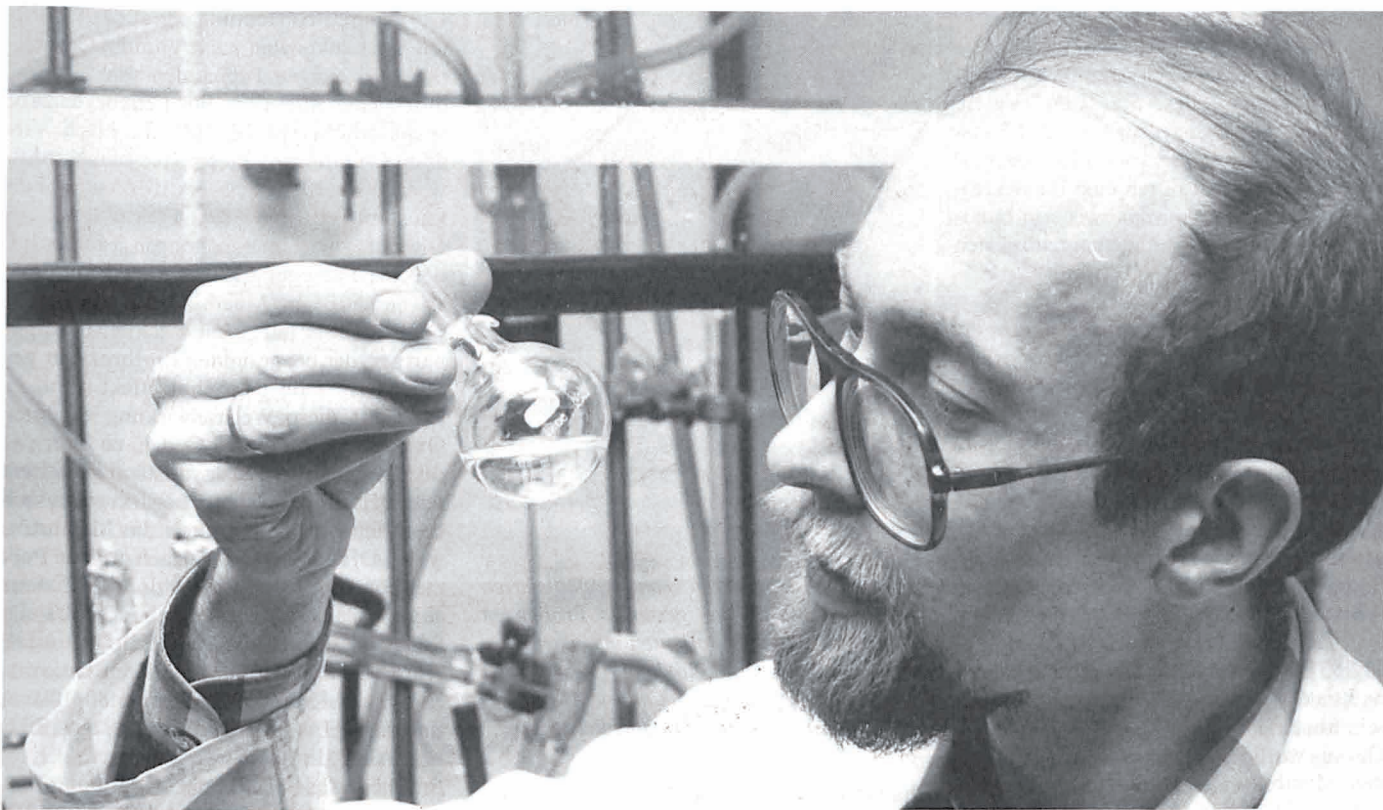




Vitamin C und Krebs

Untersuchungen von biomolekularen Reaktionen / Von Wolfgang Lohmann

In den letzten Jahren ist viel über Vitamin C und Krebs diskutiert worden. Während einige glauben, daß Vitamin C gegen Krebs, oder zumindest gegen einige Krebsarten, schützen kann, ist eine Mehrheit eher geneigt, eine solche Funktion für dieses Vitamin zu bezweifeln. Wie andere biochemische Systeme, so ist auch das Vitamin C-Redox-System (Redox $\equiv$ Reduktion-Oxidation) für die Erhaltung normaler, optimaler biologischer Funktionen wichtig. Der dadurch bewirkte Elektronenfluß wie auch sein Gleichgewicht können durch cancerogene Substanzen, die als Elektronen-Donatoren oder Akzeptoren wirken, beeinflusst werden. Eine solche Modifikation der normalen biologischen Prozesse kann freie Radikale, also Spezies mit einem ungepaarten Elektron, erzeugen, die in gesunden biologischen Systemen normalerweise nicht vorhanden sind. Diese können mittels der Elektronenspin-Resonanz (ESR)-Methode nachgewiesen werden und erlauben somit eine Aufklärung molekularer Veränderungen, die während der Krankheits-Entstehung und ihres Verlaufes auftreten. Eine Kenntnis dieser molekularen Mechanismen, zumal, wenn sie spezifisch für eine bestimmte Krankheit sind, kann eine eindeutige Diagnose und ggf. eine effektivere Therapie ermöglichen. Eine solche Spezifität erlaubt auch, diese Radikale u. a. als Tumor-Marker und darüber hinaus als Indikator für den Erfolg der benutzten Therapie zu verwenden.

Bei der Aufnahme der ESR-Spektren von lyophilisierten (gefriergetrockneten) Erythrozyten von Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) beobachteten wir bei $g \approx 2005^*$ ein zusätzliches Signal, das in den Erythrozyten von Kontroll-Probanden nicht vorhanden ist (Bild 1). Außerdem nimmt die Spin-Konzentration, das ist die Fläche unterhalb der Kurve, die der Anzahl der ungepaarten Elektronen (Radikale) entspricht, zu. Beim Vergleich der beiden Spektren muß beobachtet werden, daß das „ALL“-Spektrum mit etwa $1/6$ der Empfindlichkeit des Kontroll-Spektrums aufgenommen worden ist. Ein ganz anderes ESR-Spektrum wird für die Ery-

