen unterscheiden. Kleinsäuger, z. B. Ratten, haben einen deutlich höheren metabolischen Umsatz [191] und unterliegen somit einer höheren basalen oxidativen Belastung, vergleichbar mit der erhöhten oxidativen Belastung, die unter hoher sportlicher Aktivität im menschlichen Organismus auftritt (siehe Kapitel 5.2.2).

Ein weiterer Vorteil von PBMCs als Versuchszellen in der vorliegenden Studie ist, dass sie den Zustand des Gesamtorganismus aufgrund der Passage durch alle Bereiche des Organismus vergleichsweise genau abbilden können [192]. Dies ist wichtig für die in dieser Arbeit verwendete Methode der hyperbaren Oxygenierung *in vivo*, denn bei Belastung mit hyperbarem Sauerstoff (siehe Kapitel 2.1) ist nicht davon auszugehen, dass alle Bereiche des Körpers gleichmäßig belastet sind. Vielmehr sind die Zellen der Lunge zuerst und am intensivsten betroffen, periphere Bereiche jedoch später und schwächer [192]. Zudem ist die Gewinnung von PBMCs über Venenpunktion und Aufbereitung durch Dichtegradientenzentrifugation relativ schnell möglich und PBMCs sind stabil gegenüber gekühlten Transportphasen, sodass mögliche Änderungen des physiologischen Verhaltens aufgrund langer *ex vivo* Zeiten gering gehalten werden können [193]. Weiterhin sind PBMCs einheitliche diploide Zellen, die sich nahezu alle in derselben Zellzyklusphase G0 (Ruhephase) befinden [61]. In dieser Ruhephase sind sie gegenüber Umwelteinflüssen viel unempfindlicher als in der Mitosephase, wie es bei teilungsaktiven Zellen (z. B. Tumorzellen) der Fall ist [194]. Insbesondere für Untersuchungen mit Vitamin C sind PBMCs gut geeignet, da sie im Vergleich zu anderen Zellpopulationen die höchste intrazelluläre VC-Konzentration aufweisen (intrazelluläre VC-Konzentration in Lymphozyten bis zu 4mM; in Monozyten bis zu 3mM) [186][195], was auf eine besondere Bedeutung des Vitamin C im Stoffwechsel dieser Zellen schließen lässt und eine hohe Reaktionsfähigkeit im Zusammenhang mit VC nahe legt.

5.1.3 Methodik

Oxidativer Stress durch hyperbare Oxygenierung mit/ohne VC-Einfluss

Hyperbare Oxygenierung

Für die Induktion von oxidativem Stress zur Untersuchung der Wirkung von ROS auf die DNA wurde in der vorliegenden Studie das Modell der hyperbaren Oxygenierung verwendet. Diese Methode hat gegenüber anderen Verfahren zur Induktion oxidativen Stresses einige Vorteile, obgleich in allen Fällen die biochemischen Reaktionen des Wasserstoffperoxids zur DNA-Schädigung führen (vgl. Kapitel 1.2.). Bei der direkten Applikation von H₂O₂ lässt sich die Intensität der DNA-Schädigung schlechter steuern und es kann zu Zellmembranschäden kommen, die bei indirekter Induktion von H₂O₂ durch hyperbare Oxygenierung unwahrscheinlich sind. Neben der hyperbaren Oxygenierung gibt es verschiedene andere Möglichkeiten der indirekten Induktion von Wasserstoffperoxid. Vielfach wird radioaktive Strahlung, z. B. Gamma-Strahlung [196][197][198] appliziert oder es werden Endotoxine oder Chemikalien [98][145] verwendet. Allerdings kann es im Fall von Gamma-Strahlung auch zur direkten ungerichteten Schädigung von Molekülen (z. B. DNA) kommen [199], sodass der jeweilige Schädigungsmechanismus unklar ist. Zudem ist zu berücksichtigen, dass die genannten Möglichkeiten stärker in die physiologische Stoffwechsellage eingreifen, als der "sanftere" Weg über hyperbaren Sauerstoff. Denn hierbei wird ein biochemischer Mechanismus genutzt, der auch unter physiologischen Bedingungen, zwar selten, aber kontinuierlich (in etwa 1-2% des umgesetzten Sauerstoffs) abläuft (vgl. Kapitel 1.2, 3.2).

Ein weiterer Vorteil der Induktion von DNA-Schädigung durch Sauerstoffüberdruckbelastung ist die Möglichkeit der Anwendung *ex vivo* sowie *in vivo*, was durch andere schädigende Agenzien aus ethischen Gründen lediglich retrospektiv (z. B. durch Umweltstrahlung) oder gar nicht (z. B. Applikation von H₂O₂, Chemikalien, Endotoxinen) im

Humanmodell möglich ist. Ein Vergleich von *in vivo* und *ex vivo* Daten aus grundlegend gleichen Versuchsaufbauten (hier vor allem das schädigende Agens) ist jedoch für die klinische Beurteilung und Relevanz notwendig. Denn Zellen reagieren erwiesenermaßen auf unterschiedliche schädigende Agenzien verschieden, wie z. B. Birnboim et al. [62] postulierten, die unterschiedliche DNA-Schädigungsmuster in und eine unterschiedliche Reparaturfähigkeit von Leukozyten nach einer Schädigungsinduktion mittels H₂O₂-Applikation und durch ionisierende Strahlung fanden.

Ex vivo Experimente

Ein erheblicher Teil der Ergebnisse der vorliegenden Studie wurde anhand von *ex vivo* Experimenten erhoben, wobei die isolierten PBMCs höheren Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt wurden, als physiologisch unbedenklich ist (pO₂ oberhalb der Schwelle der zentralnervösen Toxizität [200]). Die daraus resultierenden höheren DNA-Schäden führen allerdings zu einer besseren Diskriminierbarkeit der Daten (vgl. Kapitel A - 1.3), sodass z. B. die protektive Adaptation und deren Dauer genauer beurteilt werden und auch bei den VC-Experimenten besser diskriminierbare Daten erreicht werden konnten. Dieses Vorgehen wurde nach der Beurteilung anderer *in vivo* VC-Studien vor dem Hintergrund gewählt, das häufig nur bei oxidativ belasteten oder VC-depletierten Probanden wie Rauchern oder Dialysepatienten ein signifikanter antioxidativer Effekt nach VC-Applikation messbar war (z. B. anhand einer verminderten basalen DNA-Schädigung oder vermindelter VC-Konzentration im Serum) [52][54][141][147][154][201]. Als ursächlich hierfür wird postuliert, dass der Organismus unter physiologischen Bedingungen und normaler Ernährung ausreichend VC zur Verfügung hat, sodass überschüssiges VC nicht aufgenommen wird bzw. wirkungslos bleibt. Anhand der Ergebnisse (vgl. Kapitel 4.3) wird deutlich, dass VC bei höherer Schädigungsdosis tatsächlich einen größeren Effekt hat.

Nachweis der Zell- und DNA-Schädigung

Zellvitalität und Ausschluss anormal geschädigter Zellen

In der vorliegenden Studie wurde die präparierte Zellsuspension vor und nach dem Experiment auf Zellanzahl und Zellvitalität (Bestimmung mittels Trypanblau) untersucht, um nur die Daten von Proben auszuwerten, die einer festgelegten Anzahl von physiologisch funktionsfähigen Zellen entsprachen. Präexperimentell wurden Proben mit einer Zellvitalität von unter 97%, postexperimentell von unter 96% (siehe Kapitel 3.4) von der Auswertung ausgeschlossen, da eine Exposition gegenüber hyperbarem Sauerstoff unter normalen Umständen nicht zur Veränderung der Zellintegrität führen sollte. Damit liegt die in dieser Studie vorausgesetzte minimale Zellvitalität deutlich über einer minimalen Zellvitalität von 75%, die von Henderson et al. [202] als ausreichend für die Ergebnisvalidität im Comet Assay beschrieben wurde.

Bestimmung der DNA-Schädigung

Oxidativer Stress induziert in der Zelle oxidative Schädigung an verschiedenen Zellbestandteilen, beispielsweise an Membranlipiden oder DNA (vgl. Kapitel 1.1). Weiterhin können ROS auch eine Erhöhung inflammatorischer Zytokine und eine Aktivierung von Apoptosemechanismen induzieren [105][111][203][204][205]. Die hyperbare Oxygenierung bietet hierbei die Möglichkeit der Anwendung für *in vivo* und *ex vivo* Experimente. Im Gegensatz dazu ist beispielsweise die Bestimmung von durch oxidativen Stress induzierten Zytokinen [206] problematisch,

denn es ist anzunehmen, dass die komplexen Reaktionswege der Zytokininduktion durch die *ex vivo* veränderte inter- und intrazelluläre Kommunikation beeinflusst werden. Die DNA-Schädigung hingegen ist in dem hier verwendeten Modell weitgehend unabhängig von diesen Signalwegen (vgl. Kapitel 5.2.3). Die Bestimmung der DNA-Schädigung ist weiterhin von Vorteil gegenüber der Bestimmung der manifesten Apoptose, da letztere erst nach einigen Stunden messbar ist [93][205], sodass die begrenzte Lebensdauer der PBMCs [207] die Ergebnisse beeinflussen kann. Eine weitere Möglichkeit der Quantifizierung von oxidativer Schädigung ist die Messung von Apoptoseparametern. Dies ist vorteilhaft gegenüber der Bestimmung der manifesten Apoptose, da eine frühere Bestimmung möglich ist, sodass die begrenzte Lebensdauer der PBMCs bei dieser Methode nicht so relevant ist. Von Nachteil ist jedoch, dass auch die Apoptose über inter- und/oder intrazelluläre Signalwege eingeleitet wird, was eine vergleichende *in vivo/ex vivo* Betrachtung, ähnlich wie bei der Bestimmung von durch oxidativen Stress induzierten Zytokinen, erschwert. Ein weiterer Vorteil der Bestimmung der DNA-Schädigung als Messparameter für oxidativen Stress ist, dass auch noch reparable Schäden messbar sind.

Der alkalische Comet Assay

Die Methode des Comet Assays ist ein wichtiges Werkzeug zum humanen Biomonitoring und hat sich als Nachweis oxidativer DNA-Schäden etabliert [96][103][109][118][119][120][121][122][123][124] (vgl. Kapitel 1.3). Dabei handelt es sich um eine sensitive indirekte Methode zur quantitativen Detektion von DNA-Strangbrüchen in eukaryotischen Zellen [208][120], die sich unter anderem aufgrund ihrer guten Reproduzierbarkeit gegenüber anderen Assays zur Messung von DNA-Strangbrüchen (z. B. alkalische DNA-Fällung, Pulsfeldgelelektrophorese) auszeichnet. Zudem bietet sie aufgrund der vielfachen Nutzung die Möglichkeit des Datenvergleichs mit anderen Arbeitsgruppen [183]. Daneben existieren auch direkte Methoden des Nachweises oxidativer DNA-Schädigung, mit denen direkt Metabolite des oxidativen Stresses, z. B. 8-oxo-2'-Deoxyguanosin [101][102] oder 8-Hydroxyguanin [209][210] in Blut oder Urin bestimmt werden können. Dazu zählen Gaschromatographie, Massenspektrometrie (MS) und High-Performance-Liquid Chromatographie (HPLC) [210][211][212][213]. Der Vorteil am Comet Assay ist, dass aufgrund der Auswertung auf Einzelzellebene Heterogenitäten innerhalb von Zellpopulationen berücksichtigt werden können, die sich z. B. bei Messung an gepoolter DNA (z. B. bei alkalischer DNA-Fällung, PFGE-Assay) verlieren würden [183][214]. Durch die Messung von DNA-Schädigung direkt in den Zielzellen ist es weiterhin möglich, Einflussfaktoren zu begrenzen. Demgegenüber gibt es bei Messungen von Metaboliten im Blut und Urin zahlreiche Einflussmöglichkeiten, die die Zusammensetzung des Untersuchungsmediums und damit die Zielmoleküle und Messgrößen beeinflussen können. Deshalb haben direkte Messverfahren (z. B. Massenspektrometrie, HPLC) trotz der mitunter enormen Sensitivität eine im Vergleich zum Comet Assay sehr geringe Spezifität und damit die relativ hohe Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse. Diese geringe Spezifität kann ursächlich für die fehlende Aussagekraft von Studienergebnissen sein. Beispielsweise konnte in zwei sehr ähnlichen Untersuchungen an denselben Versuchstieren (Meerschweinchen) kein signifikanter Unterschied im Auftreten von 8-oxo-7,8-dihydro-2'-DeoxyGuanosin zwischen VC-substituierten und nicht substituierten Tieren gefunden werden [215]. Mit der Methode des Comet Assays konnte jedoch nach UV-Licht-Provokation ein Rückgang der DNA-Schädigung unter VC-Substitution nachgewiesen werden [216]. In diesem Zusammenhang gehen Olive und Banáth [217] sogar davon aus, dass es sich beim Comet Assay um die

sensitivste und akkuratete Methode zur Bestimmung oxidativer DNA-Schädigung handelt. Ein Nachteil des Comet Assay ist es, dass das lediglich eine "Momentaufnahme" der DNA-Schädigung in der Zelle beurteilt werden kann. Es kann also keine Aussage zu Schädigungs- oder Reparaturmechanismen getroffen werden, wie es durch Messung von Regulationsenzymen des oxidativen Stresses (wie z. B. Hämoxigenase-1) der Fall ist [49][109][50][218][219][220]. Untersuchungen im Verlauf können jedoch Aufschluss über Auswirkungen von Regulations- und Reparaturmechanismen geben (vgl. Kapitel 4.2).

Es gibt verschiedene Formen und Auswertungsmethoden des Comet Assays. In der vorliegenden Arbeit wurde die alkalische Form des Comet Assays verwendet^{ff}. Der Vorteil der alkalischen Methode ist, dass nicht nur DNA-Strangbrüche detektiert werden können, sondern auch "alkali-labile sites" (vor allem apurinische und apyrimidinische ("AP-sites") Stellen), die beim Verlust einer Purin- bzw. Pyrimidinbase entstehen [123]. Das Zuckergerüst bleibt dabei erhalten, doch der hohe pH führt zum Bruch an diesen "AP-sites" [61][120] wodurch ein ausgeprägterer "CometTail" entsteht, als bei der neutralen Methode. Dadurch erweitert sich auch der Bereich der möglichen Detektion von DNA-Schädigung [221]. Ein weiterer Vorteil des alkalischen Milieus ist, dass sich die Doppelstränge voneinander lösen, wodurch nicht nur Doppel- (Double-strand breaks "DS"), sondern auch Einzelstrangbrüche (Single-strand breaks "SS") während der Elektrophorese aufgetrennt werden können^{gg}.

Visuelle bzw. softwaregestützte Auswertung

Zur Auswertung des Comet Assays stehen visuelle Scoringverfahren und softwaregestützte Auswertungsmöglichkeiten zur Verfügung (siehe Kapitel 1.3). Bei der softwaregestützten Auswertung werden verschiedene Parameter des DNA-Bildes von einer Software errechnet, von denen in der Regel Tailmoment (TM) oder %Tail Intensity (TI) zur Bewertung der Ergebnisse herangezogen wird (vgl. Kapitel 1.3 und 3.4.4). Vielfach wird zusätzlich oder ausschließlich ein visuelles Scoring- oder Graduierungs-Verfahren verwendet, da sich bei der softwaregestützten Auswertung der Objektträger einige Schwierigkeiten ergeben [158][222]: Vor allem können Artefakte im Agarose-Gel oder unterschiedliche Intensitäten der Fluoreszenzemission der DNA die Höhe der Schädigungsparameter (TM/TI) beeinflussen. Unterschiedliche Intensitäten der Fluoreszenzemission können dabei nicht nur in der Höhe des Agarose-Gels oder der Lage der Zelle im Agarose-Gel bzw. der Zusammensetzung des Agarose-Gels begründet sein. Vielmehr können auch die Brenndauer und das Alter der Quecksilberdampfampe, die Dauer der Bestrahlung der eingefärbten DNA sowie das Alter und die Zusammensetzung des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid die Auswertung durch die Comet Assay-Software beeinflussen. Aufgrund dieser Tatsachen produziert dasselbe Zellbild ein unterschiedliches TI/TM-Ergebnis, wenn es am Anfang oder am Ende der Auszählung von 200 Zellen erfasst wird, was die Aussagekraft und Diskriminierbarkeit der Daten einschränkt [16]. Die visuellen Scoringverfahren haben demnach in der Regel eine höhere Aussagekraft, denn jedes DNA-Bild kann vom Untersucher einzeln beurteilt werden. Somit kann die Beurteilung der DNA-Bilder im Kontext des jeweiligen Objektträgers erfolgen. Es können also z. B. auch Objektträger, auf denen viele Artefakte vorhanden sind, ausgewertet werden. Weiterhin können Unterschiede, die die Signalintensität beeinflussen, wie

^{ff} Ostling und Johanson [94] entwickelten 1984 die Methode des neutralen Comet Assays. Diese wurde 1988 von Singh et al. [124] zum alkalischen Comet Assay weiterentwickelt.

^{gg} Auf die Verwendung von Endonukleasen wurde verzichtet (siehe Kapitel A - 5.2).

die Höhe des Agarose-Gels oder die Lage der Zellen im Agarose-Gel, von einem geübten Untersucher ausgeglichen werden. In der Folge wurde aufgrund der höheren Aussagekraft visueller Methoden in den Versuchen zur Erarbeitung einer Methode für die Evaluation antioxidativer Substanzen (siehe Kapitel 4.3) von der softwaregestützten Auswertung abgesehen. Nur die Hauptergebnisse der Studie wurden zusätzlich mit dem softwaregestützten Verfahren ausgewertet (siehe Kapitel A-4), wobei auch in den Untersuchungen dieser Arbeit schlechter diskriminierbare Ergebnisse im Vergleich zur visuellen Scoring-Methode entstanden.

Visuelle Scoring- und Graduierungs-Verfahren

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde die Verwendung unterschiedlicher visueller Scoring-Systeme abgewägt, die in der aktuellen Literatur verwendet werden. Einige Autoren postulieren, dass bei der visuellen Analyse apoptotische Zellen identifiziert werden können und eine Unterscheidung zwischen apoptotischem und nekrotischem Zelltod möglich ist [223][205]. Andere Autoren postulieren jedoch, dass die DNA-Fragmente, die bei Apoptose entstehen, aufgrund ihrer geringen Größe mit dem Comet Assay nicht sicher nachgewiesen werden [61]. Zudem ist Apoptose im Comet Assay, wie oben beschrieben, erst nach Stunden messbar, sodass diese Methode für die Messung von PBMCs in diesem Studienmodell ungeeignet ist. Eine weitere Methode zur visuellen Beurteilung der Art bzw. Intensität der DNA-Schädigung ist die Graduierung der Fluoreszenzemission der DNA-Bruchstücke im "Comet Tail" und Einteilung der Zellbilder in Gruppen^{hh} [100][158][61][201]. Für diese Studie wurde jedoch das binäre visuelle Ja/Nein-Auswertungsverfahren gewählt (siehe Kapitel 1.3). Bei diesem Verfahren können mögliche Einflussfaktoren (Agarose-Eigenschaften, Lage der Zelle, Brenndauer der Lampe usw.) eingeschränkt und so die Auswertung objektiviert werden. Ein weiteres Problem der Graduierung der DNA-Schädigung ist, dass die im Fluoreszenzfeld sichtbaren DNA-Strangbrüche keine Differenzierung zwischen direkter DNA-Schädigung und Intermediärprodukten des regulären Zellreparaturprozesses zulassen [224]. Ein Comet-Tail ist also nicht eindeutig allein der oxidativen Schädigung zuzuordnen, sondern kann durch Zellreparaturprozesse noch verstärkt und somit fälschlicher Weise als höhere DNA-Schädigung kategorisiert werden. In jedem Fall würde jedoch die Zuordnung der Ja-Aussage den Zellzustand korrekt beschreiben. Zudem ist die Zuordnung, ob eine Zelle geschädigt ist, oder nicht, einfacher und damit reproduzierbarer, als eine Graduierung vorzunehmen. Folglich ist bei der Ja/Nein-Auswertemethode die inter- und intraindividuelle Untersuchervarianz geringer, sodass ein Vergleich von eigenen Ergebnissen und denen unterschiedlicher Arbeitsgruppen leichter möglich istⁱⁱ.

Optimierung der Methode Comet Assay

Von jedem Objektträger wurden die DNA-Bilddarstellungen von Zellen unterschiedlicher Stellen der Objektträger ausgewertet, um den Einfluss von Unregelmäßigkeiten im Gel oder der Wirkung von Chemikalien zu minimieren. Die Auswertung einer großen Anzahl von DNA-Bildern beschrieben u. a. Forchhammer et al. [222] als wichtig, da die Auswertung der DNA-Schädigung von 200 DNA-Bildern pro Objektträger bei mehrfacher Auswertung

^{hh} Zumeist werden den Zellbildern dabei in Abhängigkeit der Gruppe Multiplikationsfaktoren zugeordnet (z.B. 0 für Zellen ohne DNA-Schädigung und 1 bis 4, abhängig von der Länge und Intensität des "Comet Tails", also dem Grad der sichtbaren DNA-Schädigung)

ⁱⁱ In diesem Sinne haben sich die Ergebnisse gleicher Untersuchungsaufbauten aus unterschiedlichen Studien, die durch drei unterschiedliche Personen ausgewertet wurden, als nahezu identisch herausgestellt (siehe Kapitel 5.2.2).

desselben Objektträgers mit einer geringeren Varianz behaftet ist, als die einer kleineren Anzahl von DNA-Bildern [16][158][222]. Vor allem für das visuelle Scoring ist es wichtig, dass die Auswertung durch eine geübte Person durchgeführt wird, sowie, dass möglichst alle einem Datenpool zugrunde liegenden Comet-Daten (zum Ausschluss möglicher interindividueller Abweichungen) durch denselben Auswerter erhoben werden [16][222] (beides wurde in der vorliegenden Studie beachtet).

5.2 Die Ergebnisse

5.2.1 Quantifizierung des Einflusses von hyperbarem Sauerstoff auf Probanden

Die Untersuchung und Quantifizierung von oxidativem Stress im Humanexperiment stellt eine messtechnische Herausforderung dar, da dem oxidativen Stress biochemisch eine multifaktorielle Schädigungs-, Reparatur- oder auch Anpassungskaskade folgt, die schwer zu differenzieren ist. Es sollte deshalb in diesem Teil der Studie anhand streng standardisierter Größen die mögliche DNA- und Zellschädigung in PBMCs durch hyperbaren Sauerstoff quantifiziert werden. Hierzu wurden die PBMCs aus Blutproben von Probanden vor und nach einer oxidativen Belastung im Rahmen eines Sauerstofftoleranztests, bei dem standardmäßig sehr hohe Dosen O₂ (100% O₂, 280 kPa, 30 min) appliziert werden, mittels Comet Assay auf DNA-Schäden untersucht. Die Ergebnisse (siehe Kapitel 4.1) zeigen deutlich, dass hyperbarer Sauerstoff *in vivo* DNA-Schädigung induzieren kann, wie es auch schon von anderen Autoren [106][107][108][225][200] beschrieben wurde. Auch die aktuellen Untersuchungen von Üstündag et al. [226], der für den Nachweis von DNA-Schäden den Zytokinese-Block-Mikronukleus-Assay an Lymphozyten von 100 Probanden vor und nach einer HBO-Behandlung durchführte, untermauern diese Ergebnisse.

In der vorliegenden Studie konnten, trotz der deutlich geringeren Probandenzahl ($n = 14$), sogar ausgeprägter signifikante Unterschiede zwischen den Untersuchungen vor und nach der nach Sauerstoffbelastung gefunden werden, als in den oben genannten Studien. Dies könnte zum einen an der für die Untersuchung von oxidativer DNA-Schädigung sehr sensiblen Methode des Comet Assay [68][16][106][120] liegen, die in der vorliegenden Studie verwendet wurde (vgl. Kapitel 5.1.3). Die hohe Signifikanz der Werte kann zum anderen auch in der Homogenität der Probandengruppe (vgl. Kapitel 5.1.1) begründet sein, die aus jungen gesunden nicht rauchenden männlichen Probanden mit einer sehr ähnlichen Lebenssituation bestand. Demgegenüber wurden die Untersuchungen von Üstündag et al. an PBMCs von rauchenden und nicht rauchenden Probanden inhomogener Altersstruktur und multipler Vorerkrankungen vorgenommen. Letztlich ist auch zu berücksichtigen, dass in dem in dieser Studie verwendeten Sauerstoffbelastungsprotokoll die Probanden mit 30 Minuten zwar einer insgesamt kürzeren O₂-Belastungsphase, jedoch einem deutlich höheren pO₂ von 280 kPa ausgesetzt wurden, als es in der genannten Studie oder der im allgemeinen angewandten Sauerstoffexposition bei HBO-Therapie (100% O₂, 2,5 ATA (≈ 245 kPa), 3x20 min [51][226]) der Fall ist.

5.2.2 Untersuchung der Adaptation an die Exposition gegenüber hyperbarem Sauerstoff

Wie bereits im Kapitel 1.1.1 erwähnt, ist der menschliche Organismus in der Lage, auf oxidativen Stress im Sinne von „Adaptationsreaktionen“ zu reagieren, wobei sich die Literaturlage auf sehr wenige Publikationen hierzu beschränkt. Es wurde deshalb untersucht, in wieweit diese Anpassungsreaktionen zu einer messbaren Verringerung von DNA-Schäden in PBMCs führen. Dabei wurde auch der Verlust dieses adaptiven Schutzes im zeitlichen Verlauf dargestellt. Als aussagekräftigster Indikator wurde hierbei die Vulnerabilität der PBMCs bei neuerlicher Exposition gegenüber oxidativem Stress untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Kapitel 4.2 beschrieben und zum Vergleich mit den Ergebnissen von Witte et al. [16], die ebenfalls die Adaptation gegenüber hyperbarer hyperoxischer Belastung mit der gleichen Methodik retrospektiv untersuchten, unter Kapitel 4.2.1 dargestellt. In dieser vergleichenden Darstellung wird die offensichtliche Adaptation an oxidativen Stress durch repetitive Hyperoxie besonders deutlich. Schon der im Diagramm auffällige sukzessive Anstieg der basalen DNA-Schädigung mit dem Abstand zur letzten *in vivo* O₂-Exposition deutet auf einen Adaptationsprozess hin. Wesentlich deutlicher wird das Vorhandensein und die Abnahme eines adaptiven Schutzes anhand der steigenden Vulnerabilität der PBMCs gegenüber zusätzlich *ex vivo* induziertem oxidativem Stress, welche sich durch den deutlichen Anstieg der DNA-Schädigung mit größerem Abstand zur letzten *in vivo* O₂-Exposition zeigt.

Dauer des adaptiven Schutzes

Im Verlauf der Abnahme des adaptiven Schutzes gegenüber *ex vivo* Sauerstoffbelastung fällt ein "Übergangsbereich" zwischen zweiter und vierter Woche nach letzter O₂-Exposition *in vivo* auf, in dem der adaptive Schutz offensichtlich besonders stark abnimmt, sodass die induzierte DNA-Schädigung sich dem Wert ohne vorherige *in vivo* O₂-Exposition^{jj} annähert (ergänzende Graphik unter Kapitel A - 5.6). Dazu passend postulierten Witte et al. in ihrem retrospektiven Ansatz ein Anhalten des adaptiven Schutzes für circa zwei bis drei Wochen.

Wie lange genau der adaptive Schutz vorhanden ist, lässt sich aus den gewonnenen Daten nicht eindeutig ableiten. Dass der Vergleichswert ("Kontrolle") aus der sekundären Kontrollgruppe PG C (vgl. Abbildung 4-5) etwas höher liegt als 5 Wochen nach letzter *in vivo* Sauerstoffexposition, könnte ein Hinweis darauf sein. Es kann auch die Tatsache entscheidend sein, dass es sich bei PG B im Gegensatz zu PG C um eine homogene Gruppe junger gesunder Probanden handelt (siehe Kapitel 5.1.1) oder, dass bei sonst identischem Versuchsaufbau unterschiedliche große Probenwells verwendet wurden (vgl. Kapitel A - 1.3).

Mögliche Ursachen der Adaptationseffekte

Aus der Interpretation der beschriebenen Daten ergibt sich, dass in PBMCs von Probanden, die repetitiv hohen Sauerstoffbelastungen ausgesetzt sind, Adaptationsprozesse stattfinden. Grundlegend für diese Adaptation könnte die von Ferrer et al. [49] beschriebene Anpassungsreaktion im Sinne einer Erhöhung des antioxidativen Status (siehe Kapitel 1.1) sein. Die Erhöhung des antioxidativen Status wurde von Ferrer et al. [49] anhand der Erhöhung der Gluthathionperoxidase- und Katalase-Aktivität und der Expression von Hämoxigenase-1 nach

^{jj} Dieser Wert liegt am ehesten zwischen dem "Kontrollwert" aus PG C und dem Wert in fünf wöchigem Abstand zur letzten *in vivo* O₂-Exposition (aus organisatorischen Gründen nicht bestimmt)

einem Tauchgang (40 m, 25 min) bzw. einer HBO-Behandlung abgeleitet. Auch die in Abbildung 4-5 dargestellte geringe basale DNA-Schädigung kurz nach letzter Sauerstoffexposition *in vivo* kann in einer erhöhten antioxidativen Kapazität begründet sein, die wahrscheinlich auf die Anwesenheit erhöhter Schutz- und/oder Reparaturmechanismen gegen oxidativen Stress zurückzuführen ist. Entgegen dieser Ergebnisse konnten von Gröger et al. [103] bei der Untersuchung Maritimer Fünfkampf-Athleten, UDT^{kk}-Tauchern, Kampfschwimmern und einer Kontrollgruppe keinen Unterschied der basalen DNA-Schädigung zwischen sauerstoffvorbelasteten und nicht-sauerstoffvorlasten Probanden nachweisen. Ursächlich hierfür ist am ehesten das Probandenkollektiv: Für die Untersuchungen der vorliegenden Studie wurden PBMCs eines ausgesprochen homogenen Probandenkollektivs (vgl. Kapitel 5.1.1) verwendet, die zu diesem Zeitpunkt alle einer identischen Phase repetitiver identischer Sauerstoffbelastung ausgesetzt waren. Gröger et al. standen nur Probanden zur Verfügung, die im Rahmen ihrer beruflichen Tätigkeit unabhängig voneinander unterschiedlicher Sauerstoffbelastung ausgesetzt waren.

Aufbauend auf der Annahme, dass eine repetitive Sauerstoffexposition Adaptationseffekte hervorruft, haben auch andere Arbeitsgruppen Beobachtungen gemacht, die auf eine Verringerung der DNA-Schäden bei erneuter Sauerstoffüberdruckexposition hinweisen [50][51][109][121][225]. Beispielsweise konnten Dennog et al. [51][106] im Humanmodell zeigen, dass nach einer einmaligen Exposition mit hyperbarem Sauerstoff an den Folgetagen auch nach erneuter Sauerstoffüberdruckbelastung signifikant weniger bis keine DNA-Schäden in den Lymphozyten der Probanden nachzuweisen waren. Dass eine Art adaptiver Schutz durch HBO-Behandlung induziert wird, beschrieben auch Rothfuss et al. [108], die feststellten, dass Lymphozyten von Probanden nach HBO-Behandlung bei erneuter oxidativer Belastung sowohl *in vivo* (durch HBO) als auch *ex vivo* (durch H₂O₂) über einen Zeitraum von mindestens einer Woche weniger DNA-Schädigung ausbildeten, als Lymphozyten nicht vorbelasteter Probanden. Yu et al. [228] postulierten neben anderen Autoren, dass der adaptive Schutz durch "Sauerstofftraining" ("Preconditioning") mit hyperbarem Sauerstoff die oxidative Schädigung durch Ischämie-Reperfusionstraumata reduzieren kann [229][230][231][232]. Einige Autoren nehmen sogar an, dass allein die erhöhte Sauerstoffbelastung, die durch Atmung hyperbarer Pressluft entsteht, ausreicht, um einen Adaptationseffekt hervorzurufen [49][103]. Vergleichbare Adaptationseffekte wie die, die durch hyperbaren Sauerstoff entstehen, wurden bei Ausdauersportlern beschrieben, die vor allem oberhalb der aeroben Schwelle trainierten. Der oxidative Stress wurde hierbei mit der vermehrten ROS-Produktion aufgrund der hohen ATP-Produktion mit hohem Durchsatz an Sauerstoff begründet (vgl. Kapitel 1.1) [119][179][233][234][235]. Die für die Untersuchung der Adaptationsmechanismen rekrutierten Probanden der vorliegenden Studie unternahmen während ihrer Tauchgänge mit Sauerstoffkreislauftauchgeräten erschöpfende Flossenschwimmübungen und waren somit in zweifacher Hinsicht (aufgrund der hyperbaren Sauerstoffexposition und der körperlichen Belastung) erhöhtem oxidativen Stress ausgesetzt [103]. Diese zusätzliche Induktion oxidativen Stresses kann, neben der Homogenität des Probandenkollektivs (siehe Kapitel 5.1.1), ein weiterer Grund für das deutliche Ergebnis trotz geringer Probandenzahl sein.

^{kk} UDT- Underwater Demolition Team (siehe [227])

In Bezug auf die Ursache der beobachteten Adaptation an Sauerstoffexposition kommen Ferrer et al. [49] und verschiedene andere Autoren überein, dass die antioxidativen Schutzsysteme (siehe. Kapitel 1.1) als Reaktion auf das vermehrte Auftreten von ROS sowie die kurzfristige Reduktion der (nicht)enzymatischen antioxidativen Kapazität unter dem Einfluss von ROS induziert werden [49][149][236][237][238]. Hierbei steht die Induktion der Gluthathionperoxidasen [49][238][237], Katalasen [237][238] und Superoxiddismutasen [235][237][238][239][228][229] im Vordergrund, jedoch wird zusätzlich die Transkription spezialisierter Enzyme wie der Hämoxygenase-1 [49][50][109][218][121] in der Literatur erwähnt. Weiterhin kann eine vermehrte Anreicherung antioxidativer Vitamine (A, C, E) ursächlich für verminderte DNA-Schädigung sein. Als Summe der beschriebenen Reaktionen der verschiedenen Systeme resultiert demnach eine adaptive Erhöhung der antioxidativen Kapazität, die zu einer Verringerung der ROS- induzierten DNA-Schäden führt, sodass der Organismus gegenüber erneuter oxidativer Belastung durch erneute Sauerstoffüberdruckexposition [106] besser geschützt ist.

5.2.3 Untersuchung des Einflusses von Vitamin C auf PBMCs unter hyperbarer Oxigenierung

Vitamin C, eines der meist untersuchtesten Antioxidantien des menschlichen Organismus, ist in der Lage, die Mehrzahl der biologisch relevanten Radikale und Oxidantien wie beispielsweise das Hydroxyl-Radikal, das Superoxidanion-Radikal oder den Singulett-Sauerstoff zu reduzieren [95]. Um den Einfluss von VC als Schutz vor DNA-Schäden durch hyperbare Oxigenierung in Lymphozyten zu untersuchen, musste zunächst eine geeignete Methode entwickelt und validiert werden. Die entsprechenden Versuchsaufbauten und -ergebnisse sowie die Diskussion derselben befinden sich im Anhang (siehe Kapitel A-1). An dieser Stelle sollen lediglich die Experimentalergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss von VC auf PBMCs unter hyperbarer Oxigenierung diskutiert werden.

Wirkkonzentrationen des Vitamin Cs

Um ein umfassendes Verständnis von der Wirksamkeit von VC zu erlangen, wurden verschiedene Wirkkonzentrationen gewählt. Diese orientierten sich an der durchschnittlichen Plasmakonzentration von VC im menschlichen Organismus, welche bei normaler Ernährung zwischen 41 und 114 μM [195] liegt. Die Validierungsversuche (siehe Kapitel A-1) hatten ergeben, dass VC am ehesten im Bereich von 100 μM DNA-Schäden reduzieren kann. Auch in der Literatur sind Hinweise auf eine entsprechende Wirkkonzentration zu finden. Beispielsweise schlussfolgerte Gey [154] in seinem Review von Studien zu radikal-assoziiertes kardiovaskulärer Schädigung und deren Prävention, dass eine Plasmakonzentration von $> 50 \mu\text{M}$ VC zur Ausprägung einer DNA-protaktiven Wirkung notwendig sei. Einen anderen Hinweis der antioxidativen Wirksamkeit von VC in dieser Plasmakonzentration lieferten Frei et al. [36], die zeigten, dass VC in einer Konzentration von 100 μM effektiv Lipidperoxidation vermindern kann. Um einen möglichen konzentrationsabhängigen Effekt von VC abzubilden, wurde die Wirkung von 50, 100 und 200 μM VC untersucht. 200 μM VC entspricht dabei dem oberen physiologischen Grenzbereich von VC (die maximale VC-Konzentration nach oraler Aufnahme ist 220 μM) [240][241][186]. Zusätzlich wurde mit 400 μM VC eine VC-Konzentration im suprphysiologischen Bereich gewählt. Für jede der untersuchten VC-Konzentrationen war in Studien anderer Autoren eine zell- und DNA-schädigende Wirkung auf physiologische Zellen ausgeschlossen worden. Beispielsweise inkubierten Chen et al. [184]

physiologische Lymphozyten und Monozyten mit VC-Konzentrationen bis zu 20 mM, ohne Veränderungen an den Zellen zu finden. In Tumorstudien wurden *in vivo* sogar höhere Konzentrationen erprobt und als unschädlich beschrieben: Riordan et al. [242] injizierten Patienten beispielsweise 30 g oder 100 g bis zu zweimal wöchentlich und Casciari et al. [243] maßen eine Peak-Plasmakonzentration von 20 mM VC nach i.v.-Applikation von 60 g VC, ohne nachteilige Effekte^l zu beobachten. Auch Putchala et al. [190] schlossen in ihrem Review aus 17 *in vivo* und *ex vivo* Studien, dass VC lediglich auf pathologische, nicht jedoch auf physiologische Zellen prooxidativ wirken kann. Eine schädigende Wirkung von VC auf PBMCs konnte folglich ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis konnte in den Validierungsversuchen bestätigt werden (siehe Kapitel A - 1.3).

