

**Untersuchungen zur antioxidativen Wirksamkeit von
polyphenolischen Apfelsaftinhaltsstoffen in humanen
Kolonzellen**

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation
(D386)

vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemikerin

Sandra Schäfer

Kaiserslautern, 2006

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Juni 2002 und November 2005 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 25.04.2006

Prüfungskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. H. Sitzmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Eisenbrand und Frau Dr. C. Janzowski für die Überlassung des Themas sowie für Anregungen und die wohlwollende Unterstützung während der Promotionszeit.

1	<u>EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
2	<u>PROBLEMSTELLUNG</u>	<u>3</u>
3	<u>THEORETISCHE GRUNDLAGEN</u>	<u>6</u>
3.1	DER DARM	6
3.1.1	AUFBAU & FUNKTION	6
3.1.2	PATHOPHYSIOLOGIE DES DARMS	8
3.1.2.1	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	8
3.1.2.2	Kolonkrebs	8
3.2	REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES (ROS)	13
3.3.	OXIDATIVER STRESS UND SEINE FOLGEN	17
3.3.1	LIPIDPEROXIDATION (LPO)	17
3.3.2	DNA-SCHÄDIGUNG	19
3.3.3	OXIDATIVE PROTEINMODIFIKATION	21
3.3.4	ANTIOXIDATIVE ABWEHRMECHANISMEN	22
3.3.4.1	Primäre endogene Abwehr	22
3.3.4.2	Sekundäre endogene Abwehr	24
3.3.4.3	Das Antioxidative Response Element (ARE)	26
3.4	FLAVONOIDE UND (POLY-)PHENOLE	28
3.4.1	STRUKTUR, VORKOMMEN UND AUFNAHMEMENGEN	28
3.4.1.1	Flavonoide	28
3.4.1.2	Phloretinderivate	30
3.4.1.3	Hydroxyzimtsäurederivate	30
3.4.2	RESORPTION	31
3.4.3	METABOLISMUS IM DARMGEWEBE	33
3.4.3.1	Hydrolyse	34
3.4.3.2	Cytochrom-P450-abhängige Phase-I-Reaktionen	34
3.4.3.3	Konjugation	35
3.4.4	METABOLISMUS IM KOLON	36
3.4.5	ANTIOXIDATIVE WIRKSAMKEIT	38
3.4.5.1	Hydroxylgruppen	38
3.4.5.2	sonstige Strukturmerkmale	39
3.4.6	BIOLOGISCHE WIRKUNGEN VON APFELSAFTINHALTSSTOFFEN	39
3.4.6.1	Schutz vor ROS	41
3.4.6.2	Einfluss auf Fremdstoffmetabolismus	41
3.4.6.3	Einfluss auf Zellproliferation	42
3.4.6.4	Einfluss auf Entzündungsmarker	42
3.4.7	ADVERSE EFFEKTE	43
3.4.7.1	Mutagenität und Genotoxizität	43
3.4.7.2	Prooxidative Wirkungen	43
3.5	APFELSAFT UND PHENOLISCHE APFELSAFTEXTRAKTE	47
3.5.1	HERSTELLUNG VON APFELSAFT	47
3.5.2	POLYPHENOLPROFIL VON APFELSÄFTEN	48
3.5.2.1	Sortenauswahl	48
3.5.2.2	Technologische Aspekte	49
3.5.3	HERSTELLUNG VON APFELSAFTEXTRAKT	50
3.5.4	ZUSAMMENSETZUNG DER APFELSAFTEXTRAKTE	50
3.6	TESTMETHODEN	53
3.6.1	ZELLSYSTEME	53
3.6.1.1	Caco-2 Zellen	53
3.6.1.2	HT29 Zellen	53

Inhalt

3.6.2	INDUKTION VON MODERATEM OXIDATIVEN STRESS	54
3.6.2.1	Menadion	54
3.6.2.2	tert-Butylhydroperoxid.....	56
3.6.2.3	Fenton-Reagens.....	56
3.6.3	DETEKTION VON (OXIDATIVER) DNA-SCHÄDIGUNG	57
3.6.4	DICHLOROFLUORESCEIN (DCF)-ASSAY	59
3.6.5	GLUTATHIONBESTIMMUNG	61
3.6.6	BESTIMMUNG DER LIPIDPEROXIDATION	62
3.6.7	BESTIMMUNG DER ANTIOXIDATIVEN KAPAZITÄT	62
3.6.8	WACHSTUMSHEMMUNG	64
3.6.9	STABILITÄT VON POLYPHENOLEN UNTER INKUBATIONSBEDINGUNGEN	65
4	MATERIALIEN UND METHODEN.....	66
4.1	ZELLKULTUR.....	66
4.1.1	MATERIALIEN	66
4.1.2	KULTIVIERUNG	67
4.1.2.1	Mediumwechsel	67
4.1.2.2	Subkultivierung	68
4.1.2.3	Einfrieren von Zellen	68
4.1.2.4	Auftauen von Zellen	69
4.1.2.5	Kontrolle der Zellkultur auf Mykoplasmen	69
4.2	ISOLIERUNG VON PRIMÄREN HUMANEN KOLONZELLEN	70
4.2.1	MATERIALIEN	70
4.2.2	ISOLIERUNG DER PRIMÄREN KOLONZELLEN	70
4.3	ZELLINKUBATION	71
4.3.1	MATERIALIEN	71
4.3.2	SUBSTANZEN	71
4.3.3	ZELLINKUBATIONEN FÜR COMET ASSAY, GSH-, MDA-BESTIMMUNG	73
4.3.3.1	Zweistufenprotokoll für primäre Kolonzenellen	73
4.3.3.2	Postinkubation zur Erfassung der DNA-Reparatur	74
4.3.4	VIABILITÄTSBESTIMMUNG	75
4.3.4.1	Zellzahlbestimmung	75
4.3.4.2	Bestimmung der Viabilität	75
4.3.4.3	SRB-Test	75
4.4	EINZELZELLGELELEKTROPHORESE (COMET ASSAY).....	76
4.4.1	MATERIALIEN	76
4.4.2	DURCHFÜHRUNG	78
4.5	DICHLOROFLUORESCEIN (DCF)-ASSAY	79
4.5.1	GERÄTE, VERBRAUCHSMATERIALIEN UND LÖSUNGEN	79
4.5.2	DURCHFÜHRUNG	80
4.6	GLUTATHIONBESTIMMUNG	81
4.6.1	GERÄTE, VERBRAUCHSMATERIALIEN UND LÖSUNGEN	81
4.6.2	DURCHFÜHRUNG	83
4.6.2.1	Zellaufarbeitung	83
4.6.2.2	Messung von tGSH.....	83
4.6.2.3	Messung von GSSG	85
4.7	MALONDIALDEHYD/TBARS-BESTIMMUNG.....	86
4.7.1	GERÄTE, VERBRAUCHSMATERIALIEN, LÖSUNGEN	86
4.7.2	DURCHFÜHRUNG	86
4.7.2.1	Zellaufarbeitung	86
4.7.2.2	Messung	87
4.8	PROTEINBESTIMMUNG (BCA)	88
4.8.1	GERÄTE, VERBRAUCHSMATERIALIEN UND LÖSUNGEN	88
4.8.2	DURCHFÜHRUNG	89

Inhalt

4.8.3	AUSWERTUNG	89
4.9	TROLOX EQUIVALENT ANTIOXIDANT CAPACITY (TEAC)	89
4.9.1	GERÄTE, VERBRAUCHSMATERIALIEN UND LÖSUNGEN	89
4.9.2	DURCHFÜHRUNG	90
4.9.3	BESTIMMUNG DES TEAC-WERTES WÄHREND 24 H INKUBATION	91
4.10	MESSUNG VON ABSORPTIONSSPEKTREN	92
4.10.1	GERÄTE, VERBRAUCHSMATERIALIEN UND LÖSUNGEN	92
4.10.2	AUFNAHME DER SPEKTREN ÜBER 24 H	92
4.10.3	ZUGABE VON ASCORBINSÄURE	93
4.10.4	PH-ABHÄNGIGKEIT UND REVERSIBILITÄT	93
4.11	STABILITÄT DER EINZELVERBINDUNGEN	93
4.11.1	GERÄTE, VERBRAUCHSMATERIALIEN UND LÖSUNGEN	93
4.11.2	PROBENVORBEREITUNG	94
4.12	STATISTIK	94
4.12.1	SIGNIFIKANZEN	94
4.12.2	AUSREIßER-TEST	95
5	ERGEBNISSE UND ERSTE DISKUSSION	96
5.1	CHARAKTERISIERUNG DER OXIDANZIEN	96
5.1.1	INDUKTION (OXIDATIVER) DNA-SCHÄDEN	96
5.1.1.1	Menadion	96
5.1.1.2	Wasserstoffperoxid	98
5.1.1.3	tert-Butylhydroperoxid (TBH)	99
5.1.2	INDUKTION DES ZELLULÄREN ROS-LEVELS	100
5.1.3	GLUTATHION-DEPLETION	101
5.1.4	INDUKTION DER LIPIDPEROXIDATION	102
5.1.5	ZUSAMMENFASSUNG ZUR OXIDANZIENCHARAKTERISIERUNG	104
5.2	ANTIOXIDATIVE WIRKSAMKEIT DER AGLYKA	106
5.2.1	ANTIOXIDATIVE KAPAZITÄT (TEAC)	106
5.2.2	ZYTOTOXIZITÄT/WACHSTUMSHEMMUNG	106
5.2.3	MODULATION MD-INDUZIERTER (OXIDATIVER) DNA-SCHÄDEN	107
5.2.4	EINFLUSS AUF DNA-„REPARATUR“	112
5.2.5	MODULATION DES TBH-INDUZIERTEN ZELLULÄREN ROS-LEVELS	114
5.2.6	EINFLUSS AUF DEN GLUTATHIONSPIEGEL	116
5.2.6.1	Modulation der Md-induzierten GSH-Depletion	116
5.2.6.2	Modulation des Basis-tGSH-Spiegels	118
5.2.7	MODULATION DER OH [•] -INDUZIERTEN LIPIDPEROXIDATION	119
5.2.8	ZUSAMMENFASSUNG DER WIRKSAMKEIT DER AGLYKA	121
5.3	ANTIOXIDATIVE WIRKSAMKEIT DER APFELSAFTEXTRAKTE	123
5.3.6	ANTIOXIDATIVE KAPAZITÄT (TEAC)	123
5.3.7	MODULATION MD-INDUZIERTER DNA-SCHÄDEN	123
5.3.8	MODULATION DES TBH-INDUZIERTEN ZELLULÄREN ROS-LEVELS	128
5.3.9	MODULATION DES TGSH-SPIEGELS	130
5.3.10	ZUSAMMENFASSUNG DER WIRKSAMKEIT VON APFELSAFTEXTRAKTEN	132
5.4	ANTIOXIDATIVE WIRKSAMKEIT DER APFELSAFTINHALTSSTOFFE	134
5.4.6	ANTIOXIDATIVE KAPAZITÄT	134
5.4.7	MODULATION MD-INDUZIERTER DNA-SCHÄDEN	136
5.4.8	ZYTOTOXIZITÄT UND WACHSTUMSHEMMUNG	139
5.4.9	MODULATION DES TBH-INDUZIERTEN ROS-LEVELS	140
5.4.10	EINFLUSS AUF DEN TGSH-GEHALT	144
5.4.11	ZUSAMMENFASSUNG DER WIRKSAMKEIT VON EINZELSUBSTANZEN	145
5.5	UNTERSUCHUNGEN ZUR STABILITÄT	147
5.5.6	STABILITÄT UNTER INKUBATIONSBEDINGUNGEN (HPLC)	147
5.5.7	STABILITÄT UNTER INKUBATIONSBEDINGUNGEN (UV-SPEKTREN)	151

Inhalt

5.5.2.1 Zugabe von Ascorbinsäure	152
5.5.7.1 pH-Abhängigkeit und Reversibilität	154
5.5.8 ZUSAMMENFASSUNG ZUR STABILITÄT VON POLYPHENOLEN	157
6 DISKUSSION UND AUSBLICK.....	158
7 ZUSAMMENFASSUNG	168
8 LITERATURVERZEICHNIS.....	170
9 ANHANG.....	I
9.1. NICHT DARGESTELLTE ABBILDUNGEN	I
9.2 LEBENSLAUF	V
9.3 POSTERBEITRÄGE UND PUBLIKATIONEN.....	VI

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

8-OH-dG	8-Hydroxy-desoxyguanin
ABTS	2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat)
ACF	aberrant crypt foci
AE	Apfelsaftextrakt
Ah-Rezeptor	Arylhydrocarbon-Rezeptor
APE03	„apple pomace extract“, engl. für Apfeltresterextrakt 03
AP	apurinisch/apyrimidinisch
APC	adenomatöse Polyposis coli
ARE	„antioxidative response element“
ATP	Adenosintriphosphat
B.	Bacillus
BCA	Bichinolincarbonsäure
BER	„base excision repair“, engl. für Basenausschneidereparatur
BHT	tButylhydroxytoluol
BSA	„bovine serum albumin“, engl. für Rinderserumalbumin
C.	Clostridium
CaA	„caffeic acid“, engl. für Kaffeesäure
CAT	Katalase
ChA	Chlorogensäure
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CU	Colitis Ulcerosa
CUPRAC	Cupric reducing antioxidant capacity
CYP 450	Cytochrom-P450
DAD	Diodenarray-Detektor
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DCC	„deleted in colon cancer“
DCF	2'-7'-Dichlorofluorescein (oxidierte Form)
DCFH	2',7'-Dichlorfluorescein (reduzierte Form)
DCFH-DA	2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat
DMEM	„Dulbecco´s modified eagle medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„desoxyribonucleic acid“, engl. für Desoxyribonukleinsäure
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazylradikal
DSB	Doppelstrangbruch
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
E.	Eubacterium
E%	Entfärbung im Vergleich zur Kontrolle (TEAC)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF(R)	„epidermal growth factor (receptor)“
ELISA	„Enzyme Linked immunosorbent Assay“
Epi	(-)-Epicatechin
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid, reduziert

Abkürzungsverzeichnis

FAP	familiars adematöses Polyposis-Syndrom
FaPy	2,6-Diamino-4-hydroxyformamidopyrimidin
FI%	“fluorescence increase”, engl. für Fluoreszenzanstieg
FKS	Fötales Kälberserum
FPG	Formamindopyrimidin-DNA-Glykosylase
FRAP	„ferric reducing ability of plasma“
GCS	γ -Gluamylcysteinsynthetase
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion (reduziert)
GS·	Glutathion-Radikal
GSR	Glutathionreduktase
GSSG	Glutathion (oxidiert)
GST	Glutathion-S-Transferase
HBSS	„hanks buffered salt solution“
HNPCC	“hereditary non polyposis colorectal cancer syndrome“
HPLC	“High performance (pressure) liquid chromatography“, engl. für Hochleistungs(druck)flüssigkeitschromatografie
IC ₅₀	Inhibierende Konzentration 50%
LC/MS	„liquid chromatography/ mass spectrometry“, engl. für Flüssigchromatographie/ Massenspektrometrie
LH	Fettsäure
LMA	„low melting agarose“
LOOH	Fettsäurehydroperoxid
LPH	Laktat-Phloridzin-Hydrolase
LPO	Lipidperoxidation
LPx	Laktat-Peroxidase
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
MC	Morbus Crohn
Md	Menadion
MDA	Malondialdehyd
MRP2	Multidrug-resistance-associated Protein
n	Anzahl unabhängiger Versuche
NAD(P)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (Phosphat)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphathydrid
NER	„nucleotid excision repair“, engl. für Nukleotidausschneidereparatur
NF κ B	“nuclear factor κ B“
Nrf2	(nuclear transcription factor erythroid 2p45, NF-E2) related factor 2
NMA	“normal melting Agarose“
NQO1	NADPH-Chinon-Oxidoreduktase (DT-Diaphorase)
o-	ortho
ORAC	“oxygen radical absorbance capacity“
p-	para
p	Irrtumswahrscheinlichkeit (Statistik)
PBS	“phosphate saline buffer“, engl. für Phosphat-gepufferte Salzlösung

Abkürzungsverzeichnis

pH	Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pK _a	Logarithmus der Säuredissoziationskonstante
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKZ	primäre (humane) Kolonzellen
Plt	Phloretin
Plz	Phloridzin
Que, Q	Quercetin
Q [•]	Quercetin-o-Semichinon
Qq	Quercetinchinon
rA(P)E	rekonstituierte Mischungen der Apfelsaft(Trester)extrakte
ROS	„reactive oxygen species“, engl. für Reaktive Sauerstoffspezies
RP	reversed phase
RT	Retentionszeit
Rut	Rutin
SD	„standard deviation“, engl. für Standardabweichung
SE	„standard error“, engl. für Standardfehler
SGLT1	„sodium dependent glucose transporter“
SOD	Superoxiddismutase
SRB	Sulforhosamin B
SSA	Sulfosalicylsäure
SSB	„single strand break“, engl. für Einzelstrangbruch
SULT	Phenol-Sulfattransferase
TAC	„total antioxidant capacity“
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TEAC	„Trolox equivalent antioxidative capacity“
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethanolamin
tGSH	Gesamtglutathion
TI%	„Tail intensity“, engl. für Schweifintensität
TNB	5-Thio-2-Nitrobenzoat
TRAP	„total peroxy radical trapping potential“
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
UDPGT	UDP-Glucuronyl-Transferase
UDP	Uracil-Diphosphat
VdF	Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie e.V.

1 Einleitung

Darmkrebs ist eine der häufigsten Zivilisationskrankheiten in den westlichen Industrieländern. Das Auftreten ist zu einem großen Teil ernährungsbedingt [Donaldson, 2004]. Risikofaktoren sind tierische Fette, rotes Fleisch und Stoffe, die sog. reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) generieren können [Owen, 2001]. Zu den ROS gehören freie Radikale, z.B. das Hydroxylradikal und das Superoxidani-onradikal und Nichtradikale wie Singulett-sauerstoff und Wasserstoffperoxid [Kelly *et al.*, 1998]. Sie sind in der Lage, mit Lipiden, Proteinen und DNA zu interagieren [Aherne und O'Brien, 2000b]. Der Darm ist beträchtlichen Mengen aufgenommener Oxidanzien aus-gesetzt, z.B. Lipidperoxide oder Eisen. Sie können adverse Effekte im Kolon durch Erhöhung der Radikalbildung verursachen [Aw, 1999, Nelson, 2001]. ROS können auch im Darm aus Nahrungsbestandteilen gebildet werden [Valko *et al.*, 2001]. Dadurch kann ein Ungleichgewicht zwischen Bildung von ROS und deren Beseitigung entstehen und zu oxidativem Stress führen. Dieser ist assoziiert mit degenerativen Erkrankun-gen wie z.B. Krebs, Atherosklerose und Diabetes.

Chronische Darmentzündungen, z.B. Colitis Ulcerosa oder Morbus Crohn, werden ebenfalls mit einer vermehrten Produktion von Oxidanzien im Darm in Verbindung gebracht, die durch infiltrierende Makrophagen und Neutrophile ausgeschüttet wer-den. In Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen ist zusätzlich die zelluläre Abwehr gestört, z.B. die Synthese von Glutathion, dem bedeutensten zellulären Anti-oxidans. [Sido *et al.*, 1998]

Antioxidanzien sind Substanzen, die ROS direkt durch Abfangen von Radikalen [Nijveldt *et al.*, 2001] oder durch Chelatbildung mit Übergangsmetallen [van Acker *et al.*, 1998] oder indirekt durch Modulation der Zellantwort [Talalay *et al.*, 1995] beseitigen. Zu den Antioxidanzien zählen sekundäre Pflanzenstoffen, eine Vielzahl meist polyphen-olischer Verbindungen, z.B. Flavonoide und Hydroxyzimtsäurederivate. Durch einen hohen Anteil von Obst, Gemüse und komplexen Kohlenhydraten in der Nahrung kann das Krebsrisiko gesenkt werden [Steinmetz und Potter, 1996] und vor degenerativen Erkrankungen schützen. Mögliche Mechanismen sind z.B. Hemmung des Zellwachs-tums, Induktion detoxifizierender Enzymen und Apoptose [Birt *et al.*, 2001].