throzyten von Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) erhalten, das für diese Krankheit charakteristisch zu sein scheint (s. Abb. 1). Eine Diskussion dieses Spektrums erfolgt später. Zunächst soll die Frage diskutiert werden, wie indikativ und kognitiv das „ALL“-Erythrozyten-Spektrum ist.

Bei der Untersuchung von Erythrozyten von Patienten mit anderen Leukämie-Arten oder weiteren Erkrankungen des hämatopoetischen oder lymphatischen Systems konnte nie das für die ALL typische ESR-Spektrum beobachtet werden. Es trat auch nicht in den Erythrozyten von Patienten mit malignen Erkrankungen anderer Organsysteme auf. Es scheint also sehr indikativ für die ALL zu sein, zumal unter geeigneter Behandlung und der damit verbundenen fast vollständigen Remission des Knochen-

marks und des peripheren Blutes das Signal wieder verschwindet und die Spin-Konzentration abnimmt.

Das führt zu der wichtigen Frage der Zuordnung dieses Signals, d. h. der Identifizierung derjenigen Substanz, die bei der Reaktion mit einem Wechselwirkungspartner in die radikalische Form überführt wird und dann das in Bild 1 gezeigte Spektrum ergibt. Von Bedeutung ist dabei der Ort der Wechselwirkung, denn gerade dort unterscheidet sich ja der gesunde Erythrozyt von „ALL“-Erythrozyten.

Es war naheliegend anzunehmen, daß es sich um ein Antioxidans handelt, dessen radikalische Form durch einen Einelektronen-Oxidationsschritt erzeugt wird. Von mehr als 100 getesteten organischen und anorganischen Antioxidanzien, wenn immer sie zu gesunden Erythrozyten hinzugegeben

* Der g-Faktor beschreibt die Lage eines Signals im Magnetfeld (H), das von links nach rechts zunimmt; da $g \approx 1/H$ ist, nimmt der g-Faktor von rechts nach links zu.

wurden, ergab nur Vitamin C (Ascorbinsäure) ein zur ALL identisches Spektrum (s. Bild 2). Da selbst andere Vitamine, wie z. B. E und A, nicht diese Reaktion zeigten, scheint das Semidehydroascorbat ($\equiv$ Ascorbyl, SDA) Radikal typisch für die ALL zu sein. Es entsteht durch eine Einelektronen-Oxidation der normalerweise in biologischen Systemen vorhandenen reduzierten Form des Vitamins (ASC).