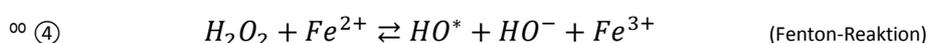
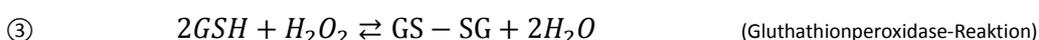
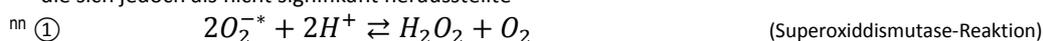
Paradoxe Wirkweise von Vitamin C

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Wirkung von VC in Kombination mit hyperbarem Sauerstoff zeigten konzentrationsabhängig starke Unterschiede. So konnte einerseits die vielfach postulierte (siehe Kapitel 1.4) antioxidative Wirkung von VC in physiologischen Konzentrationen durch eine Verringerung der Anzahl DNA-geschädigter PBMCs bestätigt werden; es konnte sogar eine Konzentrationsabhängigkeit dieser protektiven Wirkung beobachtet werden^{mm}. Andererseits konnte auch nachgewiesen werden, dass unphysiologisch hohe Konzentrationen von VC unter hyperbarer Oxigenierung eine DNA-schädigende Wirkkomponente ausprägen. Um diese offensichtlich widersprüchlichen Ergebnisse zu diskutieren, soll im Folgenden zunächst ein Überblick über die verschiedenen Reaktionen von VC mit ROS und den entsprechenden Folgereaktionen gegeben werden, um anschließend eine Hypothese zur Erklärung der Zusammenhänge darzulegen.

Wie in der Einleitung (siehe Kapitel 1.1 und 1.2) beschrieben, können ROS, insbesondere das vorrangig gebildete Superoxid-Radikal, zu Wasserstoffperoxid reduziert werden. Unter normobaren Bedingungen sind die intrazellulären Katalasen und Gluthathionperoxidasen in der Lage, anfallendes Wasserstoffperoxid nahezu vollständig zu Wasser zu reduzierenⁿⁿ. Unter hyperoxischen Bedingungen kommt es jedoch zur Bildung von unphysiologisch hohen Konzentrationen von Superoxid-Radikalen und H₂O₂, sodass die physiologischen "Entgiftungskapazitäten" nicht ausreichen und es zu einem Anstieg der intrazellulären Sauerstoff-Radikale und von H₂O₂ kommt (vgl. Kapitel 1.1 und 1.2). Das H₂O₂ diffundiert dem Konzentrationsgradienten folgend durch die Zellmembranen nicht nur aus den Mitochondrien heraus, sondern gelangt auch über das Zytosol bis in den Zellkern. Überall dort, wo oxidierbare Metallionen vorliegen (z. B. Fe²⁺ oder Cu²⁺), kann es zur Generation von hochreaktiven Hydroxyl-Radikalen aus H₂O₂ kommen (Fenton Chemie^{oo}). Die Hydroxyl-Radikale können im

^l allein bei renaler Insuffizienz, Eisenüberladung, Oxalatsteinen und Glucose-6-Phosphat Dehydrogenasemangel ist VC in therapeutischer Konzentration kontraindiziert [242][244][245][246]

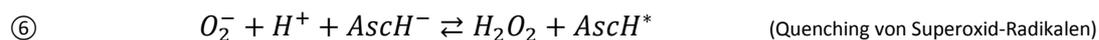
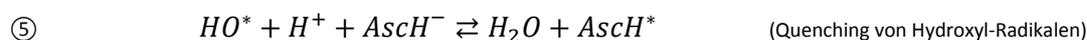
^{mm} die sich jedoch als nicht signifikant herausstellte



Zellkern DNA-Schädigungen (Strangbrüche) induzieren (siehe Kapitel 1.2) [101][170]. Da der pO_2 in einem linearen Zusammenhang zur Bildung von Superoxid-Radikalen und H_2O_2 steht, ist auch die Anzahl der durch die Fenton-Reaktion gebildeten Hydroxyl-Radikale und in der Folge auch die Anzahl DNA-geschädigter Zellen pO_2 -abhängig. Dies kommt in der graphischen Darstellung der DNA-Schädigung bei Inkubation mit 400 kPa O_2 im Gegensatz zu 500 kPa zu Ausdruck (vgl. Kapitel 4.3 und A-4 Abbildung 6-17). Es wird ersichtlich, dass das Gleichgewicht zwischen Radikalentstehung und Radikalentgiftung bei höherem Sauerstoffdruck in Richtung vermehrter Radikalbildung verschoben ist.

DNA-protective Reaktionen

Neben der dargestellten enzymatischen Radikalabwehr verfügt die Zelle über nicht-enzymatische antioxidative Substanzen, unter anderem das Vitamin C. Bei der Anwesenheit von geringen bis moderaten Konzentrationen von VC (bzw. der biologisch wirksamen Form, dem Ascorbat ($AscH^-$)) kommt es dosisabhängig zum Abbau von ROS, wobei insbesondere Hydroxyl-Radikale (OH^\cdot) und Superoxid-Radikale ($O_2^{\cdot-}$) zu Wasser bzw. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reduziert werden (Quenching) [10][12][36][40][136].



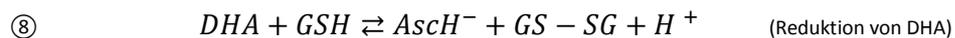
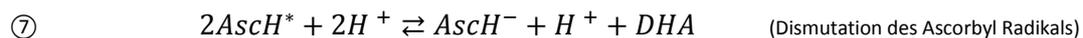
Diese Reaktionen finden nach Umwandlung von DHA in $AscH^-$ im Zytosol und in allen Zellkompartimenten statt, in die VC in Form von DHA über GLUT1^{pp}-Transporter konzentrationsabhängig gelangt (vgl. Kapitel A - 5.3), also auch im Zellkern. Verstärkt wird der Quenching-Effekt weiterhin durch Vitamin E (α -Tocopherol, α -TOH), welches ebenfalls in der Lage ist, ROS durch direkte Reaktion in lipophiler Phase (z. B. in Zell-/Kernmembranen) zu reduzieren [35][38]. Das Vitamin E kann durch VC regeneriert werden, wodurch es erneuten Quenching-Reaktionen zur Verfügung steht und eine prooxidative Aktivität des α -Tocopheryloxyl-Radikals verhindert wird [10][12][35][36][40][247] (vgl. Kapitel 1.4) (aus Gründen der Übersicht nicht in den Schaubildern eingetragen). Auf diese Weise wirkt das hydrophile VC indirekt auch in lipophiler Phase antioxidativ.



Da bei höherer oxidativer Belastung vermehrt Sauerstoffradiale anfallen, können auch geringere Konzentrationen von VC zu einer messbaren Verringerung von DNA-Schädigung führen, denn aufgrund der größeren Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens von ROS und VC findet mit größerer Wahrscheinlichkeit eine Quenching-Reaktion statt. In der graphischen Darstellung (siehe Kapitel A-4 Abbildung 6-17, vgl. Abbildung 4-6) wird dies anhand einer deutlicheren Verminderung der DNA-Schädigung bei 100 μM unter höherer oxidativer Belastung deutlich.

Bei allen beschriebenen Quenching-Reaktionen entsteht ein Ascorbyl-Radikal ($AscH^\cdot$), das weiter zu $AscH^-$ und DHA dismutieren kann $\textcircled{7}$ oder chemisch (z. B. durch Gluthathion) $\textcircled{8}$ oder enzymatisch (z. B. durch Thioredoxin-Reduktase) zu $AscH^-$ reduziert wird [35][95][140][248]. Die chemische Reduktion durch Gluthathionperoxidasen ist dabei die wichtigste Reaktion [48][137][188][248][249][250].

^{pp} Glukose-Transporter 1 - erleichterte VC-Aufnahme entlang eines Konzentrationsgefälles. In allen Zellen vorhanden



Auf diese Weise kann AscH* zu AscH⁻ regeneriert werden und steht für weitere Reaktionen mit ROS wieder zur Verfügung. Kommt es jedoch zur Hydrolyse des Lactonrings von DHA entsteht irreversibel 2,3-Diketogluconsäure, welche abgebaut wird (vgl. Kapitel 1.4) [134][135][136]. Da die Zelle für alle oben genannten Reaktionen VC benötigt, verfügt sie über spezielle Transporter, um dieses aus dem Umgebungsmedium aufzunehmen. Bei Zellen mit hohem VC-Bedarf, z. B. PBMCs (siehe Kapitel 5.1.2), sind neben den ubiquitär vorkommenden GLUT1-Transportern auch spezialisierte SVCT^{qq}-Transporter in den Zellmembranen enthalten, die durch aktiven Transport von AA (z. B. in Form von AscH⁻) gezielt die benötigte Menge an VC aufnehmen und verbrauchtes VC ergänzen können (vgl. Kapitel A - 5.3). Durch diesen Zusammenhang wird deutlich, dass bei höheren VC-Konzentrationen im Probenpuffer durch die erleichterte VC-Aufnahme die Anzahl DNA-geschädigter PBMCs unter oxidativem Stress sinkt (vgl. Kapitel 4.3). Die DNA-protective Wirkung von VC ist folglich konzentrationsabhängig im moderaten Konzentrationsbereich. Hinweise für diese offensichtlich konzentrationsabhängige Wirkweise von VC unter oxidativem Stress finden sich auch in der Literatur. Beispielsweise beschrieben Siddique et al. [251], die Lymphozyten mit unterschiedlichen VC-Konzentrationen (bis 80 µM) und H₂O₂ (zur Induktion von oxidativem Stress) inkubierten, eine konzentrationsabhängige DNA-protective Wirkung mit steigender VC-Konzentration.

Extrazelluläre Anreicherung von DHA durch hyperbaren Sauerstoff

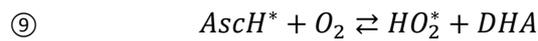
Entgegen dieser konzentrationsabhängigen DNA-protectiven Wirkung im physiologischen Konzentrationsbereich und gegenüber der oben beschriebenen fehlenden prooxidativen Wirkung von VC allein^{rr}, kann VC in sehr hohen Konzentrationen die oxidativ schädigende Wirkung von beispielsweise Hyperoxie verstärken (vgl. Kapitel 4.3). Zu diesem Ergebnis, kamen auch Zhou et al. [91], die DNA-Schäden durch Applikation von UV-Licht induzierten. Die Grenzkonzentration, bei der VC gerade noch DNA-protectiv wirkt bzw. bei der die DNA-protectiven Effekte überwiegen, liegt bei Zhou et al. latent höher (> 400 µM) als in den Versuchen der vorliegenden Studie (zwischen 200 und 400 µM)^{ss}. Es ist anzunehmen, dass die protectiven antioxidativen Reaktionen trotz der hohen VC-Konzentrationen stattfinden, jedoch Reaktionswege einer prooxidativen Wirkweise von VC an Bedeutung gewinnen. Im Folgenden soll ein Erklärungsansatz dieser Reaktionswege dargelegt werden:

Durch das Vorliegen einer hohen Konzentration von VC (in Form von AA) sind verschiedene Wechselwirkungen zwischen dem Sauerstoff, dem VC (AA) und Bestandteilen des Zellmediums (RPMI-Puffer) möglich. Beispielsweise ist eine Reduktion von AA zu einem Ascorbyl-Radikal (AscH*) durch Redoxreaktion mit einer der in dem RPMI-Puffer vorliegenden Aminosäuren möglich, welches unter physiologischen Umgebungsbedingungen sofort weiter zu DHA oder zurück zu AA reagieren würde, z. B. durch Dismutation des Ascorbyl-Radikals $\textcircled{7}$. Unter hyperbarer Oxigenierung kann das Ascorbyl-Radikal jedoch auch mit O₂ zu einem Hydroperoxyl-Radikal (HO₂^{*}) und DHA reagieren [252].

^{qq} High-affinity sodium-vitamin C Co-Transporter - aktiver VC-Transport in spezialisierte Zellen, z.B. Lymphozyten

^{rr} ohne das zusätzliche Vorhandensein von oxidativem Stress durch beispielsweise ionisierende Strahlung oder hyperbaren Sauerstoff (vgl. Kapitel 1.4)

^{ss} Dieser Unterschied ist wahrscheinlich in den verschiedenen Studiendesigns begründet.



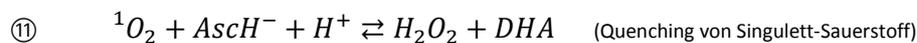
Das HO_2^* kann dann in einer Quenching-Reaktion zu H_2O_2 oxidiert werden.



In der Folge dieser Reaktionen kommt es mit steigender Konzentration von VC (AA) zu einer extrazellulären Erhöhung von DHA und H_2O_2 .

Durch den konzentrationsabhängigen Ausstrom von durch hyperbare Oxygenierung in den Mitochondrien induziertem Wasserstoffperoxid (vgl. Abbildung 1-6) gleicht sich die extrazelluläre an die intrazelluläre H_2O_2 -Konzentration an^{tt}.

Das H_2O_2 kann nun auf verschiedenen Wegen, die von Miyamoto et al. [253] ausführlich dargelegt wurden, den sehr reaktionsfreudigen Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$ [4] induzieren. Das $^1\text{O}_2$ wird wiederum durch AscH⁻ in einer Quenchingreaktion $\textcircled{9}$ entgiftet [95][137]. Bei dieser Reaktion entsteht aus einem Singulett-Sauerstoff-Molekül direkt DHA und ein Wasserstoffperoxid [137][115][254][255].



Der Induktion von Singulett-Sauerstoff aus Wasserstoffperoxid folgt demnach aufgrund dieser Quenching-Reaktion ein zusätzlicher Anstieg des extrazellulären DHAs.

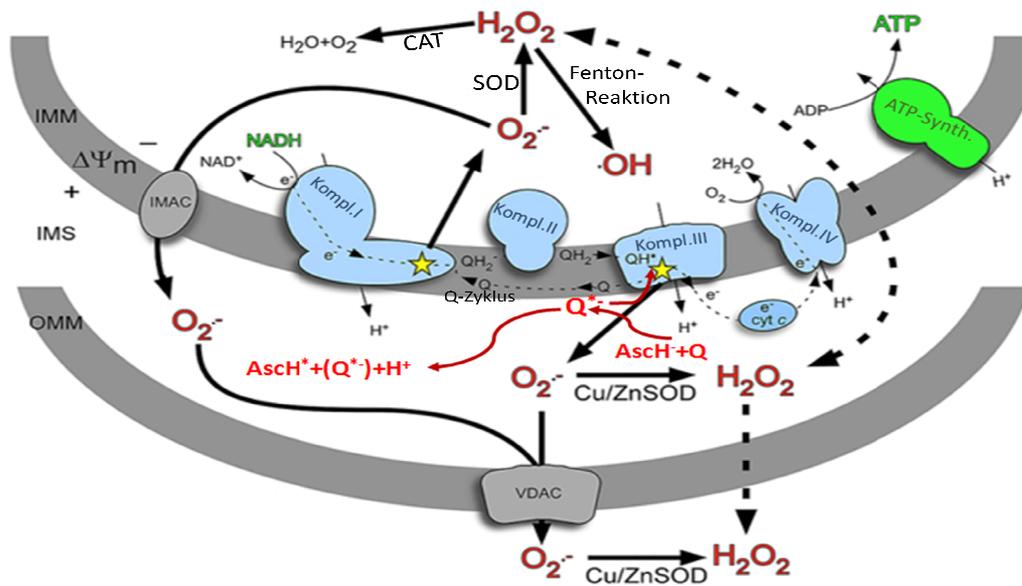
DNA-schädigende Reaktionen

Aufgrund des hohen Konzentrationsgradienten gelangt das extrazellulär angereicherte DHA nun konzentrationsabhängig durch GLUT1 in die Zelle und reichert sich dort an. Das DHA würde unter physiologischen Bedingungen vor allem durch die Gluthathionperoxidasen $\textcircled{8}$ sofort zu AA, der VC-Speicherform, reduziert werden (siehe Kapitel A - 5.3). Unter den vorliegenden hyperbaren Bedingungen besteht jedoch eine Konkurrenzreaktion an den Gluthathionperoxidasen, die sowohl die Reduktion von DHA zu AA als auch die Entgiftung der unter hyperbar-hyperoxisch anfallenden ROS katalysieren $\textcircled{3}$. Folglich verteilt sich das DHA dem Konzentrationsgradienten folgend im Zytosol und wird vermehrt in die Zellorganellen (u. a. Mitochondrien, Zellkern) aufgenommen, die ebenfalls über die ubiquitär vorkommenden GLUT1-Transporter verfügen (siehe Kapitel A - 5.3). In den Zellorganellen steht nach der Reduktion von DHA zu AA, bzw. dem Ascorbat-Monoanion (AscH^-), vermehrt überschüssiges Reduktionspotential zur Verfügung, sodass es vermehrt zu "unerwünschten" Reaktionen von VC-Derivaten kommen kann. In den Mitochondrien können z. B. zusätzlich Superoxid-Radikale in Folge einer Reduktion quinonischer Molekülkomponenten induziert werden [95] (siehe Abbildung 5-1).



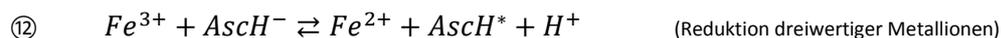
^{tt} bzw. es ist sogar ein konzentrationsabhängiger Einstrom von H_2O_2 nach intrazellulär denkbar!

Abbildung 5-1 Mechanismus der vermehrten Entstehung von Superoxid und Wasserstoffperoxid in Mitochondrien unter Vitamin C -Einfluss (nach Batty et al. [115]; vgl. Kapitel 1.2)



Aufgrund dieser Reaktion, die wahrscheinlich auch für die Erhöhung der DNA-Schädigung in Mitochondrien unter Zugabe von VC verantwortlich ist [173], kommt es zur zusätzlichen Erhöhung von Superoxid-Radikalen und in der Folge von Wasserstoffperoxid (siehe Abbildung 5-1).

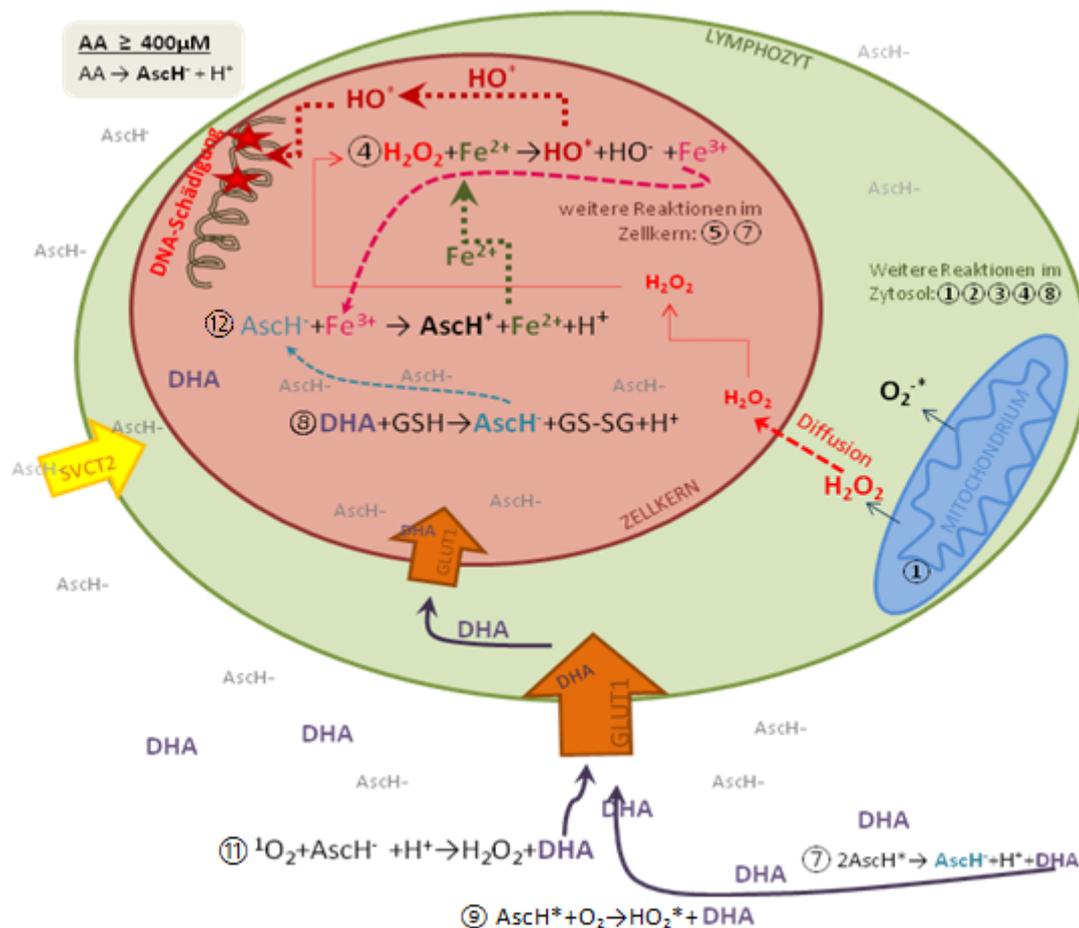
Viel entscheidender für die Erhöhung der DNA-Schädigung im Zellkern ist jedoch offenbar die Katalyse der Fentonreaktion durch hohe VC-Konzentrationen im Zellkern: Ascorbat kann dreiwertige Metallionen (vor allem Eisenionen) reduzieren, sodass die zweiwertigen Metallionen erneut der Fenton-Reaktion zur Verfügung stehen [256][257][95].



Versuche mit und ohne VC im Probenpuffer

Aus der Beschreibung der Reaktionsfolgen (vgl. Abbildung 5-2) wird deutlich, dass der starke Anstieg des extrazellulären DHAs und die letztendlich folgende Katalyse der Fenton-Reaktion im Zellkern offensichtlich ausschlaggebend für die Erhöhung der messbaren DNA-Schädigung bei Vorliegen von sehr hohen VC-Konzentration unter der hyperbaren Oxigenierung ist. Entsprechend wurde in einer weiteren Untersuchung die DNA-Schädigung ohne extrazelluläres VC während des Experiments (also nach Herauswaschen des VCs nach Vorinkubation mit 400 μM VC) bestimmt. Es zeigte sich, dass die DNA-Schädigung in den PBMCs deutlich höher war, wenn während der hyperbaren Oxigenierung VC (400 μM , 500 kPa pO_2) im Probenpuffer vorhanden war (siehe Kapitel 4.3 und A-4 Abbildung 6-18).

Abbildung 5-2 Mechanismus der DNA-Schädigung unter hyperbarer Oxygenierung *ex vivo* bei hochsupraphysiologischer VC-Konzentration im Probenmedium



Folgerung

Es ist anzunehmen, dass die beschriebenen Reaktionsfolgen nicht nur in dieser Studie die entscheidende Ursache prooxidativer Wirkweisen von VC sind, sondern auch eine entscheidende Rolle für die oxidative Schädigung im Zusammenhang mit VC spielen, die unter Anwesenheit von Metallionen beschrieben ist [150][172]. Insbesondere die Überlastung der intrazellulären antioxidativen Schutzsysteme ist vermutlich entscheidend für die oxidativ schädigende Wirkung von VC, wenn zusätzlich ein oxidativer Stressor vorliegt, z. B. UV- oder radioaktive Strahlung [89][91][258] oder, wie in diesem Beispiel, Hyperoxie. Auch die postulierte oxidative Schädigung durch VC in Tumorzellen (vgl. Kapitel 1.4) ist vermutlich auf diesen Mechanismus zurückzuführen [184][188][259]. Denn zum einen nehmen einige Tumorzelllinien übermäßig viel VC auf [184][189][243]. Zum anderen sind in vielen Tumorzelllinien antioxidative Schutzenzyme, vor allem Katalasen und SODs, geringer ausgeprägt [243][260][261] als in gesunden Zellen, weshalb sie besonders anfällig gegenüber oxidativem Stress sind. Diese Eigenschaft nutzend ist der Wirkmechanismus einiger Chemotherapeutika (z. B. Bleomycin) die Induktion oxidativen Stresses. In diesem Zusammenhang wird auch die Bekämpfung von Krebszellen durch Chemotherapeutika in Kombination mit VC und sogar durch VC allein erforscht [95][190][184][243][260][262].

5.3 Limitierung der Studie

Methodik

Die gewonnenen Ergebnisse sind nicht uneingeschränkt auf ein humanes Normalmodell übertragbar, da besondere Versuchsbedingungen geschaffen wurden. Zum einen wurden viele Untersuchungen am Zellmodell durchgeführt, was aus vielerlei Hinsicht nicht uneingeschränkt dem Humanmodell entspricht, da sich die Versuchszellen nicht in der physiologischen Umgebung befanden. Zum anderen ist nicht davon auszugehen, dass bei Applikation gleicher Sauerstoffüberdruckverhältnisse im Probanden und im Versuchsmedium die PBMCs derselben oxidativen Belastung ausgesetzt sind. Zudem kann eine einzelne Zellpopulation nicht uneingeschränkt einen Gesamtorganismus repräsentieren. Die *in vivo* Untersuchungen wurden jeweils an Zellen von mehr oder weniger spezialisierten Probandengruppen durchgeführt (vgl. Kapitel 3.1), weshalb keine uneingeschränkte Gültigkeit für eine randomisierte Normalpopulation gegeben ist.

Auch für die Datenerhebung gelten Limitierungen. Für die Untersuchung der DNA-Schädigung wurde der Comet Assay verwendet. Es wurden zur Validierung der Ergebnisse verschiedenen Auswertungsverfahren durchgeführt. Bei der Verwendung des Comet Assays ist zu beachten, dass die im Fluoreszenzfeld sichtbaren DNA-Strangbrüche keine Differenzierung zwischen direkter DNA-Schädigung und Intermediärprodukten des regulären Zellstoffwechsels und von Zellreparaturprozessen zulassen [224]. Dies ist jedoch eher nicht erheblich, da hiervon aufgrund der kurzen Versuchszeiten und der relativen Zellenaktivität (G 0-Phase, siehe Kapitel 5.1.2) nur wenige Zellen betroffen sind. Eine additive Verwendung weiterer Methoden könnte die hier gewonnenen Ergebnisse ergänzen, würde jedoch den Rahmen dieser Arbeit überschreiten.

Zellschädigung durch VC nur unter unphysiologischen Bedingungen

Bei der Ausarbeitung der möglichen zellschädigenden Wirkkomponente von VC ist zu beachten, dass die beschriebenen prooxidativen Reaktionen nur unter unphysiologischen Bedingungen stattgefunden haben. Demgegenüber würde unter ausreichend physiologischen Bedingungen^{uu} die Kapazität der antioxidativen Schutzsysteme ausreichen, um die oxidative Schädigung durch VC zu verhindern (vgl. Kapitel 1.4 und A - 1.3). Beispielsweise kann schon die Verwendung von Blutserum als Versuchsmedium den prooxidativen Effekt von VC unter Anwesenheit von Metallionen verhindern [263][264]. Entsprechend ist *in vivo* auch unter Eisenüberladung keinerlei schädigende Wirkung von VC auf normale Zellen beschrieben [256]. Nicht zuletzt auch, da bei oraler Aufnahme eine maximale VC-Serumkonzentration von rund 200µM VC erreicht wird, bei der auch unter den Sauerstoffüberdruckbedingungen der Versuche der vorliegenden Studie nur protektive Effekte von VC festzustellen waren.

^{uu} wenn entweder sehr hohe Dosen VC in ein sonst physiologisches System ohne das Vorhandensein von oxidativem Stress eingebracht werden oder wenn unter hyperbarer Oxigenierung physiologische VC-Konzentrationen vorliegen

5.4 Ausblick

Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse der Untersuchungen zur Adaptation gegenüber oxidativem Stress durch hyperbare Hyperoxie sowie die Wirkung von Vitamin C im Zusammenhang mit oxidativer DNA-Schädigung können als Grundlage für weiterführende *ex vivo* und Humanexperimente bis zur klinischen Anwendung gesehen werden.

Folgeuntersuchungen der VC-Experimente

Zunächst einmal bleibt in direkter Folge auf die hier gefundene Konzentrationsabhängigkeit der DNA-Schädigung durch Vitamin C noch zu klären, bei welcher Konzentration VC gerade noch protektiv wirkt und ab wann eine prooxidative Wirkung überwiegt (den Ergebnissen dieser Studie zu Folge zwischen 200 und 400 μM VC); und ob sich bei Verwendung eines anderen oxidativen Stressors, beispielsweise hochenergetischer Strahlung, bei sonst gleichem Studiendesign die protektive "Grenzkonzentration" von VC verschiebt. Weiterhin wäre es von Interesse zu ermitteln, ob tatsächlich (allein) ein übermäßiger DHA-Einstrom für die prooxidative Wirkung von VC verantwortlich ist bzw. welche weiteren Faktoren eine Rolle spielen. Ein möglicher Ansatz wäre die intrazelluläre DHA-Messung. In der Folge bleibt zu klären, ob bzw. wie lange es dauert, bis in der Zelle Gegenregulationsmaßnahmen gegen diese schädigenden Reaktionswege eingeleitet werden. Denkbar wäre hierbei, einen möglichen Abbau von GLUT1-Transportern oder die Reduktion der Transkription von GLUT1-Transportern zu untersuchen. Wichtige Erkenntnisse könnten auch Untersuchungen bringen, in denen überprüft wird, ob VC in sehr hohen Dosen (i.v.-Applikation) bei gleichzeitiger Induktion ausgeprägten oxidativen Stresses (z. B. durch hyperbare Oxygenierung mit hohen Sauerstoffdrücken) auch *in vivo* DNA-schädigende Effekte ausprägen kann. Diese Untersuchung wäre vor allem vor dem Hintergrund von Interesse, dass VC, das unter Experimentalbedingungen bei gleichzeitigem Vorliegen von Übergangsmetallen oxidative Schädigung induziert, dieses Potential im Blutplasma offensichtlich nicht entwickelt (vgl. Kapitel 1.4).

Weiterführende Untersuchungen mit anderen Xenobiotika

Im Zusammenhang mit der herausgearbeiteten DNA-protektiven Wirkung von VC könnte mit der in dieser Studie entwickelten Methode *ex vivo* untersucht werden, in welcher Weise sich andere Xenobiotika, z. B. Vitamin E in Reinform oder in Kombination mit VC bei hyperbar-hyperoxischer Belastung auswirken. Diese *ex vivo* Experimente wären, genau wie die VC-Experimente aus dieser Studie, als Vorstufe zu *in vivo* Untersuchungen zu sehen. Weitergehend könnte die Wirkung antioxidativer Substanzen auch als Bestandteil von Nahrungsmitteln untersucht werden, denn es gibt Hinweise, dass VC und andere antioxidativ wirksame Xenobiotika in natürlicher Darreichungsform z. B. als Bestandteil von Früchten/ Fruchtsaft bzw. im Zusammenspiel mit anderen Bestandteilen dieser Lebensmittel, eine größere antioxidative Wirkung entfalten [265][266], als in Reinform.

Reduktion von oxidativem Stress im klinischen Ansatz

In weiteren aufbauenden Untersuchungen könnte überprüft werden, ob durch eine kurzfristige Exposition gegenüber normobarem oder hyperbarem Sauerstoff oder die orale Aufnahme von VC DNA-Schädigung durch oxidativen Stress in PBMCs im *in vivo* Versuch (Tauchgang/HBO) reduziert werden kann. Diese Untersuchungen könnten beispielsweise an PBMCs von Probanden/ Versuchstieren durchgeführt werden, die einen

Sauerstofftoleranztest, eine HBO-Therapie oder einen Tauchgang mit hohen Sauerstoffdrücken durchlaufen. Hier ist additional auch die Untersuchung weiterer Parameter neben der DNA-Schädigung in PBMCs denkbar, beispielsweise des antioxidativen Status im Serum oder der gezielten Bestimmung des intra/extrazellulären VCs. Darauf aufbauend könnte die Effektivität von "Sauerstoff-Training" bezüglich des Potentials überprüft werden, die basale DNA-Schädigung von Personen zu reduzieren, die überdurchschnittlicher oxidativer Belastung ausgesetzt sind. Dabei ist an Patienten mit Tumorleiden und/oder unter Chemotherapie oder an hämodialysepflichtige Patienten zu denken. Auch Personengruppen, die hoher Luftverschmutzung oder überdurchschnittlicher Umgebungsstrahlung ausgesetzt sind, sind überdurchschnittlich oxidativ belastet. Altas und Haffor [267] beschrieben bereits eine protektive Wirkung repetitiv applizierter Hyperoxie gegenüber oxidativer Schädigung in Lungengewebe von Mäusen. Auch zur Prävention neuronaler [229][232][268] oder kardiovaskulärer [229][230][231] Ischämieschädigung durch oxidativen Stress wird ein "HBO-Preconditioning" bereits erprobt. Vitamin C könnte additional oder alternativ eingesetzt werden.

6 Zusammenfassung

In dieser Studie sollten Erkenntnisse über Schutzmechanismen gegenüber oxidativem Stress gewonnen werden. Der Terminus oxidativer Stress beschreibt einen Zustand des Organismus, bei dem auftretende radikalische Moleküle, z. B. reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die körpereigenen Schutz- und Abwehrsysteme überfordern und es zur oxidativen Schädigung von Lipiden, Proteinen und DNA kommen kann. Folgen von oxidativem Stress sind Alterungsprozesse oder die Entstehung von Erkrankungen. Es gibt eine Vielzahl von Situationen, in denen oxidativer Stress im menschlichen Organismus entsteht, z. B. bei Entzündungen/Infektionen, durch Umwelteinflüsse oder bei extremer körperlicher Belastung. Auch hyperbare Hyperoxie, die z. B. beim Tauchen (insbesondere mit Sauerstoffkreislaufgeräten) oder in der HBO-Therapie vorkommt, ist ein potenter Induktor von oxidativem Stress. Die Induktion von oxidativem Stress durch hyperbare Hyperoxie wird als hyperbare Oxigenierung bezeichnet. Anhand dieser praxisnahen Methode zur Induktion von oxidativem Stress wurden im Humanversuch und *ex vivo* anhand der DNA-Schädigung in humanen peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) mögliche Schutzmechanismen gegenüber oxidativem Stress untersucht. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Charakteristika einer Adaptation an rezidivierende Hyperoxie gelegt, sowie auf Nutzen und Risiken von Vitamin C in diesem Zusammenhang. Die Quantifizierung der DNA-Schädigung wurde jeweils anhand des alkalischen Comet Assays vorgenommen.

Zunächst wurde untersucht, in welchem Ausmaß hyperbarer Sauerstoff DNA-Schädigung *in vivo* in jungen gesunden Probanden indizieren kann. In einer weiteren Untersuchung wurde die in der Literatur beschriebene Möglichkeit der körpereigenen Adaptation in prospektivem Ansatz überprüft. Hierzu wurden die PBMCs von professionellen Tauchern nach einer dreimonatigen Phase repetitiver Tauchgänge mit hoher Sauerstoffbelastung 24 h nach dem letzten Tauchgang und im Verlauf von fünf Wochen wöchentlich auf basale DNA-Schädigung untersucht. Zudem wurde die Resistenz der PBMCs dieser Probanden gegenüber hyperbarer Oxigenierung *ex vivo* in Bezug auf DNA-Schädigung untersucht. Dabei ergab sich, dass die basale DNA-Schädigung 24 h nach dem letztem Tauchgang am geringsten ist und bis zur dritten Woche zunimmt, im weiteren Verlauf jedoch bis zur fünften Woche konstant bleibt. Bei der hyperbaren Oxigenierung *ex vivo* nahm die oxidative DNA-Schädigung im Verlauf der wöchentlichen Untersuchungen signifikant zu. Zwischen der zweiten und vierten Woche nach letzter *in vivo* Sauerstoffbelastung stellte sich ein Übergangsbereich heraus, in dem die Resistenz gegenüber oxidativer *ex vivo* Belastung besonders deutlich sank. Dieses Ergebnis legt nahe, dass bis etwa zur dritten Woche ein wirkungsvoller adaptiver Schutz besteht. Ursächlich für diesen adaptiven Schutz sind entsprechend der in der Literatur vorherrschenden Meinung die Aktivierung von antioxidativ wirksamen Enzymen sowie die Induktion der Translation spezialisierter antioxidativ wirksamer Proteine. Diesbezüglich kommt auch eine Akkumulation von Antioxidantien, z. B. den antioxidativen Vitaminen C und E in Frage.

Anknüpfend an die mögliche Schutzwirkung von Vitamin C (VC), dessen antioxidative Kapazität durch zahlreiche *ex vivo* und *in vivo* Untersuchungen bestätigt wurde, wurde im Modell der hyperbaren Oxigenierung anhand von PBMCs überprüft, ob ein antioxidativer Schutz messbar ist. Nach Entwicklung einer geeigneten Methode für diese Untersuchung wurde gefunden, dass VC in moderaten Konzentrationen durch hyperbare Oxigenierung induzierte

DNA-Schädigung reduzieren kann. Im Gegensatz dazu wurde die durch hyperbare Oxigenierung induzierte DNA-Schädigung in demselben Versuchsaufbau unter sehr hohen VC-Konzentrationen zusätzlich erhöht. Dass dieser Effekt tatsächlich auf das Zusammenspiel von oxidativer Belastung und hohen VC-Dosen zurückzuführen sein muss, konnte dadurch bestätigt werden, dass identisch hohe VC-Konzentrationen unter normobar-normoxischen Kontrollbedingungen nicht zu einer Erhöhung der DNA-Schädigung führten. Diese Beobachtung entspricht der in der Literatur vorherrschenden Ansicht, dass VC zwar prooxidatives Potential hat, dies jedoch nur unter besonderen Bedingungen wie zusätzlicher oxidativer Belastung zum Tragen kommt.

Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass eine Adaptation an oxidativen Stress durch Sauerstofftraining möglich ist, sowie, dass Vitamin C antioxidative Kapazität entfalten kann. In weiterführenden Studien kann diese antioxidative Schutzwirkung durch Sauerstoff-Preconditioning oder Vitamin C-Gabe im Humanversuch z. B. im Rahmen von Sauerstofftoleranztests oder in einer klinischen Studie an oxidativ stark belasteten Patienten, wie Dialysepatienten, erprobt werden. Der Einsatz sehr hoher Dosen von Vitamin C ist hierbei kritisch zu betrachten; die durch orale Ingestion erreichbare Dosierung von Vitamin C ist jedoch nach Kenntnisstand der Literatur und den Ergebnissen dieser Studie zu Folge bezüglich einer ungewollten prooxidativen VC-Wirkung unbedenklich.

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Entstehung von Superoxidradikalen ($O_2^{\cdot-}$) in 1-2% der Elektronenübertragungen (e^-) der Atmungskette (Abbildung nach Rassow et al. [1])	8
Abbildung 1-2 Intermediate bei der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser	8
Abbildung 1-3 Übersicht über die wichtigsten Vertreter der Reaktiven Sauerstoffspezies	9
Abbildung 1-4 Enzyme der Sauerstoffentgiftung	11
Abbildung 1-5 Superoxidentstehung am Q-Zyklus	14
Abbildung 1-6 Mechanismus der Entstehung von Superoxid und Wasserstoffperoxid in Mitochondrien	15
Abbildung 1-7 Schematische Darstellung des Comet Assay-Protokolls	16
Abbildung 1-8 Lymphozyten im Fluoreszenzbild (400fache Vergrößerung)	17
Abbildung 1-9 Enol- bzw. Diketon-Verbindung des Vitamin C	18
Abbildung 1-10 Nomenklatur der VC-Derivate	19
Abbildung 1-11 Quenching-Reaktion von Vitamin C und einem Hydroxyl-Radikal	19
Abbildung 3-1 Experimentaldruckkammer Außen- (<i>links</i>) und Innenansicht (<i>rechts</i>)	25
Abbildung 3-2 Kontrollkammer mit Deckel und Pressluftsystem (<i>links</i>) und bestückte 96-Well-Platte sowie geöffnete Kontrollkammer mit Blick auf die Abdeckhaube in Wasserbad (<i>rechts</i>)	26
Abbildung 3-3 Aufgetrenntes Vollblut nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	27
Abbildung 4-1 DNA-Schädigung in PBMCs vor und nach hyperbarer Oxigenierung <i>in vivo</i>	32
Abbildung 4-2 Verlauf der Aufsättigung mit Sauerstoff über verschiedenen Hautarealen während der hyperbaren Oxigenierung	32
Abbildung 4-3 Vulnerabilität von PBMCs gegenüber hyperbarer Oxigenierung <i>ex vivo</i> im Anschluss an repetitive O_2 -Belastung <i>in vivo</i>	33
Abbildung 4-4 Median der DNA-Schädigung in PBMCs nach hyperbarer Oxigenierung <i>ex vivo</i> im Anschluss an repetitive O_2 -Belastung <i>in vivo</i>	34
Abbildung 4-5 Adaptation an oxidativen Stress	35
Abbildung 4-6 DNA-Schädigung in PBMCs nach hyperbarer Oxigenierung in Abhängigkeit von der VC-Konzentration und der oxidativen Belastung	37
Abbildung 4-7 DNA-Schädigung durch hyperbare Oxigenierung in Abhängigkeit von der VC-Konzentration im Probenmedium während der Sauerstoffbelastung bzw. nach alleiniger Vorinkubation mit VC	38
Abbildung 5-1 Mechanismus der vermehrten Entstehung von Superoxid und Wasserstoffperoxid in Mitochondrien unter Vitamin C -Einfluss (nach Batty et al. [115]; vgl. Kapitel 1.2)	55
Abbildung 5-2 Mechanismus der DNA-Schädigung unter hyperbarer Oxigenierung <i>ex vivo</i> bei hochsupraphysiologischer VC-Konzentration im Probenmedium	56
Abbildung 6-1 pH-Wert-Veränderung durch Vitamin C	88

Abbildung 6-2 pH und Farbveränderungen von RPMI-Puffer im Brutschrank unter verschiedenen VC-Konzentrationen.....	88
Abbildung 6-3 Farbveränderung des RPMI-Puffers bei Brutschrankinkubation.....	89
Abbildung 6-4 DNA-Schädigung bei Inkubation im Brutschrank.....	90
Abbildung 6-5 DNA-Schädigung in Abhängigkeit von der VC-Konzentration bei Inkubation im Brutschrank.....	90
Abbildung 6-6 DNA-Schädigung in Abhängigkeit von der Expositionszeit gegenüber hyperbarem Sauerstoff bzw. Pressluft.....	91
Abbildung 6-7 DNA-Schädigung in Abhängigkeit von der Intensität der oxidativen Belastung und der VC-Konzentration im Probenmedium bzw. nach alleiniger Inkubation.....	92
Abbildung 6-8 Genauere Analyse der DNA-Schädigung durch hyperbare Oxigenierung mit bzw. ohne VC im Probenpuffer	93
Abbildung 6-9 DNA-Schädigung durch den Milieuwechsel während des Experimentalverlaufs.....	97
Abbildung 6-10 DNA-Schädigung in PBMCs nach hyperbarer Oxigenierung <i>in vivo</i>	113
Abbildung 6-11 Median der DNA-Schädigung in Tailmoment-Auswertung nach hyperbarer Oxigenierung <i>ex vivo</i> im Anschluss an repetitive O ₂ -Belastung <i>in vivo</i> über drei Monate	114
Abbildung 6-12 DNA-Schädigung in %Tail Intensity-Auswertung nach hyperbarer Oxigenierung <i>ex vivo</i> im Anschluss repetitive O ₂ -Belastung <i>in vivo</i> über drei Monate	114
Abbildung 6-13 Basale DNA-Schädigung in PBMCs nach dreimonatiger repetitiver O ₂ -Belastung <i>in vivo</i>	114
Abbildung 6-14 %Tail Intensity-Auswertung der DNA-Schädigung nach hyperbarer Oxigenierung in Abhängigkeit der Intensität der Belastung und der Vitamin-C-Konzentration nach Inkubation und während des Experiments.....	115
Abbildung 6-15 Empfehlung zur Vitamin C- Zufuhr gemäß der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE)	118
Abbildung 6-16 Abnahme des adaptiven Schutzes gegenüber Sauerstoffbelastung <i>ex vivo</i>	120
Abbildung 6-17 DNA-Schädigung durch verschiedene Intensitäten oxidativer Belastung und in Abhängigkeit von der Vitamin C-Konzentration.....	121
Abbildung 6-18 DNA-Schädigung in Abhängigkeit von der VC-Konzentration unter hyperbarer Sauerstoffbelastung mit und ohne VC im Probenmedium.....	122
Abbildung 6-19 <i>Ex vivo</i> induzierbare DNA-Schädigung kurz und in großem Abstand zu repetitiver Sauerstoffbelastung <i>in vivo</i>	122

IV. Literaturverzeichnis

- [1] J. Rassow, R. Deutzmann, R. Netzker, und K. Hauser, *Duale Reihe Biochemie*. Georg Thieme Verlag, 2012.
- [2] E. Cadenas und K. J. Davies, „Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging“, *Free Radic. Biol. Med.*, Bd. 29, Nr. 3–4, S. 222–230, Aug. 2000.
- [3] D. F. Stowe und A. K. S. Camara, „Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function“, *Antioxid. Redox Signal.*, Bd. 11, Nr. 6, S. 1373–1414, Juni 2009.
- [4] J. F. Turrens, „Mitochondrial formation of reactive oxygen species“, *J. Physiol.*, Bd. 552, Nr. 2, S. 335–344, Okt. 2003.
- [5] J. F. Turrens und A. Boveris, „Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria.“, *Biochem. J.*, Bd. 191, Nr. 2, S. 421–427, Nov. 1980.
- [6] J. F. Turrens, B. A. Freeman, J. G. Levitt, und J. D. Crapo, „The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles“, *Arch. Biochem. Biophys.*, Bd. 217, Nr. 2, S. 401–410, Sep. 1982.
- [7] G. Barja, „Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity“, *J. Bioenerg. Biomembr.*, Bd. 31, Nr. 4, S. 347–366, Aug. 1999.
- [8] G. Barja und A. Herrero, „Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon“, *J. Bioenerg. Biomembr.*, Bd. 30, Nr. 3, S. 235–243, Juni 1998.
- [9] D. Han, E. Williams, und E. Cadenas, „Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space.“, *Biochem. J.*, Bd. 353, Nr. Pt 2, S. 411–416, Jan. 2001.
- [10] L. J. Machlin und A. Bendich, „Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients“, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, Bd. 1, Nr. 6, S. 441–445, Dez. 1987.
- [11] E. F. Elstner, *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin*. Bibliographisches Institut & F.A. Brockhaus. BI-Wissenschaftsverlag, 1990.
- [12] P. C. Heinrich, M. Müller, und L. Graeve, *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag, 2014.
- [13] J. D. Rush und W. H. Koppenol, „Oxidizing intermediates in the reaction of ferrous EDTA with hydrogen peroxide. Reactions with organic molecules and ferrocytochrome c“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 261, Nr. 15, S. 6730–6733, Mai 1986.
- [14] J. D. Rush, Z. Maskos, und W. H. Koppenol, „Distinction between hydroxyl radical and ferryl species“, *Methods Enzymol.*, Bd. 186, S. 148–156, 1990.

- [15] W. Kähler, I. Koch, C. Wohlrab, J. Kowalski, J. Witte, und A. Koch, „Influence of hyperoxia and physical exercise on *OH-radical stress in humans as measured by dihydroxylated benzoates (DHB) in urine“, *Undersea Hyperb. Med. J. Undersea Hyperb. Med. Soc. Inc*, Bd. 40, Nr. 3, S. 231–238, Juni 2013.
- [16] J. Witte, W. Kähler, T. Wunderlich, P. Radermacher, C. Wohlrab, und A. Koch, „Dose-time dependency of hyperbaric hyperoxia-induced DNA strand breaks in human immune cells visualized with the comet assay“, *Undersea Hyperb. Med. J. Undersea Hyperb. Med. Soc. Inc*, Bd. 41, Nr. 3, S. 171–181, Juni 2014.
- [17] C. C. Winterbourn, „Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction“, *Toxicol. Lett.*, Bd. 82–83, S. 969–974, Dez. 1995.
- [18] J. S. Beckman, T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall, und B. A. Freeman, „Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 87, Nr. 4, S. 1620–1624, Feb. 1990.
- [19] A. P. Halestrap, „The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism“, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, Bd. 973, Nr. 3, S. 355–382, März 1989.
- [20] S. Alvarez, L. B. Valdez, T. Zaobornyj, und A. Boveris, „Oxygen dependence of mitochondrial nitric oxide synthase activity“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Bd. 305, Nr. 3, S. 771–775, Juni 2003.
- [21] P. R. Gardner und I. Fridovich, „Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 266, Nr. 29, S. 19328–19333, Okt. 1991.
- [22] P. V. Vignais, „The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism“, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, Bd. 59, Nr. 9, S. 1428–1459, Sep. 2002.
- [23] B. M. Babior, „The NADPH oxidase of endothelial cells“, *IUBMB Life*, Bd. 50, Nr. 4–5, S. 267–269, Nov. 2000.
- [24] B. M. Babior, J. D. Lambeth, und W. Nauseef, „The neutrophil NADPH oxidase“, *Arch. Biochem. Biophys.*, Bd. 397, Nr. 2, S. 342–344, Jan. 2002.
- [25] S. G. Rhee, „Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger“, *Exp. Mol. Med.*, Bd. 31, Nr. 2, S. 53–59, Juni 1999.
- [26] V. J. Thannickal und B. L. Fanburg, „Reactive oxygen species in cell signaling“, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, Bd. 279, Nr. 6, S. L1005-1028, Dez. 2000.
- [27] P. Sarti, L. Avigliano, A. Görlach, und B. Brüne, „Superoxide and nitric oxide--participation in cell communication“, *Cell Death Differ.*, Bd. 9, Nr. 10, S. 1160–1162, Okt. 2002.
- [28] M. R. Gwinn und V. Vallyathan, „Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages“, *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*, Bd. 9, Nr. 1, S. 27–39, Feb. 2006.
- [29] D. Anderson und B. J. Phillips, „Comparative in vitro and in vivo effects of antioxidants“, *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.*, Bd. 37, Nr. 9–10, S. 1015–1025, Okt. 1999.

- [30] B. Novotna, J. Topinka, I. Solansky, I. Chvatalova, Z. Lnenickova, und R. J. Sram, „Impact of air pollution and genotype variability on DNA damage in Prague policemen“, *Toxicol. Lett.*, Bd. 172, Nr. 1–2, S. 37–47, Juli 2007.
- [31] Y. Bagryantseva u. a., „Oxidative damage to biological macromolecules in Prague bus drivers and garagemen: Impact of air pollution and genetic polymorphisms“, *Toxicol. Lett.*, Bd. 199, Nr. 1, S. 60–68, Nov. 2010.
- [32] E. Nagy, C. Johansson, M. Zeisig, und L. Möller, „Oxidative stress and DNA damage caused by the urban air pollutant 3-NBA and its isomer 2-NBA in human lung cells analyzed with three independent methods“, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, Bd. 827, Nr. 1, S. 94–103, Nov. 2005.
- [33] R. J. Sram u. a., „Biomarkers of exposure and effect—interpretation in human risk assessment“, *Air Qual. Atmosphere Health*, Bd. 4, Nr. 3–4, S. 161–167, Jan. 2011.
- [34] R. J. Sram, B. Binkova, und P. Rossner, „Vitamin C for DNA damage prevention“, *Mutat. Res.*, Bd. 733, Nr. 1–2, S. 39–49, Mai 2012.
- [35] A. C. Carr, B. Z. Zhu, und B. Frei, „Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E)“, *Circ. Res.*, Bd. 87, Nr. 5, S. 349–354, Sep. 2000.
- [36] B. Frei, L. England, und B. N. Ames, „Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma.“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 86, Nr. 16, S. 6377–6381, Aug. 1989.
- [37] H. Sies, „Biochemie des oxidativen Stress“, *Angew. Chem.*, Bd. 98, Nr. 12, S. 1061–1075, Dez. 1986.
- [38] M. Sugiyama, K. Tsuzuki, K. Matsumoto, und R. Ogura, „Effect of vitamin E on cytotoxicity, DNA single strand breaks, chromosomal aberrations, and mutation in Chinese hamster V-79 cells exposed to ultraviolet-B light“, *Photochem. Photobiol.*, Bd. 56, Nr. 1, S. 31–34, Juli 1992.
- [39] D. Bagchi, A. Garg, R. L. Krohn, M. Bagchi, M. X. Tran, und S. J. Stohs, „Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro“, *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, Bd. 95, Nr. 2, S. 179–189, Feb. 1997.
- [40] E. Niki, „Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals“, *Am. J. Clin. Nutr.*, Bd. 54, Nr. 6 Suppl, S. 1119S–1124S, Dez. 1991.
- [41] L. H. Breimer, „Repair of DNA damage induced by reactive oxygen species“, *Free Radic. Res. Commun.*, Bd. 14, Nr. 3, S. 159–171, 1991.
- [42] M. Maiorino, F. F. Chu, F. Ursini, K. J. Davies, J. H. Doroshov, und R. S. Esworthy, „Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is the 18-kDa selenoprotein expressed in human tumor cell lines“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 266, Nr. 12, S. 7728–7732, Apr. 1991.
- [43] E. R. Stadtman und C. N. Oliver, „Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 266, Nr. 4, S. 2005–2008, Feb. 1991.
- [44] I. Sundl u. a., „Antioxidant status of patients on peritoneal dialysis: associations with inflammation and glycoxidative stress“, *Perit. Dial. Int. J. Int. Soc. Perit. Dial.*, Bd. 29, Nr. 1, S. 89–101, Feb. 2009.

- [45] J. Kasapović, S. Pejić, A. Todorović, V. Stojiljković, und S. B. Pajović, „Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages“, *Cell Biochem. Funct.*, Bd. 26, Nr. 6, S. 723–730, Aug. 2008.
- [46] D. Costantini, G. Dell'ariccia, und H.-P. Lipp, „Long flights and age affect oxidative status of homing pigeons (*Columba livia*)“, *J. Exp. Biol.*, Bd. 211, Nr. Pt 3, S. 377–381, Feb. 2008.
- [47] F. Veglia u. a., „Age- and gender-related oxidative status determined in healthy subjects by means of OXY-SCORE, a potential new comprehensive index“, *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.*, Bd. 11, Nr. 6, S. 562–573, Dez. 2006.
- [48] D. Doenecke, *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. Georg Thieme Verlag, 2005.
- [49] M. D. Ferrer, A. Sureda, J. M. Batle, P. Tauler, J. A. Tur, und A. Pons, „Scuba diving enhances endogenous antioxidant defenses in lymphocytes and neutrophils“, *Free Radic. Res.*, Bd. 41, Nr. 3, S. 274–281, März 2007.
- [50] A. Rothfuss und G. Speit, „Investigations on the mechanism of hyperbaric oxygen (HBO)-induced adaptive protection against oxidative stress“, *Mutat. Res.*, Bd. 508, Nr. 1–2, S. 157–165, Okt. 2002.
- [51] C. Dennog, P. Radermacher, Y. A. Barnett, und G. Speit, „Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen“, *Mutat. Res.*, Bd. 428, Nr. 1–2, S. 83–89, Juli 1999.
- [52] D.-C. Tarng, T.-Y. Liu, und T.-P. Huang, „Protective effect of vitamin C on 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine level in peripheral blood lymphocytes of chronic hemodialysis patients“, *Kidney Int.*, Bd. 66, Nr. 2, S. 820–831, Aug. 2004.
- [53] C. M. Gedik, A. Collins, und ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage), „Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study“, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, Bd. 19, Nr. 1, S. 82–84, Jan. 2005.
- [54] P. Møller, M. Viscovich, J. Lykkesfeldt, S. Loft, A. Jensen, und H. E. Poulsen, „Vitamin C supplementation decreases oxidative DNA damage in mononuclear blood cells of smokers“, *Eur. J. Nutr.*, Bd. 43, Nr. 5, S. 267–274, Okt. 2004.
- [55] B. A. Freeman und J. D. Crapo, „Biology of disease: free radicals and tissue injury“, *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, Bd. 47, Nr. 5, S. 412–426, Nov. 1982.
- [56] K. Linhart, H. Bartsch, und H. K. Seitz, „The role of reactive oxygen species (ROS) and cytochrome P-450 2E1 in the generation of carcinogenic etheno-DNA adducts“, *Redox Biol.*, Bd. 3C, S. 56–62, 2014.
- [57] S. B. Astley, R. M. Elliott, D. B. Archer, und S. Southon, „Increased cellular carotenoid levels reduce the persistence of DNA single-strand breaks after oxidative challenge“, *Nutr. Cancer*, Bd. 43, Nr. 2, S. 202–213, 2002.
- [58] B. Halliwell und M. Whiteman, „Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?“, *Br. J. Pharmacol.*, Bd. 142, Nr. 2, S. 231–255, Mai 2004.

- [59] R. Kontek, B. Kontek, und K. Grzegorzcyk, „Vitamin C modulates DNA damage induced by hydrogen peroxide in human colorectal adenocarcinoma cell lines (HT29) estimated by comet assay in vitro“, *Arch. Med. Sci. AMS*, Bd. 9, Nr. 6, S. 1006–1012, Dez. 2013.
- [60] S. A. Weitzman, P. W. Turk, D. H. Milkowski, und K. Kozlowski, „Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation.“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 91, Nr. 4, S. 1261–1264, Feb. 1994.
- [61] A. R. Collins u. a., „The comet assay: topical issues“, *Mutagenesis*, Bd. 23, Nr. 3, S. 143–151, Mai 2008.
- [62] H. C. Birboim, „DNA strand breaks in human leukocytes induced by superoxide anion, hydrogen peroxide and tumor promoters are repaired slowly compared to breaks induced by ionizing radiation“, *Carcinogenesis*, Bd. 7, Nr. 9, S. 1511–1517, Sep. 1986.
- [63] B. Halliwell und O. I. Aruoma, „DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems“, *FEBS Lett.*, Bd. 281, Nr. 1–2, S. 9–19, Apr. 1991.
- [64] D. Harman, „The Free Radical Theory of Aging“, *Antioxid. Redox Signal.*, Bd. 5, Nr. 5, S. 557–561, Okt. 2003.
- [65] H. E. Poulsen, H. Prieme, und S. Loft, „Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion“, *Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ. ECP*, Bd. 7, Nr. 1, S. 9–16, Feb. 1998.
- [66] L. Packer, *Vitamin C in Health and Disease*. CRC Press, 1997.
- [67] A. Gupta, S. F. Rosenberger, und G. T. Bowden, „Increased ROS levels contribute to elevated transcription factor and MAP kinase activities in malignantly progressed mouse keratinocyte cell lines“, *Carcinogenesis*, Bd. 20, Nr. 11, S. 2063–2073, Nov. 1999.
- [68] M. Gröger, „Einfluss einer Beatmung mit 100% Sauerstoff auf die Ausbildung von DNA-Strangbrüchen und die Parameter des oxidativen Stress im Langzeitmodell des septischen Schocks beim Schwein [Elektronische Ressource] / vorgelegt von Michael Gröger“, Online-Ressource, 2007.
- [69] L. Lyras, N. J. Cairns, A. Jenner, P. Jenner, und B. Halliwell, „An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer’s disease“, *J. Neurochem.*, Bd. 68, Nr. 5, S. 2061–2069, Mai 1997.
- [70] T. Aguirre, G. Matthijs, W. Robberecht, P. Tilkin, und J. J. Cassiman, „Mutational analysis of the Cu/Zn superoxide dismutase gene in 23 familial and 69 sporadic cases of amyotrophic lateral sclerosis in Belgium“, *Eur. J. Hum. Genet. EJHG*, Bd. 7, Nr. 5, S. 599–602, Juli 1999.
- [71] R. J. Ragusa, C. K. Chow, und J. D. Porter, „Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy“, *Neuromuscul. Disord. NMD*, Bd. 7, Nr. 6–7, S. 379–386, Sep. 1997.
- [72] J. M. McCord, „Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase“, *Science*, Bd. 185, Nr. 4150, S. 529–531, Aug. 1974.

- [73] A. Vaile, G. Jadot, und A. Elizagaray, „Anti-inflammatory activity of various superoxide dismutases on polyarthritis in the Lewis rat“, *Biochem. Pharmacol.*, Bd. 39, Nr. 2, S. 247–255, Jan. 1990.
- [74] J. S. Warren, K. R. Yabroff, D. M. Mandel, K. J. Johnson, und P. A. Ward, „Role of O₂⁻ in neutrophil recruitment into sites of dermal and pulmonary vasculitis“, *Free Radic. Biol. Med.*, Bd. 8, Nr. 2, S. 163–172, 1990.
- [75] S. V. Shah, „The role of reactive oxygen metabolites in glomerular disease“, *Annu. Rev. Physiol.*, Bd. 57, S. 245–262, 1995.
- [76] I. K. Mohan und U. N. Das, „Oxidant stress, anti-oxidants and essential fatty acids in systemic lupus erythematosus“, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, Bd. 56, Nr. 3, S. 193–198, März 1997.
- [77] B. A. Omar und J. M. McCord, „Interstitial equilibration of superoxide dismutase correlates with its protective effect in the isolated rabbit heart“, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, Bd. 23, Nr. 2, S. 149–159, Feb. 1991.
- [78] U. P. Steinbrecher, H. F. Zhang, und M. Lougheed, „Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis“, *Free Radic. Biol. Med.*, Bd. 9, Nr. 2, S. 155–168, 1990.
- [79] K. Baker, C. B. Marcus, K. Huffman, H. Kruk, B. Malfroy, und S. R. Doctrow, „Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: a key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury“, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Bd. 284, Nr. 1, S. 215–221, Jan. 1998.
- [80] D. Ziech, R. Franco, A. Pappa, und M. I. Panayiotidis, „Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis“, *Mutat. Res.*, Bd. 711, Nr. 1–2, S. 167–173, Juni 2011.
- [81] M. N. Diaz, B. Frei, J. A. Vita, und J. F. Keaney, „Antioxidants and atherosclerotic heart disease“, *N. Engl. J. Med.*, Bd. 337, Nr. 6, S. 408–416, Aug. 1997.
- [82] H. F. Goode, H. C. Cowley, B. E. Walker, P. D. Howdle, und N. R. Webster, „Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction“, *Crit. Care Med.*, Bd. 23, Nr. 4, S. 646–651, Apr. 1995.
- [83] C. J. Schorah *u. a.*, „Total vitamin C, ascorbic acid, and dehydroascorbic acid concentrations in plasma of critically ill patients.“, *Am. J. Clin. Nutr.*, Bd. 63, Nr. 5, S. 760–765, Jan. 1996.
- [84] R. H. Demling und C. Lalonde, „Systemic lipid peroxidation and inflammation induced by thermal injury persists into the post-resuscitation period“, *J. Trauma*, Bd. 30, Nr. 1, S. 69–74, Jan. 1990.
- [85] T. T. Nguyen *u. a.*, „Free radical activity and loss of plasma antioxidants, vitamin E, and sulfhydryl groups in patients with burns: the 1993 Moyer Award“, *J. Burn Care Rehabil.*, Bd. 14, Nr. 6, S. 602–609, Dez. 1993.
- [86] E. Barquist *u. a.*, „The impact of antioxidant and splanchnic-directed therapy on persistent uncorrected gastric mucosal pH in the critically injured trauma patient“, *J. Trauma*, Bd. 44, Nr. 2, S. 355–360, Feb. 1998.
- [87] J. Krutmann, H. Hönigsmann, und C. A. Elmets, *Dermatological Phototherapy and Photodiagnostic Methods*. Springer Science & Business Media, 2008.

- [88] F. Breuckmann, T. Gambichler, P. Altmeyer, und A. Kreuter, „UVA/UVA1 phototherapy and PUVA photochemotherapy in connective tissue diseases and related disorders: a research based review“, *BMC Dermatol.*, Bd. 4, S. 11, Sep. 2004.
- [89] H. S. Taper, A. Keyeux, und M. Roberfroid, „Potentiation of radiotherapy by nontoxic pretreatment with combined vitamins C and K3 in mice bearing solid transplantable tumor“, *Anticancer Res.*, Bd. 16, Nr. 1, S. 499–503, Feb. 1996.
- [90] H. Wei, Q. Cai, L. Tian, und M. Lebowitz, „Tamoxifen reduces endogenous and UV light-induced oxidative damage to DNA, lipid and protein in vitro and in vivo“, *Carcinogenesis*, Bd. 19, Nr. 6, S. 1013–1018, Juni 1998.
- [91] D.-F. Zhou, W.-Z. Ke, N.-F. Chen, und K. Ji, „[Effects of different levels of vitamin C on UV radiation-induced DNA damage]“, *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi Guang Pu*, Bd. 25, Nr. 12, S. 2012–2015, Dez. 2005.
- [92] L. C. Yong u. a., „Increased frequency of chromosome translocations in airline pilots with long-term flying experience“, *Occup. Environ. Med.*, Bd. 66, Nr. 1, S. 56–62, Jan. 2009.
- [93] P. L. Olive, G. Frazer, und J. P. Banáth, „Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay“, *Radiat. Res.*, Bd. 136, Nr. 1, S. 130–136, Okt. 1993.
- [94] O. Ostling und K. J. Johanson, „Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Bd. 123, Nr. 1, S. 291–298, Aug. 1984.
- [95] J. Verrax und P. B. Calderon, „The controversial place of vitamin C in cancer treatment“, *Biochem. Pharmacol.*, Bd. 76, Nr. 12, S. 1644–1652, Dez. 2008.
- [96] D. Anderson, T.-W. Yu, B. J. Phillips, und P. Schmezer, „The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay“, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, Bd. 307, Nr. 1, S. 261–271, Mai 1994.
- [97] K. C. Teixeira u. a., „Attenuation of bleomycin-induced lung injury and oxidative stress by N-acetylcysteine plus deferoxamine“, *Pulm. Pharmacol. Ther.*, Bd. 21, Nr. 2, S. 309–316, 2008.
- [98] S. Cadenas, C. Rojas, und G. Barja, „Endotoxin increases oxidative injury to proteins in guinea pig liver: protection by dietary vitamin C“, *Pharmacol. Toxicol.*, Bd. 82, Nr. 1, S. 11–18, Jan. 1998.
- [99] A. R. Collins, A. G. Ma, und S. J. Duthie, „The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells“, *Mutat. Res.*, Bd. 336, Nr. 1, S. 69–77, Jan. 1995.
- [100] A. Azqueta, S. Costa, Y. Lorenzo, N. E. Bastani, und A. R. Collins, „Vitamin C in Cultured Human (HeLa) Cells: Lack of Effect on DNA Protection and Repair“, *Nutrients*, Bd. 5, Nr. 4, S. 1200–1217, Apr. 2013.
- [101] A. Carr und B. Frei, „Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?“, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, Bd. 13, Nr. 9, S. 1007–1024, Juni 1999.
- [102] J. M. Roper, D. J. Mazzatti, R. H. Watkins, W. M. Maniscalco, P. C. Keng, und M. A. O'Reilly, „In vivo exposure to hyperoxia induces DNA damage in a population of alveolar type II epithelial cells“, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, Bd. 286, Nr. 5, S. L1045-1054, Mai 2004.

- [103] M. Gröger u. a., „DNA damage after long-term repetitive hyperbaric oxygen exposure“, *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985, Bd. 106, Nr. 1, S. 311–315, Jan. 2009.
- [104] D. Jamieson, B. Chance, E. Cadenas, und A. Boveris, „The Relation of Free Radical Production to Hyperoxia“, *Annu. Rev. Physiol.*, Bd. 48, Nr. 1, S. 703–719, 1986.
- [105] H. S. Al-Shmgani, R. M. Moate, J. R. Sneyd, P. D. Macnaughton, und A. J. Moody, „Hyperoxia-induced ciliary loss and oxidative damage in an in vitro bovine model: the protective role of antioxidant vitamins E and C“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Bd. 429, Nr. 3–4, S. 191–196, Dez. 2012.
- [106] C. Dennog, A. Hartmann, G. Frey, und G. Speit, „Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy“, *Mutagenesis*, Bd. 11, Nr. 6, S. 605–609, Nov. 1996.
- [107] C. K. Narkowicz, J. H. Vial, und P. W. McCartney, „Hyperbaric oxygen therapy increases free radical levels in the blood of humans“, *Free Radic. Res. Commun.*, Bd. 19, Nr. 2, S. 71–80, 1993.
- [108] A. Rothfuss, C. Dennog, und G. Speit, „Adaptive protection against the induction of oxidative DNA damage after hyperbaric oxygen treatment“, *Carcinogenesis*, Bd. 19, Nr. 11, S. 1913–1917, Nov. 1998.
- [109] A. Rothfuss, P. Radermacher, und G. Speit, „Involvement of heme oxygenase-1 (HO-1) in the adaptive protection of human lymphocytes after hyperbaric oxygen (HBO) treatment“, *Carcinogenesis*, Bd. 22, Nr. 12, S. 1979–1985, Dez. 2001.
- [110] A. Y. Andreyev, Y. E. Kushnareva, und A. A. Starkov, „Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species“, *Biochem. Mosc.*, Bd. 70, Nr. 2, S. 200–214, Feb. 2005.
- [111] B. J. Ganguly, N. Tonomura, R. M. Benson, B. A. Osborne, und E. V. Granowitz, „Hyperbaric oxygen enhances apoptosis in hematopoietic cells“, *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death*, Bd. 7, Nr. 6, S. 499–510, Dez. 2002.
- [112] M. P. Murphy, „How mitochondria produce reactive oxygen species“, *Biochem. J.*, Bd. 417, Nr. Pt 1, S. 1–13, Jan. 2009.
- [113] B. O'Rourke, „Mitochondrial Ion Channels“, *Annu. Rev. Physiol.*, Bd. 69, S. 19–49, 2007.
- [114] P. M. Peixoto, S.-Y. Ryu, und K. W. Kinnally, „Mitochondrial ion channels as therapeutic targets“, *FEBS Lett.*, Bd. 584, Nr. 10, S. 2142–2152, Mai 2010.
- [115] E. Batty, K. Jensen, und P. Freemont, „PML nuclear bodies and their spatial relationships in the mammalian cell nucleus“, *Front. Biosci. Landmark Ed.*, Bd. 14, S. 1182–1196, 2009.
- [116] D. B. Zorov, C. R. Filburn, L. O. Klotz, J. L. Zweier, und S. J. Sollott, „Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes“, *J. Exp. Med.*, Bd. 192, Nr. 7, S. 1001–1014, Okt. 2000.
- [117] N. R. Brady, A. Hamacher-Brady, H. V. Westerhoff, und R. A. Gottlieb, „A wave of reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release in a sea of excitable mitochondria“, *Antioxid. Redox Signal.*, Bd. 8, Nr. 9–10, S. 1651–1665, Okt. 2006.

- [118] V. W. C. Wong, Y. T. Szeto, A. R. Collins, und I. F. F. Benzie, „The comet assay : a biomonitoring tool for nutraceutical research“, 2005.
- [119] A. Hartmann, U. Plappert, K. Raddatz, M. Grünert-Fuchs, und G. Speit, „Does physical activity induce DNA damage?“, *Mutagenesis*, Bd. 9, Nr. 3, S. 269–272, Mai 1994.
- [120] G. Speit und A. Hartmann, „The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair“, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, Bd. 314, S. 275–286, 2006.
- [121] G. Speit, C. Dennog, U. Eichhorn, A. Rothfuss, und B. Kaina, „Induction of heme oxygenase-1 and adaptive protection against the induction of DNA damage after hyperbaric oxygen treatment“, *Carcinogenesis*, Bd. 21, Nr. 10, S. 1795–1799, Okt. 2000.
- [122] G. Speit, C. Dennog, und L. Lampl, „Biological significance of DNA damage induced by hyperbaric oxygen“, *Mutagenesis*, Bd. 13, Nr. 1, S. 85–87, Jan. 1998.
- [123] R. R. Tice u. a., „Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing“, *Environ. Mol. Mutagen.*, Bd. 35, Nr. 3, S. 206–221, 2000.
- [124] N. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice, und E. L. Schneider, „A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells“, *Exp. Cell Res.*, Bd. 175, Nr. 1, S. 184–191, März 1988.
- [125] A. R. Collins, „The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations“, *Mol. Biotechnol.*, Bd. 26, Nr. 3, S. 249–261, März 2004.
- [126] „Interkalation (Chemie)“, *Wikipedia*. 19-Juni-2014.
- [127] A. Remde, *Mikrobiologische Charakterisierung aquatischer Sedimente: Methodensammlung*. Oldenbourg Industrieverlag, 1998.
- [128] C. Ersson, I. Odar-Cederlöf, I. Fehrman-Ekholm, und L. Möller, „The effects of hemodialysis treatment on the level of DNA strand breaks and oxidative DNA lesions measured by the comet assay“, *Hemodial. Int. Int. Symp. Home Hemodial.*, Bd. 17, Nr. 3, S. 366–373, Juli 2013.
- [129] P. L. Olive, J. P. Banáth, und R. E. Durand, „Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Measured Using the ‚Comet‘ Assay“, *Radiat. Res.*, Bd. 122, Nr. 1, S. 86–94, Apr. 1990.
- [130] T. L. Duarte und J. Lunec, „ReviewPart of the Series: From Dietary Antioxidants to Regulators in Cellular Signalling and Gene ExpressionReview: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C“, *Free Radic. Res.*, Bd. 39, Nr. 7, S. 671–686, Jan. 2005.
- [131] D. Anderson, B. J. Phillips, T. W. Yu, A. J. Edwards, R. Ayesh, und K. R. Butterworth, „The effects of vitamin C supplementation on biomarkers of oxygen radical generated damage in human volunteers with ‚low‘ or ‚high‘ cholesterol levels“, *Environ. Mol. Mutagen.*, Bd. 30, Nr. 2, S. 161–174, 1997.
- [132] G. Bartosz, *Food Oxidants and Antioxidants: Chemical, Biological, and Functional Properties*. CRC Press, 2013.