Seit einigen Jahren stehen daher Obst- und Gemüseprodukte im Vordergrund ernäh-rungsphysiologischer Untersuchungen. Äpfel sind in der „westlichen“ Ernährung auf-grund ihres Vorkommens eine bedeutende Quelle von Antioxidanzien. Apfelsaft ist mit einem durchschnittlichen Prokopf-Verzehr von 13 L pro Jahr der häufigste ge-

trunkene Saft, daher bietet dieser ein Ziel für die Untersuchung seiner antioxidativen Wirksamkeit sowie Möglichkeiten zu deren Optimierung. Durch geeignete Sortenauswahl und Technologien lassen sich die Gehalte an Antioxidanzien um ein Vielfaches steigern. Tafeläpfel sind Grundlage von in großen Mengen produzierten Apfelsäften und der Trend ist steigend. Der Gesamtgehalt an Antioxidanzien liegt für diese Rohware bei ca. 100-200 mg/L. Durch den Einsatz von hochwertigeren Mostpapiersorten, so genannte „alte Apfelsorten“, können diese Konzentrationen im Apfelsaft um das 6-9-fache erhöht werden [Kahle *et al.*, 2005a].

Eine weitere Möglichkeit, die Konzentration der Polyphenole zu verändern besteht in einer Behandlung des Pressrückstandes (Trester) mit Pektinasen und Zellulasen [Will *et al.*, 2000]. Polyphenole sind im Apfel nicht homogen verteilt und viele dieser Substanzen werden beim Pressen des Saftes nicht herausgelöst, weil sie z.B. nicht genügend wasserlöslich sind oder in der Schale und im Kerngehäuse gebunden bleiben.

Inwieweit Apfelsaftinhaltsstoffe den Darm vor ROS schützen können, ist bisher noch nicht geklärt. In einer *in vivo*-Studie mit Ratten wurden Dimethylhydrazin-induzierte genotoxische Schäden durch Apfelsaft signifikant reduziert [Barth *et al.*, 2005].

2 Problemstellung

Diese Arbeit entstand im Rahmen des BMBF-geförderten Netzwerkprojektes (NutritionNet) „Rolle von Nahrungsbestandteilen in der Genese von Darmkrankheiten und Möglichkeiten ihrer Prävention durch Ernährung“. Ziel dieses Projektes ist die Entwicklung eines (Apfel)-Produktes mit hohem gesundheitlichem Wert. Der Fokus der vorliegenden Arbeit richtete sich auf die Modulation oxidativer Zellschädigung durch Apfelsaftinhaltsstoffe in humanen Kolonzellen.

Flavonoide und Polyphenole sind sekundäre Pflanzenstoffe, die in Obst und Gemüse in z.T. hohen Mengen enthalten sind. Im Apfel sind vor allem Quercetin- und Phloretinglykoside sowie Hydroxyzimtsäurederivate und Katechine vertreten. Sie zeigen ausgeprägte antioxidative Eigenschaften und besitzen daher ein Potenzial, oxidativem Stress und damit assoziierten Krankheiten entgegen wirken zu können.

Die Erfassung der biologischen Wirksamkeit von Flavonoiden/ Polyphenolen ist daher gegenwärtig das Forschungsziel vieler Studien. In Interventionsstudien wurden bisher konträre Ergebnisse erhalten, die teilweise auf der unterschiedlichen Bioverfügbarkeit aus den Nahrungsmitteln beruhen können. Durch die schlechte Resorption der phenolischen Verbindungen werden im Kolon dagegen mitunter beträchtliche Konzentrationen erreicht, so dass Effekte der Antioxidanzien für Darmzellen relevant sein können.

Ziel dieser Arbeit war es, das antioxidative Potenzial von Apfelsaftinhaltsstoffen in humanen Kolonzellen zu charakterisieren. Folgende Aspekte sollten dabei Beachtung finden:

- Um dem Organ Darm möglichst nahe zu kommen, kamen zwei Kolonkarzinomzelllinien (Caco-2, HT29) zum Einsatz. Diese werden häufig als Modellzelllinien für das Kolon verwendet, da sich die Enzymausstattung mit denen des normalen Darmgewebes ähnelt. In einzelnen Fällen sollten zusätzlich primäre humane Kolonzellen aus Biopsiematerial in die Untersuchungen einbezogen werden. Die Verwendung verschiedener Zellsysteme gewährleistet eine zuverlässigere Aussage über die biologische Wirksamkeit der Antioxidanzien im Hinblick auf die Übertragung auf das *in vivo*-System.
- Zur Beurteilung des antioxidativen Potenzials werden häufig zellfreie Tests zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität herangezogen. Dadurch lässt sich nur schwer abschätzen, inwieweit diese Wirkung auch im Organismus eine Rolle spielen kann; Faktoren wie Bioverfügbarkeit, Metabolismus und Zellant-

wort bleiben unberücksichtigt. Daher wurden zur Erfassung des antioxidativen Potenzials neben einem zellfreien Test zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität (TEAC) verschiedene biologische Marker ausgewählt, die in direktem Zusammenhang mit oxidativer Zellschädigung stehen und Möglichkeiten einer Prävention durch die Apfelsaftinhaltsstoffe offenbaren. Sie umfassten die Modulation (oxidativer) DNA-Schädigung und des ROS-Levels in der Zelle sowie in Einzelfällen auch der Lipidperoxidation. Für die Unterscheidung, ob es sich um eine direkte antioxidative Wirkung oder um eine Zellantwortvermittelte Wirkung handelt, wurden verschiedene Inkubationszeiten (24 h, 2 h) gewählt. Begleitend wurden Zytotoxizität und Wachstumshemmung untersucht.

Da eine Modulation des ohnehin geringen Basisschadens der Zelle nur schlecht quantifizierbar war, erforderte für die Zellinkubation die Etablierung eines Zweistufenprotokoll, das eine Vorinkubation mit den potenziellen Antioxidanzien gefolgt von einer Oxidansbehandlung zur Erhöhung des Schädigungsmaßes, wie sie *in vivo* in pathologischen Situationen gefunden werden, umfasste. Dazu wurden Agenzien verwendet, die unterschiedliche ROS bilden, um für den jeweiligen Endpunkt das am besten geeignete Oxidans zu finden.

- Die Modulation der Zellantwort wurde durch die Veränderung des Glutathionspiegels untersucht, da Antioxidanzien nicht nur direkte radikalabfandende Wirkungen haben, sondern auch einen Einfluss auf die Genexpression von z.B. antioxidativen Enzymen haben können.
- Als Referenzsubstanzen wurden die Aglyka Quercetin und Phloretin geprüft. Quercetin ist eine gut beschriebene Verbindung, die in verschiedenen Testsystemen bereits als potentes Antioxidans charakterisiert ist. Die beiden Aglyka haben zusätzlich eine biologische Relevanz im Darm, da sie aus den entsprechenden Glykosiden durch lumenständige Enzyme im Darm freigesetzt werden können und dort ihre Wirkung entfalten können.
- Zur Erfassung des protektiven Potenzials von Apfelsaftinhaltsstoffen wurden in der Forschungsanstalt Geisenheim Apfelsaftextrakte verschiedener Herkunft hergestellt. Die Auswahl der Rohware richtete sich nach einem möglichst hohen Gehalt von phenolischen Verbindungen im Saft. Dies wurde gewährleistet durch die Verwendung von „alten“ Mostapfelsorten, die einen 6-9fachen Polyphenolgehalt verglichen zu Tafelapfelsorten aufweisen. Da bei der Apfelpressung ein Großteil der Polyphenole im Trester verbleiben, wurde für einen Ex-

trakt eine so genannte Tresterverflüssigung mittels Zellulasen-/Pektinasenbehandlung durchgeführt, um die Verbindungen herauszulösen und in den Tresterextraktionssaft zu überführen. Ziel war es, die verschiedenen Extrakte vergleichend auf ihr protektives Potenzial zu prüfen.

- Da die Extrakte komplex zusammengesetzte Mischungen polyphenolischer Substanzen sind, von denen bisher weniger als 50% identifiziert sind, können für die protektive Wirkungen verschiedene Verbindungen verantwortlich sein. Zur Vereinfachung wurden Mischungen aus fünf Apfelsaftinhaltsstoffen (Rutin, Phloridzin, Epicatechin, Chlorogensäure, Kaffeesäure) in den Anteilen hergestellt, wie sie im Extrakt vorkommen und ihre protektive Wirksamkeit mit der der natürlichen Extrakte verglichen. Weitere Hinweise auf relevante Verbindungen sollten die Untersuchungen der Einzelstoffe geben.
- Polyphenole sind Verbindungen mit funktionellen Gruppen, die sehr reaktiv sein können. Gerade unter physiologischen Inkubationsbedingungen (pH 7,4, wässrig) sind vielfältige Reaktionen möglich, so dass im Laufe der Inkubation andere Verbindungen entstehen, die die Wirksamkeit beeinflussen können. Die Stabilität der Einzelstoffe während der Inkubation sollte mittels HPLV-UV verfolgt werden. Durch Vergleich der Chromatogramme bei Inkubationen mit und ohne Zellen sollten außerdem Hinweise auf eine mögliche metabolische Aktivität der Zellen erhalten werden. Für die beiden Aglyka wurden zusätzlich UV-Spektren in den Inkubationsmedien aufgenommen, um Anhaltspunkte für Strukturveränderungen zu erhalten.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Der Darm

Nach Aufbau und Lage lässt sich das Verdauungssystem in verschiedene Bereiche aufteilen (Abbildung 3.1) und umfasst Speiseröhre, Magen und Pankreas, Dünndarm sowie Dickdarm (Kolon).

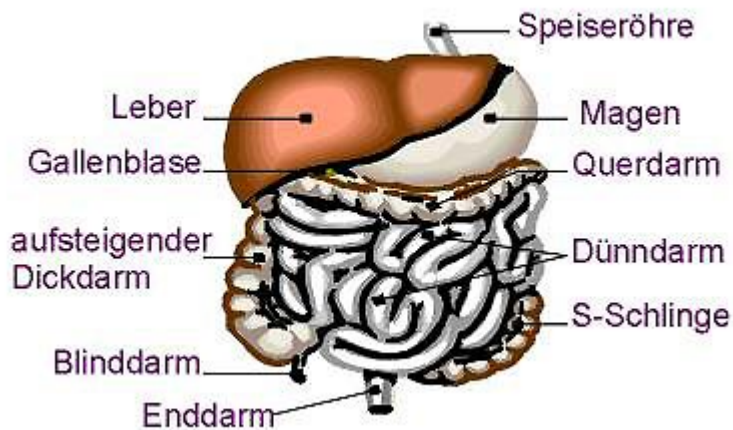


Abbildung 3.1: Aufbau des Gastrointestinaltraktes.

3.1.1 Aufbau & Funktion

Das Dünndarmepithel

Die physiologische Funktion des Dünndarms besteht in der Aufspaltung von Nahrungsbestandteilen und der Resorption von Nährstoffen. Letzteres geschieht in der Dünndarmschleimhaut. Durch Mehrfachfaltung (zirkuläre Kerckringfalten, Darmzotten und Mikrovilli des Darmepithels) kommt eine Vergrößerung der Lumenbegrenzenden Dünndarmoberfläche um den Faktor 300 zustande. Das Epithel der Zotten besteht vorwiegend aus Enterozyten, daneben aus Mukus-produzierenden Becherzellen und M-Zellen. Die gesamte Oberfläche des Dünndarmepithels ist mit einer Mukusschicht überzogen. In ihr herrscht ein Mikroklima mit einem pH-Wert von 6,1 bis 6,8 und wird trotz der Peristaltikbewegungen des Darms nicht entfernt. Die resorbierenden Enterozyten bilden ab der Mitte der Zotten Mikrovilli aus, die den Bürstensaum formen. In diesem befinden sich Bürstensaumenzyme, die an der Verdauung beteiligt sind, z.B. β -Glukosidasen oder Laktat-Phloridzin-Hydrolase (LPH), die Phenolglykoside spalten können. In den epithelialen Zellen der Dünndarm-

schleimhaut sind Transportsysteme exprimiert, die der Aufnahme von Nahrungsbestandteilen dienen. [Betz *et al.*, 2001]

Das Dickdarmepithel

Die Hauptfunktionen des Kolons sind Resorption von Wasser und Elektrolyten, intraluminärer Metabolismus von unverdauten Kohlenhydraten durch Bakterien und die zeitliche Lagerung von Fäzes sowie dessen Transport. Die motorische Aktivität des Dickdarms ist von primärer Bedeutung für die letztgenannte Funktion, beeinflusst aber gleichwohl auch die übrigen Aufgaben. Die Schleimhaut des gesamten Dickdarms ist zottenlos, die Krypten sind jedoch besonders tief und stehen dicht nebeneinander. Das Epithel besteht vorwiegend aus Schleim-produzierenden Becherzellen. Ein Teil der Oberfläche ist mit einem Bürstensaum überzogen und dient der Resorption. [Thews, 1999] Die Darmschleimhaut wird ständig erneuert. Dadurch kommt es zu besonders hohen Zellteilungsraten: Am unteren Pol jeder Krypte befinden sich Stammzellen, die kontinuierlich Tochterzellen produzieren (Abbildung 3.2).

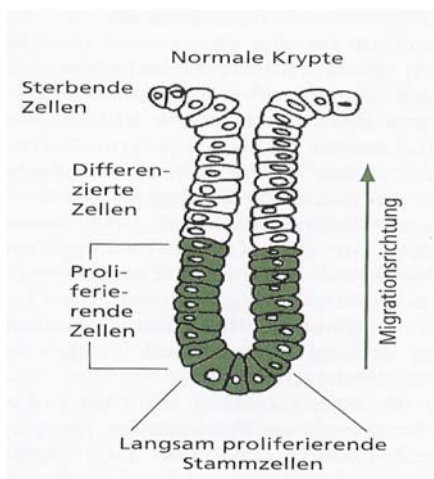


Abbildung 3.2: Aufbau einer Darmkrypte des Dickdarms [Marquardt und Pfau, 2004].

Diese sind noch für 7-8 weitere Zellteilungen befähigt. Währenddessen wandern sie bis zur Schleimhautoberfläche und zum Darmlumen. Dort stellen sie die Zellteilung ein und gehen in die G₀-Phase terminal differenzierter Zellen über. Schließlich unterliegen sie einem aktiven Zelltod und werden ins Darmlumen abgestoßen. [Schulte-Hermann *et al.*, 2004]

Die Epithelzellen mit sog. tight junctions, adherens junctions und Desmosomen bilden die intestinale Barriere, die für die Gewährleistung der intestinalen Homöostase von wesentlicher Bedeutung ist, da die Oberfläche von zahlreichen Mikroorganismen kolonisiert ist, so dass sich das Kolon ständig mit einer Vielzahl von Antigenen aus-

einander setzen muss. Die intestinale Mukosa befindet sich in einem Dauerzustand der kontrollierten Entzündung [Kucharzik, 2004].

3.1.2 Pathophysiologie des Darms

Störungen der Kolonmotilität können zu Obstipation, Diarrhoe oder zur Stuhlinkontinenz führen. Als Folge können Störungen zwischen Resorption und Sekretion entstehen. Bei Diarrhöen z.B. resultiert dies in einer luminalen Akkumulation von Flüssigkeit und Elektrolyten [Kucharzik, 2004].

3.1.2.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Unter chronisch entzündlichen Darmerkrankungen leiden in Deutschland rund 300.000 Menschen. Sie manifestieren sich meistens bei 20- bis 30-Jährigen [DLR-Newsletter, 2002]. Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn (MC) und Colitis Ulcerosa (CU) sind das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels von genetischen Suszeptibilitätsfaktoren, Umweltfaktoren, Veränderungen der Darmflora und einer fehlerhaften Regulation des intestinalen Immunsystems. Die Folge ist eine immunvermittelte Gewebeerstörung [Holtmann und Neurath, 2004]. Während MC den gesamten Gastrointestinaltrakt befallen kann [Reinshagen, 2004], ist die CU auf die Mukosa des Rektums/Kolons beschränkt, wobei sich die Entzündung nur selten von Rektum aus weiter über das Sigma hinaus im Kolon ausbreitet [Göke, 2004]. Beide Formen verlaufen in Schüben, die wochen- oder monatelang andauern können und denen unter Umständen eine jahrelange Remission folgt [Göke, 2004, Reinshagen, 2004]. Im Laufe der Krankheit können verschiedene krankheitsbedingte Komplikationen auftreten: Fisteln/Abszesse, Strikturen/Stenosen, Fissuren, Perforation, toxisches Megakolon und, häufiger bei der CU beobachtet, Neoplasien und kolorektale Karzinome [Reinshagen, 2004].

3.1.2.2 Kolonkrebs

Darmkrebs, insbesondere in Kolon und Rektum, ist die zweithäufigste Krebsart in Westeuropa, Nordamerika und Australien hinter Lungen- bzw. Brustkrebs [Gill und Rowland, 2002], wobei ca. 6% der 65jährigen Bevölkerung von Kolonkrebs betroffen ist. Jährlich treten in Europa 190.000 neue Krebsfälle auf [Pool-Zobel *et al.*, 2005]. Die überwiegenden Risikofaktoren von Krebs haben ihren Ursprung in der Ernährung und im Lebenswandel. In westlichen Industrieländern könnten ca. 30-40% aller Krebsfälle

durch einen angemessenen Ernährungsstil und Lebenswandel verhindert werden [Donaldson, 2004].

Molekulare Mechanismen der Kolonkanzerogenese

Kanzerogenese ist ein mehrstufiger Prozess, der molekulare und zelluläre Veränderungen umfasst. Der Prozess kann in drei miteinander verknüpfte Stufen eingeteilt werden: Tumorinitiation – Promotion – Progression (Abbildung 3.3).

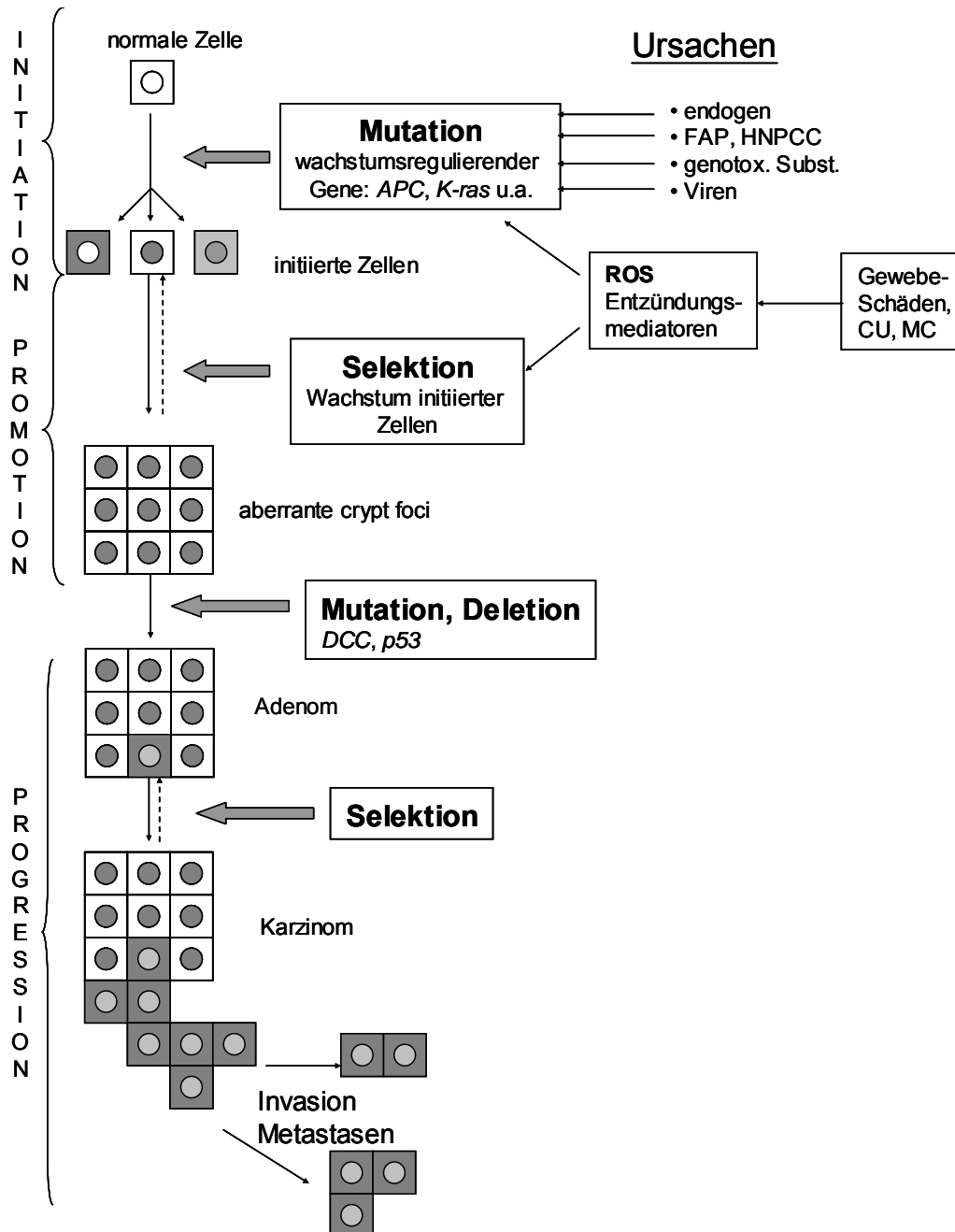


Abbildung 3.3: Mehrstufigenprozess der Kolonkrebsentstehung, modifiziert nach [Schulte-Hermann *et al.*, 2004]; Abkürzungen: *APC*: adenomatöse Polyposis coli; *FAP*: familiäres adenomatöses Polyposis-Syndrom; *HNPCC*: nicht-polypöses kolo- rektales Krebsyndrom; *CU*: Colitis ulcerosa; *MC*: Morbus Crohn; *DCC*: deleted in colon cancer