Da bis jetzt angenommen wird, daß nur die vollständig oxidierte Form der Ascorbinsäure, die Dehydroascorbinsäure (DHA), die Zytoplasma-Membran passieren kann, wurde vermutet, daß die Radikalbildung an der Oberfläche oder innerhalb der Membran erfolgt. Solche Membran-Veränderungen sollten dann ggf. auch rasterelektronenmikroskopisch nachweisbar sein. Wie in Bild 3 zu sehen ist, sind die von gesunden Probanden (Bild 3 a) erhaltenen Erythrozyten nach Zugabe von 1 mM Vitamin C (Bild 3 b) oberflächenmäßig so verändert, daß sie denen von ALL-Patienten (Bild 3 c) sehr ähneln.

Daraus wurde gefolgert, daß es sich um einen Membran-Defekt handeln muß, d. h. daß die Membran der oben beschriebene Ort der Wechselwirkung ist. Es wurden deshalb die sog. White Ghosts, d. h. die Erythrozyten-Membranen, isoliert. Eine Untersuchung dieser Membranen mittels ESR-Spektroskopie ergab kein Signal. Eine Zugabe von 1 mM Vitamin C zu diesem White Ghosts bewirkte jedoch die Bildung des in Abb. 1 gezeigten „ALL“-Spektrums.

Daraus kann geschlossen werden, daß es sich bei dem „ALL“-Spektrum mit größter Wahrscheinlichkeit um das Ascorbyl-Radikal handelt, das an oder in der Zellmembran durch Oxidation der Ascorbinsäure gebildet wird.

Eine solche Reaktion sollte bei intakten Erythrozyten in vivo nicht auftreten und jede Abweichung davon als Indikation für eine Prädisposition für eine mögliche ALL-Erkrankung gewertet werden. Aus diesem Grunde werden z. Z. an einigen hundert freiwilligen Probanden Vitamin C-Versuche durchgeführt. Nach Verabfolgung von 1 g Vitamin C zeigte sich, daß in den meisten Fällen das Erythrozyten-ESR-Spektrum nicht verändert war, d. h. dem Kontroll-Spektrum entsprach. Der Vitamin C-Gehalt im Plasma betrug zwei Minuten nach Injektion, wie erwartet, etwa 17 mg/100 ml und nahm exponentiell ab, so daß nach einigen Stunden der Normwert von ≈ 1 mg/100 ml wieder erreicht war. Der Vitamin C-Gehalt der Erythrozyten stieg im Laufe von einigen Stunden leicht an.

Bei diesen Untersuchungen wurden zwei interessante Beobachtungen gemacht: Bei einem Probanden betrug der Vitamin C-Gehalt

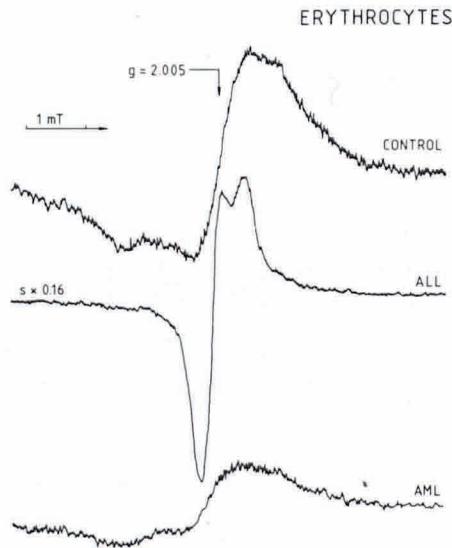
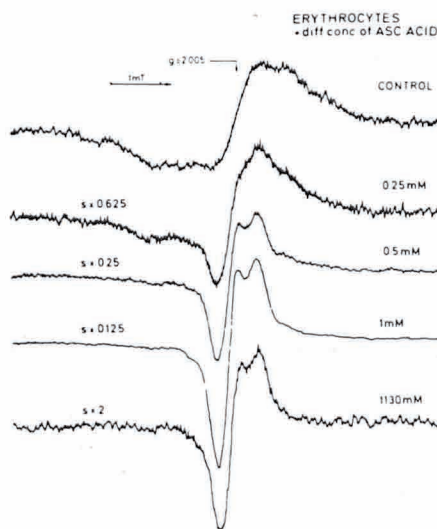