- [133] „Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma und Leukozyten mit HPLC/UV und HPLC/EC: Methodenentwicklung, Validierung und Anwendung - Deutsche Digitale Bibliothek“. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.deutsche-digitale-bibliothek.de/item/KUAL53C3WQE2AYILOU45MAAXX3LUM3U6>. [Zugegriffen: 05-Apr-2015].
- [134] I. B. Chatterjee, G. C. Chatterjee, N. C. Ghosh, J. J. Ghosh, und B. C. Guha, „Biological synthesis of l-ascorbic acid in animal tissues: conversion of l-gulonolactone into l-ascorbic acid“, *Biochem. J.*, Bd. 74, Nr. 1, S. 193–203, Jan. 1960.
- [135] A. M. Bode, L. Cunningham, und R. C. Rose, „Spontaneous decay of oxidized ascorbic acid (dehydro-L-ascorbic acid) evaluated by high-pressure liquid chromatography“, *Clin. Chem.*, Bd. 36, Nr. 10, S. 1807–1809, Okt. 1990.
- [136] R. F. Cathcart, „Vitamin C: the nontoxic, nonrate-limited, antioxidant free radical scavenger“, *Med. Hypotheses*, Bd. 18, Nr. 1, S. 61–77, Sep. 1985.
- [137] C. Leitzmann, *Ernährung in Prävention und Therapie: ein Lehrbuch ; 165 Tabellen*. Georg Thieme Verlag, 2003.
- [138] A. Bendich, „Antioxidant micronutrients and immune responses“, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Bd. 587, S. 168–180, 1990.
- [139] H. Tsukaguchi *u. a.*, „A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters“, *Nature*, Bd. 399, Nr. 6731, S. 70–75, Mai 1999.
- [140] J. M. May, C. E. Cobb, S. Mendiratta, K. E. Hill, und R. F. Burk, „Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 273, Nr. 36, S. 23039–23045, Sep. 1998.
- [141] A. Helen und P. L. Vijayammal, „Vitamin C supplementation on hepatic oxidative stress induced by cigarette smoke“, *J. Appl. Toxicol. JAT*, Bd. 17, Nr. 5, S. 289–295, Okt. 1997.
- [142] R.-M. Han, J.-P. Zhang, und L. H. Skibsted, „Reaction Dynamics of Flavonoids and Carotenoids as Antioxidants“, *Molecules*, Bd. 17, Nr. 2, S. 2140–2160, Feb. 2012.
- [143] D. Naidoo und O. Lux, „The effect of vitamin C and E supplementation on lipid and urate oxidation products in plasma“, *Nutr. Res.*, Bd. 18, Nr. 6, S. 953–961, Juni 1998.
- [144] S. Cadenas, S. Lertsiri, M. Otsuka, G. Barja, und T. Miyazawa, „Phospholipid hydroperoxides and lipid peroxidation in liver and plasma of ODS rats supplemented with alpha-tocopherol and ascorbic acid“, *Free Radic. Res.*, Bd. 24, Nr. 6, S. 485–493, Juni 1996.
- [145] T. Yamaguchi *u. a.*, „Bilirubin oxidation provoked by endotoxin treatment is suppressed by feeding ascorbic acid in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid“, *Eur. J. Biochem. FEBS*, Bd. 245, Nr. 2, S. 233–240, Apr. 1997.

- [146] F. Shang *u. a.*, „Vitamin C prevents hyperbaric oxygen-induced growth retardation and lipid peroxidation and attenuates the oxidation-induced up-regulation of glutathione in guinea pigs“, *J. Nutr. Biochem.*, Bd. 13, Nr. 5, S. 307–313, Mai 2002.
- [147] I. D. Podmore, H. R. Griffiths, K. E. Herbert, N. Mistry, P. Mistry, und J. Lunec, „Vitamin C exhibits pro-oxidant properties“, *Nature*, Bd. 392, Nr. 6676, S. 559, Apr. 1998.
- [148] M. Levine, R. C. Daruwala, J. B. Park, S. C. Rumsey, und Y. Wang, „Does vitamin C have a pro-oxidant effect?“, *Nature*, Bd. 395, Nr. 6699, S. 231; author reply 232, Sep. 1998.
- [149] N. Bader *u. a.*, „Effect of hyperbaric oxygen and vitamin C and E supplementation on biomarkers of oxidative stress in healthy men“, *Br. J. Nutr.*, Bd. 98, Nr. 4, S. 826–833, Okt. 2007.
- [150] A. Rehman *u. a.*, „The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Bd. 246, Nr. 1, S. 293–298, Mai 1998.
- [151] W. Friedberg, K. Copeland, F. E. Duke, J. S. Nicholas, E. B. Darden, und K. O'Brien, „Radiation exposure of aircrews“, *Occup. Med. Phila. Pa.*, Bd. 17, Nr. 2, S. 293–309, v, Juni 2002.
- [152] M. Dusinská *u. a.*, „Nutritional supplementation with antioxidants decreases chromosomal damage in humans“, *Mutagenesis*, Bd. 18, Nr. 4, S. 371–376, Juli 2003.
- [153] M. Reilly, N. Delanty, J. A. Lawson, und G. A. FitzGerald, „Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers“, *Circulation*, Bd. 94, Nr. 1, S. 19–25, Juli 1996.
- [154] K. F. Gey, „Ten-year retrospective on the antioxidant hypothesis of arteriosclerosis: Threshold plasma levels of antioxidant micronutrients related to minimum cardiovascular risk“, *J. Nutr. Biochem.*, Bd. 6, Nr. 4, S. 206–236, Apr. 1995.
- [155] A. Fischer-Nielsen, H. E. Poulsen, und S. Loft, „8-Hydroxydeoxyguanosine in vitro: effects of glutathione, ascorbate, and 5-aminosalicylic acid“, *Free Radic. Biol. Med.*, Bd. 13, Nr. 2, S. 121–126, 1992.
- [156] E. S. Fiala, R. S. Sodum, M. Bhattacharya, und H. Li, „(-)-Epigallocatechin gallate, a polyphenolic tea antioxidant, inhibits peroxynitrite-mediated formation of 8-oxodeoxyguanosine and 3-nitrotyrosine“, *Experientia*, Bd. 52, Nr. 9, S. 922–926, Sep. 1996.
- [157] E. A. Lutsenko, J. M. Cárcamo, und D. W. Golde, „Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 277, Nr. 19, S. 16895–16899, Mai 2002.
- [158] M. Noroozi, W. J. Angerson, und M. E. Lean, „Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes“, *Am. J. Clin. Nutr.*, Bd. 67, Nr. 6, S. 1210–1218, Juni 1998.
- [159] J. W. Crott und M. Fenech, „Effect of vitamin C supplementation on chromosome damage, apoptosis and necrosis ex vivo“, *Carcinogenesis*, Bd. 20, Nr. 6, S. 1035–1041, Juni 1999.
- [160] L. A. Brennan, G. M. Morris, G. R. Wasson, B. M. Hannigan, und Y. A. Barnett, „The effect of vitamin C or vitamin E supplementation on basal and H₂O₂-induced DNA damage in human lymphocytes“, *Br. J. Nutr.*, Bd. 84, Nr. 2, S. 195–202, Aug. 2000.

- [161] A. Brevik *u. a.*, „Supplementation of a western diet with golden kiwifruits (*Actinidia chinensis* var. 'Hort 16A') effects on biomarkers of oxidation damage and antioxidant protection“, *Nutr. J.*, Bd. 10, S. 54, 2011.
- [162] I. M. C. M. Rietjens *u. a.*, „The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids“, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, Bd. 11, Nr. 3–4, S. 321–333, Juli 2002.
- [163] R. Drouin *u. a.*, „Cupric ion/ascorbate/hydrogen peroxide-induced DNA damage: DNA-bound copper ion primarily induces base modifications“, *Free Radic. Biol. Med.*, Bd. 21, Nr. 3, S. 261–273, 1996.
- [164] M. L. Hu und M. K. Shih, „Ascorbic acid inhibits lipid peroxidation but enhances DNA damage in rat liver nuclei incubated with iron ions“, *Free Radic. Res.*, Bd. 26, Nr. 6, S. 585–592, Juni 1997.
- [165] N. P. Singh, „Sodium ascorbate induces DNA single-strand breaks in human cells in vitro“, *Mutat. Res.*, Bd. 375, Nr. 2, S. 195–203, Apr. 1997.
- [166] M. H. Green, J. E. Lowe, A. P. Waugh, K. E. Aldridge, J. Cole, und C. F. Arlett, „Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells“, *Mutat. Res.*, Bd. 316, Nr. 2, S. 91–102, Aug. 1994.
- [167] T. Bergström, J. Bergman, und L. Möller, „Vitamin A and C compounds permitted in supplements differ in their abilities to affect cell viability, DNA and the DNA nucleoside deoxyguanosine“, *Mutagenesis*, Bd. 26, Nr. 6, S. 735–744, Nov. 2011.
- [168] T. Bergström, C. Ersson, J. Bergman, und L. Möller, „Vitamins at physiological levels cause oxidation to the DNA nucleoside deoxyguanosine and to DNA--alone or in synergism with metals“, *Mutagenesis*, Bd. 27, Nr. 4, S. 511–517, Juli 2012.
- [169] J. Błasiak, A. Trzeciak, A. Dziki, J. Ułańska, und B. Pander, „Synergistic effect of vitamin C on DNA damage induced by cadmium“, *Gen. Physiol. Biophys.*, Bd. 19, Nr. 4, S. 373–379, Dez. 2000.
- [170] B. Halliwell, „Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo?“, *Free Radic. Res.*, Bd. 25, Nr. 5, S. 439–454, Nov. 1996.
- [171] M. S. Cooke *u. a.*, „Novel repair action of vitamin C upon in vivo oxidative DNA damage“, *FEBS Lett.*, Bd. 439, Nr. 3, S. 363–367, Nov. 1998.
- [172] A. R. Proteggente, T. G. England, C. A. Rice-Evans, und B. Halliwell, „Iron supplementation and oxidative damage to DNA in healthy individuals with high plasma ascorbate“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Bd. 288, Nr. 1, S. 245–251, Okt. 2001.
- [173] S. Kc, J. M. Cárcamo, und D. W. Golde, „Vitamin C enters mitochondria via facilitative glucose transporter 1 (Glut1) and confers mitochondrial protection against oxidative injury“, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, Bd. 19, Nr. 12, S. 1657–1667, Okt. 2005.
- [174] M. Khassaf *u. a.*, „Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle“, *J. Physiol.*, Bd. 549, Nr. Pt 2, S. 645–652, Juni 2003.

- [175] H. J. Boxberger, *Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur: Einführung in Grundlagen und Techniken*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2006.
- [176] I. Rodrigues Siqueira, C. Fochesatto, I. L. da Silva Torres, C. Dalmaz, und C. Alexandre Netto, „Aging affects oxidative state in hippocampus, hypothalamus and adrenal glands of Wistar rats“, *Life Sci.*, Bd. 78, Nr. 3, S. 271–278, Dez. 2005.
- [177] M. Andriollo-Sanchez *u. a.*, „Age-related oxidative stress and antioxidant parameters in middle-aged and older European subjects: the ZENITH study“, *Eur. J. Clin. Nutr.*, Bd. 59, Nr. S2, S. S58–S62, 2005.
- [178] L. L. Ji, „Antioxidants and oxidative stress in exercise“, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N.*, Bd. 222, Nr. 3, S. 283–292, Dez. 1999.
- [179] A. Hartmann, S. Pfulher, C. Dennog, D. Germadnik, A. Pilger, und G. Speit, „Exercise-induced DNA effects in human leukocytes are not accompanied by increased formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine or induction of micronuclei“, *Free Radic. Biol. Med.*, Bd. 24, Nr. 2, S. 245–251, Jan. 1998.
- [180] T. Nguyen-Khoa *u. a.*, „Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment“, *Nephrol. Dial. Transplant.*, Bd. 16, Nr. 2, S. 335–340, Jan. 2001.
- [181] D. J. McKenna, S. R. McKeown, und V. J. McKelvey-Martin, „Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer“, *Mutagenesis*, Bd. 23, Nr. 3, S. 183–190, Mai 2008.
- [182] H. Hoffmann, J. Högel, und G. Speit, „The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis“, *Mutagenesis*, Bd. 20, Nr. 6, S. 455–466, Nov. 2005.
- [183] D. W. Fairbairn, P. L. Olive, und K. L. O'Neill, „The comet assay: a comprehensive review“, *Mutat. Res. Genet. Toxicol.*, Bd. 339, Nr. 1, S. 37–59, Feb. 1995.
- [184] Q. Chen *u. a.*, „Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 102, Nr. 38, S. 13604–13609, Sep. 2005.
- [185] C. I. Rivas *u. a.*, „Increased Uptake and Accumulation of Vitamin C in Human Immunodeficiency Virus 1-infected Hematopoietic Cell Lines“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 272, Nr. 9, S. 5814–5820, Feb. 1997.
- [186] M. Levine, Y. Wang, S. J. Padayatty, und J. Morrow, „A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 98, Nr. 17, S. 9842–9846, Aug. 2001.
- [187] A. Montel-Hagen *u. a.*, „Erythrocyte Glut1 triggers dehydroascorbic acid uptake in mammals unable to synthesize vitamin C“, *Cell*, Bd. 132, Nr. 6, S. 1039–1048, März 2008.
- [188] S. Park *u. a.*, „L-Ascorbic acid induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells via hydrogen peroxide-mediated mechanisms“, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Bd. 36, Nr. 11, S. 2180–2195, Nov. 2004.
- [189] Q. Chen *u. a.*, „Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 105, Nr. 32, S. 11105–11109, Aug. 2008.

- [190] M. C. Putchala, P. Ramani, H. J. Sherlin, P. Premkumar, und A. Natesan, „Ascorbic acid and its pro-oxidant activity as a therapy for tumours of oral cavity -- a systematic review“, *Arch. Oral Biol.*, Bd. 58, Nr. 6, S. 563–574, Juni 2013.
- [191] Y. van Bergen und K. Phillips, „Size Matters“, *J. Exp. Biol.*, Bd. 208, Nr. 9, S. i–iii, Jan. 2005.
- [192] M. Dusinska und A. R. Collins, „The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions“, *Mutagenesis*, Bd. 23, Nr. 3, S. 191–205, Mai 2008.
- [193] D. English und B. R. Andersen, „Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque“, *J. Immunol. Methods*, Bd. 5, Nr. 3, S. 249–252, Aug. 1974.
- [194] H. Nefić, „The genotoxicity of vitamin C in vitro“, *Bosn. J. Basic Med. Sci. Udruženje Basičnih Med. Znan. Assoc. Basic Med. Sci.*, Bd. 8, Nr. 2, S. 141–146, Mai 2008.
- [195] M. J. Müller, *Ernährungsmedizinische Praxis: Methoden - Prävention - Behandlung*. Springer-Verlag, 2007.
- [196] E. J. Hall und A. J. Giaccia, *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- [197] E. I. Azzam, J.-P. Jay-Gerin, und D. Pain, „Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury“, *Cancer Lett.*, Bd. 327, Nr. 1–2, S. 48–60, Dez. 2012.
- [198] S. Schreidl und K. Najafi, „Ermittlung von DNA Schäden in Gunn Ratten mittels Comet Assay“, dipl, uni wien, wien, 2012.
- [199] J. Thacker, „The nature of mutants induced by ionising radiation in cultured hamster cells. III. Molecular characterization of HPRT-deficient mutants induced by gamma-rays or alpha-particles showing that the majority have deletions of all or part of the hprt gene“, *Mutat. Res.*, Bd. 160, Nr. 3, S. 267–275, Mai 1986.
- [200] M. S. Carraway und C. A. Piantadosi, „Oxygen toxicity“, *Respir. Care Clin. N. Am.*, Bd. 5, Nr. 2, S. 265–295, Juni 1999.
- [201] S. J. Duthie, A. Ma, M. A. Ross, und A. R. Collins, „Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes“, *Cancer Res.*, Bd. 56, Nr. 6, S. 1291–1295, März 1996.
- [202] L. Henderson, A. Wolfreys, J. Fedyk, C. Bourner, und S. Windebank, „The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins“, *Mutagenesis*, Bd. 13, Nr. 1, S. 89–94, Jan. 1998.
- [203] W. A. Altemeier und S. E. Sinclair, „Hyperoxia in the intensive care unit: why more is not always better“, *Curr. Opin. Crit. Care*, Bd. 13, Nr. 1, S. 73–78, Feb. 2007.
- [204] P. J. Lee und A. M. K. Choi, „Pathways of cell signaling in hyperoxia“, *Free Radic. Biol. Med.*, Bd. 35, Nr. 4, S. 341–350, Aug. 2003.
- [205] S. Yasuhara u. a., „Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis“, *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, Bd. 51, Nr. 7, S. 873–885, Juli 2003.

- [206] J. Kot, Z. Sićko, und M. Wozniak, „Oxidative stress during oxygen tolerance test“, *Int. Marit. Health*, Bd. 54, Nr. 1–4, S. 117–126, 2003.
- [207] D. F. Tough und J. Sprent, „Lifespan of lymphocytes“, *Immunol. Res.*, Bd. 14, Nr. 1, S. 1–12, 1995.
- [208] P. L. Olive und J. P. Banáth, „The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells“, *Nat. Protoc.*, Bd. 1, Nr. 1, S. 23–29, 2006.
- [209] T. Arai, V. P. Kelly, O. Minowa, T. Noda, und S. Nishimura, „High accumulation of oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanine, in Mmh/Ogg1 deficient mice by chronic oxidative stress“, *Carcinogenesis*, Bd. 23, Nr. 12, S. 2005–2010, Dez. 2002.
- [210] A. Weimann, D. Belling, und H. E. Poulsen, „Quantification of 8-oxo-guanine and guanine as the nucleobase, nucleoside and deoxynucleoside forms in human urine by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 30, Nr. 2, S. e7–e7, Jan. 2002.
- [211] A. Collins, J. Cadet, B. Epe, und C. Gedik, „Problems in the measurement of 8-oxoguanine in human DNA. Report of a workshop, DNA oxidation, held in Aberdeen, UK, 19–21 January, 1997“, *Carcinogenesis*, Bd. 18, Nr. 9, S. 1833–1836, Sep. 1997.
- [212] H. J. Helbock *u. a.*, „DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 95, Nr. 1, S. 288–293, Jan. 1998.
- [213] A. Jenner, T. G. England, O. I. Aruoma, und B. Halliwell, „Measurement of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry: ethanethiol prevents artifactual generation of oxidized DNA bases.“, *Biochem. J.*, Bd. 331, Nr. Pt 2, S. 365–369, Apr. 1998.
- [214] P. L. Olive, D. Wlodek, und J. P. Banáth, „DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis“, *Cancer Res.*, Bd. 51, Nr. 17, S. 4671–4676, Sep. 1991.
- [215] S. Cadenas, G. Barja, H. E. Poulsen, und S. Loft, „Oxidative DNA damage estimated by oxo8dG in the liver of guinea-pigs supplemented with graded dietary doses of ascorbic acid and alpha-tocopherol“, *Carcinogenesis*, Bd. 18, Nr. 12, S. 2373–2377, Dez. 1997.
- [216] V. N. Reddy, F. J. Giblin, L. R. Lin, und B. Chakrapani, „The effect of aqueous humor ascorbate on ultraviolet-B-induced DNA damage in lens epithelium“, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, Bd. 39, Nr. 2, S. 344–350, Feb. 1998.
- [217] A. R. Collins, „Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay“, *Mutat. Res. Mutat. Res.*, Bd. 681, Nr. 1, S. 24–32, Jan. 2009.
- [218] P. J. Lee, J. Alam, G. W. Wiegand, und A. M. Choi, „Overexpression of heme oxygenase-1 in human pulmonary epithelial cells results in cell growth arrest and increased resistance to hyperoxia.“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 93, Nr. 19, S. 10393–10398, Sep. 1996.

- [219] M. H. Ghattas, L. T. Chuang, A. Kappas, und N. G. Abraham, „Protective effect of HO-1 against oxidative stress in human hepatoma cell line (HepG2) is independent of telomerase enzyme activity“, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Bd. 34, Nr. 12, S. 1619–1628, Dez. 2002.
- [220] W. D. Le, W. J. Xie, und S. H. Appel, „Protective role of heme oxygenase-1 in oxidative stress-induced neuronal injury“, *J. Neurosci. Res.*, Bd. 56, Nr. 6, S. 652–658, Juni 1999.
- [221] A. R. Collins, V. L. Dobson, M. Dusinská, G. Kennedy, und R. Stětina, „The comet assay: what can it really tell us?“, *Mutat. Res.*, Bd. 375, Nr. 2, S. 183–193, Apr. 1997.
- [222] L. Forchhammer *u. a.*, „Variation in assessment of oxidatively damaged DNA in mononuclear blood cells by the comet assay with visual scoring“, *Mutagenesis*, Bd. 23, Nr. 3, S. 223–231, Mai 2008.
- [223] G. H. Shaker und N. A. Melake, „Use of the single cell gel electrophoresis (comet assay) for comparing apoptotic effect of conventional antibodies versus nanobodies“, *Saudi Pharm. J. SPJ Off. Publ. Saudi Pharm. Soc.*, Bd. 20, Nr. 3, S. 221–227, Juli 2012.
- [224] A. R. Collins *u. a.*, „DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker“, *Free Radic. Biol. Med.*, Bd. 25, Nr. 3, S. 373–377, Aug. 1998.
- [225] G. Speit, C. Dennog, P. Radermacher, und A. Rothfuss, „Genotoxicity of hyperbaric oxygen“, *Mutat. Res.*, Bd. 512, Nr. 2–3, S. 111–119, Dez. 2002.
- [226] K. Ş. Aylin Üstündağ, „Evaluation of the Genotoxic Effects of Patients Undergoing Hyperbaric Oxygen (HBO) Therapy“, *Turk. J. Pharm. Sci.*, Bd. 11, Nr. 2, S. 203–208, 2014.
- [227] C. Cunningham, *The Frogmen of World War II: An Oral History of the U.S. Navy's Underwater Demolition Teams*. Simon and Schuster, 2007.
- [228] S. Y. Yu *u. a.*, „Preconditioned hyperbaric oxygenation protects the liver against ischemia-reperfusion injury in rats“, *J. Surg. Res.*, Bd. 128, Nr. 1, S. 28–36, Sep. 2005.
- [229] H. Nie, L. Z. Xiong, N. Lao, S. Y. Chen, N. Xu, und Z. H. Zhu, „Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against spinal cord ischemia by upregulation of antioxidant enzymes in rabbits“, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, Bd. 26, Nr. 5, S. 666–674, Mai 2006.
- [230] J. Z. Yogaratnam *u. a.*, „Hyperbaric oxygen: a new drug in myocardial revascularization and protection?“, *Cardiovasc. Revascularization Med. Mol. Interv.*, Bd. 7, Nr. 3, S. 146–154, Sep. 2006.
- [231] J. Z. Yogaratnam, G. Laden, L. Guvendik, M. Cowen, A. Cale, und S. Griffin, „Hyperbaric oxygen preconditioning improves myocardial function, reduces length of intensive care stay, and limits complications post coronary artery bypass graft surgery“, *Cardiovasc. Revasc. Med.*, Bd. 11, Nr. 1, S. 8–19, Jan. 2010.
- [232] J. J. Freiburger, H. B. Suliman, H. X. Sheng, J. McAdoo, C. A. Piantadosi, und D. S. Warner, „A comparison of hyperbaric oxygen versus hypoxic cerebral preconditioning in neonatal rats“, *Brain Res.*, Bd. 1075, S. 213–222, Feb. 2006.

- [233] E. Fehrenbach, R. Veith, M. Schmid, H.-H. Dickhuth, H. Northoff, und A. M. Niess, „Inverse response of leukocyte heat shock proteins and DNA damage to exercise and heat“, *Free Radic. Res.*, Bd. 37, Nr. 9, S. 975–982, Sep. 2003.
- [234] A. M. Niess, A. Hartmann, M. GrunertFuchs, B. Poch, und G. Speit, „DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men“, *Int. J. Sports Med.*, Bd. 17, Nr. 6, S. 397–403, Aug. 1996.
- [235] C. D. Schneider, J. Barp, J. L. Ribeiro, A. Belló-Klein, und A. R. Oliveira, „Oxidative stress after three different intensities of running“, *Can. J. Appl. Physiol. Rev. Can. Physiol. Appliquée*, Bd. 30, Nr. 6, S. 723–734, Dez. 2005.
- [236] N. Bader, A. Bosy-Westphal, A. Koch, und M. J. Mueller, „Influence of vitamin C and E supplementation on oxidative stress induced by hyperbaric oxygen in healthy men“, *Ann. Nutr. Metab.*, Bd. 50, Nr. 3, S. 173–176, 2006.
- [237] W. L. Knez, D. G. Jenkins, und J. S. Coombes, „Oxidative stress in half and full Ironman triathletes“, *Med. Sci. Sports Exerc.*, Bd. 39, Nr. 2, S. 283–288, Feb. 2007.
- [238] M. Dékány, V. Nemeskéri, I. Györe, I. Harbula, J. Malomsoki, und J. Pucsok, „Antioxidant status of interval-trained athletes in various sports“, *Int. J. Sports Med.*, Bd. 27, Nr. 2, S. 112–116, Feb. 2006.
- [239] C. M. Muth, Y. Glenz, M. Klaus, P. Radermacher, G. Speit, und X. Leverage, „Influence of an orally effective SOD on hyperbaric oxygen-related cell damage“, *Free Radic. Res.*, Bd. 38, Nr. 9, S. 927–932, Sep. 2004.
- [240] S. J. Padayatty u. a., „Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use“, *Ann. Intern. Med.*, Bd. 140, Nr. 7, S. 533–537, Apr. 2004.
- [241] M. Levine u. a., „Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Bd. 93, Nr. 8, S. 3704–3709, Apr. 1996.
- [242] H. D. Riordan u. a., „Intravenous ascorbic acid: protocol for its application and use“, *P. R. Health Sci. J.*, Bd. 22, Nr. 3, S. 287–290, Sep. 2003.
- [243] J. J. Casciari, N. H. Riordan, T. L. Schmidt, X. L. Meng, J. A. Jackson, und H. D. Riordan, „Cytotoxicity of ascorbate, lipoic acid, and other antioxidants in hollow fibre in vitro tumours“, *Br. J. Cancer*, Bd. 84, Nr. 11, S. 1544–1550, Juni 2001.
- [244] K. Wong, C. Thomson, R. R. Bailey, S. McDiarmid, und J. Gardner, „Acute oxalate nephropathy after a massive intravenous dose of vitamin C“, *Aust. N. Z. J. Med.*, Bd. 24, Nr. 4, S. 410–411, Aug. 1994.
- [245] A. De Flora, U. Benatti, A. Morelli, und L. Guida, „Oxidant damage of normal and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient red blood cells is enhanced by iron-EDTA complex“, *Biochem. Int.*, Bd. 7, Nr. 3, S. 281–290, Sep. 1983.
- [246] J. M. Rivers, „Safety of high-level vitamin C ingestion“, *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Suppl. Int. Z. Für Vitam.-Ernährungsforschung Suppl.*, Bd. 30, S. 95–102, 1989.

- [247] G. R. Buettner, „The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate“, *Arch. Biochem. Biophys.*, Bd. 300, Nr. 2, S. 535–543, Feb. 1993.
- [248] J. M. May, S. Mendiratta, K. E. Hill, und R. F. Burk, „Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 272, Nr. 36, S. 22607–22610, Sep. 1997.
- [249] B. S. Winkler, „Unequivocal evidence in support of the nonenzymatic redox coupling between glutathione/glutathione disulfide and ascorbic acid/dehydroascorbic acid“, *Biochim. Biophys. Acta*, Bd. 1117, Nr. 3, S. 287–290, Okt. 1992.
- [250] B. S. Winkler, „In vitro oxidation of ascorbic acid and its prevention by GSH“, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, Bd. 925, Nr. 3, S. 258–264, Sep. 1987.
- [251] Y. H. Siddique, T. Beg, und M. Afzal, „Protective effect of ascorbic acid against oxidative damage induced by hydrogen peroxide in cultured human peripheral blood lymphocytes“, *Indian J. Clin. Biochem.*, Bd. 24, Nr. 3, S. 294–300, Sep. 2009.
- [252] W. L. Boatright, „Oxygen dependency of one-electron reactions generating ascorbate radicals and hydrogen peroxide from ascorbic acid“, *Food Chem.*, Bd. 196, S. 1361–1367, Apr. 2016.
- [253] S. Miyamoto, G. R. Martinez, M. H. G. Medeiros, und P. Di Mascio, „Singlet molecular oxygen generated by biological hydroperoxides“, *J. Photochem. Photobiol. B*, Bd. 139, S. 24–33, Okt. 2014.
- [254] P. T. Chou und A. U. Khan, „L-ascorbic acid quenching of singlet delta molecular oxygen in aqueous media: generalized antioxidant property of vitamin C“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Bd. 115, Nr. 3, S. 932–937, Sep. 1983.
- [255] G. G. Kramarenko, S. G. Hummel, S. M. Martin, und G. R. Buettner, „Ascorbate Reacts with Singlet Oxygen to Produce Hydrogen Peroxide“, *Photochem. Photobiol.*, Bd. 82, Nr. 6, S. 1634–1637, 2006.
- [256] K. Chen, J. Suh, A. C. Carr, J. D. Morrow, J. Zeind, und B. Frei, „Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload“, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, Bd. 279, Nr. 6, S. E1406–1412, Dez. 2000.
- [257] M. H. Stipanuk und M. A. Caudill, *Biochemical, Physiological, and Molecular Aspects of Human Nutrition*. Elsevier Health Sciences, 2013.
- [258] K. N. Prasad, P. K. Sinha, M. Ramanujam, und A. Sakamoto, „Sodium ascorbate potentiates the growth inhibitory effect of certain agents on neuroblastoma cells in culture“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 76, Nr. 2, S. 829–832, Feb. 1979.
- [259] C. H. Park, M. Amare, M. A. Savin, und B. Hoogstraten, „Growth suppression of human leukemic cells in vitro by L-ascorbic acid“, *Cancer Res.*, Bd. 40, Nr. 4, S. 1062–1065, Apr. 1980.
- [260] J. Verrax *u. a.*, „Redox-active quinones and ascorbate: an innovative cancer therapy that exploits the vulnerability of cancer cells to oxidative stress“, *Anticancer Agents Med. Chem.*, Bd. 11, Nr. 2, S. 213–221, Feb. 2011.

- [261] L. Benade, T. Howard, und D. Burk, „Synergistic killing of Ehrlich ascites carcinoma cells by ascorbate and 3-amino-1,2,4,-triazole“, *Oncology*, Bd. 23, Nr. 1, S. 33–43, 1969.
- [262] C. M. Kurbacher, U. Wagner, B. Kolster, P. E. Andreotti, D. Krebs, und H. W. Bruckner, „Ascorbic acid (vitamin C) improves the antineoplastic activity of doxorubicin, cisplatin, and paclitaxel in human breast carcinoma cells in vitro“, *Cancer Lett.*, Bd. 103, Nr. 2, S. 183–189, Juni 1996.
- [263] J. Suh, B.-Z. Zhu, und B. Frei, „Ascorbate does not act as a pro-oxidant towards lipids and proteins in human plasma exposed to redox-active transition metal ions and hydrogen peroxide“, *Free Radic. Biol. Med.*, Bd. 34, Nr. 10, S. 1306–1314, Mai 2003.
- [264] T. M. Berger *u. a.*, „Antioxidant activity of vitamin C in iron-overloaded human plasma“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 272, Nr. 25, S. 15656–15660, Juni 1997.
- [265] B. H. Collins, A. Horská, P. M. Hotten, C. Riddoch, und A. R. Collins, „Kiwifruit protects against oxidative DNA damage in human cells and in vitro“, *Nutr. Cancer*, Bd. 39, Nr. 1, S. 148–153, 2001.
- [266] S. Guarnieri, P. Riso, und M. Porrini, „Orange juice vs vitamin C: effect on hydrogen peroxide-induced DNA damage in mononuclear blood cells“, *Br. J. Nutr.*, Bd. 97, Nr. 4, S. 639–643, Apr. 2007.
- [267] O. Altas und A.-S. Haffor, „Effects of hyperoxia periodic training on free radicals production, biological antioxidants potential and lactate dehydrogenase activity in the lungs of rats, *Rattus norvegicus*“, *Saudi J. Biol. Sci.*, Bd. 17, Nr. 1, S. 65–71, Jan. 2010.
- [268] Y.-C. Wang, S. Zhang, T.-Y. Du, B. Wang, und X.-Q. Sun, „Hyperbaric oxygen preconditioning reduces ischemia–reperfusion injury by stimulating autophagy in neurocyte“, *Brain Res.*, Bd. 1323, S. 149–151, Apr. 2010.
- [269] S. Silbernagl, *Taschenatlas Physiologie*. Georg Thieme Verlag, 2012.
- [270] S. Schmitz, *Der Experimentator: Zellkultur*, 3., Überarb. u. erg. Aufl. 2011. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2011.
- [271] L. A. Clark und R. E. Moon, „Hyperbaric oxygen in the treatment of life-threatening soft-tissue infections“, *Respir. Care Clin. N. Am.*, Bd. 5, Nr. 2, S. 203–219, Juni 1999.
- [272] P. M. Tibbles und J. S. Edelsberg, „Hyperbaric-Oxygen Therapy“, *N. Engl. J. Med.*, Bd. 334, Nr. 25, S. 1642–1648, Juni 1996.
- [273] G. Oriani, A. Marroni, und F. Wattel, *Handbook on Hyperbaric Medicine*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [274] S.-Y. Chen *u. a.*, „Early hyperbaric oxygen therapy attenuates disease severity in lupus-prone autoimmune (NZB x NZW) F1 mice“, *Clin. Immunol. Orlando Fla*, Bd. 108, Nr. 2, S. 103–110, Aug. 2003.
- [275] A. R. Collins, S. J. Duthie, und V. L. Dobson, „Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA“, *Carcinogenesis*, Bd. 14, Nr. 9, S. 1733–1735, Sep. 1993.

- [276] C. A. R. Dušinská M, „Detection of oxidised purines and UV-induced photoproducts in DNA, by inclusion of lesion-specific enzymes in the comet assay (single cell gell electrophoresis)“, *Altern. Lab. Anim. ATLA*, Bd. 24, S. 405–411, 1996.
- [277] J. M. May, „Vitamin C transport and its role in the central nervous system“, *Subcell. Biochem.*, Bd. 56, S. 85–103, 2012.
- [278] E. A. Lutsenko, J. M. Carcamo, und D. W. Golde, „A Human Sodium-Dependent Vitamin C Transporter 2 Isoform Acts as a Dominant-Negative Inhibitor of Ascorbic Acid Transport“, *Mol. Cell. Biol.*, Bd. 24, Nr. 8, S. 3150–3156, Apr. 2004.
- [279] M. Levine, S. C. Rumsey, R. Daruwala, J. B. Park, und Y. Wang, „Criteria and recommendations for vitamin C intake“, *JAMA*, Bd. 281, Nr. 15, S. 1415–1423, Apr. 1999.
- [280] M.-B. Troadec und J. Kaplan, „Some vertebrates go with the GLO“, *Cell*, Bd. 132, Nr. 6, S. 921–922, März 2008.
- [281] J. C. Vera, C. I. Rivas, J. Fischbarg, und D. W. Golde, „Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid“, *Nature*, Bd. 364, Nr. 6432, S. 79–82, Juli 1993.
- [282] J. C. Vera, C. I. Rivas, R. H. Zhang, C. M. Farber, und D. W. Golde, „Human HL-60 myeloid leukemia cells transport dehydroascorbic acid via the glucose transporters and accumulate reduced ascorbic acid“, *Blood*, Bd. 84, Nr. 5, S. 1628–1634, Sep. 1994.
- [283] Y.-C. Lee, H.-Y. Huang, C.-J. Chang, C.-H. Cheng, und Y.-T. Chen, „Mitochondrial GLUT10 facilitates dehydroascorbic acid import and protects cells against oxidative stress: mechanistic insight into arterial tortuosity syndrome“, *Hum. Mol. Genet.*, Bd. 19, Nr. 19, S. 3721–3733, Okt. 2010.

V. Anhang

A-1 Methodenentwicklung für die Untersuchungen des Einflusses von VC auf DNA-Schäden in PBMCs während einer hyperbaren Oxigenierung

Bevor Untersuchungen mit Vitamin C als potentielles Antioxidans vorgenommen werden konnten, mussten mögliche Stör- und Einflussgrößen (z. B. Waschschritte oder pH-Wert des Nährmediums) evaluiert und quantifiziert werden. Diese Methodenentwicklung ist, gegliedert in die Unterpunkte Methodik (siehe Kapitel A - 1.1), Ergebnisse (siehe Kapitel A - 1.2) und Diskussion, (siehe Kapitel A - 1.3) im Folgenden beschrieben.

A - 1.1 Methoden

I Einfluss von Vitamin C und/ oder CO₂ auf die Pufferkapazität von RPMI-Puffer

Da ein unphysiologischer pH-Bereich die Versuchszellen beeinflussen kann, sollte vor Beginn der Zellversuche überprüft werden, ob und gegebenenfalls in wie weit sich der pH-Wert des verwendeten Probenmediums RPMI in Abhängigkeit von (1.) der Vitamin C-Konzentration bzw. von (2.) der Zeit der Begasung mit CO₂ oder (3.) unter diesen beiden Einflussgrößen verändert. Die Einflussgrößen wurden über die geplanten Konzentrationen bzw. Zeiten hinaus dosiert, um den Einfluss dieser Substanzen umfassend zu prüfen zu. Zudem sollte überprüft werden, in wie weit die dreistündige Begasung mit 400 kPa Sauerstoffdruck in der Experimentaldruckkammer im Anschluss an eine dreistündige Inkubation im Brutschrank den pH-Wert des RPMI-Mediums mit/ohne VC verändert.

1. Einfluss von Vitamin C auf den pH-Wert des Puffers

L-Ascorbinsäure (molare Masse 176,13 g/mol) wurde in industriell gereinigtem Wasser (Ampuva) gelöst und anschließend frischem RPMI-Puffer schrittweise (je 25 µM) zugefügt. Dabei wurde kontinuierlich der pH-Wert des Puffers gemessen und die Farbänderung des im RPMI-Puffer vorhandenen pH-Indikators (Phenolrot) optisch bewertet.

2. Einfluss von Vitamin C bei Inkubation im Brutschrank auf den pH-Wert des Puffers

RPMI-Puffer wurde mit verschiedenen Konzentrationen Ascorbinsäure (0, 50, 100, 200, 400, 500, 1550 µM) versetzt und der pH-Wert wurde bei Raumtemperatur bestimmt. Anschließend wurde die Lösung im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 21% O₂, 74% N₂) inkubiert, wobei jeweils nach 3, 6, 24 und 48 Stunden pH-Wert und Farbveränderung des Puffers gemessen bzw. optisch bewertet wurden. Zur Kontrolle wurden dieselben Parameter bei Inkubation von RPMI-Puffer ohne Vitamin C unter Raumbedingungen bestimmt.