Ungefähr 20% aller kolorektalen Tumore sind genetisch bedingt. Dazu gehören u.a. das familiäre adenomatöse Polyposis-Syndrom (FAP) und das hereditäre, nicht-polypöse kolorektale Krebsyndrom (HNPCC). Entzündliche Darmerkrankungen, z.B. MC oder CU, können in ihrem fortgeschrittenen Krankheitsverlauf ebenfalls zu kolorektalen Tumoren führen [Gottstein und Koop, 2004]. Die meisten kolorektalen Tumore treten sporadisch auf und sind durch exogene Faktoren, z.B. aus der Nahrung, bestimmt. Diese verursachen genetische Veränderungen oder greifen aktivierend in die Prozesse der Krebsentstehung ein, gefolgt von einer gestörten Zellhomöostase. [Schulte-Hermann *et al.*, 2004]

Zur Bildung von malignen Tumoren werden Mutationen in mindestens vier oder fünf Genen benötigt. Eines der ersten Ereignisse inaktiviert das Tumorsuppressorgen *APC* (adenomatöse Polyposis des Kolons) in beiden Chromosomen. Danach folgt die Mutation des Onkogens *K-ras* und weiterer Tumorsuppressorgene. Auch andere genetische Veränderungen spielen eine Rolle, z.B. die Modulation der DNA-Methylierung in CpG-Sequenzen von Promoterregionen von Tumorsuppressor- und DNA-Reparaturgenen, was letztlich zur Inaktivierung oder DNA-Amplifikation als Mechanismen der Onkogenaktivierung führt. Eingriffe in diese Prozesse bedeuten meist ein verstärktes Wachstum und Geninstabilität [Berlau *et al.*, 2004]. Eine Ansammlung von Änderungen kann zu einer klonalen Selektion von Zellen mit aggressiven und invasiven Wachstumseigenschaften gegenüber normalen Nachbarzellen führen [Berlau *et al.*, 2004, Gee und Johnson, 2001], was durch Wachstumsfaktoren verstärkt wird, die die Zellproliferation in einem frühen Stadium der Tumorentwicklung stimulieren [Berlau *et al.*, 2004].

Frühe prämaligne Läsionen sind z.B. aberrante crypt foci (ACF). Dabei handelt es sich um einzelne oder multiple Krypten, die veränderte luminale Öffnungen besitzen, ein verdicktes Epithel zeigen und größer als benachbarte Krypten sind [Mori *et al.*, 2004]. Sie überexprimieren Proteine, die in der Promotionsphase für das weitere übermäßige Wachstum und Mutationen verantwortlich sind:

1. Prooxidative Enzyme, z.B. Cyclooxygenase 2 und Lipoxygenase. Dies führt zu einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und dadurch zu einer erhöhten Mutationsrate.
2. Ornithin-Decarboxylase: Dieses Enzym ist beteiligt an der Polyaminbildung und ist das limitierende Enzym bei der Nukleotidsynthese. Eine Überexpression führt zu einer erhöhten DNA-Synthese und damit zur vermehrten Zellproliferation.

3. DNA-Polymerase oder Topoisomerase II: Die DNA-Synthese kann direkt aktiviert werden.

4. Enzyme, die in wachstumsregulierenden Signalwegen involviert sind: Dies führt zu einer Aktivierung der Zellproliferation. Der häufigste Mechanismus der Regulation ist die Phosphorylierung und Dephosphorylierung durch Kinasen und Phosphatasen, z.B. Proteinkinase A und C (PKA, PKC) und Cyclin-abhängige Kinasen. [Depeint *et al.*, 2002]

Aus prämaligen Läsionen entstehen Adenome, die sehr langsam wachsen und aus denen meist Karzinome entstehen. [Schulte-Hermann *et al.*, 2004].

Ernährungsfaktoren für Erhöhung des Krebsrisikos

Die Kanzerogenese ist ein lang andauernder, statistischer Prozess, in dem eine Zelle zahlreiche Mutationen durchläuft.

Ein wichtiger Grund für ernährungsbedingte Erkrankungen in unserer Wohlstandsgesellschaft ist Über- und Fehlernährung, charakterisiert durch unausgewogene Kost mit hohem kalorischen Energiewert („westlicher Ernährungsstil“) und einem zu geringem Anteil an Ballaststoffen. In epidemiologischen Studien werden als klassische Risikofaktoren vor allem tierische Fette, rotes Fleisch und Alkohol diskutiert [Owen, 2001], womit ein erhöhtes Risiko für degenerative Erkrankungen, z.B. Atherosklerose, Tumoren in verschiedenen epithelialen Geweben, Übergewicht und Diabetes einhergeht [Berlau *et al.*, 2004]. ROS (Kap. 3.2) können durch die Aufnahme solcher Risikofaktoren entstehen und auf diese Weise genotoxische Läsionen induzieren. Zudem wirken ROS als Wachstumsfaktoren [Berlau *et al.*, 2004]. Sie greifen die DNA an, was zu Chromosomenalterationen, Genmutationen, Zelltransformationen und Zelltod führen kann. Somit können sie eine Rolle im Kanzerogeneseprozess spielen [Martins und Meneghini, 1990].

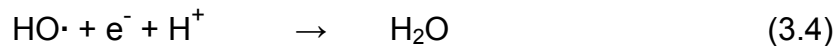
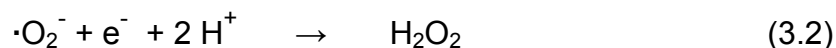
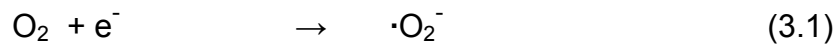
Bei einer fettreichen Mahlzeit kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von primären Gallensäuren in den Dünndarm. Im terminalen Ileum werden sie überwiegend über einen Natrium-Kotransport rückresorbiert und gelangen wieder in die Leber (enterohepatischer Kreislauf). Ein gewisser Anteil gelangt jedoch weiter in das Kolon [Thews, 1999]. Dort werden die primären Gallensäuren durch die angesiedelten Mikroorganismen zu sekundären Gallensäuren verstoffwechselt, welche nur zu einem gewissen Anteil resorbiert werden können [Biesalski, 1999]. Diese Produkte wurden im Tierversuch als potenzielle Kanzerogene mit promovierenden Eigenschaften identifiziert [Owen, 2001].

Bei hohem Proteinverzehr kommt es zu einem vermehrten Übertritt von Proteinen, Peptiden und Harnstoff in das Kolon. Durch den bakteriellen Metabolismus entsteht unter anderem das Ammoniumkation (NH_4^+). Dies ist im Tierversuch zytotoxisch und spielt möglicherweise eine Rolle in der Kanzerogenese. [Biesalski, 1999]

3.2 **Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)**

Da Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) bei Entzündungen und bei der Kanzerogenese eine Rolle spielen, soll im folgenden Kapitel allgemein auf die Entstehung und Auswirkungen auf den Organismus und dessen Abwehrmechanismen eingegangen werden.

In aerob lebenden Organismen wird Sauerstoff für Oxidationsreaktionen benötigt. Das O₂-Molekül ist in seinem Grundzustand mit zwei ungepaarten Elektronen (Triplettzustand) als freies Diradikal anzusehen und reagiert deshalb auch hauptsächlich mit Radikalen. Bei der Zellatmung erfolgt die Reduktion von O₂ zu Wasser über vier Ein-Elektronen-Reduktionsschritte, dargestellt in Gln 3.1-3.4.



Durch die erste Ein-Elektronen-Reduktion entsteht das Superoxidradikalanion ($\cdot\text{O}_2^-$), durch eine Zweite mit anschließender Protonierung Wasserstoffperoxid (H₂O₂) (Gln 3.1, 3.2). Aus H₂O₂ kann entweder das hochreaktive Hydroxylradikal (HO \cdot) (Gl. 3.3), oder durch Reduktion mit zwei Elektronen schließlich Wasser entstehen (Gln. 3.3, 3.4) [Berg *et al.*, 2003]. Zu geringen Teilen fällt vor allem $\cdot\text{O}_2^-$ in der Zelle an. Zu den ROS zählen außerdem nicht-radikalische Formen, wie z.B. H₂O₂, Ozon, hypochlorige Säure (HOCl), Alkylhydroperoxide und radikalische Derivate wie Alkoxy- und Alkylperoxyradikale (ROO \cdot) [Eisenbrand und Metzler, 2005]. Der Organismus hat vielzählige Mechanismen entwickelt, ROS zu eliminieren, bevor sich die schädigende Wirkung manifestieren kann. Herrscht jedoch ein Ungleichgewicht zwischen der Entstehung und Beseitigung von ROS, so spricht man von oxidativem Stress.

Abbildung 3.4 gibt einen Überblick über die Entstehung von ROS sowie die zellulären Abwehrmechanismen.

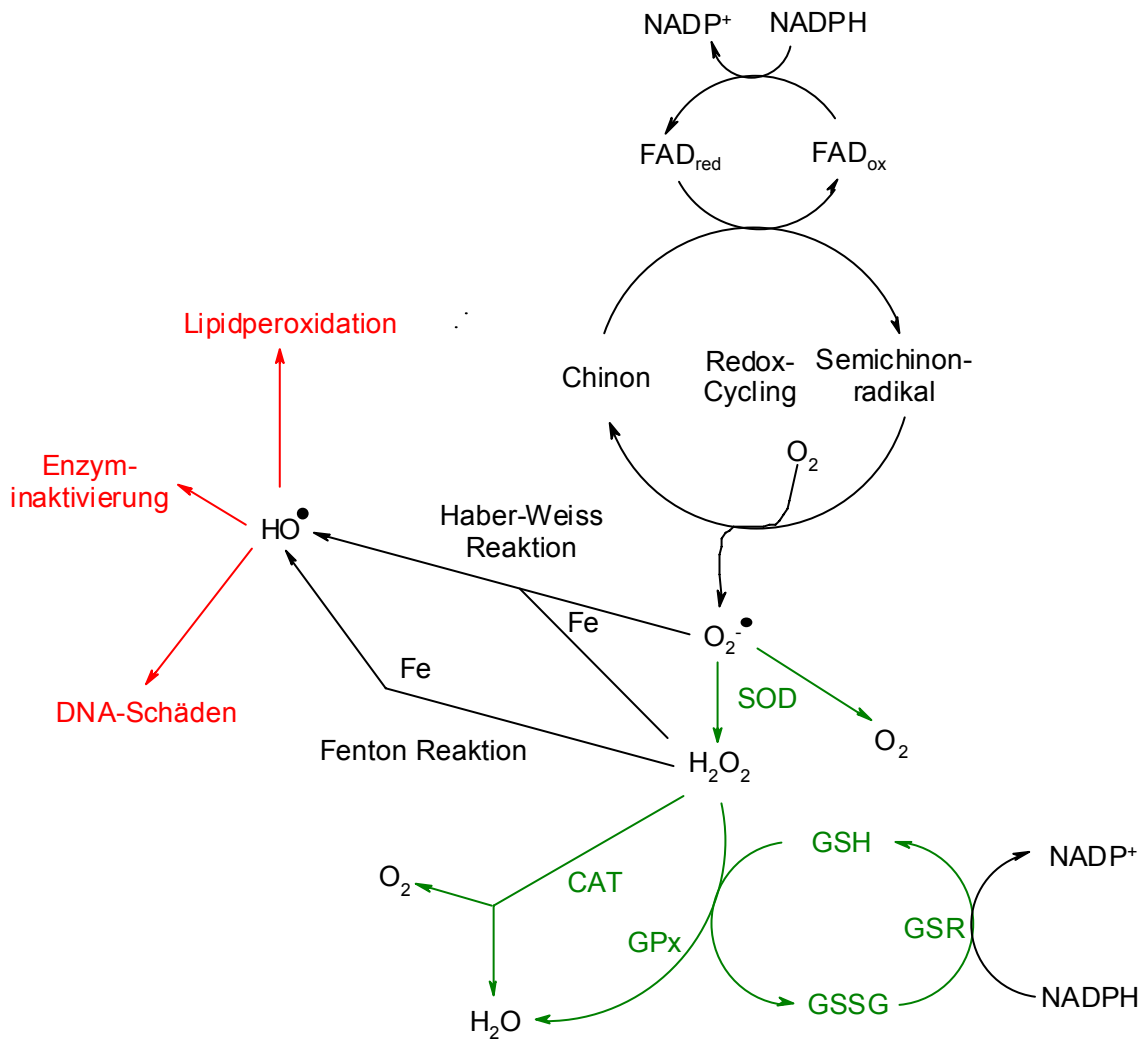
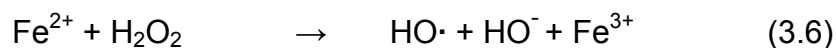
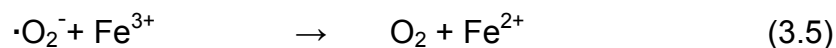


Abbildung 3.4: Beispiele für die Entstehung verschiedener ROS, Abwehrmechanismen und Schädigungen (grün: Entgiftung, rot: direkte Folgen von ROS-Reaktionen; modifiziert nach [Kelly *et al.*, 1998, Sies, 1985]; CAT: Katalase, GSH: reduziertes Glutathion, GSSG: oxidiertes Glutathion, GPx: Glutathion-Peroxidase, GSR: Glutathion-Reduktase, SOD: Superoxiddismutase, CYP: Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen

Das **Hydroxylradikal** HO^{\cdot} wirkt als reaktivste Sauerstoffspezies [Sies, 1991] mit einem Standardreduktionspotenzial von 2,31 V stark oxidierend [Halliwell und Gutteridge, 1999]. HO^{\cdot} kann in vielen biologisch relevanten Systemen entstehen, wie z.B. durch die Schwermetallionen-katalysierte Haber-Weiss-Reaktion (z.B. mit Kupfer oder Eisen, Gl. 3.7) aus $\cdot\text{O}_2^-$ und H_2O_2 . Die Eisenionen-katalysierte Teilreaktion wird auch als Fenton-Reaktion bezeichnet (Gl. 3.6) [Eisenbrand und Metzler, 2005].



Durch UV-Licht-induzierte homolytische Spaltung von H_2O_2 oder durch die Zersetzung von Wasser durch ionisierende Strahlung wird ebenfalls $\text{HO}\cdot$ gebildet [Halliwell und Gutteridge, 1999]. $\text{HO}\cdot$ bevorzugen drei Reaktionstypen, die u.a. bei der Autoxidation von Fetten eine Rolle spielen: Wasserstoffabstraktion, Addition und Elektronentransfer.

Das **Superoxidradikalanion** $\cdot\text{O}_2^-$ wird im Organismus durch einige Enzyme gebildet, die O_2 zu $\cdot\text{O}_2^-$ reduzieren (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Beispiele für Enzyme, die $\cdot\text{O}_2^-$ generieren, nach [Halliwell und Gutteridge, 1999].

Enzym	Lokalisation
Peroxidasen (nicht spezifisch)	Pflanzen, Bakterien, Tiere
Xanthin-Oxidase	Darm, ischämisches Gewebe
NO-Synthase	(überwiegend) Säugertierzellen
Tryptophan-Dioxygenase	Leber
Adehyd-Oxidase	Leber

Die Xanthin-Oxidase katalysiert die Reaktion von Hypoxanthin zu Xanthin. Dabei werden Elektronen zu geringen Anteilen auf O_2 anstatt auf NAD^+ übertragen. Hämproteine, die nach O_2 -Bindung und Elektronentransport von Fe^{2+} auf den Sauerstoff $\cdot\text{O}_2^-$ freisetzen, und Elektronentransportketten, wie in Cytochrom-P450-Enzymen oder in den Mitochondrien, gelten als wichtigste $\cdot\text{O}_2^-$ -Quellen. Hier kommt es durch „Leckage“ zur direkten Elektronenübertragung auf den Sauerstoff. Etwa 1-3% des in den Mitochondrien verbrauchten O_2 wird zu $\cdot\text{O}_2^-$ reduziert, wodurch die erhöhte oxidative Schädigung der mitochondrialen DNA erklärt wird. [Halliwell und Gutteridge, 1999, Wei, 1998] Des Weiteren wird $\cdot\text{O}_2^-$ durch Autoxidationsreaktionen einiger Moleküle wie Flavin-haltige Reduktionsäquivalente, Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin gebildet [Sies, 1991]. Xenobiotika können durch so genanntes „Redox-Cycling“ ebenfalls $\cdot\text{O}_2^-$ generieren. Hierbei nimmt ein Chinon von einer Reduktase ein Elektron auf, das dann auf O_2 übertragen wird. Dieser Prozess ist für die Toxizität vieler Stoffe mitverantwortlich (Kapitel 3.6.2). [Eisenbrand und Metzler, 2005]

Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$ zeichnet sich dadurch aus, dass die beiden entarteten π^* -Molekülorbitale Elektronen mit entgegengesetztem Spin aufweisen. Dabei existieren zwei Formen, die sich in ihrer Elektronenkonfiguration und Reaktivität unterscheiden.

Bei dem Zustand $^1\Delta gO_2$ handelt es sich zwar nicht um ein Radikal, da keine ungepaarten Elektronen vorliegen, er ist aber dennoch deutlich reaktiver als der Grundzustand. $^1\Sigma g^+O_2$ ist wie der Grundzustand ein Diradikal (mit entgegen gesetztem Elektronenspin) und noch reaktiver als $^1\Delta gO_2$. Singulett-Sauerstoff 1O_2 entsteht durch Lichtanregung und ist hinsichtlich Reaktionen mit Molekülen im Singulettzustand (z.B. Fettsäuren) wesentlich reaktiver als der Grundzustand 3O_2 . 1O_2 reagiert mit ungesättigten Fettsäuren in einer Art „Cyclo-Addition“. [Belitz *et al.*, 2001]

Wasserstoffperoxid H_2O_2 wird durch Enzym-abhängige Prozesse gebildet. Guanylcyclase, Glukose-Oxidase, Monoamin-Oxidase oder Superoxiddismutase (SOD, s. Kap. 3.3.4.1) generieren H_2O_2 , das nur noch schwach reaktiv ist [Halliwell und Gutteridge, 1999, Kelly *et al.*, 1998, Sies, 1991]. Es kann direkt keine DNA und Lipide oxidieren. Bei manchen Proteinen lassen sich durch H_2O_2 Thiol-Gruppen oxidieren, die dadurch auch inaktiviert werden können. Die wesentliche Toxizität von H_2O_2 beruht auf der Bildung von hochreaktiven $HO\cdot$, die durch Metallionen-katalysierte Reaktion wie der Fenton-Reaktion entstehen.

Die Reaktivität der verschiedenen ROS spiegelt sich in der Halbwertszeit wider (Tabelle 3.2): das hochreaktive $HO\cdot$ besitzt die kürzeste Halbwertszeit, wohingegen aus H_2O_2 stabile Lösungen herstellbar sind.

Tabelle 3.2: Geschätzte Halbwertszeiten einiger ROS, nach [Sies, 1991]

	Halbwertszeit
Hydroxylradikal ($HO\cdot$)	10^{-9} s
Alkyl-Radikal ($R\cdot$)	10^{-8} s
Singulett-Sauerstoff (1O_2)	10^{-6} s
Alkoxy-Radikal ($RO\cdot$)	10^{-6} s
Peroxy-Radikal ($ROO\cdot$)	7 s
Semichinonradikal ($Q\cdot$)	Tage
Superoxidanionradikal ($\cdot O_2^-$)	spontane und enzymatische Dismutation
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	stabil, enzymatischer Abbau

ROS sind nicht immer nur schädigende Nebenprodukte einer Enzymreaktion, sondern werden z.B. aktiv von Leukozyten gebildet, um Mikroorganismen zu bekämpfen [Delves und Roitt, 2000]. Des Weiteren werden ROS bei der Synthese der Entzündungsmediatoren Prostaglandine, Leukotriene und Thromboxane aus Arachidonsäure benötigt [Halliwell und Gutteridge, 1999].