Bild 1: ESR-Spektren von lyophilisierten Erythrozyten, die von gesunden Probanden (Control) und von Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) oder akuten myeloischen Leukämie (AML) erhalten wurden. $s \equiv$ Empfindlichkeitsfaktor.

halt des Plasmas zwei Minuten nach intravenöser Gabe der Ascorbinsäure 76 mg/100 ml, und das Erythrozyten-ESR-Spektrum war einem „ALL“-Spektrum sehr ähnlich. Nach einigen Stunden waren jedoch der Vitamin C-Gehalt des Plasmas als auch das Erythrozyten-ESR-Spektrum wieder normalisiert. Ob es sich in diesem Fall um einen prospektiven ALL-Kandidaten handelt, bei dem die Krankheit evtl. nach oxidativen Stress-Reaktionen auftreten kann, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Bild 2: ESR-Spektrum von Erythrozyten, zu denen verschiedene Konzentrationen von Ascorbinsäure hinzugesetzt wurden, $s \equiv$ Empfindlichkeitsfaktor.



Die andere Beobachtung betraf das Verhalten der Leukozyten nach Vitamin C-Injektion. Bei einigen Probanden war, bedingt durch eine Infektion, die Leukozytenzahl leicht erhöht ($12-18 \times 10^3/\mu\text{l}$). Nach Vitamin C-Gabe sank dieser Spiegel innerhalb weniger Stunden auf $5-6 \times 10^3/\mu\text{l}$ und blieb konstant.

Diese in vivo Untersuchungen legen nahe, daß die Erzeugung des Ascorbyl-Radikals an der äußeren Membran-Oberfläche erfolgt und zwar mit einem Wechselwirkungspartner, der bei gesunden Erythrozyten geschützt ist. Falls der Schutzeffekt nicht da ist, führt diese Wechselwirkung zu einer Oxidation des Vitamin C, d. h. zu ihrer radikalischen (SDA) oder vollständig oxidierten (DHA) Form. Dieses bewirkt einen verbesserten Transport durch die Membran, wobei DHA eine etwa 100-fach größere Permeationsrate (Permeationskoeffizient $\approx 4 \times 10^{-7}$ cm/s bei pH 7 bei 37°C) als SDA hat. Dieses wiederum führt zu einer Anreicherung der intrazellulären Gesamt-Vitamin C-Konzentration (um 80–100%) und des DHA-Anteils (von etwa 7 auf 18%) bei „ALL“-Erythrozyten.

Es scheint sich also bei der ALL u. a. um einen Stoffwechseldefekt zu handeln, der das Vitamin C-Redox-System durch Oxidation aus dem Gleichgewicht bringt. Es ist nahelegend zu vermuten, daß unter dem Einfluß bestimmter Enzyme die Konzentration von Sulfhydryl(SH)-haltigen Substanzen, spez. Cystein und reduziertes Glutathion (GSH), dessen Redox-System u. a. für die Aufrechterhaltung des Vitamin C-Redox-Systems sorgt, abnimmt. Welche Reaktionen auch immer vor der Veränderung des Vitamin C-Redox-Systems ablaufen, es scheint sich auf jeden Fall um eine oxidative Entartung (oxidative damage oder Stress) zu handeln, bei dem u. a. die Wechselwirkung zwischen Vitamin C und Glutathion gestört ist.

Während bei der ALL die Störung des Vitamin C-Redox-Systems mit der Bildung des Ascorbyl-Radikals von Bedeutung ist, zeigen von uns durchgeführte vorläufige Untersuchungen, daß bei der AML der SH-SS Redox-Zyklus beeinträchtigt zu sein scheint. Die bei einer AML erhaltenen Erythrozyten ESR-Spektren (s. Bild 1) sind vergleichbar mit denen, bei denen GSH oder Cystein zu gesunden Erythrozyten in vitro hinzugegeben wurde (s. Bild 4). Wie in Bild 5 zu erkennen ist, bewirkt eine „Heilung“ der Patienten, d. h. eine fast vollständige Remission des Knochenmarks und des peripheren Blutes, den graduellen Übergang des ESR-Spektrums von „typisch AML“ zu „gesunden“ Erythrozyten.