3. Einfluss von Vitamin C bei Inkubation im Brutschrank und anschließender hyperbarer Oxigenierung auf den pH-Wert des Puffers

In diesem Versuchsabschnitt wurde der RPMI-Puffer mit Vitamin C-Konzentrationen von 0, 50, 100, 200, 400 und 500 µM versetzt und anschließend 3 Stunden im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 21% O₂, 74% N₂) inkubiert. Danach wurde das RPMI-Medium 3 Stunden in der Experimentaldruckkammer (siehe Kapitel 3.2) mit 400kPa hyperbarem Sauerstoff begast. Der pH-Wert des Puffers wurde vor und nach der Überdruckbegasung gemessen und die Farbänderung des im RPMI-Puffer vorhandenen pH-Indikators jeweils optisch bewertet.

II Grundlage der Zellversuche - Basislevel der DNA-Schädigung und Zellvitalität in PBMCs

Um die Ergebnisse der folgenden Versuche beurteilen zu können, wurden die PBMCs jedes Versuchsprobanden auf einen Basislevel von DNA-Schädigungen untersucht. Der Basislevel stellte in dieser Experimentalreihe die Menge der DNA-Schäden dar, die ohne zusätzliche Belastung der Versuchszellen mit dem Comet-Assay direkt nach der Blutentnahme und Aufbereitung (Nativproben) in den PBMCs detektierbar waren. Dieser Wert wurde sowohl als Ausgangswert als auch als Indikator verwendet, um überdurchschnittlich stark geschädigte PBMCs von der Untersuchung auszuschließen.

III Wirkung von VC auf PBMCs

In diesem Versuchsabschnitt sollte untersucht werden, ob eine Inkubation von PBMCs mit Vitamin C im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 21% O₂, 74% N₂) zu einer Erhöhung der DNA-Schädigung führt. Hierzu waren drei Experimente notwendig: Es sollte (1.) der mögliche Einfluss eines Waschschrilles zur Entfernung des VC und zum Sammeln der Zellen nach der Inkubation im Brutschrank, (2.) der mögliche Einfluss des Brutschranks allein und schließlich (3.) der von VC im Brutschrank bestimmt werden.

1. Waschschrill zum Sammeln der Zellen

Es wurde zunächst überprüft, ob ein Waschschrill zum Sammeln der Zellen die Anzahl DNA-geschädigter Zellen beeinflusst. Hierzu wurden PBMCs von Probanden aus PG C (siehe Kapitel 3.1) (n=6) nach Aufbereitung (siehe Kapitel 3.4.1) in zwei identische 24-Well-Platte aliquotiert. Die Proben wurden im Brutschrank mit RPMI-Puffer inkubiert und nach 1-6 Stunden Inkubationszeit wurde stündlich die Zellsuspension eines Wells pro Proband zur Auswertung der DNA-Schädigung und Zellschädigung entnommen. Die Proben der einen Wellplatte wurden nach Exposition gewaschen (Zentrifugation 800 g, 37°C, 5 min) und die der zweiten Wellplatte wurden ohne Waschschrill ausgewertet (siehe Kapitel 3.4).

2. Brutschrank ohne VC

Es wurde überprüft, ob die Inkubation von PBMCs im Brutschrank ohne VC zur Änderung der Anzahl DNA-geschädigter PBMCs führt. Hierzu wurden Versuchszellen von Probanden der Probandengruppe C (siehe Kapitel 3.1) (n= 19) nach Aufbereitung (siehe Kapitel 3.4.1) in einer 24-Well-Platte im Brutschrank inkubiert. Über einen Zeitraum von 1-6 Stunden wurde jede Stunde die Suspension eines Wells je Proband entnommen, gewaschen (Zentrifugation 800 g, 37°C, 5 min) und die entstandenen Zellschäden wurden ausgewertet (siehe Kapitel 3.4.1).

3. Brutschrank mit VC

Um zu ermitteln, ob sich die Anzahl DNA-geschädigter PBMCs durch die Inkubation mit verschiedenen VC-Konzentrationen im Brutschrank ändert, wurde das zuvor durchgeführte Experiment (2.) wiederholt (hier n = 22), wobei die Zellsuspension nach Aufbereitung und Aliquotierung mit VC verschiedener Konzentrationen (0, 50, 100, 200, 400 µM) versetzt wurde. Die Auswertung erfolgte nach 1, 2, 3 und 6 Stunden, Proben mit 400 µM Vitamin C wurden nach 1, 3 und 6 Stunden ausgewertet.

IV DNA-Schädigung in Abhängigkeit von der Expositionszeit gegenüber hyperbarem Sauerstoff

In diesem Versuchsabschnitt sollte die Anzahl DNA-geschädigter PBMCs in Abhängigkeit von der Expositionszeit gegenüber hyperbarem Sauerstoff als Grundlage für eine Dosis-Wirkungs-Beziehung gemessen werden. Die Daten sollten dazu dienen, die Experimentalbedingungen und -ergebnisse für die Hauptversuche zu evaluieren. Weiterhin sollten die Daten zum Vergleich der Anzahl DNA-geschädigter Zellen dienen, die bei gleicher Schädigungsdosis in den 24-Well-Platten (Oberfläche: 201,062 mm², Höhe der Flüssigkeitssäule: 4,974 mm, flacher Boden) im Gegensatz zu in den 96-Well-Platten (Oberfläche: 38,485 mm² Höhe der Flüssigkeitssäule: 5,197 mm, Rundboden) (vgl. Kapitel A - 5.5) auftritt. Dazu wurden Versuchszellen von Probanden der Probandengruppe C (siehe Kapitel 3.1) (n = 6) nach Aufbereitung (siehe Kapitel 3.4.1) in eine 24-Well-Platte (4 Wells pro Proband) aliquotiert und nach dreistündiger Inkubation im Brutschrank ohne VC (aus Vergleichsgründen) in der Versuchsdruckkammer (siehe Kapitel 3.2) hyperbarem Sauerstoff (400 kPa) ausgesetzt. Eine identische Wellplatte wurde in der Kontrollkammer (siehe Kapitel 3.2) inkubiert. Nach Expositionszeit von 1,2,3 und 4 Stunden wurden die Zellen gesammelt (Zentrifugation 800 g, 37°C, 5 min) und die Zellschädigung wurde ausgewertet (siehe Kapitel 3.4).

V Einfluss von Pufferzusätzen / Waschschritten auf die Zellschädigung

In diesem Versuchsabschnitt sollte im Hinblick auf notwendige Waschschritte im Rahmen der Inkubation von PBMCs mit VC überprüft werden, ob Waschschritte eine Auswirkung auf die Anzahl DNA-geschädigter PBMCs haben. Weiterhin sollte untersucht werden, ob und gegebenenfalls welchen Einfluss die Zugabe von Pufferzusätzen (BSA, Antibiotikum) auf die DNA-Schädigung hat. Hierzu wurden PBMCs der Probandengruppe C (n = 124) nach Aufbereitung (siehe Kapitel 3.4.1) in zwei identischen 24-Well-Platten aliquotiert und 3 Stunden in RPMI-Puffer im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 21% O₂, 74% N₂) inkubiert. Anschließend wurden die PBMCs 3 Stunden in der Versuchsdruck- bzw. Kontrollkammer (400 kPa bzw. Atmosphärendruck) (siehe Kapitel 3.2) begast.

Es wurden drei verschiedene Untersuchungsmodi gewählt:

1. *vorher waschen*, n = 44: RPMI-Puffer wurde nach Inkubation im Brutschrank (vor der Druckkammerbehandlung) in einer Probe je Proband erneuert (Zentrifugation 800 g, 37°C, 5 min, dann Resuspension in RPMI).
2. *nachher waschen*, n = 46: Nach Beendigung der Begasung in der Druckkammer wurden allein die Zellen der zweiten Probe jedes Probanden gewaschen (Zentrifugation 800 g, 37°C, 5 min).
3. *kein waschen*, n = 124: Diese Proben wurden lediglich mittels Schwerkraft für die Auswertung gesammelt.

Dieser Versuch wurde mit RPMI-Puffer wiederholt, der zu 10% mit BSA und zu 1% mit Antibiotikum (Penicillin/Streptomycin) versetzt wurde.

VI Einfluss von An-/Abwesenheit von VC unter hyperbarer Oxigenierung

In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob es zu unterschiedlich hoher Konzentration DNA-geschädigter Zellen führt, wenn das VC, jeweils nach dreistündiger Vorinkubation, vor der hyperbaren Oxigenierung ausgewaschen oder im Probenmedium belassen wird. Hierzu wurden PBMCs der Probandengruppe C (n = 11) nach Aufbereitung (siehe Kapitel 3.4.1) in eine 24-Well-Platten aliquotiert (6 Wells/Proband) wobei in

jeweils drei Wells 0, 50 oder 200 μM VC dotiert wurden. Nach dreistündiger Inkubation im Brutschrank (37°C , 5% CO_2 , 21% O_2 , 74% N_2) wurde bei je einem Well mit 0, 50 und 200 μM VC pro Proband (Sauerstoffüberdruckbehandlung "ohne" VC im Probenmedium) das Vitamin C herausgewaschen (Zentrifugation 800 g, 37°C , 5 min) und die Zellen wurden in frischen RPMI-Puffer resuspendiert. Die anderen Wells wurden ohne weiteren Zwischenschritt, also "mit" VC im Probenmedium, hyperbarem Sauerstoff (400 kPa) ausgesetzt. Eine zweite 24-Well-Platte wurde identisch vorbereitet und zu Kontrollzwecken gleichzeitig in der Kontrollkammer mit Pressluft (siehe. Kapitel 3.2) begast. Nach Beendigung einer 3 stündigen Expositionszeit wurden alle Proben gewaschen (Zentrifugation 800 g, 37°C , 5 min) und der Auswertung nach Kapitel 3.4 zugeführt. Dieser Versuch wurde mit erhöhtem Druck (500 kPa) in der Versuchsdruckkammer wiederholt.

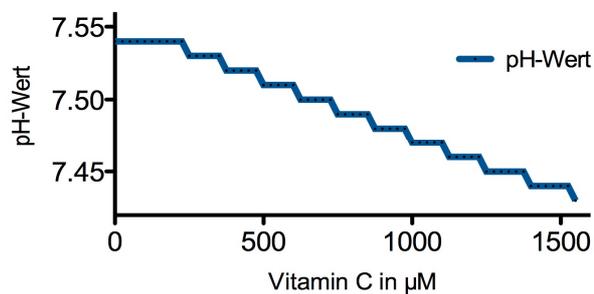
Bei der Bewertung der Ergebnisse dieses Versuchs zeigten sich teilweise signifikante Unterschiede zwischen der DNA-Schädigung in Proben, bei denen das VC vor der hyperbaren Oxigenierung ausgewaschen wurde und denen, in denen das VC für die Sauerstoffüberdruckbehandlung im Probenmedium belassen wurde. Um diese Unterschiede abschließend zu validieren bzw. zu beurteilen, wurden Untersuchungen mit kleinschrittigerer Wahl der VC-Konzentration bei 400 kPa hyperbarer Oxigenierung durchgeführt. Diese genauere Untersuchung sollte klären, ob für die Untersuchung des Einflusses von VC auf die DNA-Schädigung in PBMCs unter hyperbarer Oxigenierung das VC während der hyperbaren Oxigenierung im Probenmedium belassen oder herausgewaschen werden sollte, da dies aus den vorhergehenden Versuchen nicht eindeutig abgeleitet werden konnte. Es wurden hierfür eine 24-Well-Platten mit PBMC-Zellsuspension von Probanden der Probandengruppe C ($n = 17$) befüllt und je Proband zwei Reihen mit jeweils 0, 50, 100 und 200 μM VC dotiert. Nach dreistündiger Vorinkubation wurde das VC aus den Wells einer der Reihen je Proband herausgewaschen (Zentrifugation 800 g, 37°C , 5 min) und die PMBCs wurden resuspendiert. Anschließend wurden die Wellplatten in der Experimentaldruckkammer bzw. in der Kontrollkammer mit 400 kPa hyperbarem Sauerstoff bzw. Pressluft für 3 Stunden begast. Schließlich wurden alle Proben gewaschen, die PBMCs gesammelt (Zentrifugation 800 g, 37°C , 5 min) und der Auswertung (siehe Kapitel 3.4) zugeführt.

A - 1.2 Ergebnisse

I Einfluss von Vitamin C und /oder CO_2 auf die Pufferkapazität von RPMI-Puffer

Um zu überprüfen, in wieweit die Zugabe von VC den pH-Wert des RPMI-Mediums beeinflusst, wurde dem Puffer VC bis zu einer Endkonzentration von 1550 μM zudosiert. Die Änderung des pH-Wertes in Abhängigkeit von der VC-Konzentration ist Abbildung 6-1 dargestellt. Die pH-Wert-Messung des RPMI-Mediums ergab einen Wert von pH 7,545, der unter Zugabe von VC bis auf pH 7,435 bei 1550 μM VC abfiel.

Abbildung 6-1 pH-Wert-Veränderung durch Vitamin C



Änderung des pH-Wertes von nativem RPMI-Puffer bei Zugabe von Ascorbinsäure in 25 µM-Schritten VC bis zu einer Endkonzentration von 1550 µM unter Raumbedingungen.

Um die pH-Veränderungen im Brutschrank zu eruieren, wurden die pH-Werte, die sich mit bzw. ohne Einfluss von verschiedenen VC-Konzentrationen bei Inkubation bis zu 6h im Brutschrank ergeben, gemessen (Abbildung 6-2^{vv}). In der Tabelle ist abzulesen, dass der pH-Wert und vor allem durch die Inkubationszeit im Brutschrank beeinflusst wurde, wobei der stärkste Abfall der pH-Konzentration schon innerhalb der ersten drei Stunden stattfand. Der pH-Wert des Probenpuffers sank beispielsweise bei Inkubation von drei Stunden im Brutschrank von 7,54 schon auf 7,14 und bei 6 stündiger Inkubation auf 7,08 ab. Ein vergleichbarer Aufbau mit Inkubation von 6h unter Raumbedingungen senkte den pH lediglich um 0,03. Bei sehr langen Inkubationszeiten kam es konzentrationsabhängig zur Ausfällung des C-Vitamins.

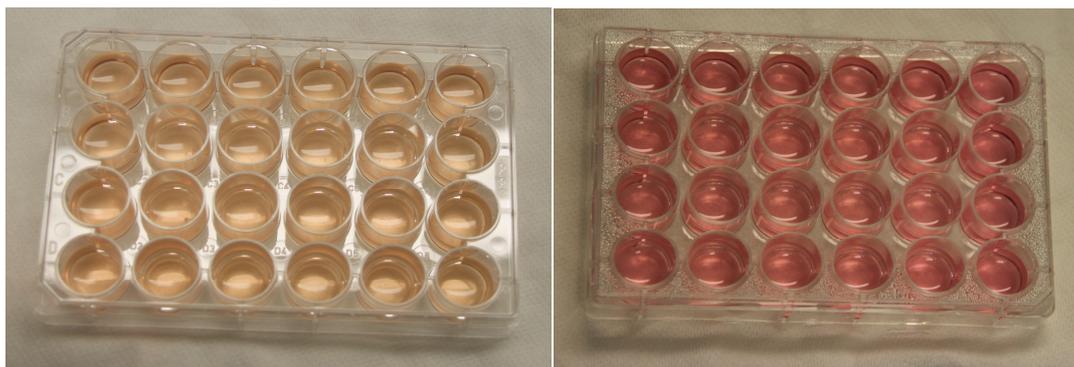
Abbildung 6-2 pH und Farbveränderungen von RPMI-Puffer im Brutschrank unter verschiedenen VC-Konzentrationen

RPMI+VC	Brutschrank (BS)										
	VC Konzentration	pH	Eigenschaften	pH nach 3h	Eigenschaften	pH nach 6h	Eigenschaften	pH nach 24h	Eigenschaften	pH nach 48h	Eigenschaften
0µM	7,54	dunkelrot	7,14	orangerot	7,08	dunkelorange	7,08	7,08	7,02	gelborange	
50µM	7,54		7,14		7,08		7,05	orange	6,97	gelb	
100µM	7,54		7,14		7,08						
200µM	7,54		7,13		7,07		4,91	gelb.			
400µM	7,52		7,13		7,06		4,97	weißer		gelb, weißer	
500µM	7,51		7,12		7,06		5,25	Bodensatz		4,74 Bodensatz	
RPMI+VC	Raumbedingungen										
0µM VC	7,54	dunkelrot					7,43	dunkelrot			
500µM VC	7,51						7,44				

Um schließlich die pH-Veränderungen vollständig zu erfassen, die im Verlauf des Experimentes auftreten, wurden die pH-Werte von RPMI-Puffer mit verschiedenen VC-Konzentrationen nach 3h BS und weiteren 3h DK (400 kPa, 100% O₂) gemessen. Der pH-Wert sank durch Brutschrankinkubation um 0,3 bis 0,4 und stieg unter Sauerstoffüberdruck wieder auf Werte nahe den Ausgangswerten (nativ) an.

Die Farbänderung des pH-Indikators Phenolrot erwies sich als Möglichkeit der ungefähren Einschätzung des pH-Werts. Durch Inkubation im Brutschrank gab es einen Farbumschlag (nach **orangerot**) und bei Begasung in der Druckkammer rückverfärbte sich das Probenmedium (nach **dunkelrot**) (siehe Abbildung 6-3). Auf diese Weise diente die Farbe des Probenmediums als visuelle Kontrolle und Proben, die farblich von diesem Schema abwichen, wurden ausgeschlossen.

^{vv} Die Farbgebung wurde zur Orientierung der beobachteten Pufferfarbe angepasst

Abbildung 6-3 Farbveränderung des RPMI-Puffers bei Brutschrankinkubation

links: RPMI-Puffer nach 3 h Brutschrankinkubation (37°C, 5%CO₂, 21% O₂, 74%N₂) rechts: nach anschließender hyperbarer Oxygenierung (3 h, 400 kPa) (Farbe etwas weniger intensiv als nativer RPMI-Puffer)

II Grundlage der Zellversuche - Basislevel der DNA-Schädigung und Zellvitalität in PBMCs

Das basale Level der DNA-Schädigung betrug $1,091 \pm 1,059\%$ Comets/200 Zellen ($n = 136$) und das der Zellvitalität betrug $> 98\%$. Diese Werte wurden genutzt, um Proben mit erhöhter nativer Schädigung von der Untersuchung auszuschließen (vgl. Kapitel 3.4.3).

III Wirkung von Vitamin C auf PBMCs

In diesem Versuchsabschnitt wurde in drei Schritten untersucht, ob eine Inkubation von PBMCs mit Vitamin C im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 21% O₂, 74% N₂) zu einer Änderung der Anzahl DNA-geschädigter PBMCs führt. Hierzu waren drei Experimente notwendig:

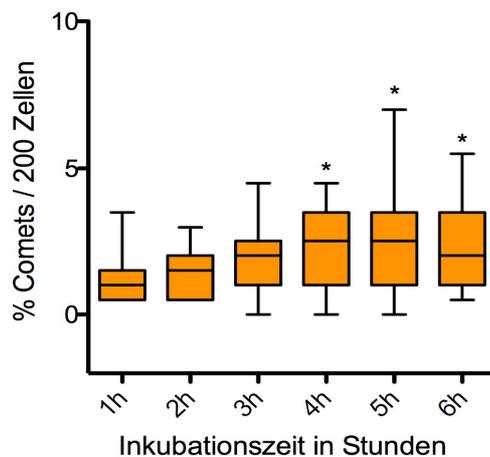
1. Waschschrift zum Sammeln

In diesem Teil der Experimente wurde geprüft, ob ein Wasch- und Zentrifugationsschritt nach Inkubation im Brutschrank (1-6 h), die Konzentration der DNA-Schäden in PBMCs beeinflusst, da zur Gewinnung der Zellen nach der Inkubation und zum Entfernen von VC aus dem Medium ein Wasch- und Zentrifugationsschritt notwendig war. Der Median der DNA-Schädigung lag zwischen $2,0\{1,0/3,5\}$ und $3,5\{2,0/3,5\}\%$ Comets/200 Zellen innerhalb von 1-6 h nach Inkubation für die Versuchsreihe ohne Wasch- und Zentrifugationsschritt. Mit Wasch- und Zentrifugationsschritt ergab sich eine mittlere DNA-Schädigung zwischen $2,0\{1,0/1,3\}$ bis $3,5\{0,5/4,0\}\%$ Comets/200 Zellen. Signifikanztestungen ergaben keine signifikanten Unterschiede.

2. Brutschrank ohne VC

Im diesem Versuchsabschnitt sollte untersucht werden, ob eine Inkubation im Brutschrank ohne VC eine Erhöhung oder Verminderung der DNA-Schädigung verursacht. Der Median der DNA-Schädigung lag zwischen $10\{0,5/1,5\}$ nach einer Stunde und $2,5\{1,0/3,5\}\%$ Comets/200 Zellen nach fünfstündiger Inkubation (Abbildung 6-4). Bei Signifikanztestungen innerhalb dieses Versuches jeweils gegen den Anfangswert (1h) ergaben sich lediglich einfach signifikante Unterschiede zu den Werten nach $p_{4h} = 0,0211$, $p_{5h} = 0,0256$, $p_{6h} = 0,0264$ (Sterne) ($p^* = 0,0026$), nicht jedoch dem 3-Stunden-Wert, der den Ausgangspunkt in den folgenden Experimenten darstellen sollte. Zwischen den einzelnen Stunden (1 h zu 2 h, 2 h zu 3 h usw.) ergaben sich keine Signifikanzen.

Abbildung 6-4 DNA-Schädigung bei Inkubation im Brutschrank

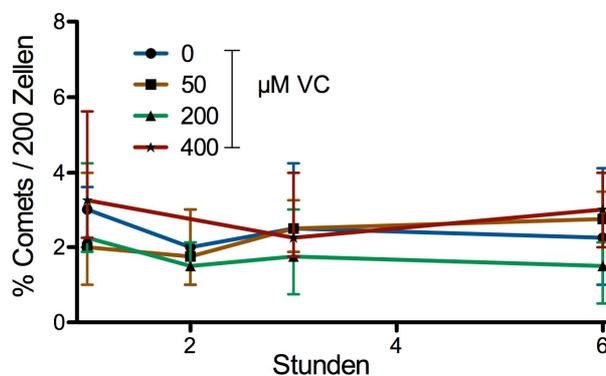


Brutschrankinkubation 37°C, 5%CO₂, 21% O₂, 74%N₂, 1-6 h; dargestellt ist jeweils der Median mit 25/75% und 5/95% Perzentilen; visuelles Scoring, jeweils pro 200 ausgewertete Zellen; Signifikanzanalyse im Vergleich zum Anfangswert (1 h) $p_{4h} = 0,0211$, $p_{5h} = 0,0256$, $p_{6h} = 0,0264$ ($p^* = 0,0026$). $n = 19$

3. Brutschrank mit VC

In diesem Versuchsabschnitt wurde die inkubationszeitabhängige DNA-Schädigung unter Einfluss verschiedener VC-Konzentrationen bestimmt. Die DNA-Schädigung zeigt sich weder von der Inkubationszeit, noch von der VC-Konzentration abhängig (siehe Abbildung 6-5). Signifikanztestungen zwischen den Untersuchungsreihen ergaben keine signifikanten Unterschiede.

Abbildung 6-5 DNA-Schädigung in Abhängigkeit von der VC-Konzentration bei Inkubation im Brutschrank



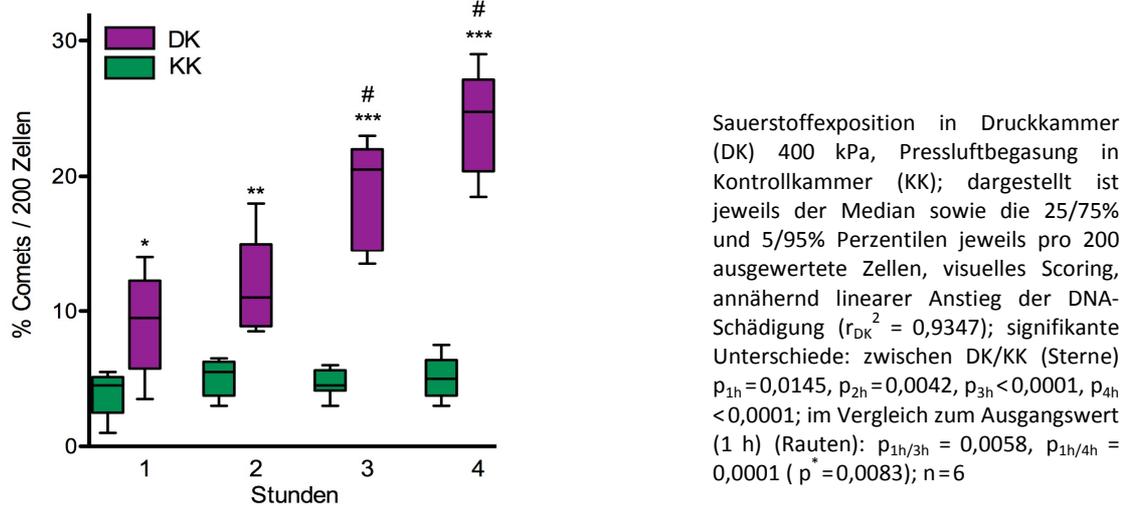
Brutschrankinkubation (37°C, 5%CO₂, 21% O₂, 74%N₂) 1-6 h; dargestellt ist jeweils der Median mit 25/75% Perzentilen; visuelles Scoring, jeweils pro 200 ausgewertete Zellen; keine Abhängigkeit der DNA-Schädigung von VC-Konzentration oder Inkubationszeit; $n = 22$

IV DNA-Schädigung in Abhängigkeit der Expositionszeit gegenüber hyperbarem Sauerstoff

In diesem Studienabschnitt wurde der Unterschied der DNA-Schädigung nach Begasung in Druck- bzw. Kontrollkammer im Experimentalaufbau der VC-Untersuchungen eruiert. Weiterhin wurde eine Dosis-Wirkungsabhängigkeit der DNA-Schädigung in Abhängigkeit von der Expositionszeit (1-4 h) gegenüber hyperbarem Sauerstoff bestimmt. Zwischen den DK- und KK-Werten bestanden schon ab dem ersten Messpunkt jeweils signifikante Unterschiede ($p_{1h} = 0,0145$, $p_{2h} = 0,0042$, $p_{3h} < 0,0001$, $p_{4h} < 0,0001$) (Sterne). Der Median der Kontrolldaten bewegte sich zwischen $M_{1h} = 4,50\{2,50/5,125\}\%$ Comets/200Zellen nach einer Stunde und $M_{4h} = 5,00\{3,75/6,375\}\%$ Comets/200Zellen nach zwei Stunden Inkubation, wobei keine Abhängigkeit von der Inkubationszeit bestand. Für die Druckkammerwerte zeigte sich hingegen eine näherungsweise lineare ($r_{DK}^2 =$

0,9347) Zunahme der DNA-Schädigung in Abhängigkeit der Exposition gegenüber hyperbarem Sauerstoff im zeitlichen Verlauf von 1-4 h (vgl. Abbildung 6-6). Der Median der DNA-Schädigung stieg von der ersten Stunde ($M_{1h} = 9,50\{5,75/12,25\}\%$ Comets/200Zellen) bis zur vierten Stunde ($M_{4h} = 24,75\{20,38/27,13\}\%$ Comets/200Zellen) um $\delta_{1h-4h} = 15,25\%$ Comets/200Zellen an. Die Testung der Signifikanz gegen den Anfangswert (1 h) war bei 3 h ($p_{1h/3h} = 0,0058$) und 4 h ($p_{1h/4h} = 0,0001$) (Rauten) signifikant ($p^* = 0,0083$).

Abbildung 6-6 DNA-Schädigung in Abhängigkeit von der Expositionszeit gegenüber hyperbarem Sauerstoff bzw. Pressluft



V Einfluss von Pufferzusätzen / Waschschritten auf die Zellschädigung

Untersuchung zum Einfluss von Pufferzusätzen

In diesem Studienabschnitt wurde untersucht, welchen Einfluss die Zugabe von BSA und Antibiotikum zum Probenmedium für die geplanten Experimente hat. Dazu wurde dem Medium BSA und Antibiotikum zugefügt und die Anzahl der DNA-geschädigten Zellen nach der hyperbaren Oxigenierung ausgewertet. Derselbe experimentelle Ansatz wurde zum Vergleich mit Medium ohne diese Zusätze durchgeführt. Die Mediane ($n = 108$) nach hyperbarer Oxigenierung lagen bei Medium mit Zusätzen bei $M_{RPMI+} = 19,00\{16,00/22,50\}\%$ Comets/200Zellen und bei Medium ohne Zusätze bei $M_{RPMI-} = 18,00\{13,50/24,75\}\%$ Comets/200Zellen. Derselbe Versuch wurde auch mit normobarer Begasung der PBMCs aus einem Pressluftsystem durchgeführt (Kontrolle). Hier zeigten sich beim Medium mit Zusätzen $M_{RPMI+} = 4,03\{2,50/5,50\}\%$ Comets/200Zellen und beim Medium ohne Zusätze $M_{RPMI-} = 4,00\{2,875/5,125\}\%$ Comets/200Zellen. Beim Vergleich der Daten für die unterschiedlichen Puffer zeigen sich weder bei der Belastung mit Pressluft noch bei der Belastung mit hyperbarem Sauerstoff Unterschiede in der Konzentration der DNA-Schädigung. Da die Verwendung von BSA und Antibiotikum folglich nicht vorteilig ist, wurden für die folgenden Versuche keine Pufferzusätze verwendet.

Untersuchung zum Einfluss von Waschschritten

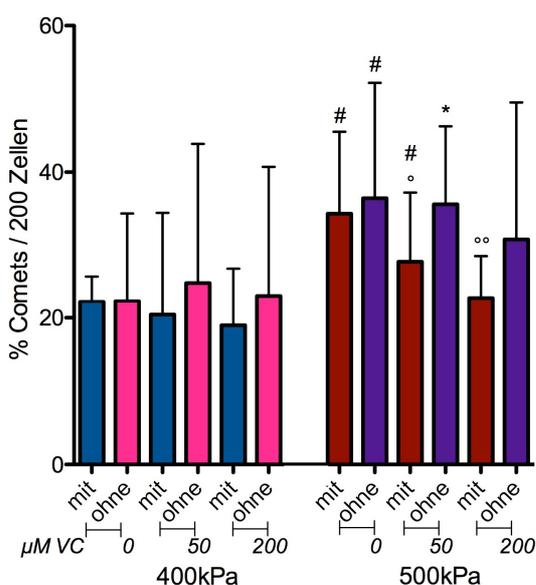
In diesem Studienabschnitt wurde untersucht, in wie weit Waschschritte zu unterschiedlichen Zeitpunkten im experimentellen Versuchsablauf zu einer Änderung der Anzahl DNA-geschädigter Zellen führen. Der Median des Datensatzes ohne Waschschritt (kw) ($n = 124$) lag bei $M_{kw} = 19,00\{15,00/22,50\}\%$ Comets/200Zellen, der des Datensatzes mit Waschschritt nach der hyperbaren Oxigenierung (nw) ($n = 46$) lag bei $M_{nw} = 18,75\{12,38/25,00\}$

und der des Datensatzes mit Waschschrift vor der hyperbaren Oxigenierung (vw) ($n = 44$) bei $M_{vw} = 20,00\{16,50/25,38\}\%Comets/200Zellen$. Die Daten zeigten, dass Waschschriffe zu unterschiedlichen Zeitpunkten nicht zu signifikanten Unterschieden der Konzentration der DNA-Schädigung führen. Auch bei der Auswertung der Kontrolldaten (normobare normoxische Begasung aus Pressluftsystem) ergaben sich untereinander vergleichbare Konzentrationen von DNA-Schäden, unabhängig davon, an welcher Stelle Waschschriffe erfolgten. Die Mediane lagen bei $M_{kw} = 5,00\{4,00/6,50\}$, $M_{nw} = 3,00\{2,00/4,50\}$, $M_{vw} = 4,00\{3,00/5,00\}\%Comets/200Zellen$.

VI Einfluss von Waschschriffen bei Verwendung von Vitamin C

In diesem Versuchsabschnitt wurde untersucht, in wie weit das Auswaschen von VC nach der Inkubationsphase im Brutschrank vor der hyperbaren Oxigenierung ($pO_2 = 400$ und 500 kPa) die Konzentration der DNA-Schäden beeinflusst. In Abbildung 6-7 ist jeweils der Median der DNA-Schädigung der Proben ($n = 11$) mit ("mit") VC-Einfluss gegenüber denen ohne ("ohne") VC-Einfluss während der hyperbaren Oxigenierung (400 und 500 kPa) dargestellt. Dabei wurde zusätzlich zwischen den verschiedenen VC-Konzentrationen und zwischen den verschiedenen Sauerstoffdrücken unterschieden. Als Kontrollwert diente hier der Ansatz ohne VC ($0 \mu M VC$)^{www}.

Abbildung 6-7 DNA-Schädigung in Abhängigkeit von der Intensität der oxidativen Belastung und der VC-Konzentration im Probenmedium bzw. nach alleiniger Inkubation



Sauerstoffbelastung 400 bzw. 500 kPa, "mit" bzw. "ohne" VC im Probenmedium jeweils nach 3 h Vorinkubation, dargestellt ist jeweils der Median sowie die $25/75\%$ Perzentilen jeweils pro 200 ausgewertete Zellen, visuelles Scoring, Signifikanzanalysen zwischen $400/500$ kPa (Rauten): $p_{0\mu MVC}^{mit} = 0,0226$, $p_{0\mu MVC}^{ohne} = 0,0450$; zwischen den einzelnen VC-Konzentrationen zum Kontrollwert ($0 = \mu MVC$) (Kreise): $p_{0/50\mu MVC} = 0,0142$ und $p_{0/200\mu MVC} = 0,0090$ ($p^* = 0,0045$); "mit"/"ohne" VC (Sterne) $p^{mit}/ohne^{500kPa} = 0,0204$, $n=11$

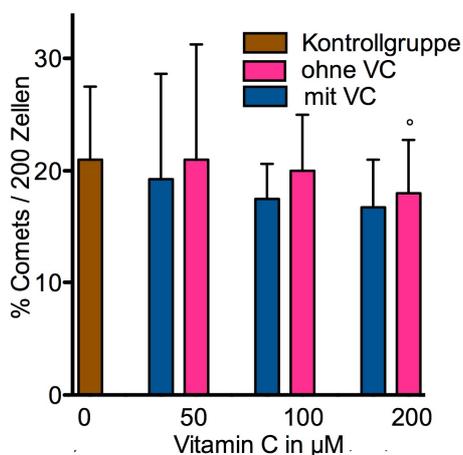
Beim Vergleich der Daten von pO_2 400 und 500 kPa zeigte sich ein ähnlicher Verlauf, wobei die Anzahl DNA-geschädigter Zellen bei 500 kPa grundsätzlich höher ist als bei 400 kPa pO_2 . Signifikant war dieser Unterschied bei $0 \mu M VC$ ("mit": $p_{0\mu MVC}^{mit} = 0,0226$, "ohne": $p_{0\mu MVC}^{ohne} = 0,0450$) und $50 \mu M VC$ ("mit": $p_{50\mu MVC}^{mit} = 0,0031$) (Rauten). Weiterhin zeigte sich, dass die DNA-Schädigung in Abhängigkeit von der VC-Konzentration abnahm, wobei dies vor allem bei höherer Sauerstoffbelastung (500 kPa) und in den Proben "mit" VC im Probenmedium der Fall war. Entsprechend zeigten sich Signifikanzen der Proben mit VC gegenüber den Kontrollproben mit $0 \mu M VC$ bei 500 kPa "mit" VC im Probenmedium ($p_{0/50\mu MVC} = 0,0090$ und $p_{0/200\mu MVC} = 0,0142$; $p^* = 0,0045$) (Kreise). Beim Vergleich

^{www} Bei dieser Gruppe wurde derselbe Wasch- und Zentrifugationsschritt durchgeführt wie bei den Proben mit VC, um einen identischen Versuchsablauf zu gewährleisten.

der Datensätze "mit" zu "ohne" VC (bei 50 und 200 μM VC) innerhalb eines Druckniveaus während der Sauerstoffüberdruckbelastung zeigte der "mit"-Datensatz grundsätzlich eine niedrigere DNA-Schädigung. Dieser Unterschied war bei 50 μM VC und 500 kPa signifikant ($p_{\text{"mit"/"ohne"}} = 0,0204$) (Sterne).

Um zu entscheiden, ob in den Hauptexperimenten zur Untersuchung des Einflusses von Vitamin C auf PBMCs unter hyperbarer Oxigenierung das VC während der hyperbaren Oxigenierung im Probenmedium belassen oder herausgewaschen werden sollte, wurden zusätzlich entsprechende Untersuchungen bei 400 kPa mit mehr Probanden und zusätzlichen VC-Konzentrationen durchgeführt ($n = 17$) (siehe Abbildung 6-8).