3.3. Oxidativer Stress und seine Folgen

3.3.1 Lipidperoxidation (LPO)

Die wichtige Rolle der Lipide in zellulären Komponenten unterstreicht die Bedeutung ihrer möglichen Schädigung durch eine Oxidation in biologischen Systemen. Diese Oxidationsreaktionen, auch LPO-Kettenreaktion genannt, wird in drei Phasen eingeteilt: Initiation, Propagation, Termination und ist schematisch in Abbildung 3.5 dargestellt.

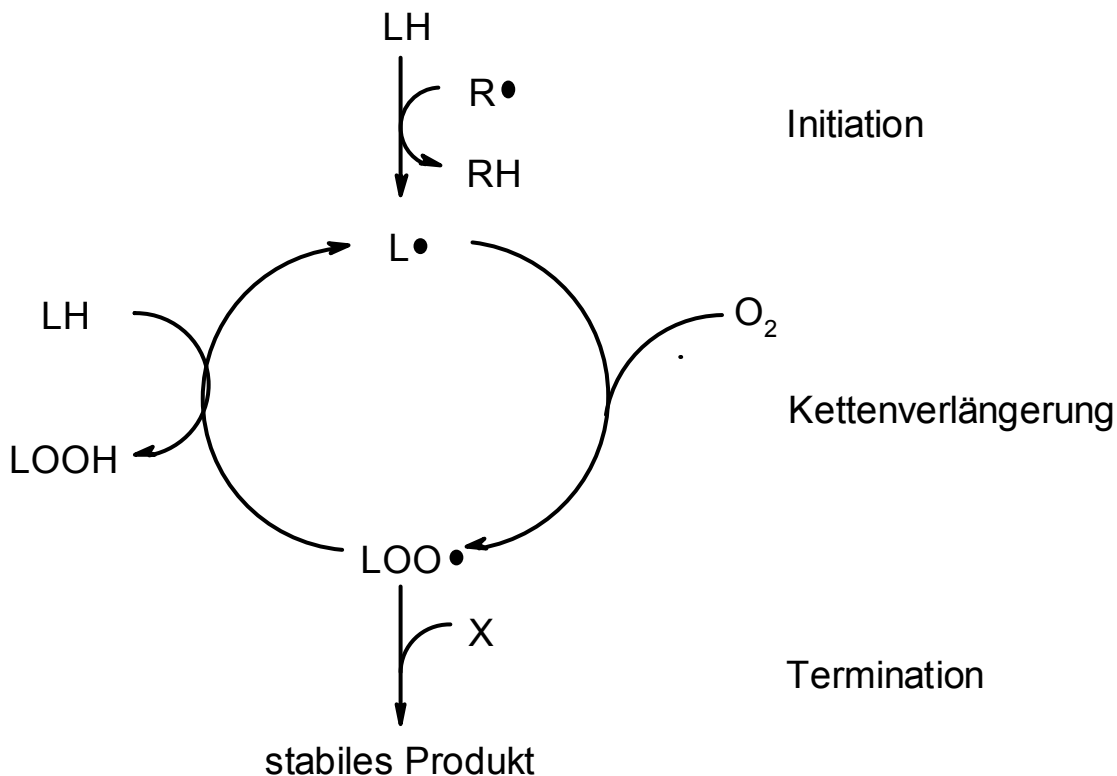


Abbildung 3.5: Überblick über die LPO, nach [Kelly *et al.*, 1998]; LH: Fettsäure; $R\cdot$: reaktive Spezies; X: Molekül, mit dem $LOO\cdot$ abreagiert.

Die Kettenreaktion wird gestartet durch reaktive Spezies, die ein Wasserstoffatom von einer Methylengruppe abstrahieren können (Initiation). $HO\cdot$ starten Kettenreaktionen mit allen Fettsäuren, wohingegen $\cdot O_2^-$ nur mit einigen, besonders aktivierten Fettsäuren reagiert [Halliwell und Gutteridge, 1999]. Daraus entstehen Alkyl- und Peroxyl-Radikale, die dann mit weiteren Fettsäuren reagieren. Die Radikalkettenreaktion verzweigt durch Zerfall von Peroxiden, woraus dann je zwei Radikale entstehen (Propagation). Ein Kettenabbruch geschieht durch Reaktion der Radikale mit Molekülen, die stabile Produkte bilden (Termination). [Belitz *et al.*, 2001, Kelly *et al.*, 1998]

Ideale Substrate für die LPO sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit bis-allylischen Methylen-Gruppen. An diesen Positionen besitzen die Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungen niedrige Dissoziationsenergien, so dass Wasserstoffabstraktionen durch Radikalreaktionen leicht möglich sind. [Kelly *et al.*, 1998]

Durch die Lipidperoxidation und die damit verbundene Fragmentierung entstehen verschiedenste gesättigte und ungesättigte Moleküle, z.B. Alkane, Aldehyde, Ketone und Furane [Belitz *et al.*, 2001]. Neben Eigenschaften als Aromakomponenten können diese reaktiven Moleküle auch zytotoxische, genotoxische und mutagene Wirkungen besitzen [Marnett, 1999].

Als Beispiel für ein LPO-Produkt soll die Entstehung von Malondialdehyd (MDA) erläutert werden:

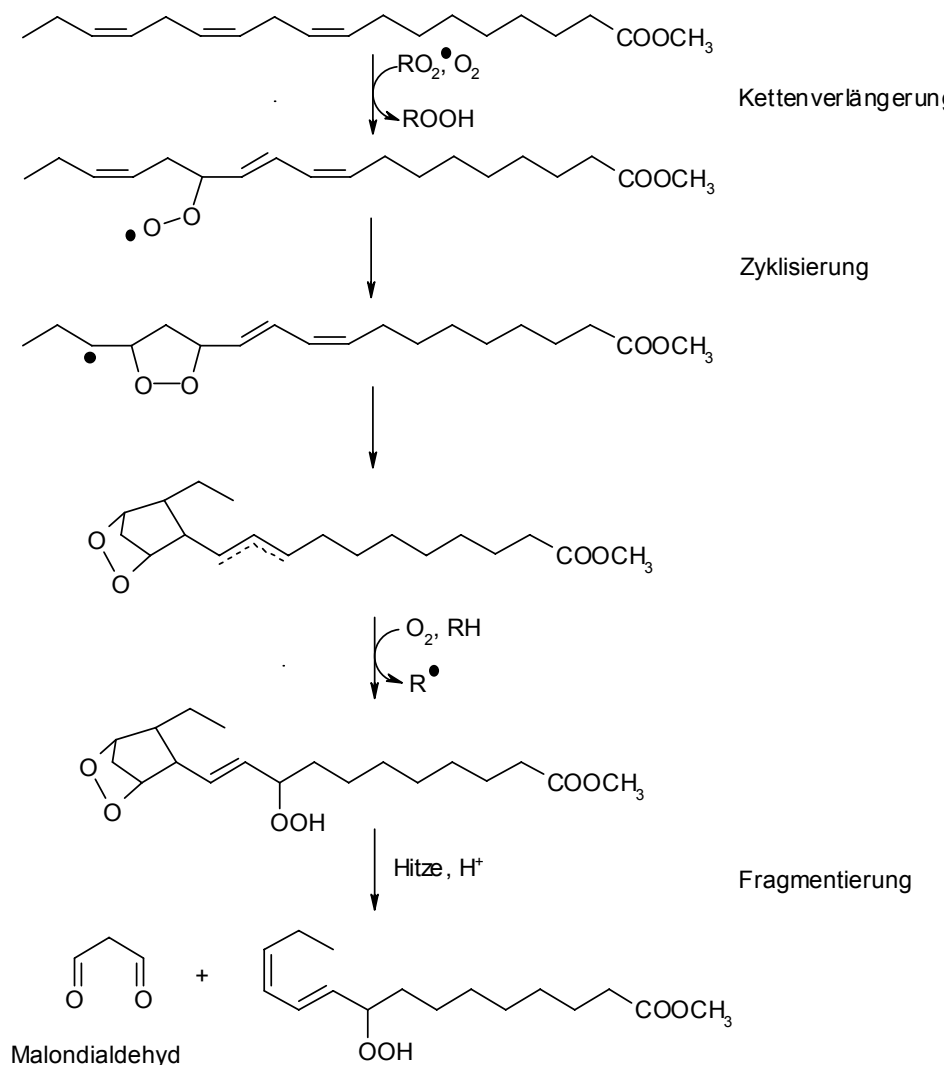


Abbildung 3.6: Entstehung von Malondialdehyd (MDA) aus α -Linolensäure, nach [Belitz *et al.*, 2001]

MDA entsteht aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch Reaktion mit einem Peroxyl-Radikal, Sauerstoff, nachfolgender Zyklisierung und Fragmentierung (Abbildung

3.6). Dies geschieht durch oxidativen Stress in Lipidmembranen und/oder bei der Enzym-katalysierten Umsetzung von Eicosanoiden [Esterbauer *et al.*, 1991, Janero, 1990]. Des Weiteren wird MDA auch durch die Myeloperoxidase (in aktivierten Makrophagen bei Entzündungen) gebildet [Marnett, 1999]. MDA und andere Aldehyde werden häufig als Marker für LPO herangezogen, indem sie nach Reaktion mit Thiobarbitursäure als Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) photometrisch oder fluorimetrisch bestimmt werden. Ein spezifischer Nachweis von MDA gelingt durch chromatographische Trennung der TBARS per HPLC (siehe auch Kapitel 3.6.6) [Janero, 1990].

MDA besitzt zwei Aldehyd-Gruppen oder als Enolat eine α,β -ungesättigte Carbonylstruktur und ist deshalb hochreaktiv und bindet an viele Zellbestandteile (DNA und Proteine) [Esterbauer *et al.*, 1991].

3.3.2 DNA-Schädigung

Viele Publikationen beschreiben den Zusammenhang zwischen ROS und der Krebsentstehung. Der Fokus liegt nicht nur auf einer direkten DNA-Schädigung, sondern auch bei einer Beeinflussung der Zellproliferation, Signaltransduktion, Zelltod und der interzellulären Kommunikation [Halliwell und Gutteridge, 1999, Klaunig *et al.*, 1998, Loft und Poulsen, 1996, Valko *et al.*, 2006].

Von den ROS ist $\text{HO}\cdot$ für die meisten Schäden verantwortlich, wohingegen Peroxyl-Radikale und H_2O_2 nicht direkt mit der DNA reagieren. Der Angriff von $\text{HO}\cdot$ an den Basen führt zu drei verschiedenen Schäden: Hydroxylierungen, Ringöffnungen und Fragmentierungen. Daraus entsteht eine Vielzahl von Sekundärprodukten. Außerdem wird auch direkt das Zucker-Phosphat-Rückgrat geschädigt, was zu DNA-Strangbrüchen führt (Abbildung 3.7). [Kelly *et al.*, 1998]

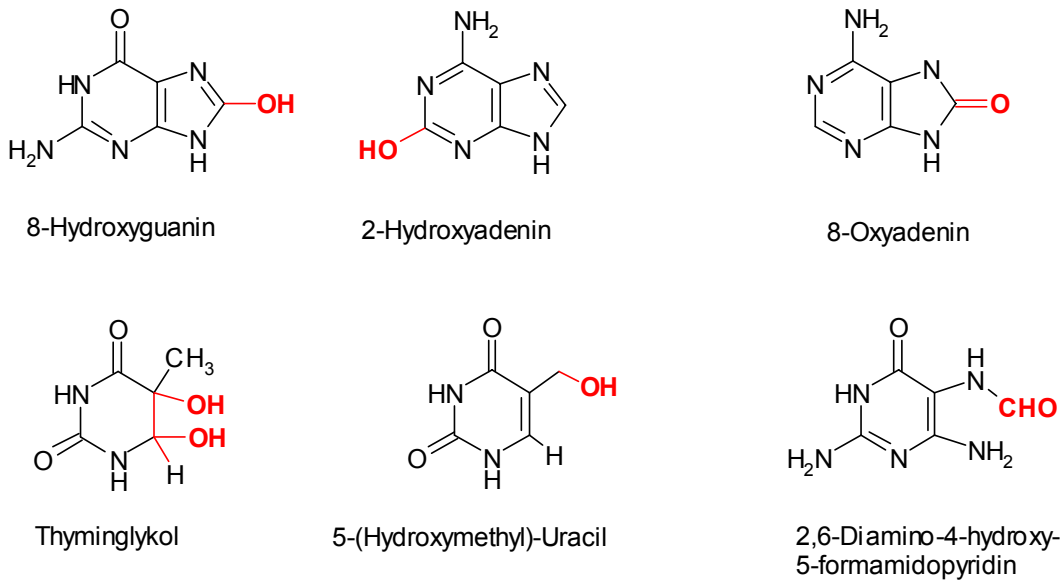


Abbildung 3.7: Beispiele für oxidierte Pyrimidine und Purine, nach [Meneghini, 1997].

Ein Angriff des HO• kann eine Vielzahl von Produkten zur Folge haben, z.B. Oxidation des Guanin in 4, 5 oder 8-Position (8-Oxo-desoxyguanin oder 8-Hydroxy-desoxyguanin, 8-OH-dG) des Purinrings, die zu ringgeöffneten Produkten wie 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FaPy) weiterreagieren (Abbildung 3.8). Ein Angriff an Pyrimidinen kann zudem zu Basendimeren führen. [Halliwell und Gutteridge, 1999, Jaruga und Dizdaroglu, 1996, Kelly *et al.*, 1998]

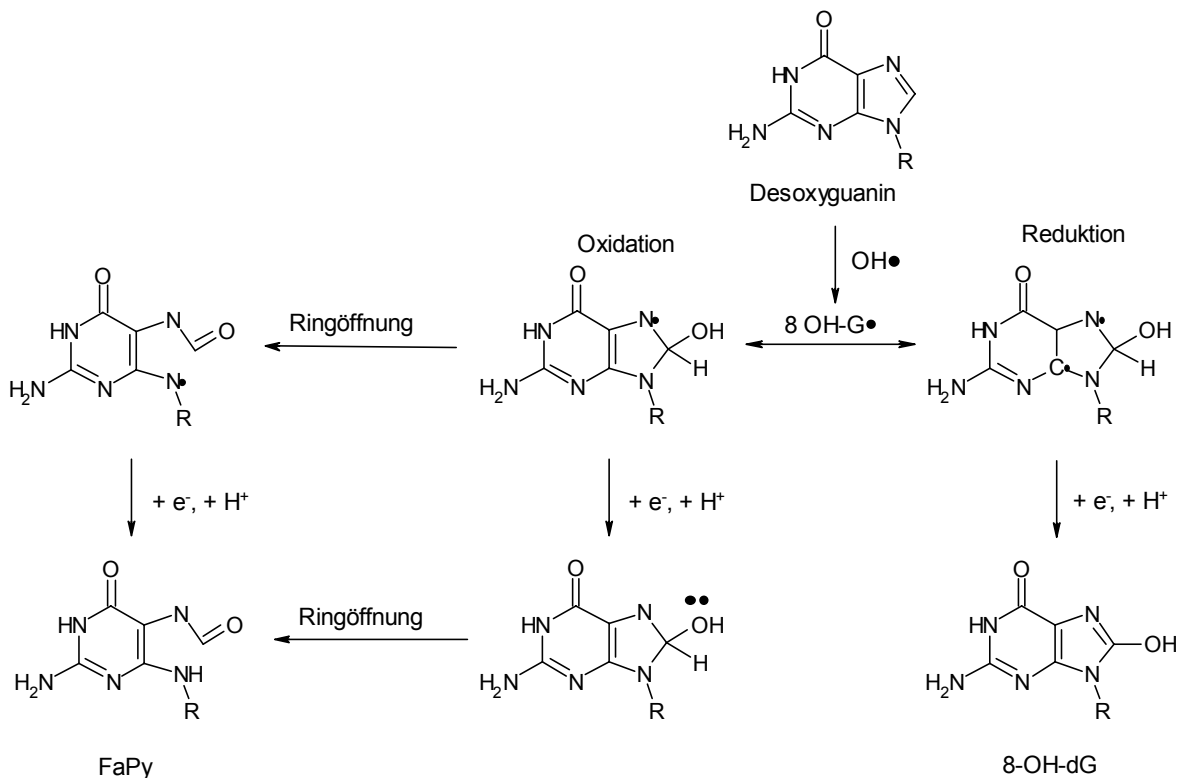


Abbildung 3.8: Modifikationen von Desoxyguanin durch •OH-Radikale, nach [Halliwell und Gutteridge, 1999]

Auch die während der LPO entstehenden Produkte, z.B. MDA können mit der DNA reagieren: MDA reagiert mit den DNA-Basen dC, dA und dG u.a. unter Adduktbildung zu M₁dC, M₁dA und M₁dG (Abbildung 3.9) [Benamira *et al.*, 1995].

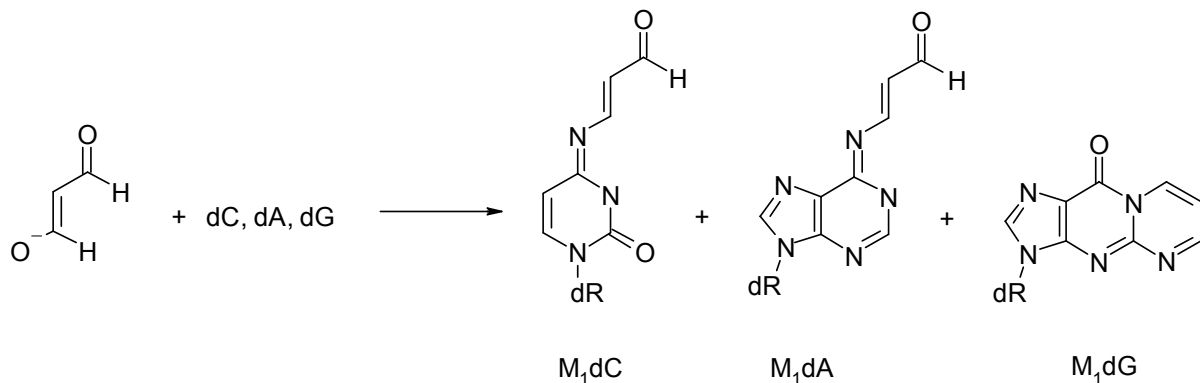


Abbildung 3.9: Strukturen von MDA-DNA-Addukten, nach [Benamira *et al.*, 1995], dR: Desoxyribose

Ein anderer, LPO-unabhängiger Weg führt ebenfalls zu M₁dG und anderen MDA-Addukten. Er verläuft über einen Radikalangriff am DNA-Zuckerrückgrates in C-4'-Position. Aus dem entstehenden „Basen-Propenal“ kann MDA auf dG übertragen werden. M₁dG ist als prämutagene Läsion anzusehen. [Benamira *et al.*, 1995, Dedon *et al.*, 1998, Marnett, 1999].

Nicht erkannte DNA-Schäden können bei der Zellteilung auf die DNA der Tochterzelle übertragen werden, die sich in Mutationen manifestieren können und letztlich zu Störungen der Zellfunktionen und zu Krebs führen [Hoeijmakers, 2001].

3.3.3 oxidative Proteinmodifikation

Proteine können ebenfalls durch Reaktionen mit ROS oder LPO-Folgeprodukten geschädigt werden. Aminosäuren-Seitenketten, v.a. Glutaminsäure, Asparaginsäure oder Prolin können oxidiert werden und zu einer Spaltung der Peptidbindung führen. Oxidation des Proteinrückgrates durch H-Abstraktion vom α -C-Atoms hat die Spaltung der Peptidbindungen sowie intra- und intermolekulare Quervernetzungen zur Folge, z.B. Tyrosindimere. Enzyme verlieren ihre Aktivität, wenn sie in der Nähe des katalytischen Zentrums verändert werden; Veränderungen von Rezeptoren und Transportproteinen beeinflussen den gesamten Zellstoffwechsel [Halliwell und Gutteridge, 1999]. Als Marker der Proteinoxidation wird häufig die Erfassung der Proteincarbonyle durch Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin herangezogen. Die Detektion erfolgt photometrisch [Levine *et al.*, 1994], über ELISA [Buss *et al.*, 1997] oder semiquantita-

tiv über Immunoblot ([Nakamura und Goto, 1996]. Weitere Proteinmodifikationen. z.B. Dityrosin lassen sich mittels LC/MS oder UV/Vis nachweisen [Malencik *et al.*, 1996]

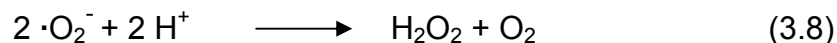
3.3.4 Antioxidative Abwehrmechanismen

3.3.4.1 Primäre endogene Abwehr

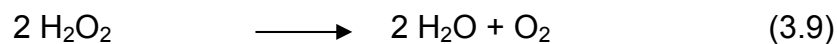
Da ROS sehr reaktive Moleküle sind, brauchen aerobe Organismen effiziente Schutzmechanismen.