Im Gegensatz zur ALL ist bei der AML der Gesamt-Vitamin C-Gehalt in Plasma und Erythrozyten beträchtlich erniedrigt (auf 21 bzw. 46% der Kontrollen). Bei der erfolg-

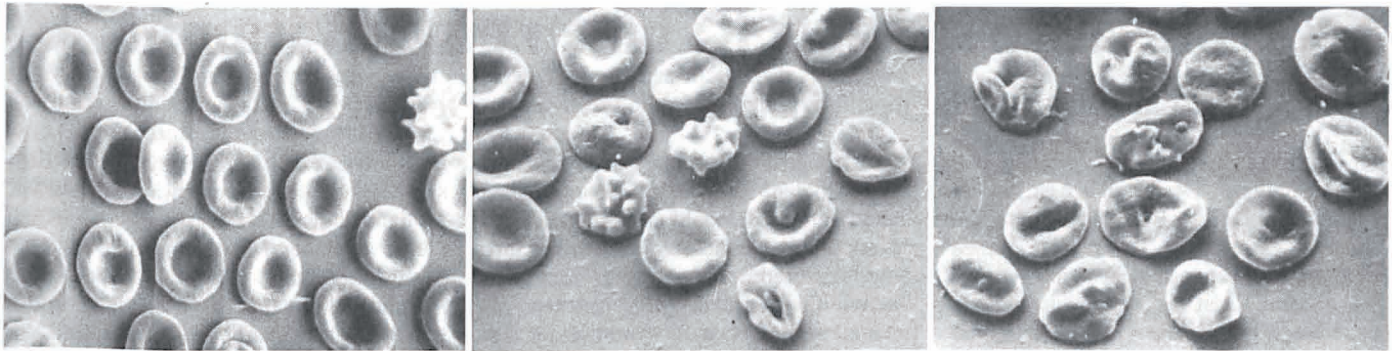


Bild 3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten von gesunden Probanden (links), die mit 1 mM Ascorbinsäure behandelt wurden (Mitte) und von Patienten mit ALL (rechts). Vergrößerung $\times 1650$.

reichen Behandlung der Patienten erreicht die Vitamin C-Konzentration der Erythrozyten fast wieder Kontrollwerte, während die Plasma-Werte sehr niedrig bleiben (zwischen 30–40% der Kontroll-Werte).

Als Indiz für eine mögliche Bedeutung für SH-Gruppen bei der AML können die Ergebnisse angesehen werden, die wir bei der Aminosäure-Bestimmung mittels HPLC (Hochleistungs-Flüssigchromatographie) im Plasma von gesunden Probanden und ALL und AML Patienten erhalten haben. Während bei der ALL die Cystein-Konzentration im Plasma vergleichbar mit der gesunder Kontrollen ist, ist sie bei der AML beträchtlich erhöht. Da auch die Glutaminsäure-Konzentration etwa um das 3fache erhöht ist, kann angenommen werden, daß neben Cystein auch GSH (auch wenn die Glycin-Konzentration unverändert ist) bei der AML eine Rolle spielen.

Da das Glutathion kaum die Zytoplasma-Membran durchdringen kann, scheint es sich auch bei der AML um einen spezifischen Effekt an der Membran-Oberfläche zu handeln, der sich dann u. a. auch auf die Vitamin C-Permeation auswirken kann.

Für das genaue Verständnis bei der ALL und AML ablaufenden molekularen Reaktionen (ALL: Bildung des Ascorbyl-Radikals; AML: SH-Effekt) ist die Aufklärung der Membran-Defekte dringend erforderlich. Bei beiden Leukämie-Arten scheint die Bildung von Glykoproteinen stark beeinträchtigt zu sein. Im Plasma von ALL- und AML-Patienten sind nämlich die Konzentrationen von Threonin, Serin, Asparagin und Lysin beträchtlich reduziert, also von Aminosäuren, die für die Bildung der Glykoproteine entscheidend sind. Diese Fehlproduktion kann gewisse Störungen in der Zytoplasma-Membran hervorrufen, die dann u. a. die in Erythrozyten von ALL- und AML-Patienten beobachteten molekularen Modifikationen bewirken können. Da die Konzentrationen der genannten 4 Aminosäuren sowohl bei ALL als auch bei AML im selben Ausmaß geändert sind, ist das mögliche Fehlen der Glykoprotein-Bil-