Abbildung 6-8 Genauere Analyse der DNA-Schädigung durch hyperbare Oxigenierung mit bzw. ohne VC im Probenpuffer



Sauerstoffbelastung ex vivo 400 kPa 3 h; dargestellt ist jeweils der Median mit 75% Perzentilen jeweils pro 200 ausgewertete Zellen; visuelles Scoring; "mit" VC im Probenmedium bzw. "ohne" VC im Probenmedium jeweils nach 3h Vorinkubation; keine signifikanten Unterschiede, $n = 17$

Der Graphik ist zu entnehmen, dass der Median der DNA-Schädigung in den Proben, die mit VC im Probenmedium der Sauerstoffüberdruckbehandlung ausgesetzt waren, in allen Paarungen niedriger ist. Signifikant war diese Differenz in keinem Fall. Weiterhin zeigt die Graphik, dass die DNA-Schädigung mit zunehmender VC-Konzentration abnimmt. Bei 200 μM "mit" VC-Einfluss während der Sauerstoffbehandlung ist der Vergleich zum 0 μM VC-Wert signifikant ($p_{0/200\mu\text{MVC}} = 0,0464$, $p^* = 0,0029$) (Kreis). Eine Signifikanz der Abnahme der DNA-Schädigung in Abhängigkeit von der VC-Konzentration ergab sich in dieser Untersuchung vor allem aus den Graphen der Mediane: Die Steigungen der Graphen der Mediane waren annähernd linear ($r^2_{\text{"mit"}} = 0,8801$, $r^2_{\text{"ohne"}} = 0,9333$) bei nicht signifikant unterschiedlichen Steigungen, doch die Steigung des gemittelten Graphen ist negativ ($m_{\text{"mit"/"ohne"}} = 0,0184$) mit signifikanter Abnahme ($p_{\text{"mit"/"ohne"}} = 0,0265$).

Auch für diese Versuchsreihen wurden dieselben Experimente unter Verwendung der Kontrollkammer durchgeführt. Auch für die Kontrollkammer-Daten wurden Datensätze "mit" und "ohne" VC gegenübergestellt. Der Median der DNA-Schädigung nach Exposition lag unabhängig von der VC-Konzentration und von der An-/Abwesenheit von VC während der Pressluftbehandlung zwischen $M_{\text{"mit"}50\mu\text{MVC}} = 3,500\{1,500/4,750\}$, $M_{\text{"mit"}100\mu\text{MVC}} = 5,750\{4,875/7,375\}$, $M_{\text{"mit"}200\mu\text{MVC}} = 5,250\{3,625/9,000\}$ %Comets/200Zellen und $M_{\text{"ohne"}50\mu\text{MVC}} = 4,2500\{3,500/6,875\}$, $M_{\text{"ohne"}100\mu\text{MVC}} = 5,00\{2,250/7,000\}$, $M_{\text{"ohne"}200\mu\text{MVC}} = 4,500\{2,500/6,875\}$ %Comets/200Zellen. In der Kontrollgruppe (0 μM VC) traten $M_{0\mu\text{MVC}} = 5,00\{2,875/6,625\}$ %Comets/200Zellen auf.

A - 1.3 Diskussion

Puffer/Nährmedium und Zusätze

Im Brutschrank wurde durch z. B. Temperatur, Wahl des Puffers oder der Brutschrankeinstellungen, sowie die eingestellte Zellkonzentration^{xx} [269] ein möglichst physiologisches Umgebungsmilieu geschaffen. Trotzdem können diese Bedingungen nicht den *in vivo*-Bedingungen entsprechen, wodurch ein erhöhter Stress für Versuchszellen besteht. Um diese mögliche Quelle der Zell- und/oder DNA-Schädigung zu quantifizieren, wurde der mögliche Einfluss der pH-Veränderungen während der Untersuchungen auf die PBMCs experimentell untersucht. Das Nähr- und Puffermedium RPMI 1640 ist für Suspensionskulturen von u.a. peripheren Blutzellen und Tumorzellen empfohlen [270] und wird häufig für Zellversuche und für die Zellzucht im Brutschrank verwendet. Durch den supraphysiologischen pH (laut Hersteller liegt er bei pH $8,3 \pm 0,3$ [9]) ist er der Kohlendioxidatmosphäre des Brutschranks angepasst. Es ist jedoch nicht bekannt, ob die Pufferkapazität des RPMI-Mediums auch ausreicht, wenn zusätzlich zur Kohlensäure (Kohlensäure pKs 3,6 [11]) auch VC (pKs 4,25 [10]) im RPMI-Probenmedium gelöst ist. Der native pH von RPMI-Medium wurde auf 7,55 gemessen, womit er über dem physiologischen pH-Niveau des Blutserums von 7,35 - 7,45 liegt. Inkubation in Kohlendioxidatmosphäre senkte den pH-Wert inkubationszeitabhängig, wobei im für diese Studie entscheidenden Zeitfenster (3 h) lediglich ein leicht subphysiologischer pH-Wert ($\text{pH}_{3\text{h BS}} = 7,14$, vgl. Kapitel 4.3) erreicht wurde. Eine Zugabe von VC hatte nur einen sehr geringen additiven Effekt, insbesondere in den in dieser Studie verwendeten Konzentrationen von maximal 400 μM (Zugabe von VC unter normobaren normoxischen Bedingungen verändert den pH nur marginal, vgl. Kapitel A - 1.2). Erst nach sehr langer Inkubation (ab 24 Stunden) wurde der Effekt des VCs deutlicher (vor allem bei sehr hohen Vitamin C-Konzentrationen > 400 μM , vgl. Kapitel A-1) und es kam zur Ausfällung der Ascorbinsäure. Dieses Phänomen sollte weiter eruiert werden, sofern Experimente mit entsprechend langen Inkubationszeiten im Brutschrank durchgeführt werden sollen. Die Farbe des Puffers gab, aufgrund der Reaktion des pH-Indikators Phenolrot beim Ansäuern des Puffers im Brutschrank, einen ungefähren Hinweis auf den aktuellen pH-Wert des Probenmedium, wodurch im Verlauf der Versuche jeweils der Puffer-pH-Wert und damit z. B. der Farbumschlag von dunkelrot zu orangerot im Brutschrank und erneut zu dunkelrot in der Experimentaldruckkammer überwacht und mögliche Kontamination durch z. B. Bakterien oder eine Mangelversorgung der Zellen [175] erkannt werden konnte.

Für die Untersuchungen der vorliegenden Studie war nach dieser Experimentierreihe bewiesen, dass die Säurewirkung von Vitamin C auch unter Kohlendioxidatmosphäre keinen Einfluss auf die PBMCs haben kann, da eine Zugabe von VC in den für die Studie relevanten Konzentrationen lediglich leichte Abweichungen vom physiologischen pH des Blutserums induziert. Auch in der Literatur war kein Hinweis auf mögliche Beeinflussung von PBMCs durch saures Milieu zu finden. Beispielsweise können Leukozyten im menschlichen Organismus lokal unter physiologischen Bedingungen CO_2 -Drücken von bis zu 13 kPa und einem pH-Wert von bis 6,4 (z. B. bei hoher Muskelaktivität) ausgesetzt sein [12].

^{xx} In den Experimentalaufbauten wurden zwischen 1×10^5 PBMCs/ml (24-Well-Platten) und 1×10^6 PBMCs/ml (96-Well-Platten) verwendet. Dies entspricht in etwa der physiologischen Zellkonzentration *in vivo*, die auf 3000-11000 Leukozyten pro μl angegeben wird.

Pufferzusätze

In diesem Zusammenhang wurden auch die Pufferzusätze BSA und ein Antibiotika-Präparat (Penicillin/Streptomycin), die *ex vivo* häufig dem Zellmedium zugefügt werden [109][52][167], auf ihren Einfluss und ihre Notwendigkeit für die Experimente dieser Studie überprüft. Anhand experimenteller Ansätze mit sehr großen Probenzahlen ($n = 103$) wurde gefunden, dass ein Zusatz von Pufferzusätzen in dem untersuchten Studienmodell keinen Einfluss auf die DNA-Schädigung und Zellvitalität hat. Da sich somit auch kein Vorteil aus der Verwendung von BSA oder des Antibiotika-Präparat in dem verwendeten Versuchsaufbau ergab, wurde, entsprechend dem Vorgehen in einer Vorarbeit zu dieser Studie [16], auf die Zugabe dieser Substanzen in den folgenden Untersuchungen zur Methodenentwicklung sowie der Hauptversuche dieser Arbeit (siehe Kapitel 4) verzichtet.

Waschschritte

Eine mögliche Einflussgröße, die der Versuchsaufbau notwendigerweise mit sich bringt, sind Waschschritte. Schon bei der Zellaufbereitung sind Waschschritte notwendig zur Isolation der Zellen im Ficoll-Gradienten und im Verlauf der Experimente werden sie immer wieder zum Sammeln oder Waschen der Zellen erforderlich, z. B. um vor der Auswertung im Comet Assay das VC aus der Probensuspension zu entfernen. Insbesondere für letzteren Punkt war die Betrachtung des Einflusses von Waschschritten sinnvoll, da in dieser Arbeit der Einfluss von VC während der Exposition mit der VC-Exposition nach alleiniger Vorinkubation verglichen werden sollte. Experimentell konnte weder ein Vorteil (z. B. aufgrund der Zugabe frischen Nährmediums) noch ein Nachteil (denkbar aufgrund der Zentrifugation und/ oder aufgrund der Störung der PBMCs, denn die PBMCs sammeln sich mit der Inkubationszeit sukzessive am Wellboden und bilden interzelluläre Wechselwirkungen aus) gefunden werden (siehe Kapitel A - 1.2). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Scher- und Zentripetalkräfte, die bei den Waschschritten zum Entfernen von VC auftreten und gerade für oxidativ geschädigte PBMCs als potentiell schädigend erachtet wurden, keinen Einfluss auf die Anzahl DNA-geschädigter Zellen haben. Diese These wird durch die Ergebnisse der Kontrollkammer gestützt, in der es ebenfalls keinen Unterschied zwischen Waschschritten vor und/ oder nach der Pressluftbegasung gab (vgl. Kapitel A - 1.2). Die Scher- und Zentripetalkräfte, die bei Zentrifugation in der Zellaufbereitung wirken, waren kleiner, als die zum Wechseln und/oder Entfernen des Probenmediums. Es kann also geschlossen werden, dass die in der nativen DNA-Schädigung abgebildete Zellbeeinträchtigung (bei adäquater Blutentnahmetechnik) ausschließlich den Basislevel der DNA-Schädigung abbildet, die in den PBMCs zum Zeitpunkt der Blutentnahme vorliegt.

Untersuchungswells

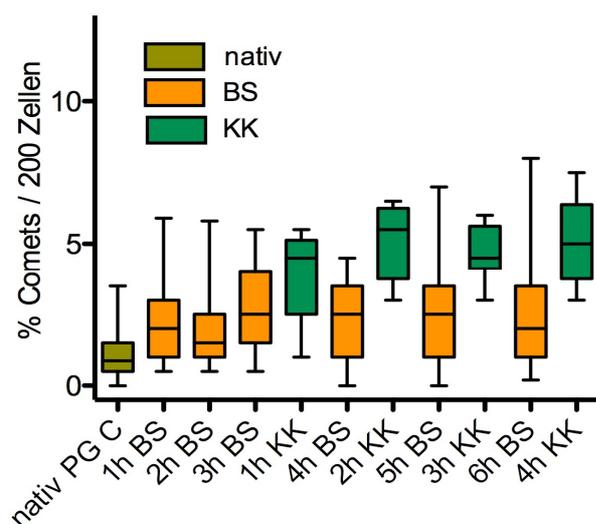
In den Experimenten zur Untersuchung der Adaptation an die Exposition gegenüber hyperbarem Sauerstoff (siehe Kapitel 3.5.2 und 4.2) wurde das in einer Vorarbeit [16] validierte Modell der hyperbaren Oxigenierung zur Induktion oxidativer DNA-Schädigung anhand von 96-Well-Platten angewandt. Für die Untersuchung des Einflusses von Vitamin C war es notwendig, größere Wells (für mind. 1000 μl Zellsuspension) zu verwenden, da in 200 μl Zellsuspension aufgrund der notwendigen Verdünnung der Grundsubstanz VC auf Konzentrationen zwischen 0 und 400 μM VC/Probenwell eine Dosierung nicht ausreichend genau und reproduzierbar möglich war.

Vor Beginn der Untersuchungen mit VC musste folglich für dieses geänderte Modell eruiert werden, wie viel DNA-Schädigung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit hervorgerufen wird. Dies war notwendig, da aufgrund eines unterschiedlichen Verhältnisses zwischen Höhe der Flüssigkeitssäule und Größe der Welloberfläche in den unterschiedlichen Probenwells die Diffusion des Sauerstoffs und damit die Exposition der PBMCs gegenüber Sauerstoff unterschiedlich war (siehe Kapitel A - 5.5). Es resultierte in den größeren Wells der 24-Well-Platten nach dreistündiger Sauerstoffüberdruckbegasung bei 400kPa eine mittlere DNA-Schädigung von ca. 20% aus 200 ausgezählten Zellen (siehe Kapitel A - 1.2). Demgegenüber war für die kleineren Wells der 96-Well-Platten bei sonst gleichen Untersuchungsbedingungen gefunden worden, dass im Mittel in ca. 15% der PBMCs DNA-Schäden auftraten und erst nach vierstündiger Inkubation ca. 20% der Zellen geschädigte DNA aufwiesen [16]. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung war dabei, wie es von Witte et al. [16] schon für die kleineren Wells herausgestellt wurde, auch in den größeren Wells der 24-Well-Platten nahezu linear ($r^2 = 0,9347$) und bildete eindeutig die DNA-Schädigung durch die Sauerstoffüberdruckbegasung ab, denn in der Kontrollkammer bei Pressluftbegasung unter sonst gleichen Bedingungen stieg die DNA-Schädigung nicht an (vgl. Kapitel A-1). Weiterhin waren die Böden der Wells der unterschiedlichen Größen verschieden: Die 96-Well-Platten hatten runde Wellböden, wodurch sich die PBMCs auf einen Punkt konzentrieren, wohingegen in den größeren Wells der 24-Well-Platten mit flachen Böden sich die PBMCs lediglich am Boden absetzen. Ob sich dies aufgrund der besseren Nährstoffversorgung durch größeren Kontakt zum Nährmedium positiv, oder durch den höheren Kontakt auch der sonst untersten Zellen zum gelösten Sauerstoff negativ auswirkt, bleibt abschließend zu klären. Anhand der Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde für die folgenden Versuche mit VC eine Expositionsdauer gegenüber hyperbarem Sauerstoff festgelegt. Es wurde eine Inkubationszeit von drei Stunden gewählt, da eine zu erwartende mittlere DNA-Schädigung in rund einem Fünftel der Versuchszellen eine gut messbare Größe darstellt und gleichzeitig ausreichend intakte Zellen bleiben.

DNA-Schädigung in Brutschrank und Kontrollkammer

Rückblickend auf die Experimente sollte eruiert werden, ob in der Kontrollkammer (KK) im Vergleich zum Brutschrank (BS) mehr DNA-Schädigung auftrat. Hierzu wurden jeweils alle BS- ($n=41$) und KK-Daten ($n=6$) ohne VC mit den Nativdaten ($n = 136$) verglichen (siehe Abbildung 6-9). Gegenüber der DNA-Schädigung nach dreistündiger Inkubation im Brutschrank als "Ausgangswert" für die Untersuchung stieg die DNA-Schädigung bis zur zweiten Stunde in der Kontrollkammer leicht an. Während der Begasung in der Kontrollkammer blieb sie konstant. Wurden die PBMCs hingegen weiter im Brutschrank inkubiert, blieb die gemessene Höhe der DNA-Schädigung über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant. In der quantitativen Auswertung zeigte sich entsprechend bei der Gegenüberstellung von BS und KK-Daten ein sehr geringer, jedoch nachweisbarer Unterschied in der Höhe der DNA-Schädigung, die jeweils unter normobaren normoxischen Bedingungen induziert wurde [105].

Abbildung 6-9 DNA-Schädigung durch den Milieuwechsel während des Experimentalverlaufs



Zusammenschau aus Ergebnissen verschiedener Versuchsreihen. Dargestellt ist die DNA-Schädigung in PBMCs von Probanden aus Probandengruppe (PG) C nativ, nach 1-6 h Brutschrank (BS) sowie nach 3 h BS und im Anschluss 1-4 h (insgesamt maximal 7 h) in der Kontrollkammer (KK). Die unter normobar-normoxischen Bedingungen auftretende DNA-Schädigung bewegt sich in dem kleinen Bereich zwischen $M_{\text{nativ}} = 0,875\{0,500/1,500\}$ bis maximal $M_{\text{KK2h}} = 5,500\{3,750/6,250\}\%$ Comets/200Zellen (Mediane), wobei sich eine höhere, jedoch nicht im Zeitverlauf progredient steigende DNA-Schädigung jeweils nach Milieuwechsel (nativ nach BS und BS nach KK) andeutet. Dargestellt ist jeweils der Median mit 25/75% und 5/95% Perzentilen; visuelles Scoring, jeweils pro 200 ausgewertete Zellen.

Hinweise zum Anstieg der DNA-Schädigung unter Raumbedingungen fanden auch z. B. Roper et al. [102], die 8-oxo-Guanine unter Raumbedingungen nachwies. Ursächlich könnte sein, dass im Brutschrank "physiologischere" Bedingungen herrschen, als in der Kontrollkammer, d.h. im Unterschied zur KK besteht ein physiologischer $p\text{CO}_2$, die Luftfeuchte ist gleichbleibend und es besteht keine dauerhafte Begasung. Hinzu kommt der erneute Milieuwechsel, durch den sich die PBMCs an die neue Umgebung "gewöhnen" müssen. Ein solcher Milieuwechsel könnte auch die höhere DNA-Schädigung im BS im Vergleich zu der basalen DNA-Schädigung erklären. Insgesamt war jedoch zu beachten, dass der Bereich der DNA-Schädigung ($M_{\text{nativ}} = 0,875\{0,500/1,500\}$ bis maximal $M_{\text{KK2h}} = 5,500\{3,750/6,250\}\%$ Comets/200Zellen), die in PBMCs unter normobaren normoxischen Bedingungen auftrat, sehr viel geringer war als der, der unter hyperbaren hyperoxischen Bedingungen in PBMCs auftrat. Aus diesem Grund und da die Belastung für alle untersuchten PBMCs jeweils gleich war, wurde die DNA-Schädigung unter normobaren normoxischen Bedingungen nicht in die Bewertung der Ergebnisse mit einbezogen.

VC und PBMCs

Bevor schließlich Untersuchungen des Einflusses von VC auf PBMCs unter hyperbarer Oxygenierung vorgenommen werden konnten, musste weiterhin untersucht werden, ob VC unter den weitgehend physiologischen Bedingungen des Brutschranks die DNA-Schädigung von PBMCs beeinflusst. In Untersuchungen mit allen für die Studie relevanten VC-Konzentrationen und Inkubationszeiten wurde jedoch gefunden, dass VC weder einen protektiven, noch einen schädigenden Effekt hat (siehe Kapitel A - 1.2). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da VC zum einen in den relevanten Konzentrationen eine zu geringe pH-Wert-Veränderung hervorruft, um aufgrund der Säureeigenschaften schädigend zu wirken hat (siehe Kapitel A - 1.2). Zum anderen unterliegt die aktive Aufnahme (über Transporter, siehe Kapitel A - 5.3) von VC in Leukozyten im Gegensatz zu einigen Tumorzellen (vgl. Kapitel 5.2.3) einer Sättigungskinetik [173][186][187][241], weshalb eine Aufnahme letaler Konzentrationen ausgeschlossen ist. Entsprechend findet sich auch in den Untersuchungen in der KK kein Hinweis auf DNA-Schädigung durch VC ($M_{0\mu\text{MVC}} = 0,500\{0,500/1,500\}$, $M_{\text{mit}50\mu\text{MVC}} = 4,000\{3,500/6,500\}$, $M_{\text{ohne}50\mu\text{MVC}} =$

4,000{3,000/6,500}, $M_{\text{mit}^*100\mu\text{MVC}} = 3,250\{1,875/7,50\}$, $M_{\text{ohne}^*100\mu\text{MVC}} = 4,500\{2,125/6,375\}$, $M_{\text{mit}^*200\mu\text{MVC}} = 5,000\{3,000/7,000\}$, $M_{\text{ohne}^*200\mu\text{MVC}} = 4,750\{3,000/7,500\}$, $M_{\text{mit}^*400\mu\text{MVC}} = 3,500\{1,125/6,125\}$ %Comets/200Zellen.

Sauerstoffbelastung "mit" oder "ohne" VC im Probenpuffer

Der letzte Schritt der Voruntersuchungen war zu beurteilen, ob das VC während der hyperbaren Oxygenierung im Probenmedium belassen werden oder herausgewaschen werden sollte. Deshalb wurden Versuchsergebnisse "mit" und "ohne" VC während der Sauerstoffüberdruckbelastung bei 400 und 500 kPa gegenübergestellt (siehe Kapitel A - 1.2). Grundsätzlich war die DNA-Schädigung der Untersuchungen "mit" VC im Probenmedium geringer, wenn auch in den meisten Untersuchungen nicht signifikant. Da jedoch dieser Effekt in der KK überhaupt nicht auftrat und aufgrund der Reproduzierbarkeit dieser Beobachtung, sollte der offensichtliche Unterschied zwischen Herauswaschen des VCs vor bzw. Belassen des VCs während der hyperbaren Oxygenierung in den Hauptuntersuchungen genauer beleuchtet werden. Ursächlich für die geringere DNA-Schädigung mit VC im Probenpuffer während der Sauerstoffbelastung könnte sein, dass für die PBMCs die Möglichkeit besteht, wieder oder weiter VC aufzunehmen, wenn die VC-Vorräte abgebaut sind. Zudem ist auch eine Reaktion des im Zellmedium gelösten VCs mit Sauerstoff denkbar, bei der zumindest die aktivierte Form des O_2 , der Singulett-Sauerstoff, unschädlich gemacht werden könnte.

Schlussfolgerung: Aufgrund der Beeinflussung der Höhe der DNA-Schädigung durch VC wurde geschlossen, dass das Modell der hyperbaren Oxygenierung geeignet ist, um den Einfluss von VC auf DNA-Schädigung in PBMCs unter Bedingungen erhöhten oxidativen Stresses experimentell zu bestimmen. Für die Hauptuntersuchungen blieb nach Evaluation der übrigen Einflussfaktoren Folgendes zu klären:

- 1. Wie genau wird die Höhe der DNA-Schädigung unter hyperbarer Oxygenierung durch unterschiedliche Konzentrationen von VC beeinflusst?*
- 2. Welchen Einfluss hat ein Herauswaschen bzw. Belassen des VC im Probenmedium während der hyperbaren Oxygenierung?*

In beiden Fragestellungen sollten, um die VC-Einflüsse genauer beurteilen zu können, auch höhere VC-Konzentrationen (400 μM VC) auf ihre Wirksamkeit untersucht werden. Dabei wurde die offensichtlich größere Wirksamkeit von VC bei höheren Sauerstoffpartialdrücken sowie der Einfluss von VC bei Auswaschen bzw. Belassen des Vitamins während der hyperbaren Oxygenierung berücksichtigt^{yy}.

^{yy} In den Vorversuchen mit VC wurde die erhöhte VC-Konzentration (400 μM) unter identischen Versuchsbedingungen ergänzt. Der Übersicht halber wurde darauf verzichtet, dies bei der Versuchsbeschreibung zu erwähnen.

A-2 Probandeninformation

Probandeninformation zur Studie

„Einfluss von Hyperoxie auf die Immunkompetenz von Tauchern und Kampfschwimmern“

Prüfstelle: Sektion Maritime Medizin
am Institut für Experimentelle Medizin des UK-SH
c/o Schiffahrtmedizinisches Institut der Marine
Kopperpahler Allee 120
24119 Kronshagen

Ansprechpartner: FLA PD Dr. med. A. Koch
Tel: 0431-5409-1503
e-mail: a.koch@iem.uni-kiel.de

Sehr geehrte Studienteilnehmer,

vielen Dank für Ihre Bereitschaft, diese Information zur Studie durchzulesen und sich damit auseinander zu setzen. Selbstverständlich beruht Ihre Teilnahme auf Freiwilligkeit. Sie können jederzeit ohne Angabe von Gründen von der Studie zurücktreten, ohne dass Ihnen dadurch Nachteile entstehen. Sie wurden bereits auf die geplante Studie angesprochen. Der nachfolgende Text soll Ihnen die Ziele und den Ablauf erläutern. Bitte zögern Sie nicht, alle Punkte anzusprechen, die Ihnen unklar sind. Sie werden danach ausreichend Bedenkzeit erhalten, um über Ihre Teilnahme zu entscheiden.

Hintergrund der Studie

Diese Studie soll helfen zu klären, welche Auswirkungen Sauerstoff in erhöhten Konzentrationen (Hyperoxie) auf die Immunzellen und ihre Funktion im menschlichen Organismus hat. Erhöhte Sauerstoffkonzentrationen treten z. B. beim Tauchen oder bei einer Hyperbaren Oxigenierungstherapie (HBO) zur Behandlung von Tauchunfällen auf.

Aus wissenschaftlicher Literatur ist bekannt, dass 2 bis 4 % des aufgenommenen Sauerstoffs in Sauerstoffradikale umgewandelt wird. Dies geschieht während des Ablaufs der Atmungskette in den Körperzellen. Die Atmungskette ist für die Sauerstoffverwertung und die Energieproduktion in den Zellen zuständig. Auf Grund eines ausgefeilten Schutzsystems ist der Körper unter „normalen

Bedingungen“ in der Lage, diese Sauerstoffradikale abzubauen. Beim Tauchen und auch bei sportlicher Belastung kommt es durch eine erhöhte Sauerstoffaufnahme zur Entstehung von mehr Sauerstoffradikalen, die die Abbaukapazität dieses Systems überfordern können. Dies wird als oxidativer Stress bezeichnet. Die Folge des oxidativen Stresses ist eine Schädigung der Zellen. Häufig wird der entstandene Schaden unzureichend repariert. Bleibende Schäden können unter anderem zu Änderungen am Erbgut (DNA) der Zellen führen. Ein Einfluss auf das Immunsystem des Menschen durch die Veränderung von Zellen und ihrer DNA wird vermutet. Dies kann zu einer Abwehrschwäche gegenüber Krankheitserregern, Krankheitsentstehung oder sogar Krebsentstehung führen.

Es ist nachgewiesen, dass eine Abhängigkeit zwischen der Menge der Sauerstoffaufnahme und der entstehenden Sauerstoffradikalkonzentration besteht. Je höher die Sauerstoffaufnahme, desto höher ist die Radikalentstehung. So sind Taucher und Tauchmedizinisches Personal während ihrer Arbeitszeit einer höheren Radikalbelastung ausgesetzt, als Nichttaucher. Auch Leistungssportler sollen einer erhöhten Radikalbelastung ausgesetzt sein, da sich bei Ausdauerbelastung ebenfalls eine höhere Sauerstoffaufnahme des Körpers zeigt.

Ein besonderes Augenmerk dieser Studie liegt auf dem Vergleich des Einflusses von Hyperoxie auf die Immunzellen dieser unterschiedlichen Probandengruppen (Nichttaucher, Taucher und Sportler). Unsere Vorversuche zeigten, dass eine wiederholte Exposition gegenüber oxidativem Stress zu einer Gewöhnung der Zellen führen kann. Die Ergebnisse sollen aus arbeitsmedizinischer Sicht helfen, Risikogruppen besser einschätzen zu können, um diese vor möglichen gesundheitlichen Risiken effektiver schützen zu können.

Im Zusammenhang der beschriebenen Schädigung von Immunzellen durch Hyperoxie soll auch ein möglicher therapeutischer Einsatz von Vitamin C erprobt werden. Dabei soll im Zellexperiment untersucht werden, ob verschiedene Konzentrationen des Antioxidants Vitamin C oder anderen Antioxidantien gegen den schädigenden Einfluss von hyperoxischen Schäden eingesetzt werden können. Hierbei sollen ausschließlich Blutzellen von männlichen Probanden der Probandengruppe I verwendet werden.

Aus diesem Grund möchten wir von Ihnen Blut- und Urinproben gewinnen, um Rückschlüsse auf die Höhe des oxidativen Stresses ziehen zu können, dem Sie im Rahmen Ihres täglichen Lebens, Ihrer dienstlichen Tätigkeit oder ihres Hobbys ausgesetzt sind.

Aus ihrem Blut sollen die Immunzellen isoliert werden. Außerhalb ihres Körpers soll dann die DNA dieser Zellen auf ihre Schädigung durch Sauerstoffexposition (nach Tauchen bzw. Sport) untersucht werden. Diese Schädigung kann in Form von Doppelstrangbrüchen unter dem Mikroskop sichtbar

gemacht werden. Es wird kein Gentest vorgenommen. Nach einer weiteren Sauerstoffinkubation der Zellen in einer Druckkammer soll weiterhin die Lebensfähigkeit, die mögliche Einleitung eines Zelltodes (Apoptoseinduktion), deren Ausmaß einer eventuellen Apoptoseresistenz und der Aktivierungszustand der Zellen untersucht werden. Eine Immunmodulation durch Sauerstoffeinwirkung soll durch Nachweis von entzündungsfördernden und –hemmenden Stoffwechselprodukten der Zellen (Zytokinen) untersucht werden.

Eventuell werden ihre Zellen für bis zu 72h in einer Zellkultur am Leben gehalten und oben genannte Untersuchungen erneut durchgeführt. Hier soll die mögliche Gewöhnung ihrer Zellen an wiederholte Sauerstoffexposition (Adaptationsmechanismen) nachgewiesen werden.

Aus ihrem Urin sollen die experimentellen Parameter 8 oxo-Guanine und dihydroxylierte Benzoate (DHB) bestimmt werden, um die Höhe ihrer gesamtkörperlichen oxidativen Belastung anzuzeigen.

Der Versuch

Die obengenannte Studie wird in mehreren Teilabschnitten durchgeführt. Hierfür werden Sie, je nach Sauerstoffbelastungsprofil, vom Projektleiter in eine der vier Gruppen: 1. Nichttaucher, 2. Taucher in Ausbildung (Soldaten), 3. Taucher und 4. Sportler eingeteilt. Für jeden Probanden ist mit einem unterschiedlichen Zeitaufwand zu rechnen. Den genauen Zeitaufwand entnehmen Sie bitte der unten folgenden Gruppenbeschreibung. Die oben genannte Studie wird zur jeweils gleichen Tageszeit durchgeführt, sodass die Ergebnisse vergleichbar sind. Die eventuell notwendige Tauchausrüstung wird gestellt, aber auch eigene Ausrüstung kann verwendet werden.

Eine besondere Diät muss nicht eingehalten werden, es wäre jedoch schön, wenn Sie am Abend vor den Blutabnahmen bzw. der Sauerstoff-Exposition Alkohol meiden und ausreichend schlafen. Wenn Sie Raucher sind, bitten wir Sie, ab 2 Stunden vor der Blutabnahme bzw. der Sauerstoff-Exposition nicht mehr zu rauchen.

A) Gehören Sie zu der Nichttauchenden Kontrollgruppe 1: wird ihnen einmal morgens eine 27ml (3 Röhrchen à 9ml) Blutprobe abgenommen und Sie sollten eine 10ml Urinprobe abgeben.

Gehören Sie zu denjenigen, deren Blutzellen in Experimenten zur Untersuchung von möglichen protektiven Effekten von Vitamin C verwendet werden, wird einmalig eine Blutprobe von 18ml (2 Röhrchen à 9ml) entnommen.

Wenn Sie Soldat sind wird die Blutprobe zusammen mit der Arbeitsmedizinischen Blutprobe in der TUKV (Arbeitsmedizinische Untersuchungsstelle der Marine) entnommen und es entsteht für Sie kein weiteres Risiko durch die Teilnahme an dieser Studie. Sind Sie kein Bundeswehrangehöriger wird die Blutabnahme mittels einer sterilen Venenpunktion durch den Arzt oder Arzthelferin vorgenommen. Diese venöse Blutentnahme stellt eine invasive Maßnahme mit den bekannten Risiken: Blutung, Bluterguss, Nervenläsion, Thrombose, Embolie und Infektion dar.

Ihre maximale zeitliche Belastung ist mit einem Tag (Anreise, Gespräch, Probenabnahme, Abreise) angesetzt.

B) Gehören Sie zu der Gruppe 2 (Taucher in Ausbildung (Soldaten)) wird Ihnen morgens vor, direkt nach und 24h nach ihrem Sauerstoff-Toleranztest eine Blutprobe abgenommen und Sie sollten jeweils eine Urinprobe von 10ml abgeben. Wenn möglich, legen Sie bitte ein gültiges (nicht älter als 2 Jahre/ bzw. bei über 40 jährigen nicht älter als 1 Jahr) Tauchsportärztliches Attest und zur Überprüfung Ihrer Taucherfahrung ihr Tauchlogbuch vor.

Der Sauerstofftoleranztest (2,8bar Druckkammerfahrt mit 100% Sauerstoffatmung über 30 Minuten) erfolgt im Rahmen ihrer dienstlichen Tätigkeit. Die Erklärung und Risiko-Aufklärung über diesen Test und vorherigen Untersuchung ihrer Tauchtauglichkeit erfolgt von ihrem Taucherarzt in der TUKV-Untersuchungsstelle. Die Blutabnahme von jeweils 18ml (2 Röhrchen a 9ml) wird mittels einer sterilen Venenpunktion durch den Arzt oder Arzthelferin vorgenommen. Sie stellt eine invasive Maßnahme mit den bekannten Risiken: Blutung, Bluterguss, Nervenläsion, Thrombose, Embolie und Infektion dar.

Während des Sauerstofftoleranztests wird routinemäßig eine Sauerstoffelektrode über der Nackenmuskulatur angebracht. Hier werden die Temperatur und die Sauerstoffsättigung der Muskulatur kontinuierlich abgeleitet. Als Teilnehmer der Studie erhalten Sie drei weitere Sauerstoffelektroden, die an ihrem linken Bein am Oberschenkel, sowie Schienbein und Wade angebracht werden. Hier werden ebenfalls kontinuierlich die Temperatur und Sauerstoffsättigung abgeleitet.

Die Untersuchung und die Probenabnahme erfolgt während ihrer Arbeitszeit. Ihre maximale zeitliche Belastung ist mit zwei Tagen (Tag 1: Anreise, Gespräch, Probenabnahme, Sauerstofftoleranztest, Probenabnahme, Abreise; Tag 2: Anreise, Probenabnahme, Abreise) angesetzt.

C) Gehören Sie zu der Gruppe 3 (Taucher, Minentaucher und Kampfschwimmer) wird Ihnen morgens vor, direkt nach und 24 h nach einem definierten Freiwasser- bzw. Druckkammertauchgang eine Blutprobe und eine 10ml Urinprobe abgenommen. Bitte legen Sie ein gültiges (nicht älter als 2 Jahre/ bzw. bei über 40 jährigen nicht älter als 1 Jahr) Tauchsportärztliches Attest vor. Zur Überprüfung Ihrer Taucherfahrung legen Sie bitte Ihr Tauchlogbuch vor.

Taucher und Minentaucher:

Freiwassertauchgang oder Tauchgang in der Druckkammer (nasser Tauchgang): Atembelastung über 45 bis 60 Minuten mit Flossenschwimmen im aeroben Ausdauerbereich. Der jeweilige pO_2 , dem Sie bei den Tauchgängen ausgesetzt sein werden, hängt vom Gasgemisch der Atemluft und der Tauchtiefe ab:

Tauchen mit Pressluft: maximale Tauchtiefe 40m (Sporttauchgrenze) – hierbei strenge Beachtung der Dekompressionsgrenzen und entsprechender Auftauchverfahren.

Tauchen mit Nitrox(60% Sauerstoff und 40% Pressluft): maximale Tauchtiefe 15m - hierbei strenge Beachtung der Dekompressionsgrenzen und entsprechender Auftauchverfahren.

Kampfschwimmer:

Freiwassertauchgang oder Tauchgang in der Druckkammer (nasser Tauchgang): mit geschlossenem Kreislauf-Tauchgerät in maximaler Tauchtiefe von 7m (max. 1,6bar pO₂), Flossenschwimmern im aeroben Ausdauerbereich, maximale Tauchdauer bis zu 120min – hier strenge Beachtung der Hyperoxiegrenze.

Die Blutabnahme von jeweils 18ml (2 Röhrchen à 9ml) wird mittels einer sterilen Venenpunktion durch den Arzt oder Arzthelferin vorgenommen. Sie stellt eine invasive Maßnahme mit den bekannten Risiken: Blutung, Bluterguss, Nervenläsion, Thrombose, Embolie und Infektion dar. Die Risiken eines Studientauchganges entsprechen denselben Risiken, denen Sie sich während Ihrer dienstlichen Tätigkeit bzw. Ihres Hobbys aussetzen.

Wenn Sie Bundeswehrangehöriger sind erfolgt die Untersuchung, die Probenabnahme und ein dienstlich definierter Ausdauer-Tauchgang bzw. Druckkammertauchgang während ihrer Arbeitszeit.

Für Sie, sowohl als Bundeswehrangehöriger oder Nicht Bundeswehrangehöriger, ist mit einer maximalen zeitlichen Belastung von zwei Tagen (Tag 1: Anreise, Gespräch, Probenabnahme, Tauchgang oder Druckkammerfahrt, Probenabnahme, Abreise; Tag 2: Anreise, Probenabnahme, Abreise) zu rechnen.

D) Gehören Sie zu der Gruppe 4 (Sportler) wird Ihnen morgens vor, direkt nach und 24 h nach großer physischer Belastung eine Blutprobe und eine 10ml Urinprobe entnommen. Als Belastung ist eine Ausdauereinheit im aeroben Ausdauerbereich geplant. Die Dauer der Einheit hängt von der Sportart Rudern/Schwimmen, ca. 45-90min Laufen/Radfahren. Entscheidend ist hier die Homogenität der Belastung in der Gruppe, damit die Ergebnisse eine möglichst geringe Varianz aufweisen.

Die Blutabnahme von jeweils 18ml (2 Röhrchen à 9ml) wird mittels einer sterilen Venenpunktion durch den Arzt oder Arzthelferin vorgenommen. Sie stellt eine invasive Maßnahme mit den bekannten Risiken: Blutung, Bluterguss, Nervenläsion, Thrombose, Embolie und Infektion dar.

Wenn Sie Bundeswehrangehöriger sind erfolgt die Untersuchung und die Probenabnahme während ihrer Arbeitszeit bei einer dienstlich definierten Ausdauerbelastung.