Enzymatischer Abbau von ROS durch sog. „antioxidative Enzyme“

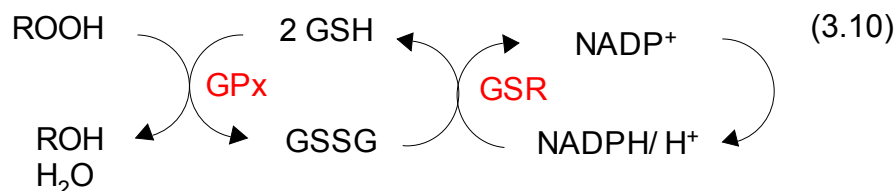
In Eukaryonten sind drei Isoformen der so genannten **Superoxiddismutase** (SOD) bekannt: Mangan-SOD, Kupfer/Zink-SOD und extrazelluläre SOD [Kelly *et al.*, 1998]. Alle drei Formen besitzen die Fähigkeit, $\cdot\text{O}_2^-$ zu H_2O_2 und O_2 zu dismutieren (Gl 3.8).



Die **Katalase** (CAT) kann das von der SOD gebildete H_2O_2 schnell und effektiv zu Wasser und O_2 umsetzen (Gl. 3.9). Sie enthalten entweder Mangan oder eine Häm-Gruppe im katalytischen Zentrum und kommen hauptsächlich in den Peroxisomen vor [Halliwell und Gutteridge, 1999].



Glutathion-Peroxidasen (GPx) reduzieren organische Peroxide (ROOH) und H_2O_2 . Die Reduktionsäquivalente werden von dem nicht-enzymatischen Antioxidans Glutathion (GSH) bereitgestellt. Die Regenerierung des GSSG wird durch die Glutathion-Reduktase (GSR) mit dem Cofaktor NADPH gewährleistet. (Gl. 3.10) [Kelly *et al.*, 1998].



Das ubiquitär verbreitete Tripeptid **Glutathion** (L- γ -Glutamyl-L-cysteinylglycin) wird in der Leber durch enzymatische Verknüpfung von L-Glutaminsäure mit L-Cystein und

darauf folgender Kondensation mit Glycin synthetisiert und trägt als reaktive Gruppe eine Thiolgruppe (Abbildung 3.10) [Meister und Anderson, 1983].

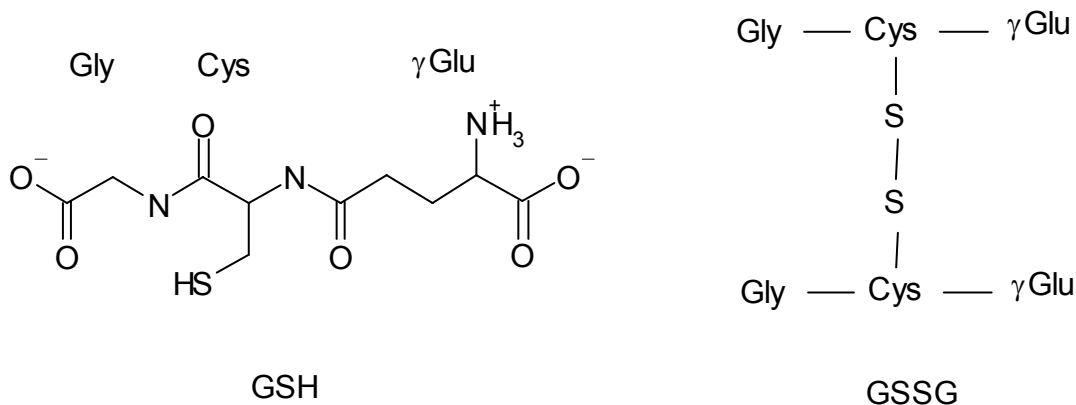


Abbildung 3.10: Struktur von reduziertem Glutathion (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG), nach [Halliwell und Gutteridge, 1999]

Einige Enzyme des Syntheseweges sind über das „antioxidative response element“ (ARE) reguliert (Kapitel 3.3.4.3). Die Thiolgruppe reduziert zahlreiche ROS ($^1\text{O}_2$, $\text{HO}\cdot$, $\cdot\text{O}_2^-$) und wird dabei zu GSSG oxidiert. Glutathion kann in den Zellen in reduzierter (GSH) oder in oxidiertem (GSSG) Form vorliegen, wobei der Anteil des GSH etwa 90% des Gesamtglutathions (tGSH) ausmacht (GSH-Status). Eine Senkung des GSH-Status oder eine GSH-Depletion kann durch starken oxidativen Stress verursacht werden oder diesen zur Folge haben, da durch die Depletion die antioxidative Kapazität der Zelle gesenkt wird [Kelly *et al.*, 1998]. Es wurde gezeigt, dass eine GSH-Depletion durch Behandlung von Zellen u.a. mit Alkenalen mit einer höheren Sensitivität gegenüber Oxidanzien (Endpunkt: oxidative DNA-Schäden) einher gehen [Glaab *et al.*, 2001, Janzowski *et al.*, 2003].

Die Oxidation von GSH zu GSSG ist reversibel und stellt so ein Puffersystem für den Redoxzustand der Zelle dar. Eine bedeutende Rolle spielt GSH auch bei der Entgiftung elektrophiler Fremdstoffe. Neben der Bildung wasserlöslicher Metabolite werden elektrophile Substanzen gebunden. Die meisten Elektrophile reagieren bereits nicht-enzymatisch mit GSH, die Reaktion wird jedoch durch Glutathion-S-Transferasen beschleunigt. [Eisenbrand und Metzler, 2005] Neben der Aktivität der GSR spielt auch die Synthese von GSH eine große Rolle (siehe Kapitel 3.3.4.3).

Proteine, die die Aktivität von Oxidanzien minimieren

Das Glykoprotein Transferrin bindet freie Eisenionen im Blutplasma (Konzentration: 1,2-3,7 g/L), die in dieser Form nicht mehr redoxaktiv sind. und im Ferritin gespeichert, das mit seinem Umbauprodukt Hämosiderin etwa 20% des gesamten Eisen-

pools ausmacht [Eisenbrand und Schreier, 2005]. Kupferionen binden an das Plasmaprotein Albumin und an das spezifische Transport- und Speicherprotein Caeruloplasmin und werden so inaktiviert [Halliwell und Gutteridge, 1999].

Proteine, die Biomoleküle durch andere Mechanismen vor Schäden schützen

Einige Hitzeschockproteine wie die Chaperone schirmen neu gebildete Proteine vor ihrer Umgebung ab, so dass sie sich richtig falten können [Stryer, 1996]. Auch die DNA im Zellkern wird durch Proteine (z.B. Histone) geschützt [Berg *et al.*, 2003].

Niedermolekulare Substanzen, die ROS abfangen können

Die Eigenschaft dieser Substanzen beruht i.A. auf der Bildung von Resonanzstabilisierten Radikalen, die nicht zu Wasserstoffabstraktionen oder Elektronentransfers fähig sind. Diese Stoffe werden unterteilt in exogene, über die Nahrung aufgenommene Stoffe (Kapitel 3.4) und endogene, also vom Körper selbst produzierte Antioxidanzien.

Bilirubin ist das Endprodukt des Hämabbaus und ist intensiv gelb gefärbt. Es liegt im Plasma hauptsächlich Albumin-gebunden in Konzentrationen von 3-21 $\mu\text{mol/L}$ vor. *In vitro* wurde gezeigt, dass Bilirubin Peroxyl-Radikale und $^1\text{O}_2$ abfangen kann. Die Bedeutung *in vivo* ist allerdings noch unklar. [Berg *et al.*, 2003, Halliwell und Gutteridge, 1999]

Aus Hypoxanthin werden durch die Xanthin-Oxidase **Harnsäure** und Xanthin (Purinabbau) gebildet. In vielen Spezies, nicht aber im Mensch und anderen Primaten, wird Harnsäure über Allantoin zu Harnstoff und Glyoxylat abgebaut. Im Menschen liegt Harnsäure normalerweise in Plasmakonzentrationen von 120-360 μM vor. Sie bildet nach Abfangen von Radikalen oder Oxidation durch ROS ein Resonanzstabilisiertes Harnstoffradikalanion, das nicht mehr zu einer Wasserstoffabstraktion fähig ist. Durch Zwei-Elektronen-Übertragung kann Harnsäure weiter oxidiert werden. [Becker, 1993, Berg *et al.*, 2003].

3.3.4.2 Sekundäre endogene Abwehr

Neben der direkten Unschädlichmachung von reaktiven Sauerstoffspezies durch antioxidative Enzyme und Moleküle (Kapitel 3.3.4), hat der Organismus auch Strategien zur Reparatur gesetzter Schäden an Makromolekülen (DNA, Proteine) entwickelt [Chiou und Tzeng, 2000, Pacifici und Davies, 1991].

DNA-Reparatur

DNA-Reparatursysteme erkennen modifizierte und fehlgepaarte DNA-Basen. Solche Modifikationen sind vor allem oxidierte Basen [Christmann *et al.*, 2003]. Durch Erkennen und Herausschneiden der geschädigten Base durch die DNA-Glykosylase entstehen sog. apurine/apyrimidine (AP-) Stellen und die Reparaturkaskade der Basenaus-schneidereparatur („Base Excision Repair“, BER), das bedeutendste Reparatursystem bei oxidativer DNA-Schädigung, wird in Gang gesetzt (Abbildung 3.11).

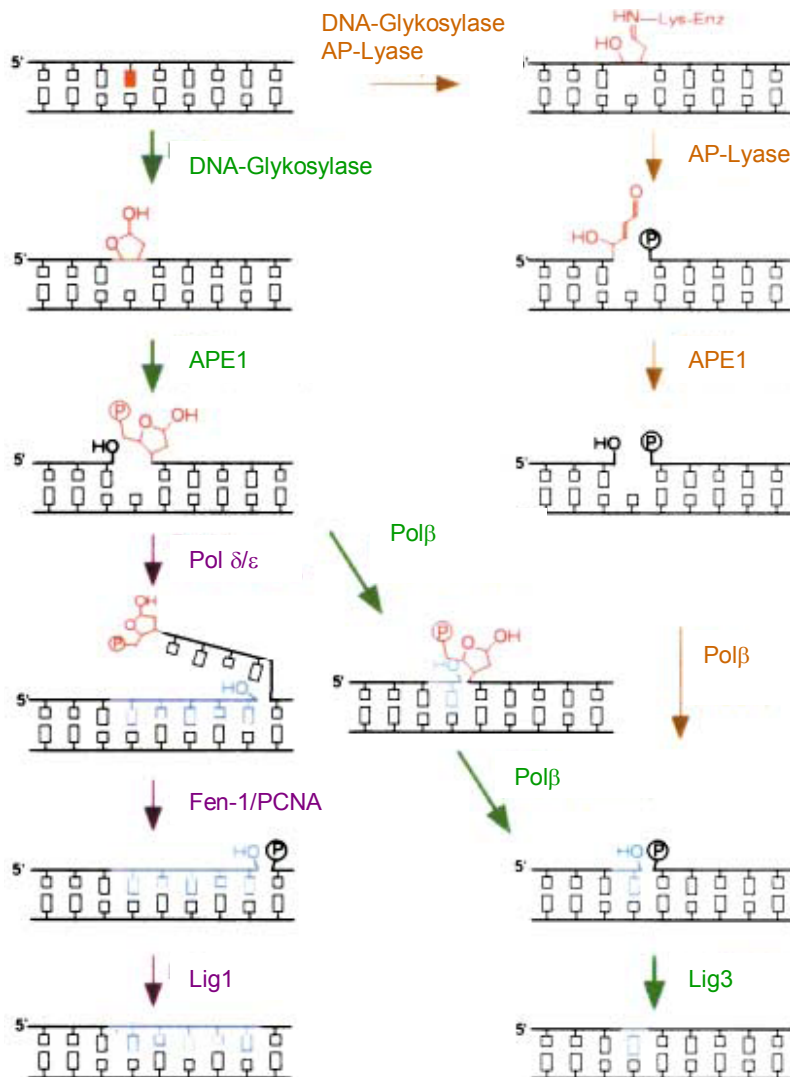


Abbildung 3.11: schematische Darstellung der BER, nach [Scharer, 2003]; grün: „short patch“-Pfad, violett „long patch“-Pfad; Abkürzungen im Text.

AP-Endonuklease-1 (APE1) hydrolysiert die Phosphatbindung an der 5'-Seite der abasischen Stellen. Polymerase β (Polβ) fügt ein Nucleotid abfolgend zur abasischen Stelle ein und entfernt danach die abasische Stelle aufgrund seiner AP-Lyase-Aktivität. DNA-Ligase III (Lig3) schließt den Nick und stellt so die ursprüngliche DNA-Sequenz wieder her. Falls BER durch difunktionale DNA-Glykosylasen/ AP-Lyasen

initiiert wird, kann der Prozess auch auf dem mit braunen Pfeilen markierten Pfad verlaufen. Nach der Entfernung der Base hydrolysiert die AP-Lyase die 3'-Bindung zur abasischen Stelle. APE1, Pol β und Lig3 schließen danach die Reparatur ab, wobei die AP-Lyaseaktivität von Pol β nicht benötigt wird („short patch“ Reparatur). Im „Long-Patch“-Pfad (violett) fügen Pol δ/ϵ und assoziierte Faktoren zwei bis sechs Nukleotide abfolgend zur abasischen Stelle ein. Der resultierende Überhang wird durch die Fen-1-Endonuklease abgeschnitten und der Nick durch DNA-Ligase I geschlossen.

Die Nukleotidausschneidereparatur („Nucleotid Excision Repair“, NER) funktioniert ähnlich, ist aber aufwändiger, da das herausgeschnittene Stück etwa 30 DNA-Basen lang ist [Hoeijmakers, 2001].

Das Reparatursystem wird unterstützt durch einen p53-vermittelten (vorübergehenden) Zellzyklusarrest. Dadurch werden die Zellteilung und die Weitergabe der DNA-Schäden an Tochterzellen verzögert und der Schaden kann repariert werden. Ist der Schaden zu schwerwiegend, geht die Zelle in den programmierten Zelltod (Apoptose) [Hoeijmakers, 2001].

Reparatur von Proteinen

Oxidierete Proteine können ebenfalls repariert werden. Oxidationsempfindliche Aminosäuren sind v.a. Cystein und Methionin [West und Marnett, 2006]. Cystein-Disulfide werden durch Disulfidreduktasen (z.B. Thioredoxin-System), Methionin-Sulfoxid durch MetSOx-Reduktasen regeneriert [Halliwell und Gutteridge, 1999]. Der Abbau von Proteinen erfolgt über proteinspezifische Proteasen, lysosomale Proteasen sowie durch den zytoplasmatischen Proteasomkomplex, zu dem das 20S-Core Proteasom gehört. Dieser erkennt oxidierte Aminosäuren und kann das oxidierte Protein ATP- und Ubiquitin-unabhängig abbauen [Wolf und Hilt, 2004].

3.3.4.3 Das Antioxidative Response Element (ARE)

Neben der Beseitigung von ROS und Reparatur von bereits geschädigten Makromolekülen spielt auch die Regulation von detoxifizierenden Enzymen z.B. durch das sog. „Antioxidative response element“ (ARE) in der Chemoprävention eine große Rolle. Zu den ARE-regulierten Proteinen gehören Enzyme des Glutathionsyntheseweges (z.B. γ -Glutamylcystein-Synthetase als Schlüsselenzym), Redoxproteine mit aktiven Sulfhydrylgruppen (z.B. Thioredoxin) und Fremdstoff-metabolisierende Enzyme (Glutathion-S-transferasen, UDP-Glucuronyltransferasen, NAD(P)H-Chinon-

Oxidoreduktase (NQO1) und Hämoxygenase-1). Sie haben die Funktion der Detoxifizierung und/oder besitzen antioxidative Funktionen, wodurch sie die Zelle vor genotoxischer Schädigung schützen [Lee und Surh, 2005, Nguyen *et al.*, 2003]. Auch Gene zur Expression von DNA-Reparaturenzymen werden als Mitglieder der ARE-Familie diskutiert [Li *et al.*, 2002].

Das ARE kann durch eine Reihe strukturell unterschiedlicher Substanzen aktiviert werden. Dazu gehören planare Flavonoide und phenolische Antioxidanzien, Chinone, Mercaptane, thiolhaltige Strukturen wie Isothiocyanate, Schwermetalle, Hämkomplexe u.a.. Die meisten aktivierenden Substanzen zeigen elektrophile und sulfhydrylbindende Eigenschaften [Lee und Surh, 2005, Nguyen *et al.*, 2003]. Substanzen, die nur das ARE aktivieren, werden als „monofunktionelle Induktoren“ bezeichnet, z.B. Quercetin und Propylgallat. „Bifunktionelle“ Induktoren induzieren Phase-I-Enzyme über den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) und nach ihrer Metabolisierung Phase-II-Enzyme über das ARE, z.B. Benzylisothiocyanat, Cumarin, Ethoxyquin und Oltipraz [Nguyen *et al.*, 2003]. Dual wirkende Induktoren hemmen Phase-I-Enzyme, induzieren jedoch Phase-II-Enzyme. Zu diesen gehören z.B. 4-Methoxyphenol und *tert*-Butylhydroxyanisol [Henderson *et al.*, 2000, Lee und Surh, 2005].

Der „nuclear transcription factor erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2“ (Nrf2) ist ein bedeutender Transkriptionsfaktor, der in der ARE-vermittelten Zellantwort auf oxidativen Stress und Fremdstoffe eine Rolle spielt. Bekannte Nrf2-Aktivatoren sind z.B. Oltipraz, Sulforaphan und Curcumin [Lee und Surh, 2005]. In der inaktiven Form liegt Nrf2 an KEAP1 gebunden im Zytoplasma vor. Nach Dissoziation des Komplexes durch Wechselwirkung der Aktivatoren mit den Cysteinresten oder nach Phosphorylierung des Komplexes kann Nrf2 in den Kern gelangen und an das ARE binden.

3.4 Flavonoide und (Poly-)Phenole

Ein hoher Verzehr an Obst und Gemüse ist invers mit dem Risiko an Krebs zu erkranken korreliert. Epidemiologische Zusammenhänge zwischen Ernährung und der Entwicklung von Krebs werden zuweilen kontrovers diskutiert, ebenso komplex ist die Bewertung der krebspräventiven Nahrungskomponenten. [Abrahamse *et al.*, 1999] Dies liegt u.a. darin begründet, dass Lebensmittel, die häufig in humanen Interventionsstudien eingesetzt werden, wie z.B. Mehrfruchtsäfte, Obst und Gemüse, eine Vielzahl von Inhaltsstoffen besitzen. Diese wiederum, selbst oder in Wechselwirkungen mit anderen Substanzen, können vielzählige Wirkungen entfalten. Dadurch ist ein Rückschluss auf die Wirksamkeit einer bestimmten Substanzklasse nur bedingt möglich [Thompson *et al.*, 1999]. Untersuchungen zu Wirkungen von Einzelsubstanzen zeigen dagegen zum Teil in hohen Dosierungen, wie sie durch Supplementierung von Nahrungsergänzungsmitteln erreicht werden können, adverse Effekte. [Ford *et al.*, 2005]

Die Strukturen von sekundären Pflanzenstoffen bilden eine heterogene Gruppe von phenolischen Verbindungen, die aus Phenylalanin über den Shikimat- und Phenylpropionid-Weg in Pflanzen synthetisiert werden [Golding *et al.*, 2001]. Im Folgenden sollen Apfelsaft-relevante Verbindungen zunächst allgemein beschrieben werden. Danach werden sie bezüglich möglicher biologischer Wirksamkeit diskutiert.