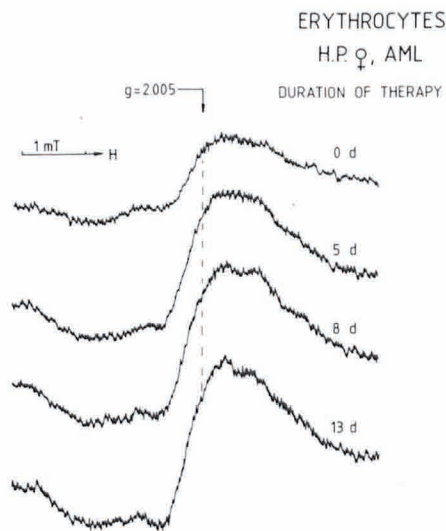


Bild 5: ESR-Spektren von lyophilisierten Erythrozyten einer Patientin (H.P.) mit AML, die nach vorgeschriebenem Protokoll behandelt wurde. Das oberste Spektrum wurde vor Behandlungsbeginn (0 Tage $\approx$ 0 d), die übrigen Spektren zu den angegebenen Behandlungstagen aufgenommen.

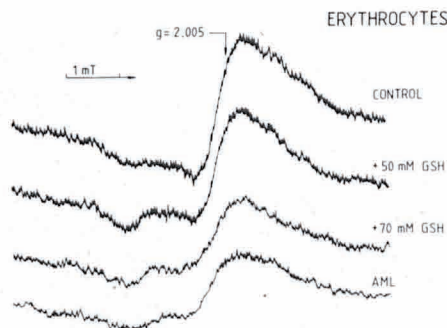


Bild 4: ESR-Spektren von gesunden Erythrozyten, die mit verschiedenen Konzentrationen von reduziertem Glutathion (GSH) versetzt wurden. Unterstes Spektrum: Erythrozyten von einer AML-Patientin zum Vergleich.

dung sicherlich nicht spezifisch für die Ausbildung einer der beiden untersuchten Leukämie-Arten. Eventuell sind Veränderungen bei den Glykolipiden und/oder im

Vitamin E-Redox-System auch vorhanden, die dann charakteristisch für die Ausbildung der beiden Leukämie-Arten sein könnten.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß, zumindest bei gewissen Leukämie-Arten, der Vitamin C-Stoffwechsel modifiziert ist. Damit ist nicht gesagt, daß Vitamin C Krebs heilt oder erzeugt. Da in gesunden biologischen Systemen Vitamin C überwiegend in der reduzierten Form vorliegt, bedeutet das Auftreten des Ascorbyl-Radikals in den Erythrozyten von Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie, daß vermehrt oxidative Prozesse ("oxidative damage") ablaufen, die der Körper nicht mehr kompensieren kann. Es ist naheliegend anzunehmen, daß andere Redox-Systeme, wie z. B. Glutathion- oder Vitamin E-Systeme, die mit dem Vitamin C-Redox-System wechselwirken, ebenfalls in ihrer Funktion gestört sein können. Ähnliches trifft auch für die für die Oxidation oder Reduktion zuständigen Enzyme zu.

Bedeutend ist, daß das Ascorbyl-Radikal in den Erythrozyten nur bei Patienten mit einer ALL nachgewiesen werden kann. Wegen seiner Spezifität kann es somit als Tumor-Marker für ALL dienen. In der Kausalkette der bei der ALL erfolgenden molekularen Reaktionsmechanismen ist die Modifikation des Vitamin C-Stoffwechsels sicherlich kein primäres Ereignis. Vielleicht ist es aber möglich, durch die Erforschung der Änderung des Vitamin C-Stoffwechsels die vorangehenden Stoffwechselveränderungen exakt zu erfassen.

Nur eine eindeutige und vollständige Aufklärung der bei der Krebsentstehung – übrigens wie bei allen anderen Krankheiten auch – ablaufenden molekularen Reaktionen wird eine eindeutige Diagnose und vor allen Dingen eine gezieltere und optimale Therapie erlauben.

Dieser Bericht wurde ermöglicht durch den tatkräftigen Einsatz vieler Mitarbeiter und durch eine ausgezeichnete Kooperation mit vielen Kollegen des Klinikums der Justus-Liebig-Universität.