Für Sie, sowohl als Bundeswehrangehöriger oder Nicht Bundeswehrangehöriger, ist mit einer maximalen zeitlichen Belastung von zwei Tagen (Tag 1: Anreise, Gespräch, Probenabnahme, sportliche Ausdauerbelastung, Probenabnahme, Abreise; Tag 2: Anreise, Probenabnahme, Abreise) zu rechnen.

Anschließend werden ihre Proben direkt unseren geplanten Untersuchungen zugeführt.

Welchen persönlichen Nutzen haben Sie von der Studie?

Sie werden durch die Teilnahme an der Studie keinen persönlichen Nutzen haben. Die Ergebnisse der Studie könnten aber möglicherweise dazu beitragen, tauchmedizinische und sportmedizinische Untersuchungen zu verbessern und somit ihre dienstliche Tätigkeit sicherer zu gestalten.

Darüber hinaus leisten sie einen wesentlichen Beitrag zur Erweiterung des Wissens über die Wirkungen von oxidativem Stress auf den menschlichen Organismus.

Welche Risiken sind mit der Teilnahme an der Studie verbunden?

Die Risiken, denen Sie während der Studie ausgesetzt sind, sind nicht höher als bei Ihrer normalen dienstlichen Tätigkeit im Rahmen von einem Freiwasser- oder Druckkammer-Tauchgang und einem Sauerstofftoleranztest, ihres Hobbys oder der üblichen sportlichen Wettkampf- bzw. Trainingsbelastung. Durch die Blutabnahme entstehen die bekannten Risiken: Blutung, Bluterguss, Nervenläsion, Thrombose, Embolie und Infektion.

Wer darf an der Studie nicht teilnehmen?

Schwangere Frauen dürfen an dieser Studie nicht teilnehmen, weder als Kontrolle noch als Taucher.

Der Grund hierfür ist, dass schwangere Frauen generell nicht tauchen sollten. Um ein Schwangerschaft möglichst sicher ausschließen zu können, wird bei jeder weiblichen Studienteilnehmerin nach vorheriger Aufklärung und schriftlicher Einwilligung ein Schwangerschaftstest im Urin durchgeführt.

Sollten Sie trotzdem während der Studie schwanger werden oder den Verdacht haben, dass Sie schwanger geworden sind, informieren Sie bitte umgehend den Versuchsleiter.

Tauchende Personen ohne entsprechende Tauchausbildung (mindestens PADI Open WaterDiver, CMAS *, DIWA Open WaterDiver oder äquivalent)

Taucher ohne gültiges Tauchsportärztliches Attest (nicht älter als 2 Jahre/ bzw. bei über 40 jährigen nicht älter als 1 Jahr)

Probanden mit akuter Erkrankung

Minderjährige

Entstehen für Sie Kosten durch die Teilnahme an der Studie? Erhalte Sie eine Aufwandsentschädigung?

Durch Ihre Teilnahme an dieser Studie entstehen für Sie keine zusätzlichen Kosten.

Für Ihre Teilnahme an dieser Studie können wir Ihnen auf Grund der engen finanziellen Rahmenbedingungen leider keine Aufwandsentschädigung anbieten.

Sind Sie während der Studie versichert?

Bundeswehrangehörige sind bei Teilnahme im dienstlichen Interesse direkt umfassend über den Dienstherrn versichert. Nicht-Bundeswehrangehörige Taucher sind über die eigene DAN (Divers

AlertNetwork) Versicherung International Diving Assurance Ltd. versichert. Nicht-Bundeswehr-Angehörige Sportler sind über die ARAG Sportversicherung versichert.

Der Umfang des Versicherungsschutzes ergibt sich aus den Versicherungsunterlagen, die Sie auf Wunsch ausgehändigt bekommen.

Wenn Sie vermuten, dass durch die Teilnahme an der Studie Ihre Gesundheit geschädigt oder bestehende Leiden verstärkt wurden, zeigen Sie dies bitte unverzüglich dem Versicherer an, um Ihren Versicherungsschutz nicht zu gefährden, gegebenenfalls mit Unterstützung durch Ihren Versuchsleiter.

Sofern Sie Ihre Anzeige direkt an den Versicherer richten, informieren Sie bitte zusätzlich Ihren Versuchsleiter.

Bei der Aufklärung der Ursache oder des Umfangs eines Schadens sind Sie zur Mitwirkung verpflichtet, um den Schaden abzuwenden und zu mindern.

Name und Anschrift der Versicherung: ARAG Allgemeine Versicherungs-AG, Sportversicherung

Telefon: 0211 - 963 38 34

Fax: 0211 - 963 36 26

Versicherungsnummer: SpV 1048515

Wir weisen Sie darauf hin, dass Sie auf dem Weg von und zur Prüfstelle nicht unfallversichert sind.

Werden Ihnen neue Erkenntnisse während der Studie mitgeteilt?

Sie werden über neue Erkenntnisse informiert, die in Bezug auf diese Studie bekannt werden und die für Ihre Bereitschaft zur weiteren Teilnahme wesentlich sein können. Auf dieser Basis können Sie dann Ihre Entscheidung zur weiteren Teilnahme an dieser Studie überdenken.

Wer entscheidet, ob Sie aus der Studie ausscheiden?

Sie können jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, Ihre Teilnahme beenden, ohne dass Ihnen dadurch irgendwelche Nachteile entstehen.

Was geschieht mit ihren Daten?

Während der Studie werden eventuell medizinische Befunde (Blutwerte der TUKV-Untersuchung) und persönliche Informationen von Ihnen erhoben und in der Prüfstelle in pseudonymisierter Form in Ihrem persönlichen Dokumentationsbogen niedergeschrieben. Pseudonymisiert bedeutet, dass keine Angaben von Namen oder Initialen verwendet werden, sondern nur ein Nummern- und/oder Buchstabencode. Durch die Codierung sind die Daten gegen unbefugten Zugriff gesichert.

Aus Versicherungstechnischen Gründen und zum Nachweis einer ordentlich durchgeführten Medizinischen Studie muss jedoch ihr Name und Geburtsdatum einmalig mit dem Code zusammen festgehalten werden. Eine Entschlüsselung erfolgt nur unter den vom Gesetz vorgeschriebenen Voraussetzungen.

Die Ergebnisdaten der Studie werden zusätzlich unter ihrem Pseudonym gespeichert, ausgewertet und gegebenenfalls für eine statistische Auswertung an einen externen Statistiker weitergegeben.

Die gesetzlichen Bestimmungen enthalten nähere Vorgaben für den erforderlichen Umfang der Einwilligung in die Datenerhebung und -verwendung. Einzelheiten, insbesondere zur Möglichkeit eines Widerrufs entnehmen Sie bitte der Einwilligungserklärung die im Anschluss an diese Patienteninformation abgedruckt ist.

Was geschieht mit ihren Blut- und Urinproben?

Die Blut- und Urinproben werden ausschließlich für diese Studie verwendet. Etwaiges Restmaterial wird bei Abschluss der Prüfung vernichtet.

Welchen Ansprechpartner haben Sie?

Sie haben stets die Gelegenheit sich zu weiteren Beratungsgesprächen und mit Fragen, die Ihre Rechte und Pflichten als Patient und Teilnehmer an der Studie betreffen, an die Prüfstelle im Schifffahrtmedizinischen Institut der Marine, Kopperpahler Allee 120, 24119 Kronshagen zu wenden. Als Projektleiter ist für Sie PD Dr. med. A. Koch zuständig. Er ist auch unter der Telefonnummer 0431-5409-1503 oder e-mail: a.koch@iem.uni-kiel.de erreichbar.

Dokumentationsbogen 1**Studie:****„Einfluss von Hyperoxie auf die Immunkompetenz von Tauchern“**

Im Dokumentationsbogen 1 soll der Probanden Name und das Geburtsdatum einer Probanden-Identifikation, bestehend aus der Gruppenzugehörigkeit A bis E für Gruppe 1 bis 5 und einer fortlaufenden Nummer von 1 bis 25, zugeordnet werden. Dieser Bogen wird in Papierform im **Studienordner I** abgelegt. Für alle weiteren Dokumentationen wird die Probanden ID verwendet. Die Ergebnisauswertung und Speicherung der Studienuntersuchungen erfolgt an den jeweiligen Labor PCs, so dass hier keine Rückschlussmöglichkeit auf personalisierte Daten besteht.

Name:**Geburtsdatum:****Probanden ID:**

Aufklärung zum Schwangerschaftstest für weibliche Studienteilnehmerinnen

Da bei einer Schwangerschaft generell nicht getaucht werden darf, soll bei Ihnen anhand eines β -HCG Urintests vor Beginn der Studie eine Schwangerschaft ausgeschlossen werden. Da ein Urintest erst ab Fälligkeitstag der Periode zu mehr als 99% sicher eine Schwangerschaft nachweisen kann, besteht ein Restrisiko schwanger zu sein. Dieses Restrisiko ist nur auszuschließen, wenn Sie nicht an der Studie teilnehmen. Sollte eine Schwangerschaft nachgewiesen werden, führt dies zum sofortigen Ausscheiden von der Studie. Für Sie hat weder die Nichtteilnahme bzw. der Ausschluss von der Studie einen Nachteil.

Ich erkläre mich bereit, einen Schwangerschaftstest im Urin durchführen zu lassen.

Probandin

-----Unterschrift
Ort, Datum

Unterschrift Projektleiter

Ort, Datum

Einverständniserklärung zur Studie**„ Einfluss von Hyperoxie auf die Immunkompetenz von Tauchern und Kampfschwimmern“**

Prüfstelle: Sektion Maritime Medizin
am Institut für Experimentelle Medizin des UK-SH
c/o Schifffahrtmedizinisches Institut der Marine
Kopperpahler Allee 120
24119 Kronshagen

Ansprechpartner: FLA PD Dr. med. A. Koch
Tel: 0431-5409-1503
e-mail: a.koch@iem.uni-kiel.de

Ich bin ausreichend mündlich und schriftlich über die Studie, an der ich teilnehme, informiert worden. Ich habe die Probandeninformation gelesen und verstanden. Meine Fragen zu der Studie sind zu meiner Zufriedenheit beantwortet worden.

Ich weiß, dass ich freiwillig an der Studie teilnehme und dass ich jederzeit davon zurücktreten kann, ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.

Ich bin damit einverstanden, dass meine unter einem Code pseudonymisierte Ergebnis-Daten zur wissenschaftlichen Auswertung innerhalb der Forschungsarbeitsgruppe und eventuell an einen externen Statistiker weitergeleitet werden. Mit einer Veröffentlichung der Ergebnisse bin ich ebenfalls einverstanden.

Hiermit stimme ich einer Teilnahme an der oben genannten Studie zu. Eine Kopie der Einverständniserklärung und der Versicherungsunterlagen habe ich erhalten.

Bei Frauen: Ich bestätige, dass ich nicht schwanger bin und, dass der durchgeführte Schwangerschaftstest negativ war.

Datenschutz:

Mir ist bekannt, dass bei dieser Studie personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde über mich erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Angaben über meine Gesundheit erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor der Teilnahme an der Studie folgende freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus, das heißt ohne die nachfolgende Einwilligung kann ich nicht an der Studie teilnehmen.

1. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser Studie personenbezogene Daten, Angaben über meine Gesundheit, über mich erhoben und in Papierform sowie auf elektronischen Datenträgern beim Schifffahrtsmedizinischen Institut in Kiel aufgezeichnet werden. Soweit erforderlich, dürfen die erhobenen Daten pseudonymisiert (verschlüsselt) weitergegeben werden:
 - a) externe wissenschaftlich kooperierende Einrichtungen (z.B externer Statistiker)
 - b) ggf. an Drittmittelgeber im Rahmen der Berichterstattung, ggf. an die Ethikkommission
 - c) im Rahmen der wissenschaftlichen Publikation der Ergebnisse
2. Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit die Teilnahme an der Studie beenden kann. Beim Widerruf meiner Einwilligung, an der Studie Teilzunehmen, habe ich das Recht, die Löschung aller meiner bis dahin gespeicherten personenbezogenen Daten zu Verlangen.
3. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Daten nach Beendigung oder Abbruch der Studie mindestens zehn Jahre aufbewahrt werden. Danach werden meiner personenbezogenen Daten gelöscht, soweit nicht gesetzliche, satzungsmäßige oder vertragliche Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.

Unterschrift Proband/in

Name lesbar in Druckbuchstaben

Ort, Datum

Unterschrift Projektleiter

Ort, Datum



A.D. 1665

ETHIK-KOMMISSION

Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Sektion Maritime Medizin
PD Dr. Andreas Koch
Institut für Experimentelle Medizin des UK-SH
Schiffahrtsmedizinisches Institut der Marine
Kopperpahler Allee 120
24119 Kiel Kronshagen

Postadresse:
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09
Telefax 04 31 / 597-53 33
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum: 13.9.2013

AZ: A 120/13 (bitte stets angeben)
Studienplan: Einfluss von Hyperoxie auf die Immunkompetenz von Tauchern und Kampfschwimmern
Studienplan - überarbeitete Version mit Schreiben vom 26.08.2013,
Stellungnahme vom 26.08.2013 zu Schreiben der Ethik-Kommission vom 17.06.2013,
Probandeninformation und Einverständniserklärung - überarbeitete Version mit Schreiben vom 26.08.2013,
Angebot ARAC Gruppenunfallversicherung vom 16.08.2013 mit Versicherteninformation

Antragsteller und Projektleiter: PD Dr. med. Andreas Koch, Institut für Experimentelle Medizin, Sektion Maritime Medizin, Schiffahrtsmedizinisches Institut der Marine, Kopperpahler Allee 120, 24119 Kronshagen

Datum des Erstantrages: 08.04.2013
Datum des überarb. Antrages: 26.08.2013

V o t u m

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel hat die zu dem oben genannten Antrag gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein eingereichten Unterlagen auf mögliche berufsethische und berufsrechtliche Bedenken hin überprüft.

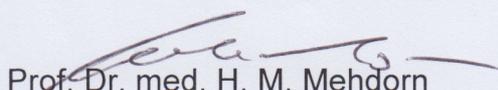
Die Kommission stimmt darin überein, dass gegen die Durchführung der Studie nunmehr keine Bedenken bestehen.

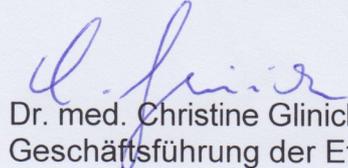
Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:

1. Die Ethik-Kommission setzt voraus, dass Minderjährige von der Studienteilnahme ausgeschlossen werden. Ein Einschluss von Sportlern ist ab 18 Jahren zulässig. Daher muss die Probandeninformation auf Seite 28 (Ausschluss: „Sportler unter 16 Jahre“) ge-

ändert werden.

2. Die Ethik-Kommission setzt voraus, dass vor Studienbeginn eine Kopie der Versicherungspolice vorgelegt wird, da dem Antrag lediglich ein Angebot der Versicherung vorliegt, nicht die Versicherungspolice.
3. Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen der Studie der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.
4. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt beim Projektleiter und den an der Studie teilnehmenden Mitarbeitern.
5. Die Ethik-Kommission weist darauf hin, dass für eventuell in Zukunft weitere teilnehmende Zentren eine berufsrechtliche Beratung bei der jeweils für sie zuständigen Ethik-Kommission erforderlich ist.
6. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muss die Kommission umgehend benachrichtigt werden.
7. Nach Abschluss der Studie erbittet die Kommission einen kurzen Bericht mit einem Hinweis, ob im Laufe der Studie ethische oder juristische Probleme aufgetreten sind.


Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn
Vorsitzender der Ethik-Kommission


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

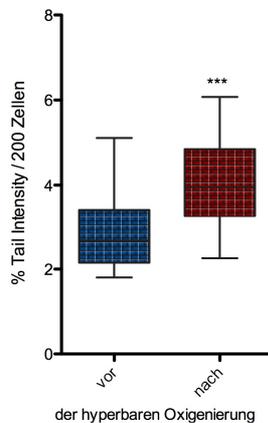
Nachfolgend sind die Mitglieder der Ethik-Kommission aufgeführt, die diese Studie im Umlaufverfahren beurteilt haben:

- Prof. Dr. med. R. Fölster-Holst (Dermatologie)
- Prof. Dr. med. N. Frey (Innere Medizin und Kardiologie)
- Prof. Dr. med. Dr. jur. H.-J. Kaatsch (Rechtsmedizin)
- Prof. Dr. med. H.M. Mehdorn (Neurochirurgie)
- PD Dr. H. Niehaus (Harz- und Gefäßchirurgie)
- PD Dr. med. S. Nikolaus (Innere Medizin)
- PD Dr. med. D. Proppe (Innere Medizin und Klinische Pharmakologie)
- PD Dr. med. A. Rohr (Neuroradiologie)
- Dr. M. Schwinge (Pröpstin i.R.)

A-4 Tailmoment und %Tail Intensity Auswertung

Quantifizierung des Einflusses von hyperbarem Sauerstoff auf Probanden

Abbildung 6-10 DNA-Schädigung in PBMCs nach hyperbarer Oxigenierung in vivo



Sauerstoffbelastung: 280 kPa, 30 min

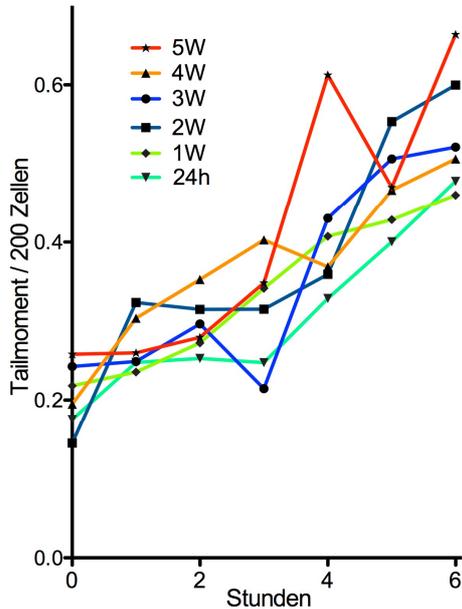
links: Darstellung der Ergebnisse aus der %Tail-Intensity-Auswertung, dargestellt ist jeweils der Median sowie die 25/75% und 5/95% Perzentilen jeweils pro 200 ausgewertete Zellen, *** $p < 0,0001$, $n = 14$

unten: Tabellarische Aufstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der DNA-Schädigung in vivo aus visueller und softwaregestützter Analyse.

DNA-Schädigung vor und nach O ₂ Toleranztest					
	Einheit	vor O ₂ Toleranztest		nach O ₂ Toleranztest	
		MW	SD	MW	SD
visuell	%/200 Zellen	4,880	3,444	16,77	4,974
TM	/200 Zellen	0,3101	0,1315	0,6412	0,2552
TI	%/200 Zellen	2,998	0,9465	4,192	1,018

Untersuchung der Adaptation an die Exposition gegenüber hyperbarem Sauerstoff

Abbildung 6-11 Median der DNA-Schädigung in Tailmoment-Auswertung nach hyperbarer Oxigenierung ex vivo im Anschluss an repetitive O₂-Belastung in vivo über drei Monate



Sauerstoffbelastung ex vivo 400 kPa (1-6 h); n=7

Abbildung 8-12: dargestellt ist jeweils der Median jeweils pro 200 ausgewertete Zellen (aus Gründen der Übersicht ohne Interperzentilranges); keine signifikanten Unterschiede zwischen den Graphen

Abbildung 8-13 links: Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichungen jeweils pro 200 ausgewertete Zellen rechts: Darstellung der der Median jeweils pro 200 ausgewertete Zellen (aus Gründen der Übersicht ohne Interperzentilranges); keine signifikanten Unterschiede zwischen den Graphen

Abbildung 6-12 DNA-Schädigung in %Tail Intensity-Auswertung nach hyperbarer Oxigenierung ex vivo im Anschluss repetitive O₂-Belastung in vivo über drei Monate

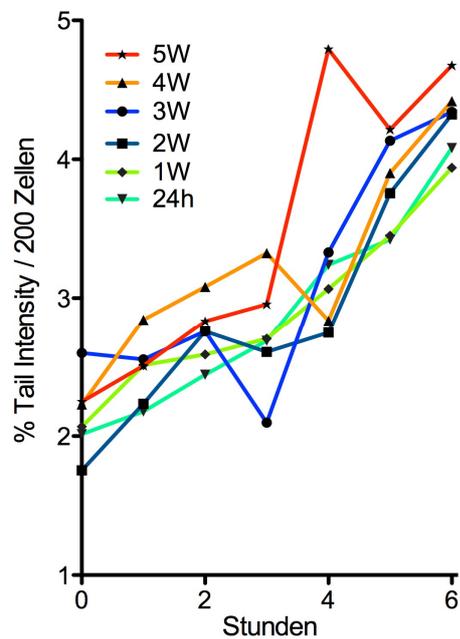
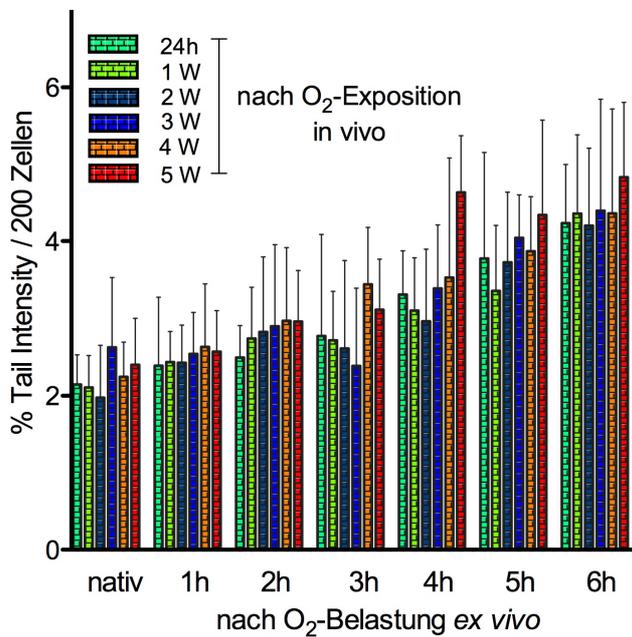
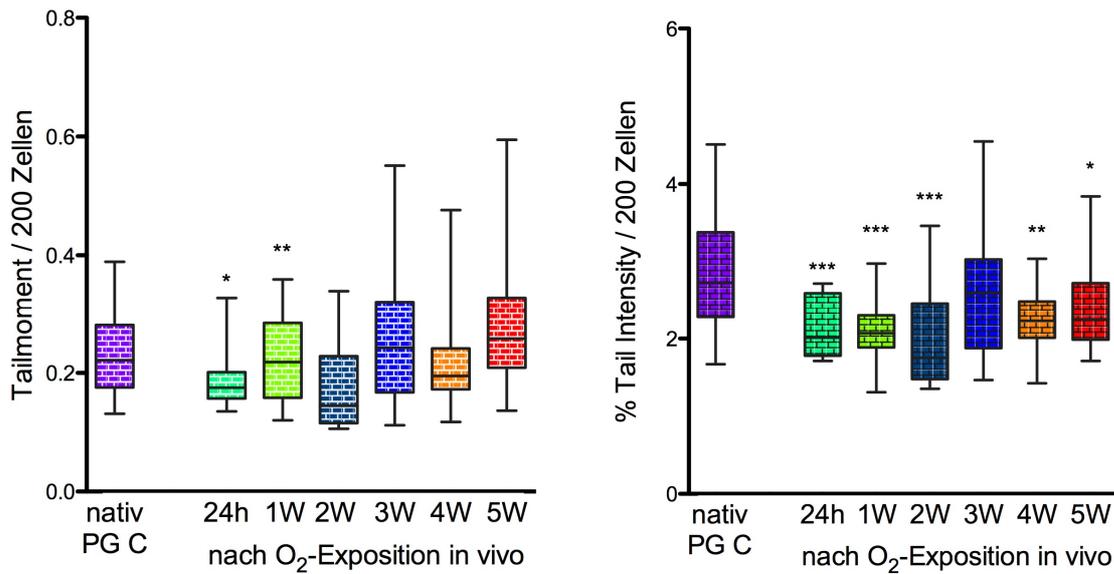


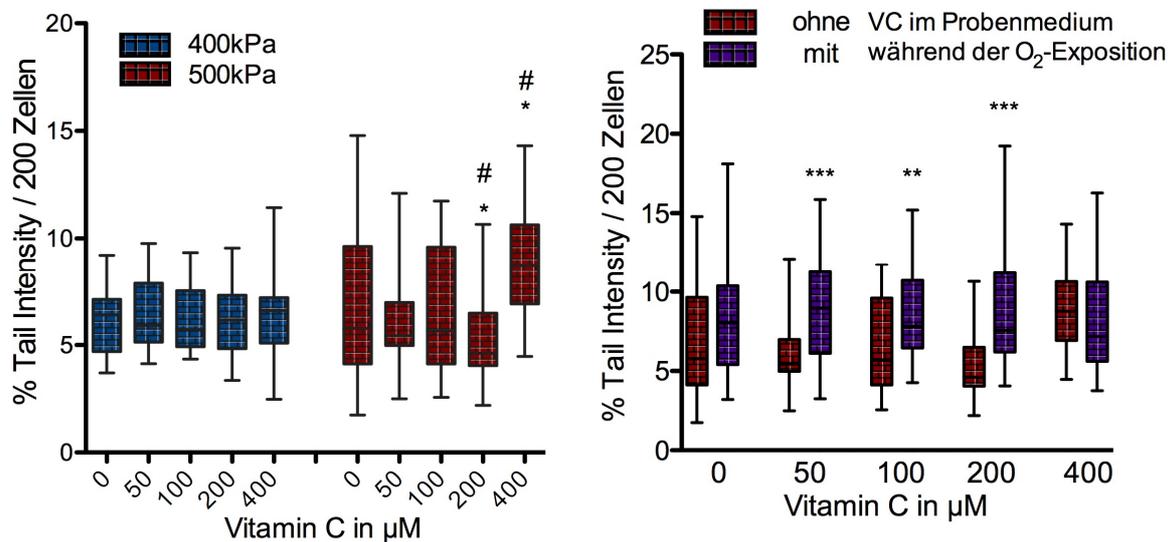
Abbildung 6-13 Basale DNA-Schädigung in PBMCs nach dreimonatiger repetitiver O₂-Belastung in vivo



Durchschnittliche Sauerstoffbelastung in vivo 160 kPa über 50 bis 120 min. mindestens 7 Mal pro Woche; dargestellt ist jeweils der Median sowie die 25/75% und 5/95% Perzentilen jeweils pro 200 ausgewertete Zellen; n=7 links: $p_{PGC/24h}=0,0431$ $p_{PGC/2W}=0,0082$ rechts: $p_{PGC/24h}=0,0009$, $p_{PGC/1W}=0,0003$, $p_{PGC/2W}=0,0009$, $p_{PGC/4W}=0,0058$, $p_{PGC/5W}=0,0439$

Einfluss von Vitamin C auf PBMCs unter hyperbarer Oxigenierung

Abbildung 6-14 %Tail Intensity-Auswertung der DNA-Schädigung nach hyperbarer Oxigenierung in Abhängigkeit der Intensität der Belastung und der Vitamin-C-Konzentration nach Inkubation und während des Experiments



links: dargestellt ist jeweils der Median sowie die 25/75% und 5/95% Perzentilen jeweils pro 200 ausgewertete Zellen, Signifikanztestungen: *Sterne* jeweils zum Kontrollwert (0 µM VC): $p_{0/400mMVC}=0,0313$ $p_{0/200mMVC}=0,0128$ ($p_{400kPa}=0,0023$, $p_{500kPa}=0,0015$); *Rauten* jeweils zwischen 400 und 500kPa (3 h.): $p_{200µMVC}=0,0311$, $p_{400µMVC}=0,0064$; $n_{400kPa}=18$, $n_{500kPa}=34$
 rechts: dargestellt ist jeweils der Median sowie die 25/75% jeweils pro 200 ausgewertete Zellen; $p_{50µMVC}=0,0007$, $p_{50µMVC}=0,0054$, $p_{50µMVC}<0,0001$ jeweils zwischen "mit"/"ohne" VC; Sauerstoffbelastung: 500 kPa, 3 h; $n_{\text{ohne}VC}=34$, $n_{\text{mit}VC}=24$

A-5 Weitere Ergänzungen

A - 5.1 HBO-Therapie / Sauerstofftoleranztest

HBO^{zz} - Hyperbaric oxygen therapy

Die Sauerstoffatmung bei Überdruck ist als hyperbare Oxygenierung bekannt und wird zur Therapie (HBO-Therapie) von verschiedenen akuten und chronischen Erkrankungen eingesetzt, z. B. Dekompressionskrankheit, Verbrennungen, Kohlenstoffmonoxidvergiftungen, Tinnitus, schweren Weichteiltraumata oder bei schwieriger Wundheilung z. B. Osteomyelitis und (aseptischen) Knochen- und Weichteilnekrosen [271][272][273]. Je nach Indikation existieren unterschiedliche Protokolle der HBO-Therapie^{aaa} (z. B. (z. B. 100% O₂, 150kPa Überdruck, 60 Minuten oder 100% O₂, 2,5 ATA (≈245kPa), 3x20min [226]). Die Wirkweise dieser Therapie ist auf die erhöhten Konzentrationen molekularen Sauerstoffs im Gewebe zurückzuführen, denn die erhöhte Sättigung von physikalisch gelöstem Sauerstoff im Blut führt zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung in unterversorgten Geweben. Somit können z. B. strikt anaerobe Bakterien abgetötet werden [271][272][274]. Des Weiteren werden der HBO-Behandlung immunmodulatorische Einflüsse zugeschrieben [274][273]. Die Entstehung von ROS ist bei der HBO nur ein Nebeneffekt, der nur in den seltensten Fällen auch therapeutische Wirkung [274] hat.

Sauerstofftoleranztest

Der Sauerstofftoleranztest (100% O₂, 280kPa, 30min) [103][206] wird bei Personen durchgeführt, die regelmäßig hochdosiertem hyperbarem Sauerstoff ausgesetzt werden, z. B. bei Kampfschwimmern der deutschen Marine. Mit diesem Test soll überprüft werden, ob eine große Empfindlichkeit des Organismus gegenüber Sauerstoff vorliegt, bei der es aufgrund der Neurotoxizität hochdosierten Sauerstoffs zu Krämpfen kommen kann (Sauerstofftoxikose) [200].

A - 5.2 Verwendung von Endonukleasen bei der Durchführung des Comet Assays

In einigen Studien werden bei der Durchführung des alkalischen Comet Assays spezielle Endonukleasen eingesetzt, die durch "schneiden" der DNA an den entsprechenden Stellen oxidierte Basen sichtbar machen sollen [275][276]. Hierdurch soll das Ausmaß der DNA-Schädigung genauer quantifiziert werden. Allerdings wird durch Verwendung eines Enzyms ein nicht vollständig kontrollierbarer zusätzlicher Experimentalschritt nötig. Da in der vorliegenden Arbeit lediglich untersucht werden sollte, ob DNA-Schädigung vorliegt, oder nicht, wurde von der Verwendung von Endonukleasen abgesehen.

^{zz} Hyperbaric oxygen

^{aaa} HBO-Therapie ist nach dem Beschluss European Consensus Conference 1994 in Lille (Frankreich) als Exposition von 100% Sauerstoff definiert, der unter Überdruckbedingungen von mindestens 2ATA (≈196kPa) und über einen Zeitraum von mindestens 60min geatmet wird.

A - 5.3 Transport von VC durch Zellmembranen

Es existieren zwei VC-Transporter-Systeme: GLUT1 und SVCT1/2. Der nahezu ubiquitär vorkommende [173][277] Glukosetransporter 1 (GLUT1) ist eigentlich ein nicht-insulinabhängiger Transporter für Glukose. In Spezies, die nicht in der Lage sind, VC zu synthetisieren^{bbb}, kann er jedoch neben D-Glukose und anderen Pentosen und Hexosen auch VC in Form von DHA transportieren [139][187][278][280]. Die Aufnahme erfolgt als erleichterter Transport entlang eines Konzentrationsgefälles. Der GLUT1-Transporter ist hauptsächlich verantwortlich für die Aufnahme von VC [173][281][282].

Daneben existieren auch spezialisierte natriumabhängige SVCT^{ccc}-Transporter (SVCT1 und SVCT2), die AA nach intrazellulär transportieren können. SVCT1 sind dabei vor allem in epithelialen Systemen wie Intestinum, Niere und Leber vertreten, wohingegen SCVT2 in metabolisch aktiven und spezialisierten Geweben wie Gehirn, Auge oder kernhaltigen Blutzellen, zu denen auch PBMCs gehören, vorkommen [139], [186][278]. Über diese Transporter können die entsprechenden Zellen ihren VC-Bedarf gezielt anpassen. Die intrazelluläre Speicherung von VC findet nach Aufnahme von AA bzw. nach Umwandlung von DHA in die reduzierte Form (AsCH⁻) (z. B. durch Gluthathionperoxidase katalysiert) als AA statt [173][282][277]. Für intrazelluläre Membranen der Zellorganellen sind lediglich GLUT1-Transporter beschrieben [173]. Mitochondrien haben zusätzlich GLUT10-Transporter, die aber wie GLUT1 DHA transportieren [283]. Es kann also nur DHA in Zellorganellen gelangen. Dies liegt jedoch, da DHA Produkt zahlreicher Reduktionsprozesse ist, in ausreichendem Maß vor, sodass der notwendige Reaktionsschritt für den ausreichenden Transport von intrazellulär in die Zellkompartimente keine Limitation der Aufnahme darstellt.

In Studien, die sich mit der Substanz Vitamin C befassen, ist oft nicht genau nachvollziehbar, wann genau welche Transportform entscheidend ist, vor allem in solchen, die sich allein mit der Wirkung von VC als Derivatgruppe befassen. Meist wird jedoch, wie auch in dieser Studie, AA^{ddd} zur Untersuchung der VC-Wirkung verwendet.

^{bbb} Menschen und einige Primaten, Meerschweinchen, zu Forschungszwecken ODS (Osteogenic Disorder Shionogi) Ratten [278][279]

^{ccc} Natrium-Vitamin C Co-Transporter

^{ddd} AA dissoziiert unter physiologischem pH-Wert größtenteils zum Ascorbat-Ion (AsCH⁻) (vgl. Kapitel 1.4)

A - 5.4 Empfehlung zur Vitamin C-Zufuhr

Abbildung 6-15 Empfehlung zur Vitamin C- Zufuhr gemäß der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE)

Alter	Vitamin C		
	mg/Tag	mg/MJ ¹ (Nährstoffdichte)	
		m	w
Säuglinge			
0 bis unter 4 Monate ²	50	25	26
4 bis unter 12 Monate	55	18	19
Kinder			
1 bis unter 4 Jahre	60	13	14
4 bis unter 7 Jahre	70	11	12
7 bis unter 10 Jahre	80	10	11
10 bis unter 13 Jahre	90	10	11
13 bis unter 15 Jahre	100	9	11
Jugendliche und Erwachsene³			
15 bis unter 19 Jahre	100	9	12
19 bis unter 25 Jahre	100	9	12
25 bis unter 51 Jahre	100	10	13
51 bis unter 65 Jahre	100	11	14
65 Jahre und älter	100	12	14
Schwangere ab 4. Monat	110		12
Stillende⁴	150		14

¹Berechnet für Jugendliche und Erwachsene mit überwiegend sitzender Tätigkeit (PAL-Wert 1,4)
²Hierbei handelt es sich um einen Schätzwert
³Raucher 150 mg/Tag
⁴Unter Berücksichtigung der mit 750 ml Frauenmilch sezernierten Vitamin C-Menge

A - 5.5 Berechnung der Wellgrößen

Größen: V = Volumen; r = Radius; h = Höhe

Formeln: $V = \pi * r^2 * h$ daraus folgt: $h = \frac{V}{\pi * r^2}$ für die Höhe der Flüssigkeitssäule.

24-Well-Platten

$$r = 8\text{mm} = 8 * 10^{-3}\text{m}$$

$$V = 1\text{ml} = 1 * 10^{-3}\text{l} = 1 * 10^{-6}\text{m}^3$$

$$h_{24} = \frac{1 * 10^{-6}}{\pi * (8 * 10^{-3})^2} = 4,974 * 10^{-3}[\text{m}] = 4,974\text{mm}$$

$$h_{96} = \frac{2 * 10^{-7}}{\pi * (3,5 * 10^{-3})^2} = 5,197 * 10^{-3}[\text{m}] = 5,197\text{mm}$$

96-Well-Platten

$$r = 3,5\text{mm} = 3,5 * 10^{-3}\text{m}$$

$$V = 0,2\text{ml} = 2 * 10^{-4}\text{l} = 2 * 10^{-7}\text{m}^3$$

Verhältnis Oberfläche ($O = \pi * r^2$) zu Höhe der Flüssigkeitssäule $\rightarrow \frac{O}{h} = \frac{\pi * r^2}{h}$

$$\text{für 24-Well-Platten} = \frac{\pi * (8 * 10^{-3})^2}{h_{24}} = \frac{2,011 * 10^{-4}}{4,974 * 10^{-3}} = 4,043 * 10^{-2}$$

$$\text{für 96-Well-Platten} = \frac{\pi * (3,5 * 10^{-3})^2}{h_{96}} = \frac{3,848 * 10^{-5}}{5,197 * 10^{-3}} = 7,405 * 10^{-3}$$

Aus dieser Berechnung folgt, dass das Verhältnis Oberfläche (O) zu Höhe (h) der Flüssigkeitssäule deutlich größer für die 24-Well Platten ist.

$$\frac{O_{24}}{h_{24}} \gg \frac{O_{96}}{h_{96}}$$

Aus dem größeren Oberflächen-Höhe-Quotienten ergibt sich, dass der Sauerstoff in den größeren Wells der 24-Well Platten schneller zu den Zellen, die sich vornehmlich am Wellboden befinden, diffundieren kann und dort oxidative DNA-Schädigung induzieren^{eee}.