3.4.1 Struktur, Vorkommen und Aufnahmemengen

3.4.1.1 Flavonoide

Flavonoide sind Diphenylpyrane: zwei Benzolringe (A & B) sind an einen heterozyklischen Pyran- oder Pyronring gebunden. Die Struktur bietet eine Vielzahl von möglichen Substitutionsmöglichkeiten, so dass über 4.000 verschiedene Flavonoide beschrieben sind [Cao *et al.*, 1997]. Neben Hydroxylierungen sind auch Methylierungen und Sulfatierungen möglich. Flavonoide lassen sich in Flavonole, Flavanole (Katechine), Flavone, Flavanone, Anthocyanidine und Isoflavonoide einteilen [Hollman, 1997]. Flavonole und Flavanole unterscheiden sich in der Doppelbindung zwischen C2 und C3 und in der Ketogruppe in C4-Position im C-Ring (Abbildung 3.12).

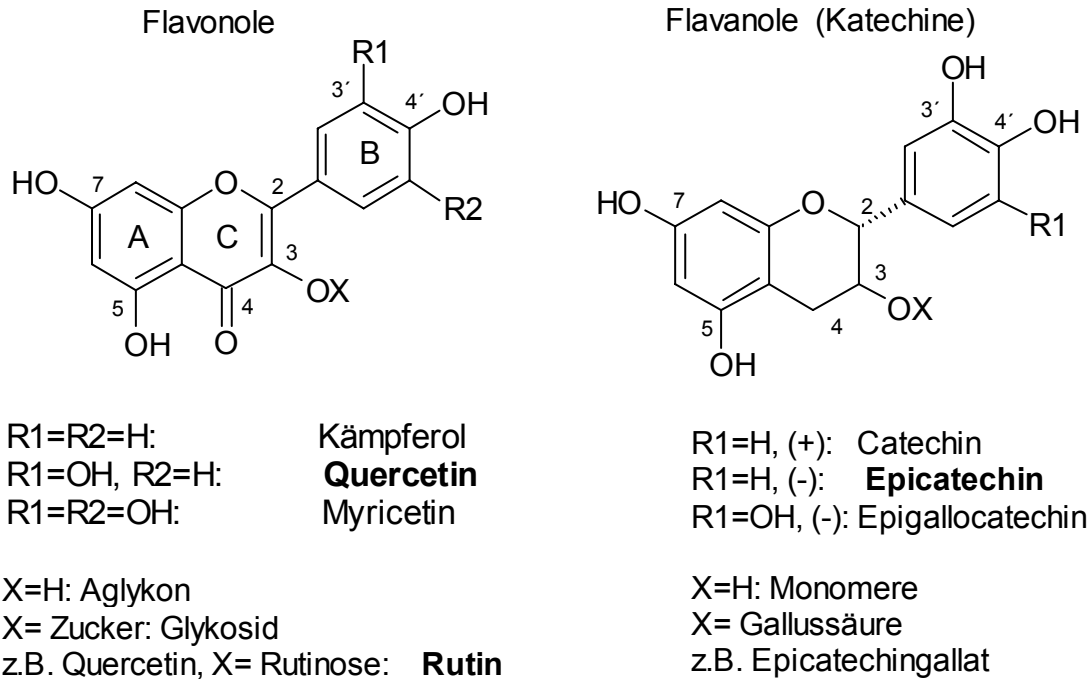


Abbildung 3.12: Strukturbeispiele für Flavonole und Flavanole, nach [Rice-Evans *et al.*, 1996]

Je nach Ernährungsgewohnheiten verschiedener Bevölkerungsgruppen schwankt die Aufnahmemenge beträchtlich. Für Flavonole sind Mengen bis zu 68 mg/d beschrieben [Radtke *et al.*, 2002].

Quercetinderivate

In der Natur kommen Quercetinderivate meistens als Glykoside vor: Das Aglykon Quercetin ist mit einem Zucker (Mono- oder Oligosaccharid) v.a. an den Positionen 3,7,3'- oder 4'-O- β -glykosidisch gebunden [Merken *et al.*, 2001]. Quercetinderivate sind die am häufigsten vorkommenden Flavonoide und hauptsächlich in Zwiebeln, Äpfeln, Tee, Kohl, Brokkoli, Beeren und Kirschen zu finden [Graefe *et al.*, 1999, Hollman, 1997]. Im Durchschnitt beträgt die Aufnahme von Flavonolen 23 mg/d, wobei ca. 16 mg/d allein das Quercetin ausmacht [Gee und Johnson, 2001].

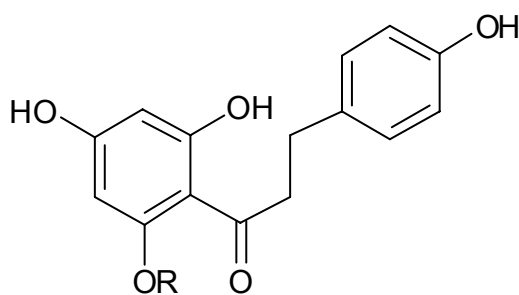
Katechine

Katechine sind nicht glykosidisch gebunden, stattdessen kommen sie in der Natur als Monomere oder als Oligomere (Proanthocyanidine oder kondensierte Tannine) vor [Lairon und Amiot, 1999]. Hauptquellen für Katechine aus der Nahrung sind grüner und schwarzer Tee (210 bzw. 70 mg/g), Rotwein (1-3 g/L) [Lairon und Amiot, 1999], Äpfel, Aprikosen und Kirschen [Hollman, 1997, Risch und Hermann, 1988]. Die Proanthocyanidinstrukturen können sehr variieren: Grundstrukturen sind die Flavanole, die meist an der 4- und 8-Position miteinander verknüpft sind, in seltenen Fällen auch an der 6-

Position [Manach *et al.*, 2004]. Daneben sind aber auch Verzweigungen möglich sowie Bindungen mit Nichtflavonoiden. Proanthocyanidine tragen in pflanzlichen Lebensmitteln zum bitteren und adstringierenden Geschmack bei [Jorgensen *et al.*, 2004]. In Mostäpfeln liegt der Polymerisierungsgrad überwiegend zwischen vier und elf Flavonoleinheiten [Manach *et al.*, 2004].

3.4.1.2 Phloretinderivate

Phloretin und seine Glykoside (hauptsächlich Phloretin-2'-glukosid = Phloridzin und Phloretin-2'-xyloglukosid) gehören zu den Dihydrochalkonen, ihre Struktur ist in Abbildung 3.13 dargestellt.



R=H: Phloretin
R= Glukose: Phloridzin

Abbildung 3.13: Struktur von Phloretin und Phloridzin

Sie kommen in der Natur fast ausschließlich in Äpfeln sowie in Blättern und Rinde des Apfelbaumes vor. Ein weiterer Entstehungsort für Phloretin stellt der mikrobielle Abbau von Apigenin im Dickdarm dar (Kapitel 3.4.4).

3.4.1.3 Hydroxyzimtsäurederivate

Zu den am häufigsten anzutreffenden Hydroxyzimtsäuren gehört die Kaffeesäure, die meist verestert mit Chinasäure oder mit Glukose in der Natur vorkommt. Die 5-Kaffeoyl-chinasäure ist auch unter dem Namen Chlorogensäure bekannt (Abbildung 3.14).

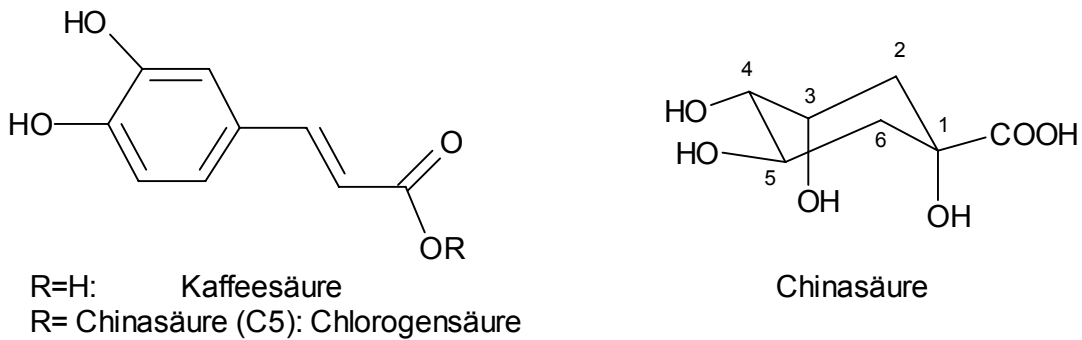


Abbildung 3.14: Strukturen von Kaffeesäure und Chlorogensäure nach [Belitz *et al.*, 2001]

Chlorogensäure kommt vor allem in Kaffee und Äpfeln, aber auch in anderem Kern- und Steinobst vor [Belitz *et al.*, 2001, Iwai *et al.*, 2004]. In starkem Kaffee können Gehalte bis zu 500-800 mg/L erreicht werden [Olthof *et al.*, 2003]. Nicht-Kaffeetrinker nehmen täglich bis zu 100 mg Chlorogensäure auf, Kaffeetrinker dagegen 500-1.000 mg/d [Olthof *et al.*, 2001].

3.4.2 Resorption

Da den phenolischen Verbindungen *in vivo* bioaktive Wirkungen zugeschrieben werden, ist eine Resorption im Dünndarm Voraussetzung. Abbildung 3.15 veranschaulicht mögliche Wege von Polyphenolen aus der Nahrung im Gastrointestinaltrakt.

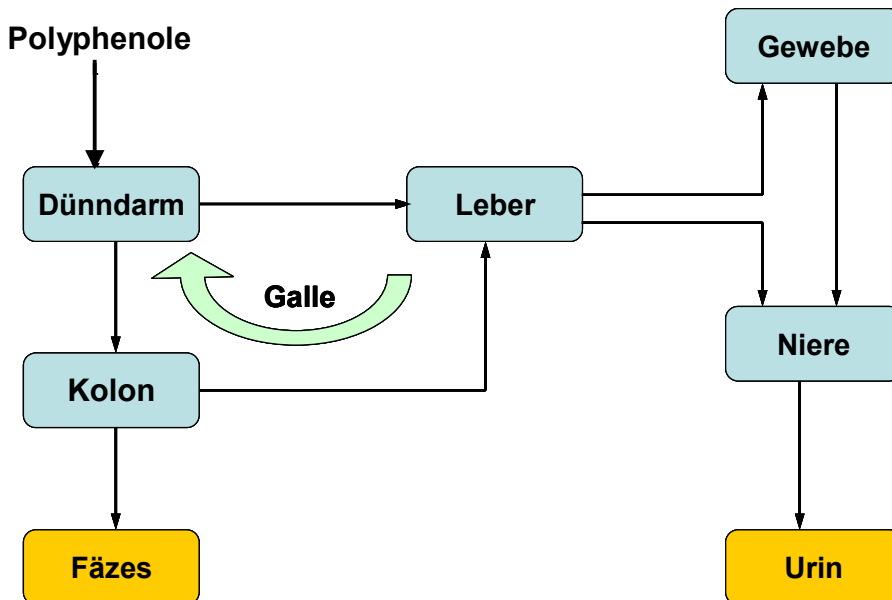


Abbildung 3.15: Mögliche Wege von Polyphenolen im Menschen, nach [Scalbert und Williamson, 2000]

Das Ausmaß und der Mechanismus der Aufnahme werden kontrovers diskutiert (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Auswahl von *in vivo* und *in vitro*-Untersuchungen zur Aufnahme von Quercetinderivaten

Studie	Substanz	Aufnahme	Metabolite	Literatur
Ileostomie-patienten	Quercetin	24%		[Hollman <i>et al.</i> , 1995]
	¹ Glykoside _{Zwiebel}	52%		
	Rutin	17%		
Probanden (Plasma über 24 h)	Glykoside _{Zwiebel}	<0,7 h		[Hollman <i>et al.</i> , 1997, Hollman <i>et al.</i> , 1996]
	Rutin	9 h		
	Glykoside _{Apfel}	2,5 h		
Ileostomie-patienten	Glykoside _{Zwiebel}	65-81% als Aglykon	Hydrolyse	[Walle <i>et al.</i> , 2000]
Caco-2 Resorptionsmodell	Que-Glykoside	schwach SGLT1 ↔ MRP2		[Walgren <i>et al.</i> , 2000]
Probanden Loc-1-gut ²	Glykoside _{Zwiebel}	Aglykon Gluc ³ in Enterozyten	Que-3'-gluc im Lumen	[Petri <i>et al.</i> , 2003]

¹ Zwiebelglykoside: Que-4'-Glukosid, Que-3,4'-Diglukosid

² Perfusionstechnik für die proximale Region des humanen Jejunum

³ Gluc: Glucuronidierung

Die Studien von Hollman *et al.* gaben Hinweise darauf, dass die Aufnahme von Quercetinglykosiden möglich ist, jedoch von den gebundenen Zuckern abhängt [Hollman *et al.*, 1996]. Als mögliche Transportwege für Glykosidresorption werden Natrium-abhängige Glukosetransporter (SGLT1) diskutiert [Gee und Johnson, 2001]. Die Studien ließen außer Acht, in welcher Form die Quercetinderivate aufgenommen wurden, da eventuell vor oder während der Resorption entstehende Konjugate ähnliche Retentionszeiten und UV-Aktivität besitzen wie die Glykoside selbst. Da Enterozyten β -Glukosidasen besitzen, ist auch eine intrazelluläre Glykosidspaltung möglich [Sesink *et al.*, 2001], so dass Aglyka bzw. Konjugate im Plasma ankommen.

Andere Arbeiten gehen davon aus, dass die Glykoside bereits im Darmlumen hydrolysiert werden und das Aglykon durch passive Diffusion aufgenommen wird [Petri *et al.*, 2003, Walle *et al.*, 2000]. Im Caco-2-Resorptionsmodell wurden die Glykoside ebenfalls nur sehr schwach aufgenommen. Der Aufnahme über den SGLT1 steht der effektive Efflux der Glykoside über das Multidrug-resistance-associated Protein (MRP2) gegenüber. Da im Plasma und im Darmlumen kein Aglykon oder Glykoside erscheinen,

muss von einer hohen Phase-II-Konjugation im Enterozyten ausgegangen werden [Petri *et al.*, 2003].

Über die Resorption von Hydroxyzimtsäurederivaten *in vivo* gibt es nur wenig Hinweise in der Literatur, da deren Bestimmung aufgrund des intensiven bakteriellen Abbaus im Kolon schwierig ist. In Supplementstudien mit Chlorogensäure und Kaffeesäure wurde bei Ileostomiepatienten eine Resorption von 33% für Chlorogensäure als intaktes Molekül und 95% für Kaffeesäure geschätzt. Die Resorption von Kaffeesäure erfolgt im Magen durch passive Diffusion der nichtionischen Form. Durch den höheren pH-Wert im Dünndarm ist dort die passive Diffusion unwahrscheinlich, daher werden aktive, z.B. natriumabhängige Transportmechanismen diskutiert. [Olthof *et al.*, 2001]

3.4.3 Metabolismus im Darmgewebe

Bevor die phenolischen Substanzen aus dem Dünndarm resorbiert werden können, unterliegen sie einer Reihe von metabolischen Phase-I (Hydrolyse) und Phase-II-Reaktionen (Konjugationen) im Dünndarm (Abbildung 3.16).

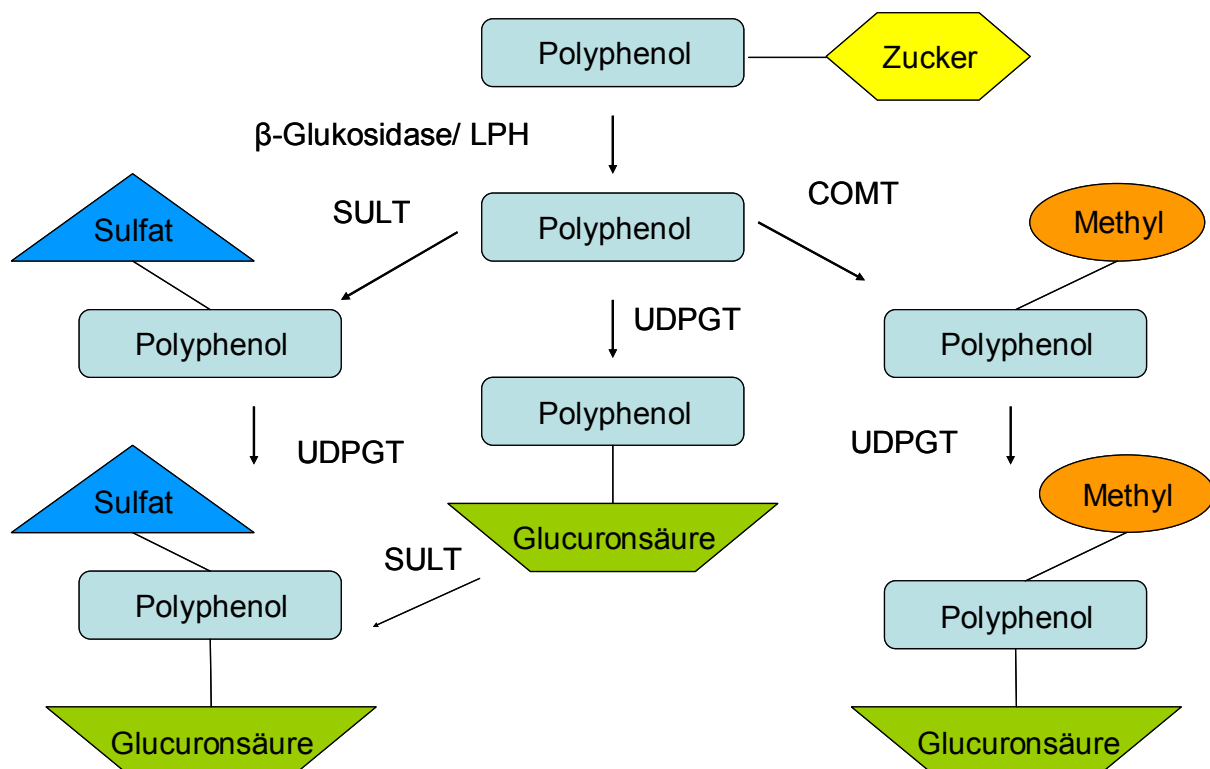


Abbildung 3.16: vereinfachtes Schema zum möglichen Metabolismus im Dünndarm nach [Scalbert und Williamson, 2000]; LPH: Laktat-Phloridzin-Hydrolase; COMT: Catechol-O-Methyltransferase; UDPGT: UDP-Glucuronyltransferase; SULT: Phenol-Sulfotransferase

Im Gegensatz zu Pharmaka werden Polyphenole in nur geringen Mengen aufgenommen. Pharmaka können die Stoffwechselwege absättigen und kommen in unkonjugierter Form in die Leber [O'Leary *et al.*, 2003, Scalbert und Williamson, 2000]. Dies ist mit den phenolischen Verbindungen aus der Nahrung nicht möglich, so dass sie komplett im Dünndarm metabolisiert werden können [Scalbert und Williamson, 2000] und vorwiegend als Glucuronide über die Pfortader in die Leber gelangen.

3.4.3.1 Hydrolyse

Glykoside werden je nach Art des Zuckers und dessen Bindungsort durch intestinale β -Glukosidasen hydrolysiert [Day und Williamson, 2001]. Zwei β -Glukosidasen wurden im Menschen identifiziert, die eine Rolle bei der Hydrolyse von Glykosiden eine Rolle spielen:

- **Laktat-Phloridzin-Hydrolase** (LPH, EC 3.2.1.108) ist ein Membran-gebundenes Enzym im Bürstensaum des Dünndarms und hydrolysiert hauptsächlich Laktose und Laktosylceramide aus der Milch. Mit seiner zweiten hydrophoben Domäne kann es zusätzlich Phloridzin in Phloretin und Glukose spalten [Day *et al.*, 1998, Scalbert und Williamson, 2000]. Auch Quercetinglykoside mit Ausnahme von Rutin sind Substrate für die LPH [Day *et al.*, 2000].
- **β -Glukosidase** ist ein zytosolisches Enzym mit einer breiten Substratspezifität, welches vor allem in Leber, Niere und Dünndarm von Säugern gefunden wurde. Es wird mit der Detoxifizierung von Xenobiotika in Verbindung gebracht, um eine Bindungsstelle für Konjugationsreaktionen zu schaffen und damit eine schnelle Ausscheidung zu ermöglichen [Day *et al.*, 1998]. Es spaltet Glykoside, wobei Quercetin-3-glukosid und Rutin keine Substrate für dieses Enzym sind [Day und Williamson, 2001].

3.4.3.2 Cytochrom-P450-abhängige Phase-I-Reaktionen

Cytochrom-P450-Enzyme sind an der Metabolisierung von Flavonoiden beteiligt und können Hydroxylierungen und Demethylierungen katalysieren. Vor allem die beiden Isoenzyme CYP1A2 und CYP3A4 sind in den Metabolismus von Flavonoiden im Darm involviert. CYP1A1 kommt dann zum Tragen, wenn es durch Fremdstoffe induziert wird. Ort und Grad der Reaktionen hängen stark vom Substitutionsmuster der Flavonoide ab: Während z.B. Kämpferol und Tamarixetin (die 4'-Position ist methoxyliert) zu Quercetin umgewandelt werden können, wurde kein Metabolismus für Quercetin oder Isorhamnetin (3'-Position methoxyliert) beobachtet. Die Cytochrom-P450-

Familie unterliegt einem starken Polymorphismus, so dass die Metabolisierung in sehr unterschiedlichem Maße stattfindet. [Breinholt *et al.*, 2002]

3.4.3.3 Konjugation

Die Polyphenole verbleiben nach ihrer Hydrolyse nicht lange in ihrer Aglykon-Form, sondern werden schnell konjugiert.

- **Catechol-O-Methyltransferase** (COMT, EC 2.1.1.6) ist im Dopamin-Metabolismus involviert; das Enzym unterliegt einem funktionellen genetischen Polymorphismus und kommt in verschiedenen Geweben vor. Außerdem ist es verantwortlich für die Methylierung von Polyphenolen, dabei bestimmt die Art des Polyphenols den Ort der Methylierung. An der 4'-Position kann durch CYP-450-Enzyme eine Demethylierung stattfinden, jedoch nicht an 3'-Position [Scalbert und Williamson, 2000].
- **UDP-Glucuronyltransferasen** (UDPGT, UGT; EC 2.4.1.17) katalysieren die Konjugation von Polyphenolen mit Glucuronsäure. Diese Enzymfamilie ist im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Die Glucuronidierung von Polyphenolen wird v.a. durch die UDPGT1A-Familie katalysiert, die in Darm, Leber und Niere vorkommen. Die Isoformen (im Kolon UDPGT1A1, -3, -4, -6, -8, -9 und -10) unterliegen einem genetischen Polymorphismus; UDPGT1A1 ist nur in 29% der Bevölkerung exprimiert. In der Leber zeigt sie größte Aktivität. Durch Alkohol, Drogen, Rauchen und durch Ernährung wird die Aktivität gesteigert. Damit kommt es zu großen interindividuellen Unterschieden. [Scalbert und Williamson, 2000]
- **Phenol-Sulfotransferasen** (P-PST, SULT; EC 2.8.2.1) sind eine kleine Gruppe zytosolischer Enzyme, die weit verbreitet sind. Ihr endogenes Substrat ist Iodothyronin, daneben werden auch Substrate wie 4-Nitrophenol, OH-Arylamide und Phenole konjugiert. Es sind verschiedene Isoformen bekannt. Im Kolon kommt vor allem die SULT1A3 vor und zeigt hohe Aktivität gegenüber Catecholgruppen von Polyphenolen. Diese Enzymfamilie wird nicht durch Nahrung, Xenobiotika oder Umweltfaktoren induziert; einige werden hingegen durch Polyphenolen gehemmt (SULT1A1 durch Quercetin). [Scalbert und Williamson, 2000]

Sonstige Phase-II-Enzyme, z.B. N-Acetyltransferase (Acetylierung von Aminen), GSTs und Epoxidhydrolasen spielen keine wesentliche Rolle für den Polyphenol-Metabolismus. [Scalbert und Williamson, 2000]

In Ratten wurden nach Inkubation von präparierten Darmabschnitten mit Quercetin-3-glukosid bzw. mit Quercetin als Hauptmetabolite das 3- und das 7-Glucuronid gefunden, daneben Sulfate und gemischte Glucuronid-Sulfate [Gee *et al.*, 2000]. Nach Inkubation von humanen Leber-S9-Homogenaten mit Quercetin wurden als vorherrschende Metaboliten Quercetin-3-, -7- und -3'-glucuronid detektiert, nach Inkubationen mit humanem Dünndarm-S9-Homogenat dagegen hauptsächlich Quercetin-3'-sulfat, Quercetin-3'- und -4'-glucuronid dagegen nur in geringen Mengen [van der Woude *et al.*, 2004]. Die Isoformen der UDPGTs weisen eine gewisse Regioselektivität auf, so dass der Ort der Metabolisierung nicht nur von der Struktur des Substrats, sondern ebenfalls von der vorliegenden Enzymform abhängt [Boersma *et al.*, 2002].

Erscheinen Metaboliten im Plasma, unterliegen sie in der Leber meist weiteren Reaktionen, z.B. mehrfache Konjugationen. Durch die hohe β -Glucuronidase-Aktivität der Leber können Glucuronide wieder gespalten werden und biliär durch den enterohepatischen Kreislauf als Aglyka oder methylierte/sulfatierte Konjugate wieder in das Kolon gelangen [O'Leary *et al.*, 2003]. Kaffeesäure kann nach Resorption ebenfalls glucuronidiert und/oder sulfatiert und sodann im Urin ausgeschieden werden [Kern *et al.*, 2003].

3.4.4 Metabolismus im Kolon

Ca. 80% der aufgenommenen Polyphenole erreichen in freier oder konjugierter Form das Kolon, wo sie durch die Mikroflora verstoffwechselt werden [Rechner *et al.*, 2004]. Dort werden die Flavonoidglykoside hydrolysiert, und es kann zu Ringöffnungen, vor allem des C-Ringes, kommen. Es resultieren Phenolsäuren: je nach Substituenten der Flavonoide, z.B. 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure, 3-Methoxy-4-Hydroxyphenyllessigsäure oder 3,4-Dihydroxybenzoesäure [Blaut *et al.*, 2003, Rechner *et al.*, 2004]. Der Abbauweg für Quercetin durch *E. ramulus* ist in Abbildung 3.17 dargestellt.

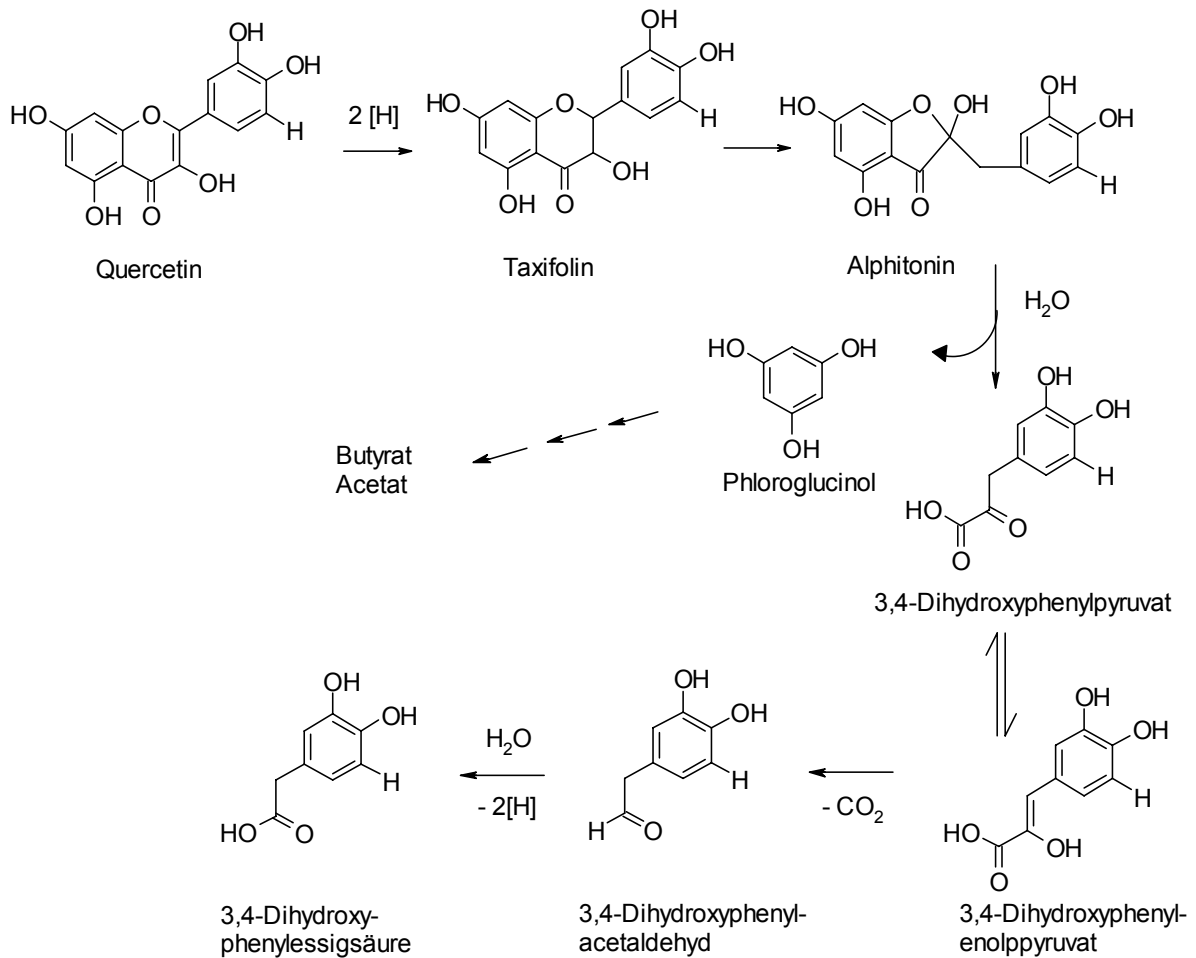


Abbildung 3.17: Abbauweg von Quercetin, wie er für *E. ramulus* beschrieben ist, nach [Blaut *et al.*, 2003]

Durch Reduktions- und Ringkontraktionen über eine Chalkon- oder Diketonstruktur und hydrolytischer Ringöffnung entstehen Phloroglucinol und 3,4-Dihydroxyphenylpyruvat. Die weiteren Schritte entsprechen denen des Phenylalanin-Abbaus. [Schoefer *et al.*, 2003]. Phloroglucinol kann in Anwesenheit von Glukose weiter in Butyrat und Acetat abgebaut werden [Blaut *et al.*, 2003]. Flavone werden z.B. durch *C. orbiscindens* in ähnlicher Weise metabolisiert, wobei als Zwischenprodukt Dihydrochalkone, z.B. Phloretin entstehen. Endprodukte sind in diesem Falle 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure, je nach Ausgangsverbindung auch das 3,4-Dihydroxyderivat [Schoefer *et al.*, 2003]. Chlorogensäure kann ebenfalls durch die Mikroflora abgebaut werden: zunächst entsteht Kaffeesäure und später Dihydrokaffeesäure (3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure) [Rechner *et al.*, 2004]. Nach Resorption der Metabolite im Kolon können sie dehydroxyliert und/oder β -oxidiert werden. Durch Glycinierung entstehen Hippursäurederivate, die als Endprodukte für Chlorogensäure-, Teekatechin- und Quercetinglykosidmetabolismus beschrieben sind [Olthof *et al.*, 2003, Rechner *et al.*, 2004]. Neben den erwähnten Mikroorganismen sind noch einige andere be-

schrieben, die Flavonoide und Polyphenole abbauen können, z.B. *B. uniformis* bzw. *B. ovatus*, die Glykoside durch ihre β -Glukosidase hydrolysieren oder *Enterococcus casseliflavus*, die die Zuckerreste der Glykoside verwerten [Blaut *et al.*, 2003, Schoefer *et al.*, 2003].

3.4.5 Antioxidative Wirksamkeit

Durch die polyphenolische Struktur haben die Apfelsaftinhaltsstoffe antioxidative Eigenschaften. Die Wirkung beruht auf der Abgabe von Wasserstoffatomen aus den phenolischen Hydroxylgruppen an radikalische ROS und damit auf der Unterbrechung von Radikalkettenreaktion [Lemanska *et al.*, 2001]. Phenolische Verbindungen mit entsprechender struktureller Voraussetzung sind außerdem in der Lage zum Elektronentransfer und/ oder Chelate mit Übergangsmetallionen zu bilden [Lindberg-Madsen *et al.*, 2000].

3.4.5.1 Hydroxylgruppen

Bildung von stabilen Radikalen

Die Fähigkeit zur Abgabe von Wasserstoffatomen aus Hydroxylgruppen hängt von deren Anzahl [Kondo *et al.*, 2001], vor allem aber von deren Position ab: Benachbarte Hydroxylgruppen zeigen eine bessere antioxidative Kapazität als nicht benachbarte, z.B. die 3'- und 4'-Position des B-Ringes (*ortho*-Catecholgruppe) [Lu und Foo, 2000]. Die Wirkung von Flavonoiden ist pH-abhängig: die pK_a -Werte im wässrigen Milieu liegen im physiologischen Bereich. Die bevorzugte Deprotonierung findet an der C7- und C4'-Position, unter alkalischen Bedingungen auch an der C3-Position statt.

Die Elektronendichte des 3,4',7-Trianion ist so hoch, dass durch Elektronentransfer (Abstraktion eines Wasserstoffatoms) ein stabiles dianionisches Radikal gebildet werden kann. Zusätzlich ist eine weitere Deprotonierung möglich, was zu einem resonanzstabilisierten trianionischen Radikal führt [Dangles *et al.*, 1999].

Quercetin besitzt zwei Strukturmerkmale, die mit Deprotonierung und daher guter antioxidativer Aktivität einhergehen, nämlich die Hydroxylgruppen an C3'/4'- und an C3/5/7-Position. [Lemanska *et al.*, 2001] Demgegenüber haben Quercetin-3-Glykoside eine schlechtere antioxidative Wirksamkeit, da die Hydroxylgruppe am C3-Atom blockiert ist und daher eine Strukturvoraussetzung wegfällt [Rice-Evans *et al.*, 1996] In ihrer neutralen Form spielt aber auch die Elektronenabgabe, vor allem an Position 3 und/ oder 5 eine Rolle [Lemanska *et al.*, 2001].

Chelatbildung

Bei der Deprotonierung der Hydroxylgruppen entsteht ein Sauerstoffzentrum mit einer hohen Ladungsdichte. In Anwesenheit von Übergangsmetallen kann die Deprotonierung bereits im physiologischen pH-Bereich erfolgen wodurch die Metallionen chelatiert werden können. Das resultierende Sauerstoffanion kann durch den mesomeren Effekt der Phenole stabilisiert werden, vor allem die Catecholgruppe bindet Fe(III) fest bei pH 7,0. [Hider *et al.*, 2001] Das Flavonol Quercetin besitzt drei potente Metallbindungsstellen, verteilt in den drei Ringen. Die Affinität der Catecholgruppe (1) ist bei pH 7.0 am größten (Abbildung 3.18).

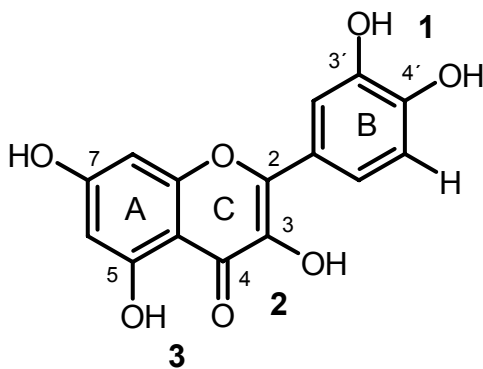


Abbildung 3.18: Struktur von Quercetin mit seinen Strukturmerkmalen.

Eine glykosidische Bindung an der 3-Position führt zum Verlust einer Bindungsstelle.

Das Ausmaß der Chelatbildung und der Verteilung hängt von der Konzentration der beiden Liganden sowie vom pH-Wert ab. [Hider *et al.*, 2001].

3.4.5.2 sonstige Strukturmerkmale

Nicht nur die Hydroxylgruppen an A- und B-Ring spielen eine wichtige Rolle für antioxidative Wirksamkeit. Weitere strukturelle Voraussetzungen bilden die 2,3-Doppelbindung und die Carbonylgruppe an C4 im C-Ring. Dies gewährleistet einen günstigen ungesättigten Charakter, der gute Elektronenwanderung zulässt.

3.4.6 Biologische Wirkungen von Apfelsaftinhaltsstoffen

In der Pflanze erfüllen Apfelsaftinhaltsstoffe verschiedene Funktionen. Sie schützen den Apfel vor UV-Licht, Pilzen, Viren und Bakterien. Außerdem zeigen sie Phytohormonaktivität und wirken als Enzyminhibitoren. [Bock, 2003]

In den letzten Jahrzehnten wurden viele Substanzen synthetischen und natürlichen Ursprungs identifiziert, die präventiv in die Genese verschiedener Erkrankungen, v.a.

aber Atherosklerose und Krebs, eingreifen können. Solche chemopräventiven Effekte wurden in verschiedenen Testsystemen *in vitro* bis hin zu humanen Interventionsstudien untersucht. Chemopräventive Substanzen können in zwei Gruppen eingeteilt werden: „Blockierende“ Agenzien entfalten ihre protektive Wirkung, bevor Kanzerogene kritische Zellstrukturen (z.B. DNA) erreichen, d.h. auf der Stufe der Initiation. Sie verhindern die metabolische Aktivierung von Kanzerogenen, fangen ultimale Kanzerogene ab und inaktivieren diese, oder sie erleichtern die Eliminierung aus dem Körper [Lee und Surh, 2005]. „Suppressive“ Verbindungen wirken nach Initiation durch Kanzerogene. Sie greifen hemmend in die prä-maligne und maligne Transformation von initiierten Zellen auf der Stufe der Promotion und Progression ein. Zugrunde liegende Mechanismen sind z.B. Wachstumshemmung, Modulation zellulärer Differenzierung und Apoptose, Erhöhung der Immunantwort sowie Aktivierung von Tumorsuppressorgenen bzw. Inaktivierung von Onkogenen [Lee und Surh, 2005, Musk *et al.*, 1995]. Aufgrund der Heterogenität der Substanzen haben sie nicht nur eine einzige Wirkung, sondern greifen meist in viele Mechanismen des Organismus ein [Breinholt *et al.*, 2003]. Da in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft phenolische Verbindungen in einer komplexen Mischung vorliegen, sind potenzielle chemoprotektive Effekte meist nicht auf bestimmte Inhaltsstoffe zurückzuführen (mögliche additive und synergistische Wirkungen) [Breinholt *et al.*, 2003, Laranjinha, 2001]. Einen Überblick über mögliche Wirkungen von Flavonoiden und deren Bedeutung für verschiedene Erkrankungen ist in Abbildung 3.19 gezeigt.

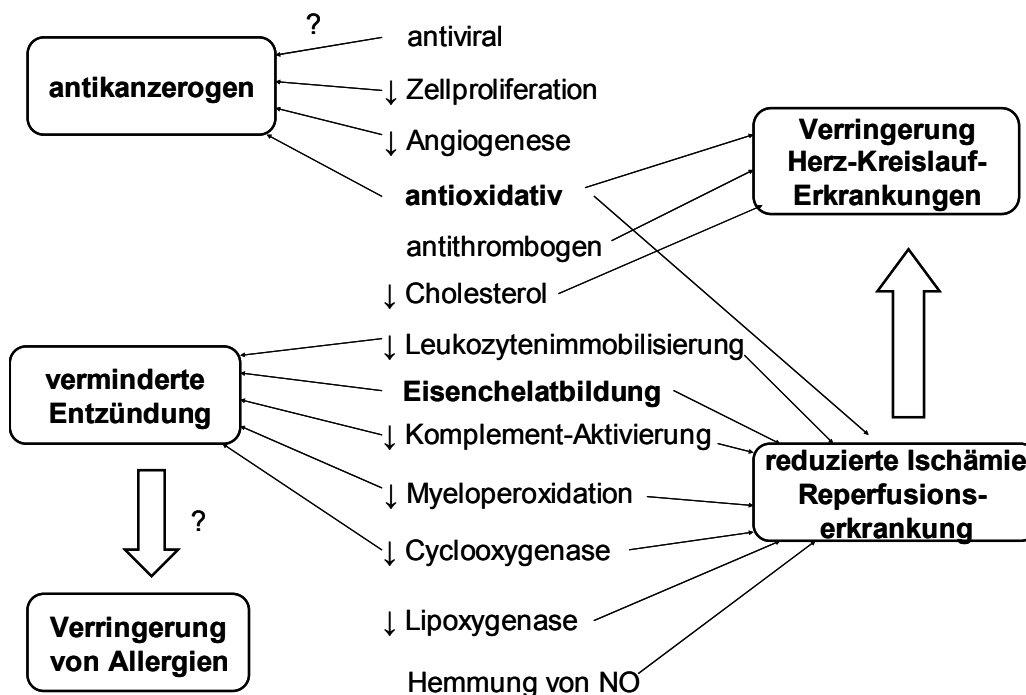


Abbildung 3.19: möglicher Zusammenhang von Wirkmechanismen von Flavonoiden und Effekte auf Krankheiten, nach [Nijveldt *et al.*, 2001].