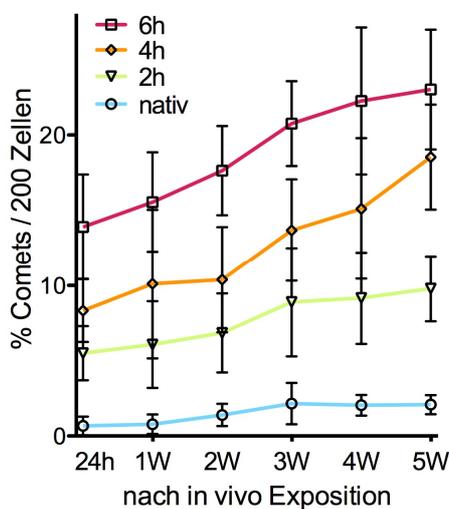
^{eee} Zur genauen Berechnung der Gaslösung müssten aufwendige Berechnungen angestellt werden, die die Löslichkeit von Sauerstoff im Probenmedium berücksichtigt, die unter anderem von der Zusammensetzung des Probenmediums (Osmolarität, Inhaltsstoffe usw.) abhängig ist. Dies würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, weshalb hier der ebenfalls aussagekräftige Parameter des Verhältnisses von Oberfläche zu Höhe der Flüssigkeitssäule angegeben ist.

A - 5.6 Ergänzende Graphiken

Ergänzung zu Kapitel 5.2.2

Um den Verlauf des abnehmenden adaptiven Schutzes genauer beurteilen zu können, wurden die bei O₂-Exposition *ex vivo* (1-6h) entstandenen Daten der DNA-Schädigung in Abhängigkeit vom Abstand zum letzten Tauchgang (24 h-5 W) ausgewertet (siehe Kapitel 4.2). In der Graphik (Abbildung 6-16) lässt sich ein annähernd sigmoidaler Verlauf der Kurven erkennen, wobei die maximale Steigung als Ausdruck des stärksten Nachlassens des adaptiven Schutzes zwischen 2 und 3/4 Wochen liegt. Dieser Verlauf einer Sättigungskurve ist beim 6h-Graphen, also bei größter gemessener O₂-Exposition *ex vivo*, am deutlichsten, was die Aussage des abnehmenden adaptiven Schutzes unterstreicht.

Abbildung 6-16 Abnahme des adaptiven Schutzes gegenüber Sauerstoffbelastung *ex vivo*

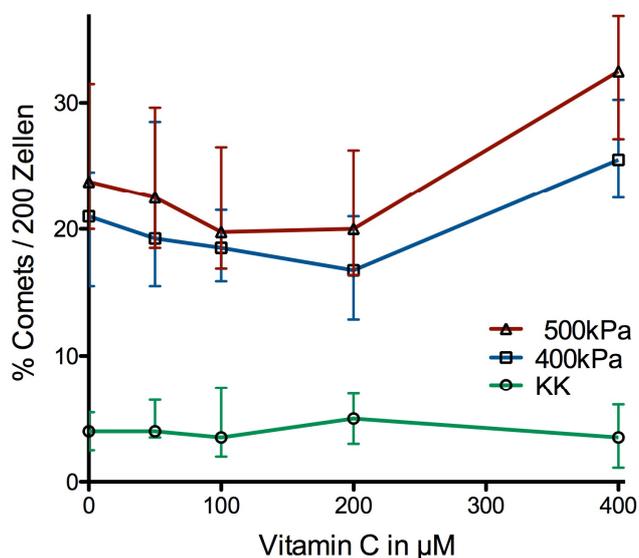


Sauerstoffbelastung 400 kPa, 1-6 h; graphische Darstellung der MW+SD nativ sowie nach 2 h, 4 h, 6 h *ex vivo* O₂-Belastung jeweils pro 200 ausgewertete Zellen; dargestellt des visuellen Scorings, n = 7 (aus Gründen der Übersicht ist nur der nativ-Graph und der nach jeder zweiten Stunde dargestellt)

Diese Beobachtung des 2-3 wöchigen Anhaltens des adaptiven Schutzes stimmt mit einer weiteren Beobachtung aus der bereits angesprochenen Studie von Witte et al. [16] überein. Die Ergebnisse dieser Studie ließen vermuten, dass in PBMCs von Probanden mit geringerem (< 21 Tage) zeitlichen Abstand zur letzten hyperbaren Sauerstoffexposition *in vivo* weniger DNA-Schäden induzierbar waren, als nach größerem (> 21 Tage) zeitlichen Abstand. Im Gegensatz zur genannten Arbeit konnten jedoch besser diskriminierbare Daten gewonnen werden, da es sich bei der vorliegenden Studie nicht (wie bei der besagten Vorarbeit) um eine retrospektive Betrachtung, sondern um eine prospektive Untersuchung handelte, in der die Zeitpunkte der Probennahmen exakt definiert waren.

Ergänzung zu Kapitel 5.2.3

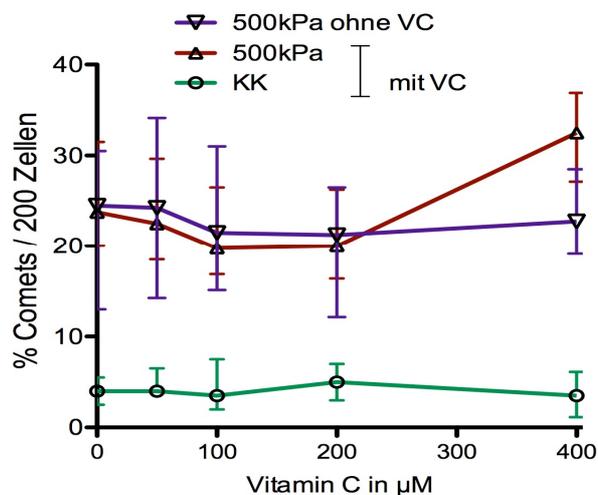
Abbildung 6-17 DNA-Schädigung durch verschiedene Intensitäten oxidativer Belastung und in Abhängigkeit von der Vitamin C-Konzentration



Dargestellt ist jeweils der Median sowie die 25/75% Perzentilen jeweils pro 200 im visuellen Scoringverfahren ausgewerteten Zellen aus Druckkammeruntersuchungen bei 400 und 500 kPa und aus Kontrollkammer (KK) (jeweils 3 h). $n_{400\text{kPa}}=18$, $n_{500\text{kPa}}=34$

In der graphischen Darstellung (Abbildung 6-17) der Ergebnisse der Untersuchung von DNA-Schädigung durch verschiedenen Intensitäten oxidativer Belastung und in Abhängigkeit von der VC-Konzentration werden einige Punkte deutlicher als in der Boxplot-Darstellung (vgl. Kapitel 4.3). Zunächst einmal ist der deutliche Unterschied in der quantitativen DNA-Schädigung durch Erhöhung des Sauerstoffdrucks und damit des oxidativen Stresses ersichtlich ($p_{0-200\mu\text{MVC}} = 0,00041$). Weiterhin ist eindeutig abzulesen, dass zwischen 100 und 200 μM VC offensichtlich die deutlichste Zellprotektion möglich ist und dass bis zu diesem Konzentrationsbereich die protektive VC-Wirkung zunimmt. Die Graphik bietet zudem einen Hinweis darauf, dass bei größerer oxidativer Belastung die protektive Wirkung von VC schon bei niedrigeren Konzentrationen messbar eintritt. Dies kann daran festgemacht werden, dass nach 500kPa O_2 Belastung zwischen 0 und 100 μM VC ein stärkerer "Rückgang" der DNA-Schädigung eintritt. Die negative Steigung ist dabei signifikant größer ($p_{0-100\mu\text{MVC}} = 0,0437$) als nach 400 kPa Sauerstoffüberdruckbelastung.

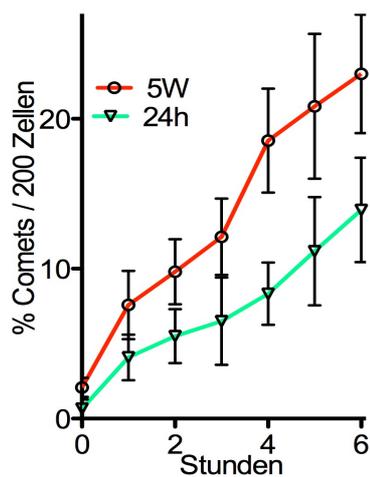
Abbildung 6-18 DNA-Schädigung in Abhängigkeit von der VC-Konzentration unter hyperbarer Sauerstoffbelastung mit und ohne VC im Probenmedium



Sauerstoffbelastung 500 kPa bzw. Pressluftbegasung in Kontrollkammer (KK) (jeweils 3 h); dargestellt ist jeweils der Median sowie die 25/75% Perzentilen jeweils pro 200 Zellen, visuelles Scoringverfahren;

$n_{500\text{kPa ohne VC}} = 24$, $n_{500\text{kPa mit VC}} = 34$

Abbildung 6-19 Ex vivo induzierbare DNA-Schädigung kurz und in großem Abstand zu repetitiver Sauerstoffbelastung in vivo



Sauerstoffbelastung in vivo: 3 Monate, 160 kPa über 50 bis 120 min. mindestens 7 Mal pro Woche; ex vivo: 400 kPa, 1-6 h; graphische Darstellung der MW + SD des visuellen Scorings jeweils pro 200 ausgewertete Zellen; signifikant unterschiedliche Steigungen $p = 0,000285$; Linearität $r_{24\text{h}}^2 = 0,9755$, $r_{5\text{W}}^2 = 0,9790$; $n = 7$

A-6 Chemikalien, Materialien und Laborgeräte

A - 6.1 Chemikalien

Ampuwa steril	Fresenius kabi, Bad Homburg, D
Antibiotikum Penicillin/Streptomycin	Biochrom, D
Aqua dest. aus Reinwasseranlage	Schiffmed. Inst., Kronshagen, D
Ascorbinsäure (L-Ascorbic-Acid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
DMSO (Di-metyl-sulfoxid)	Merck chemicals, Darmstadt, D
Decontex Reiniger 12A	Borer Chemie, Zuchwil, CH
Decontex 21 CLF, mildalkalisch (für Spülmaschine)	Borer Chemie, Zuchwil, CH
Ethanol vergällt $\geq 99,8\%$	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid 10mg/ml	Sigma, Steinheim, D
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare, S
Technische Puffer (STP10, 7, 4)	WTW, Weilheim, D
KCL (Kaliumchlorid)	Merck chemicals, Darmstadt, D
KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck chemicals, Darmstadt, D
LMP (low melting point) Agarose	Sigma, Steinheim, D
MEEO (mittlere Elektroendoosmose) Agarose, 1,5%	Merck chemicals, Darmstadt, D
Na_2EDTA (Natrium-Ethylendiaminotetraacetat)	Merck chemicals, Darmstadt, D
NaCl (Natriumchlorid)	Merck chemicals, Darmstadt, D
NaOH -Plättchen (Natriumhydroxid)	Merck chemicals, Darmstadt, D
Na_2HPO_4 (Natriumhydrogenphosphat)	Merck chemicals, Darmstadt, D
Methanol	Roth, Karlsruhe, D
RPMI 1640-Puffer (w HEPES, w stabile glutamin, w/o NaHCO_3)	Biochrom, Berlin, D
Rinderalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, D
Salzsäure rauchend 37%	Merck chemicals, Darmstadt, D
Sauerstoff	Air liquide medical, Düsseldorf, D
Spülmittel zur Reinigung von Laborgefäßen	ECOLAB Sekusept®
Stickstoff	Air liquide medical, Düsseldorf, D
Trizma®base 99,9%	Sigma, Steinheim, D
Triton X-100	Sigma, Steinheim, D
Trypanblau 0,4%	Sigma, Steinheim, D
Wasser für Autoklav: Demi-Wasser	Fischar, Saarbrücken, D
Wasserschutzmittel ProAquaTop	Geyer, Renningen, D

A - 6.2 Materialien

Adapter für Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Bechergläser	Schott, Mainz, D
Einmal-Pasteurpipetten 3ml	Assistent, Glaswarenfabrik Hecht, Sondheim, D
Einwegpipetten 10ml	Sterilin Ltd., Newport, UK
Eppendorf save lock tubes 1500 μl , 2000 μl	Eppendorf, Hamburg, D
Erlenmeyerkolben	Brand, Wertheim, D
Falcontubes 15ml	Roth, Karlsruhe, D
Falcontubes cellstar 50ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Färbeküvetten mit Objektträger-Ständer	Roth, Karlsruhe, D
Filter/Wägebepapier	Whatmann international Ltd., Maidstone, UK

Leuko-sep® Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Magnet-Rührfische	Roth, Karlsruhe, D
Messzylinder	Brand, Wertheim, D
Mikrotiterplatte 96 Well Rundboden, transparent, 500µl	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Mikrotiterplatte 24Well, transparent, 3ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Monovetten 3ml Kalium-EDTA	Sarstedt, Nümbrecht, D
Monovetten 9ml Li-Heparin	Sarstedt, Nümbrecht, D
Objektträger mit Mattrand	Menzel, Braunschweig, D
Objektträger Deckgläser (24x60mm)	Menzel, Braunschweig, D
Parafilm	Pechiney P.P., Chicago, USA
Pasteurpipetten (Glas)	Brand, Wertheim, D
Pipettenspitzen Ep T.I.P.S. (2,5µl, 10-20µl, 100µl, 200µl, 2500µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Präparatekasten	Kartell, Italien
Zählkammer Neubauer improved	Assistent, Glaswarenfabrik. Hecht, Sondheim, D

A - 6.3 Laborgeräte

Untersuchungskammern

Brutschrank	Merck chemicals, Darmstadt, D
Experimentaldruckkammer	Dräger, Lübeck, D
Experimentaldruckkammer-Bedienfeld	Haux-Live-Support, Karlsbad-Ittersbach, D
Digitalthermometer DT/G-10 und Sonde	Fuehler System enet international, Nürnberg, D
Druckregler und Druckminderer ENISO2503	Messer group, Bad Soden, D
Drucksensor Edelgas	Fischer, Göttingen, D
Gasflaschen	Air liquide medical, Düsseldorf, D
Probandendruckkammer Hydra 2000	Haux-Live-Support, Karlsbad-Ittersbach, D
Schwebe-Durchflussmesser Sho-rate	Brooks Instruments, Emerson Process Management, Haan, D
Thermobadheizer Ultrathermostat	Colora, Lorch, D

Elektrophoresekammer

Sub-Cell GT Basic und Kabel	Bio Rad, Californien, USA
Elektrophorese-Spannungsversorger Consort EV 231	Consort, Turnhout, Belgien
Elektrophoresebox, geschlossen	Bauhaus, Mannheim, D

Zentrifugen

Zentrifuge Rotina 38R	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifuge Hettich Mikro Rapid/K Typ 1303	Polzin, Darmstadt, D

Pipetten

Eppendorfpipetten (fix und variabel 2500µl, 1000µl, 100µl, 10µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Multipipette	Bio Rad, Californien, USA
Glaspipetten (10ml/20ml)	Brand, Wertheim, D

Mikroskopie

Fluoreszenzmikroskop BX 41 Olympus	Olympus, Tokyo, Japan
Quecksilberlampe U-RFL-T Olympus	Olympus, Tokyo, Japan
Mikroskop	Leica, Wetzlar, D

Analysegeräte

Feinwaage EW420-3NM	Kern u. Sohn, Balingen, D
Feinwaage CP1249-OCE	Sartorius, Göttingen, D
pH-Meter Inolab-IDS Multi9310	WTW, Weilheim, D
pH-Elektrode Sentix® 980	WTW, Weilheim, D

Reinwasseranlage

Reinwasseranlage

EYDAM, Kiel, D

Kartusche Aqua dest. SG 2800SH und
Leitfähigkeitsmessgerät Typ P2-30Sg Water, Wasseraufbereitung und Regenerations
GmbH, Barsbüttel, D*Kühlgeräte*

Kühlschränke (6°C)

Liebherr, Ochsenhausen, D

Gefrierschrank (-25°C)

Bosch, München, D

Gefrierschrank (-80°C)

Binder, Tüttlingen, D

Eisbereiter Hoshizaki FM

self-contained Hoshizaki (EU) Ltd., Shropshire, UK

weitere Geräte

Heizblock für Eppendorfgefäße

Gebr. Liebisch, Bielefeld, D

Magneheizrührer RCT basic

IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau, D

Mikrowelle R-200

Sharp electronics (EU), Hamburg, D

Petziball®

Brand, Mannheim, D

Timer, digital RS427-613 Modell 2981

Conrad Electronics, Hirschau, D

Trockenschrank Typ KTG 800

Heraeus, Hanau, D

Vortexer Reaxcontrol

Heidolph instruments, Schwabach, D

Wasserbad WNB 14

Memmert, Schwabach, D

Reinigungsgeräte

Autoklav Typ 25 MV

SHP Steriltechnik-AG, Detzel, D

Geschirrspülmaschine Miele Professional G7893

Miele, Gütersloh, D

Ultraschallbad Branson 32

Branson, Dietzenbach, D

Computer und Software

Geräte Software Comet Assay IV 4.11

Perceptive Instruments Ltd., Shawnee, Kansas, USA

Monitor Scott

Scott, Köln, D

Monitor SyncMaster 920n

Samsung, Seoul, Südkorea

PC Fujitsu

Siemens, Berlin u. München, D

PC hp compaq

Hewlett packard, Kalifornien, USA

Statistik Software Prism 5.0a

GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA

Statistik Software Excel 2007

Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

Textbearbeitungssoftware Word 2007

Microsoft Corporation, Redmond, Washington

A-7 Herstellung der Puffer, Lösungen und Agarosegele

Zellaufbereitung

PBS Puffer

Natriumchlorid 8 g/l (136,9mM)

Kaliumchlorid 0,2 g/l (2,7mM)

Natriumhydrogenphosphat 1,44 g/l (8,1mM)

Kaliumhydrogenphosphat 0,24 g/l (1,8mM)

pH-Wert 7,4 mit rauchender Salzsäure einstellen und steril mit industriell gereinigtem und destilliertem Wasser auffüllen

PBS-Puffer wird zum waschen der isolierten peripheren mononukleären Zellen verwendet, sowie zum Ansetzen der Agarosegele

Comet Assay

Lyse-Puffer

1. Lyse-Puffer Stammlösung

Natriumchlorid 146,1 g/l (2,8M)

Natrium-Ethylendiaminetetraacetat (Na₂EDTA) 37,2 g/l (112mM)

TrisBase 1,2 g/l (11mM)

pH-Wert 10 mit Natriumhydroxid einstellen und mit destilliertem Wasser auffüllen

2. Lyse-Puffer zur Verwendung

Lysepuffer Stammlösung

1% Triton X-100

10% Di-methyl-sulfoxid (DMSO)

Der 100ml Lyse-Puffer wird Lyse-Containern vorbereitet. Vor der Verwendung muss der fertige Puffer mindestens eine Stunde im Kühlschrank gekühlt werden.

Elektrophoresepuffer

1. Elektrophorese-Stammlösung A = 10M Natriumhydroxid -Lösung

2. Elektrophorese-Stammlösung B = 200mM Na₂EDTA -Lösung, pH-Wert 10 einstellen mit Natriumhydroxid

3. Elektrophoresepuffer zur Verwendung in destilliertem Wasser mischen:

3% Elektrophorese-Stammlösung A

0,5% Elektrophorese-Stammlösung B

Der pH-Wert des fertigen Elektrophoresepuffers (pH>13) muss vor jedem Gebrauch kontrolliert werden.

Neutralisationspuffer

400M TrisBase-Lösung

pH-Wert 7 einstellen mit rauchender Salzsäure

Ethidiumbromid-Gebrauchslösung

0,2% Ethidiumbromid-Lösung

Alle diese Puffer und Lösungen werden im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Agarosegele

Agarose zur Beschichtung der Objektträger

1,5% MEEO-Agarose 1,5g/100ml PBS

1. Vorbereitung der Objektträger

Vor der Beschichtung werden die Objektträger gewaschen, um Störungen im Agarose-Gel vorzubeugen. Zunächst werden sie mit Waschlösung im Objektträgerhalter eingewirkt und gewaschen. Die Waschlösung wird mit klarem warmem Wasser entfernt, dann wird mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend erfolgt die Reinigung im Ultraschallbad im Container 3x15min in destilliertem Wasser und 1x15min in Methanol. Die Trocknung erfolgt im Trockenschrank.

2. Herstellung der Agarose und Beschichtung der Objektträger

PBS wird mit 1,5% MEEO-Agarose vermischt und dreimal aufgekocht. Ein 50ml Falcon Tube wird mit flüssiger Agarose gefüllt und die gereinigten Objektträger einzeln unter Freilassung des Markierfeldes eingetaucht. Anschließend wird die Agarose von einer Seite des Objektträgers wieder entfernt und die Objektträger werden waagrecht zum trocknen ausgelegt. Während der Beschichtung der Objektträger wird die flüssige Agarose im Wasserbad bei 60°C gelagert. Die Trocknung findet über Nacht bei Zimmertemperatur statt. Die beschichteten Objektträger werden bis zur Verwendung bei Zimmertemperatur gelagert.

Träger-Agarose zur Einbettung der Zellen

Low Melting Point Agarose 500mg/100ml PBS

Herstellung und Aliquotierung

PBS wird mit LMP-Agarose vermischt und zweimal aufgekocht. Anschließend werden 1,5ml Eppendorf-Gefäße jeweils mit 125µl der flüssiger Agarose befüllt. Während der Aliquotierung wird die flüssige Agarose im Wasserbad bei 40°C gelagert.

Lagerung der Eppendorf-Gefäße erfolgt im Kühlschrank bei 2-8°C.

A-8 Danksagung

Zuerst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorandenbetreuer Dr. rer. nat. Wataru Kähler bedanken, der mich bei der Planung der Versuche unterstützte und mir jederzeit bei jeder Frage zur Seite stand. Darüber hinaus werde ich die endlosen Diskussionen über Reaktionswege und die Erkenntnisse der aktuellen Literatur in Erinnerung behalten, sowie die stoische Geduld bei der Korrektur des Dissertationstextes. Dabei schätze ich besonders seine freundschaftliche und wohlwollende Art sowie die große fachliche Kompetenz. Genauso möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Andreas Koch bedanken, der mir die Promotion in seinem Institut ermöglichte und mich durch neue Ideen immer wieder zum Nachdenken über mein Promotionsthema anregte.

Großer Dank gebührt auch der gesamten Arbeitsgruppe der Sektion Maritime Medizin des Instituts für Experimentelle Medizin, insbesondere den MTALs Brigitte Lohrie und Anke Gruschwitz, die mich bei der Vorbereitung und teilweise bei der Durchführung der Versuche unterstützten.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Schwester bedanken, die meine Dissertationsschrift mit größter Sorgfalt korrekturgelesen hat, sowie bei meinem Freund für die moralische Unterstützung und die Hilfe bei informatischen Problemen.

A-9 Publikationen

Die Ergebnisse dieser Studie fanden Eingang in folgende Posterpräsentation^{fff}:

J. Manger, W. Kähler, F. Tillmans, C. Wohlrab, S. Klapa, A. Koch: "GENOTOXICITY OF HYPERBARIC OXYGEN AN REVERSIBLE DNA PROTECTING ADAPTATION INDUCED BY REPETITIVE EXPOSURE" auf dem "94th Annual Meeting" der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG 2015, March 5 – 7, 2015, in Magdeburg, Germany) in der Poster viewing session "Oxygen, hyperoxia and cell death" (Abstract siehe Seite 130, Poster siehe Seite 131)

Die Ergebnisse dieser Studie fanden Eingang in folgende Vorträge^{ggg}:

W. Kähler, **J. Manger**, S. Klapa, F. Tillmans, B. Grams, T. Demetrowitsch, A. Koch: "CONCENTRATION DEPENDENT ANTI ANT PRO-OXIDATIVE EFFECTS OF VITAMIN C IN PBMCS UNDER OXIDATIVE STRESS" auf dem "Annual Scientific Meeting" der "European Underwater and Baromedical Society" (EUBS) vom 13.-16. September 2017 in Ravenna, Italien (Abstract siehe Seite 132)

W. Kähler, **J. Manger**, I. Koch, S. Klapa, F. Tillmans, A. Koch: "KONZENTRATIONSABHÄNGIGE ANTI- UND PRO-OXIDATIVE WIRKUNG VON VITAMIN C UNTER HYPERBARER OXIGENATION" auf dem 48. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Wehrmacht und Wehrpharmazie e. V. (DGWMP) vom 26. bis 28. Oktober 2017 in Gladbeck, Deutschland (Abstract siehe Seite 133)

^{fff} Abstract und Poster angehängt

^{ggg} Abstracts angehängt

CONCENTRATION DEPENDANT ANTI- AND PRO-OXIDATIVE EFFECTS OF VITAMIN C IN PBMCs UNDER OXIDATIVE STRESS

J. Manger, W. Kähler, F. Tillmans, C. Wohlrab, S. Klapa, A. Koch

German Naval Medical Institute – Section of Maritime Medicine of the Christian-Albrechts-University, Kiel, Germany

Contact: J. Manger: jessciamanger@riehehoefe.de, Prof. Dr. Andreas Koch: a.koch@iem.uni-kiel.de

Introduction

Vitamin C (VC) evidently is a potent antioxidant able to decrease oxidative damage e.g. induced by reactive oxygen species (ROS). Likewise VC is decreased by oxidative agents in organism. In contrast there is also evidence of pro-oxidative capacity of VC. In the present study the effect of VC under oxidative stress by means of hyperbaric oxygen was determined ex vivo.

Methods

Freshly isolated peripheral mononuclear blood cells (PBMCs) from male healthy 20 to 30 year old subjects were pre-incubated (3 h) with 0, 50, 100, 200 or 400 μM VC. VC was then washed out and PBMCs were exposed to 400 (n = 22) or 500kPa (n = 34) hyperbaric oxygen (100%). Afterward, the same experiment was performed without washing out VC before exposure to oxidative Stress (n = 24). DNA damage was determined by means of alkaline Comet Assay calculating the percentaged amount of DNA damage by a visualized binary scoring system as well as analyzing the computerized estimation of “Tailmoment” and “% Tail DNA” of 200 PBMCs, respectively. Pre and post experimental cell viability was determined by trypan blue staining.

Results

When VC is present in PBMC buffer during hyperbaric oxygenation VC decreases DNA damage in a concentration dependant manner up to 200 μM VC (maximal physiological serum VC \approx 100 μM). Comparing VC data to control (0 μM VC) VC decreases DNA damage induced by 400kPa O_2 at concentrations of 200 μMVC ($p_{0/200\mu\text{MVC}} = 0,0246$). At higher O_2 pressure (500 μM) VC shows significant DNA damage decreasing effects at concentrations of 100 and 200 μM VC ($p_{0/100\mu\text{MVC}} = 0,0029$, $p_{0/200\mu\text{MVC}} = 0,0051$). However, at 400 μM VC DNA damage was increased significantly ($p_{400\text{kPa O}_2} = 0,0244$; $p_{500\text{kPa O}_2} = 0,0012$). In contrast to these findings no increase of DNA damage has been seen when VC was washed out before hyperbaric oxygenation (HBO). Hence significantly higher quantity of DNA damaged PBMCs have been detected when VC was present during HBO.

VC itself, intra-experimental changes of pH value or washing of cells didn't influence cell viability or DNA damage. Cell viability was not influenced by VC or hyperbaric oxygen.

Conclusion

VC present during hyperbaric oxygenation is able reduce DNA damage. However, when physiological concentrations of VC are widely exceeded pro-oxidative character of VC predominates. Pro-oxidative properties of VC apparently depend on presence of VC during HBO since there has been seen no increase but a decrease of DNA damage in comparison to control when VC has been washed out before the experiment.

Key words: Hyperoxia, DNA damage, Comet Assay, vitamin C, antioxidative, pro-oxidative
(357 words, 1906 characters)



Genotoxicity of hyperbaric oxygen and reversible DNA-protecting adaptation induced by repetitive exposure



J. Manger, W. Kähler, F. Tillmans,
C. Wohlrab, S. Klapa, A. Koch

German Naval Medical Institute
Section of Maritime Medicine of CAU
Kiel-Kronshagen, Germany



Aims and Introduction

There is evidence for genotoxicity of hyperoxia, but adaptive protective processes seem to be induced, too. Aim of the study:

1. To determine the amount of double-strand breaks in PBMCs (peripheral mononuclear blood cells) after a single exposure to high-dose hyperbaric oxygen in vivo.
2. To monitor the decline of the protective adaptation after a phase of repetitive exposures to hyperbaric oxygen in professional closed-circuit divers in a prospective approach.

Methods

1. DNA-damage was determined in PBMCs from subjects (n=12) immediately before and after a 30 minutes mandatory oxygen tolerance test ($pO_2=280kPa$). All subjects were males of the same age and personal situation who have never been exposed to hyperbaric oxygen before.

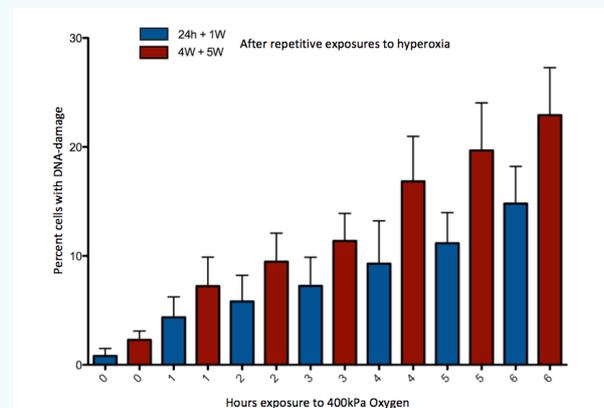
2. Likewise by determining DNA-damage in freshly isolated PBMCs the baseline of DNA-damage was assigned in professional divers (n=7) 24 hours after a three-month period of about 85 repetitive mainly physically strenuous closed-circuit dives (50 to 120 min, $pO_2\approx 160kPa$). The same PBMCs were then exposed to hyperoxia (400kPa, $pO_2=100\%$) ex vivo and DNA-damage was determined hourly for 6 hours. The same experiment was performed weekly at PBMCs of the same subjects over a five weeks period without any further exposition to hyperoxia. All subjects were males of the same age taking part in the same schooling program.

The DNA-damage of either investigation was determined by means of the alkaline Comet Assay calculating the percentaged amount of DNA-damage by a visualized binary scoring system as well as analyzing the computerized estimation of "Tailmoment" and "% Tail DNA" of 200 PBMCs, respectively.

Results

1. PBMCs after oxygen tolerance test showed highly significant ($p<0,001$) more DNA-damage.

2. The prospective approach revealed that baseline DNA-damage increases significantly ($p_{24h/5w}<0,001$) comparing the first and last determination. Furthermore, percentage of cells with DNA-damage increased hourly under 400kPa and 100% O_2 in an almost linear way. Slopes of graphs from data raised 24 hours after last oxygen dive were significantly ($p_{24h/3w}=0,022$; $p_{24h/5w}<0,001$) smaller than those raised after 3 to 5 weeks afterwards. Slope of graph from data after 1 week was similar to 24 hours graph's slope, likewise 4 and 5 weeks graph's slopes.



Discussion

Hyperbaric oxygen is genotoxic to PBMCs. Repetitive exposures to hyperoxia lead to in vivo adaptation of PBMCs with less susceptibility towards hyperoxic stress afterwards. This DNA-protecting effect of adaptation decreases with time, whereas up to one week after last exposure protection is still high.

CONCENTRATION DEPENDANT ANTI AND PRO-OXIDATIVE EFFECTS OF VITAMIN C IN PBMCs UNDER OXIDATIVE STRESS

W. Kähler, J. Manger, S. Klapa, F. Tillmans, B. Grams, T. Demetrowitsch, [A. Koch](mailto:a.koch@iem.uni-kiel.de)
German Naval Medical Institute – Section of Maritime Medicine of the Christian-Albrechts-University, Kiel,
Germany

Contact: A. Koch <a.koch@iem.uni-kiel.de>
W. Kähler <w.kaehler@iem.uni-kiel.de>

Introduction

Vitamin C (VC) is a potent antioxidant able to decrease oxidative damage e.g. induced by reactive oxygen species (ROS). Likewise VC is decreased by oxidative agents in organism. In contrast there is also evidence of pro-oxidative capacity of VC. In the present study the effect of VC under oxidative stress was determined ex vivo inducing ROS by means of hyperbaric oxygen.

Methods

Freshly isolated PBMCs (peripheral mononuclear blood cells) from male healthy 20 to 30 year old subjects were exposed to 400 (n=22) or 500kPa (n=34) hyperbaric oxygen (100%) in an experimental pressure chamber after a three hours pre-incubation period with 0, 50, 100, 200 or 400µM VC ex vivo. In order to exclude or calculate any further influencing factor possible DNA damage or cell viability influencing effects of changes of pH value, washing of cells, pre-incubation in incubator (37°C, 20%O₂, 5%pCO₂) and the leaving VC in cell suspension while exposure to hyperbaric oxygen were evaluated and method of analysis was adjusted. DNA damage used as oxidative damage parameter was determined by means of alkaline Comet Assay calculating the percentaged amount of DNA damage by a visualized binary scoring system as well as analyzing the computerized estimation of "Tailmoment" and "% Tail DNA" of 200 PBMCs, respectively. Pre and post experimental cell viability was determined by trypan blue staining.

Results

VC decreases DNA damage in a concentration dependant manner up to 200µM VC (maximal physiological serum VC≈100µM). Comparing VC data to control without VC decreasing effect of 100µM (only under 500kPa O₂, p_{500kPa O₂}=0,0029; Bonferroni-level: B_{400kPa O₂}=0,0023; B_{500kPa O₂}=0,0014) and 200µM VC (p_{400kPa O₂}=0,0187; p_{500kPa O₂}=0,0051) resulted significant. At 400µM VC DNA damage was increased significantly (p_{400kPa O₂}=0,0244; p_{500kPa O₂}=0,0012). Comparing 400µM to 200µM data DNA damage increased with even higher significance (400kPa p_{400kPa O₂}=0,0004; p_{500kPa O₂}<0,0001). Analyzing graphs of 0 to 200µM and 200 to 400µM VC's data it was found that 400 and 500kPa's graphs are significantly different (p=0,00041). For 200 to 400µM graphs doesn't exist enough data point to evaluate significance, but very different calculated y-intercepts (y_{400kPa O₂}=8,710, y_{500kPa O₂}=12,34) plus similar slopes (slopes: S_{400kPa O₂}=0,0427, S_{500kPa O₂}=0,0485) assume significant difference.

VC itself, intra-experimental changes of pH value or washing of cells didn't influence cell viability or DNA damage. VC left in cell medium while exposure was determined up to 200µM VC to hyperbaric oxygen resulted in non significantly less DNA damage than when washed out before. Cell viability was not influenced by VC or hyperbaric oxygen.

Conclusion

VC at maximal or doubled maximal physiologic serum concentration reduces DNA damage induced by hyperbaric oxygen ex vivo, whereas VC in concentrations as high as four times maximal serum level increases DNA damage in PBMCs exposed to hyperbaric oxygen.

Key words: Hyperoxia, DNA damage, Comet Assay, vitamin C, antioxidative, pro-oxidative
(452 words, 2545 characters)

KONZENTRATIONSABHÄNGIGE ANTI- UND PROOXIDATIVE WIRKUNG VON VITAMIN C UNTER HYPERBARER OXIGATION

W. Kähler, J. Manger, I. Koch, S. Klapa, F. Tillmans, A. Koch
Schiffmedizinisches Institut der Marine - Sektion Maritime Medizin der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Kontakt: W. Kähler <w.kaehler@iem.uni-kiel.de>
A. Koch <a.koch@iem.uni-kiel.de>

Einleitung: In der Literatur werden sowohl antioxidative als auch prooxidative Eigenschaften des Vitamin C (VC) in in-vivo als auch in in-vitro Versuchen beschrieben. Um die Bedingungen für die unterschiedlichen Wirkmechanismen zu erforschen, wurden in dieser Studie die Wirkungen von VC in einem hyperoxischen und hyperbaren in-vitro Modell untersucht.

Methoden: PBMCs (Peripheral Mononuclear Blood Cells) von gesunden männlichen 20 bis 30 jährigen Probanden wurden unmittelbar nach Isolation drei Stunden mit VC (0, 50, 100, 200 oder 400µM VC) im Brutschrank vorinkubiert und anschließend in einer Experimentaldruckkammer hyperbarem Sauerstoff (100%, 400/500kPa) ausgesetzt. Abschließend wurde als Maß für einen oxidativen Schaden die Anzahl DNA-geschädigter PBMCs mit dem alkalischen Comet Assay in jeweils 200 Zellen pro Proband bestimmt und mit einem binären visuellen Scoring-Verfahren ausgewertet.

Ergebnisse: Die Versuche zeigten, dass die PBMCs nach Inkubation mit VC in den Konz. 50, 100 und 200 µM und anschließender Belastung mit Sauerstoff deutlich und zum Teil signifikant weniger DNA-geschädigte Zellen aufwiesens als in der Kontrolle (0µM VC). Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen, die vor der Sauerstoffbelastung mit 400µM VC inkubiert wurden, signifikant mehr DNA-geschädigte Zellen.

Zusammenfassung: Die Ergebnisse lassen schließen, dass in den Versuchen unter hyperoxischen Bedingungen der Zusatz von VC nur bis zur doppelten physiologischen Serumkonzentration zu einer Reduktion DNA-geschädigter Zellen führt, während deutlich höhere unphysiologische Konzentrationen von VC DNA-Schäden fördern und somit prooxidativ wirken.

Key words: Hyperoxie, DNA-Schädigung, Comet Assay, Vitamin C, antioxidativ, pro-oxidativ