3.4.6.1 Schutz vor ROS

Die antioxidative Wirksamkeit und die Chelatbildung sind wesentlich für die protektiven Eigenschaften von Flavonoiden und Polyphenolen verantwortlich. Durch die Verringerung von ROS kann die Zelle z.B. vor Lipidperoxidation (LPO) oder DNA-Schädigung geschützt werden. Eine Übersicht über *in vitro*-Studien ist in Tabelle 3.4 aufgeführt.

Tabelle 3.4: Zusammenstellung einiger *in vitro*-Untersuchungen zur Fähigkeit von Flavonoiden und Polyphenolen, (oxidative) Zellschäden zu reduzieren; Que: Quercetin, Rut: Rutin, Epi: Epicatechin, Md: Menadion, TBH: *tert*-Butylhydroperoxid.

Untersuchte Verbindungen	Zellsystem/ Oxidans	Endpunkt	Literatur
Que	Caco-2, HepG2 H ₂ O ₂	DNA-Schäden ↓	[Aherne und O'Brien, 1999]
Que, Rut	Caco-2 TBH, Md	DNA-Schäden ↓	[Aherne und O'Brien, 2000b]
Que, Rut	Caco-2, Lymphozyten H ₂ O ₂	DNA-Schäden ↓	[Duthie und Dobson, 1999]
Que, Proanthocyanidine, Epi	FAO-Zellen H ₂ O ₂	DNA-Schäden ↓	[Llopiz <i>et al.</i> , 2004]
Que, EGCG	Endothelzellen PCB 77	ROS-Level ↓	[Ramadass <i>et al.</i> , 2003]
Que, Metabolite	WIL2-NS H ₂ O ₂	Chromosomen-Schäden ↓	[Saito <i>et al.</i> , 2004]
Apfelextrakt	Caco-2 TBH	ROS-Level ↓	[Tarozzi <i>et al.</i> , 2004]
Rosenkohlextrakt	Lymphozyten	oxidative DNA-Schäden ↓	[Zhu und Loft, 2001]
Que	Caco-2 H ₂ O ₂ /Fe ²⁺	LPO ↓	[Peng und Kuo, 2003]

3.4.6.2 Einfluss auf Fremdstoffmetabolismus

Enzyme, die in den Fremdstoffmetabolismus involviert sind (Cytochrom-P450-Enzyme und detoxifizierende Phase-II-Enzyme) spielen nicht nur eine Rolle bei der Metabolisierung von Flavonoiden und Polyphenolen (Kapitel 3.4.3). Diese Enzyme können durch diese Verbindungen in ihrer Aktivität beeinflusst werden, so dass po-

tentielle Kanzerogene verstärkt abgefangen werden können. Chemopräventive Stoffe wirken meist auf die Genexpression (Ah-Rezeptor, ARE, Kapitel 3.3.4.3).

3.4.6.3 Einfluss auf Zellproliferation

Im Laufe der Krebsentstehung (Kap. 3.1.2.2) spielt das Zellwachstum eine große Rolle. Flavonoide und Polyphenole zeigten in vielen *in vitro*-Studien wachstumshemmende Effekte in Kolonkrebiszellen [Calliste *et al.*, 2001, Kern *et al.*, 2005, Kuntz *et al.*, 1999, Kuo, 1996, Middleton *et al.*, 2000], vor allem während ihrer aktiven Wachstumsphase vor Erreichen ihrer Konfluenz [Agullo *et al.*, 1994]. Angriffspunkte der Verbindungen liegen in der MAP-Kinase-Kaskade, wo sie bereits auf der Ebene des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-R) eine Hemmung zeigen und damit das Anschalten des weiteren Signalweges verhindern [Kern *et al.*, 2005]. Durch Interaktionen mit dem Aryl-Hydrocarbonrezeptor (AhR) können Signalwege angeschaltet werden, die mit der Zellwachstumshemmung assoziiert sind [Kampa *et al.*, 2004].

Ein weiterer Mechanismus zur Kontrolle des Zellwachstums ist der programmierte Zelltod (Apoptose). Dieser kann durch verschiedene Faktoren induziert werden, z.B. durch Plasmamembran-Rezeptoren (TNF α , Fas, Glutamat), Störungen der Calcium-Homöostase, Stress (z.B. ROS, Entzug von Wachstumsfaktoren) oder durch DNA-Schädigung (UV-Licht, p53, Etoposid). An der Regulation der Apoptose sind Proteine der Bcl-2-Familie beteiligt. Zu ihnen gehören Agonisten (z.B. Bax, Bad) und Antagonisten (z.B. Bcl-2, Bcl-X_L). Andere Regulationsmechanismen laufen z.B. über Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsreaktionen, z.B. der Proteinkinase C (PKC). Damit der Apoptose morphologische Veränderungen einhergehen, z.B. Schrumpfen der Zellen, Chromatinkondensation, Bildung von DNA-Fragmenten („Leiter“) sowie Bildung apoptotischer Körperchen, müssen zuvor eine Reihe von Enzymen aktiviert werden, die, erst einmal aktiv, irreversibel die Apoptose in Gang setzen. Zu ihnen gehören Endonukleasen und Proteasen (Caspasen). [Guerrero und Arias, 1998] Durch vermehrte Expression proapoptotischer bzw. Hemmung antiapoptotischer Proteine sowie durch Modulation von Caspaseaktivität wurden Flavonoide und Polyphenole als Apoptose-induzierende Verbindungen identifiziert [Chen *et al.*, 2004, Kampa *et al.*, 2004].

3.4.6.4 Einfluss auf Entzündungsmarker

Cyclooxygenase und Lipoxygenase sind wichtige Entzündungsmediatoren. Sie sind beteiligt an der Freisetzung von Arachidonsäure, die am Anfang der inflammatorischen Abwehr steht. Neutrophile enthalten Lipoxygenase, die aus Arachidonsäure

chemotaktische Substanzen synthetisieren, z.B. Prostaglandine, Hydroxy- bzw. Peroxyarachidonsäurederivate oder Thromboxane. Diese Mediatoren stimulieren die Produktion von ROS an den Stellen der Entzündung. Polyphenolische Verbindungen sind in der Lage, hemmend auf den Cyclooxygenase- bzw. 5-Lipoxygenaseweg zu wirken. Dies resultiert in einer verminderten Ausschüttung von Arachidonsäure und dadurch zu einer Verringerung von Entzündungsmediatoren [Manthey, 2000, Nijveldt *et al.*, 2001]. Quercetin und auch seine Metaboliten haben hemmende Wirkung auf beide Enzymaktivitäten [de Pascual-Teresa *et al.*, 2004, Jones *et al.*, 2004, Sadik *et al.*, 2003].

3.4.7 Adverse Effekte

Flavonoide und Polyphenole haben reaktive, funktionelle Gruppen, so dass nicht nur antioxidative und protektive, sondern auch adverse Effekte, z.B. Prooxidativität, zu erwarten sind. Die relevanten Strukturmerkmale sind die freie Hydroxylgruppe an C3, die Doppelbindung an C2-C3 mit der Ketogruppe an C4 und auch die Catecholgruppe im B-Ring. Aufgrund ihrer Fähigkeit zum Redox-Cycling zeigen sie auch unerwünschte Eigenschaften, die in erster Linie auf ihre elektrophilen Metabolisierungsprodukte (Chinone, Methide) zurückzuführen sind.

3.4.7.1 Mutagenität und Genotoxizität

Ende der 70er Jahre wurden verschiedene Nahrungsinhaltsstoffe im Ames-Test auf ihre mutagenen Eigenschaften untersucht. Für einige Flavonole wurden Frameshift-Mutationen in *Salmonella typhimurium* gefunden. Auch in anderen Testsystemen gab es Hinweise für mutagene Effekte, z.B. Chromosomenaberrationen und Schwester-Chromatid-Austausch in CHO-Zellen [Brown und Dietrich, 1979]. Neben den oben genannten strukturellen Eigenschaften spielt für die Mutagenität von Flavonolen das Vorhandensein der Hydroxylgruppe an C5 eine große Rolle [Hardigree und Epler, 1978]. Es wurde gezeigt, dass nicht die Ausgangsstrukturen an sich für die Mutagenität verantwortlich sind sondern die Chinon-/ Chinon-Methid-Strukturen.

3.4.7.2 Prooxidative Wirkungen

Chinonbildung

Je nach Konzentration und Art der Radikale haben Flavonoide und Polyphenole nicht nur antioxidative, sondern auch prooxidative Wirkungen [Metodiowa *et al.*, 1999]. Die Anwesenheit von Übergangsmetallionen und wässriges Milieu begünstigen die pro-

oxidative Wirkung [Cao *et al.*, 1997, Lapidot *et al.*, 2002a]. Außerdem spielt der pH-Wert für diese Wirkungen eine große Rolle [Canada *et al.*, 1990]

Eine Strukturvoraussetzung für eine Chinonbildung ist die Catecholgruppe, wie sie z.B. bei Quercetin, Kaffeesäurederivaten und Epicatechin vorliegt. Quercetin ist hinsichtlich seiner prooxidativen Eigenschaften gut untersucht, einen Überblick über mögliche Aktivierung zeigt Abbildung 3.20.

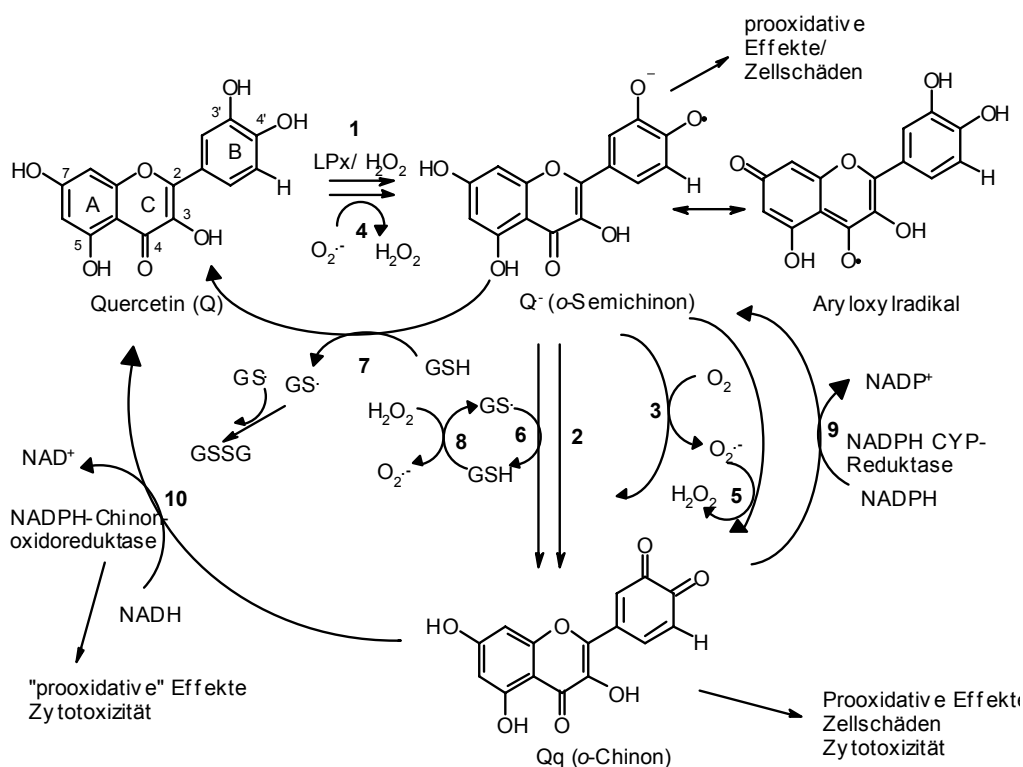
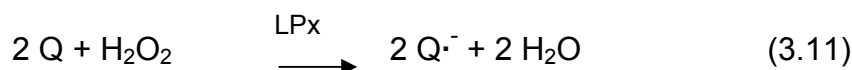
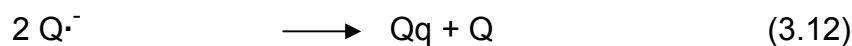


Abbildung 3.20: Postulierte Reaktionen von Quercetin und mögliche biologische Konsequenzen, nach [Metodiewa *et al.*, 1999], Reaktionen 1-10 im Text; Stöchiometrie bleibt unbeachtet; LPx: Laktat-Peroxidase

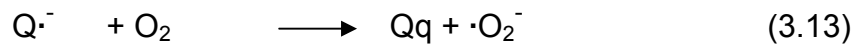
Die Reaktion mit Laktat-Peroxidase (1) folgt nach dem allgemeinen Peroxidase-Mechanismus:



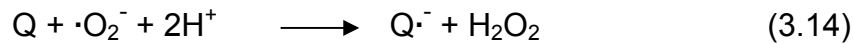
Die mesomere Struktur des gebildeten α -Semichinonradikals ($\text{Q}^{\cdot-}$) geht von der Catecholgruppe aus und verläuft über alle drei Ringe inklusive des Aryloxyradikals, was Voraussetzung für die Radikalstabilisierung ist. Es kann jedoch auch zur α -Chinonstruktur (Qq) disproportionieren (2):



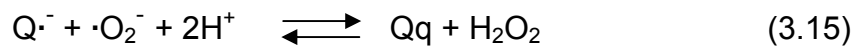
Ist Sauerstoff zugegen, kann die Reaktion zum Chinon auch über die Bildung des Superoxidanionradikals verlaufen (3):



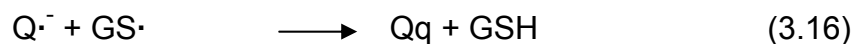
Superoxidanionradikale können von Quercetinmolekülen unter Bildung des Semichinonradikals abgefangen werden (4):



Auch das Semichinonradikal kann Superoxidanionradikale abfangen (5):



Das endogene Antioxidans Glutathion kann ebenfalls bei den Redox-Reaktionen des Quercetins eine Rolle spielen. GS \cdot kann durch das Semichinonradikal reduziert werden (6):



Das Glutathionradikal kann z.B. bei der Ein-Elektronenübertragung mit dem Semichinonradikal gebildet werden (7):



oder bei der Abfangreaktion des Superoxidanionradikals durch Glutathion (8):



Durch die Anwesenheit von NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase kann durch Ein-Elektronenübertragung das Chinon zum Semichinon reduziert werden (9). Die NADPH-Chinon-Oxidoreduktase reduziert die chinoide Form in einem Zwei-Elektronenschritt zurück zur Ausgangsverbindung (10), so dass Quercetin wieder dem oben genannten Redox-Cycling zur Verfügung steht. [Metodiewa *et al.*, 1999] Epicatechin kann durch Tyrosinase und Peroxidasen ebenfalls zum o-Chinon oxidiert werden. Diese Oxidation wurde auch mit Apfel-Phenoloxidasen beobachtet, dabei ist das Zwischenprodukt bei physiologischem pH-Wert nicht stabil, und weitere Reaktionen wie Dimerisierungen oder Polymerisierungen sind möglich [Moridani *et al.*, 2001b].

GSH-Adduktbildung

Neben der Bildung von ROS durch Redox-Cycling kann das als Zwischenprodukt entstandene Chinon weiter reagieren und über Methide mit Glutathion Addukte bilden. Der Deprotonierungsgrad und das Substitutionsmuster bestimmen die Adduktbildung, d.h. der Ort der Bindung ist pH-abhängig. Neutrale Chinone bilden v.a. am C-Ring Addukte mit Glutathion. Im neutralen pH-Bereich liegt das Chinon als Monoanion vor und bildet bevorzugt Addukte am A-Ring. B-Ring-Adduktbildung findet vor allem bei höherer Deprotonierung des Chinons statt [Awad *et al.*, 2002a]. Diese Glutathionaddukte wurden im *in vitro*-Zellsystem sowie *in vivo* als entsprechende Mercaptursäuren im Urin gefunden [Awad *et al.*, 2002b].

Die beiden Hydroxycimtsäurederivate bilden, enzymatisch katalysiert durch NADPH/Rattenlebermikrosomen, über Chinonstrukturen GSH-Addukte [Moridani *et al.*, 2001a]. Katechine sind ebenfalls in der Lage, über o-Chinone Mono-, Di- oder Tri-Glutathionkonjugate zu bilden. Auch Dimere können bis zu zwei Glutathionmoleküle binden. [Moridani *et al.*, 2001b]

3.5 Apfelsaft und phenolische Apfelsaftextrakte

Die überwiegende Zufuhr von Polyphenolen und Flavonoiden erfolgt aus dem Verzehr von Obst und Gemüse. Apfelsaft ist mit 13 Litern pro Person und Jahr der am meisten verzehrte Fruchtsaft in Deutschland. [Bitsch *et al.*, 2000, Rechner *et al.*, 1999, VdF, 2005]

3.5.1 Herstellung von Apfelsaft

Die Herstellung von Apfelsaft zeigt das in Abbildung 3.21 dargestellte Schema.



Abbildung 3.21: Herstellung von Apfelsaft, nach [VdF, 2005]

Zur Vorbereitung der Früchte wird das Obst gewaschen und anschließend sortiert, um faule und unreife Früchte zu entfernen. Nach der Entstielung wird das Obst mechanisch durch Obstmühlen zerkleinert. Im darauf folgenden Verfahren der Entsaf-

tung werden diskontinuierliche und kontinuierliche Pressen eingesetzt. Die Saftausbeute liegt bei Äpfeln bei 70%. Der Rückstand der Saftgewinnung, der Trester, dient zur Pektinengewinnung. Die anschließende Saftbehandlung umfasst eine Vorklärung, die die Abtrennung des Trubs erleichtert und Nachtrübungen verhindert. Danach erfolgt ein enzymatischer Abbau von Pektinen, die Entfernung von Polyphenolen durch Zusatz von Gelatine oder Polyvinylpyrrolidon und eine Entfernung von Proteinen durch Adsorption an Bentonit. Anschließend wird der Saft mittels Filtration durch poröse Schichten wie Zellulose bzw. Kieselgur oder durch eine Zentrifugation geklärt.

Bei naturtrüben Apfelsäften erfolgt eine Trubstabilisierung, bei der die Trubstoffe durch kurzzeitige Behandlung mit Polygalacturonsäurepräparaten partiell abgebaut und damit stabilisiert werden können.

Um eine enzymatische Bräunung durch die Oxidierung noch vorhandener Polyphenole zu verhindern, wird Vitamin C zugesetzt. Zur Abtötung von Mikroorganismen und Inaktivierung von Enzymen wird der Saft z.B. durch eine Pasteurisation haltbar gemacht. Eine zweite Pasteurisation wird nach der Auslagerung bzw. Abfüllung des Fruchtsaftes, z.B. durch Erhitzen der verschlossenen Flaschen, durchgeführt. [Belitz *et al.*, 2001]

3.5.2 Polyphenolprofil von Apfelsäften

Obst und Obstprodukte sind sehr komplex zusammengesetzte Mischungen von phenolischen Verbindungen u.a.. Äpfel sind hinsichtlich ihrer Zusammensetzung gut untersucht: Die häufigsten Polyphenole sind Quercetinglykoside, Phloretin-xyloglukosid und Phloridzin, Chlorogensäure, Epicatechin und Proanthocyanidine [Manach *et al.*, 2004]. Je nach Sorte variieren die Gehalte beachtlich.

Das Polyphenolprofil von Apfelsäften entspricht nicht dem der Rohware und lässt sich durch verschiedene Faktoren beeinflussen.

3.5.2.1 Sortenauswahl

Zum einen spielt die jeweilige Sortenauswahl eine große Rolle. Säfte aus Tafeläpfeln haben mit ca. 180 mg/L einen geringeren Gesamtphenolgehalt als Säfte aus „alten“ Mostapfelsorten, die Gehalte bis zu 1 g/L Phenole erreichen können [Kahle *et al.*, 2005a]. In der nachfolgenden Tabelle sind Profile von Apfelsorten aufgeführt, die in der vorliegenden Arbeit der Rohware für die Extrakte entsprachen.

Tabelle 3.5: Polyphenolprofil [mg/L] von verschiedenen Apfelsäften, nach [Kahle *et al.*, 2005a]

Apfelsaft Substanzgruppe	Boskoop	Bitten- felder	Winter- rambur	Bohnapfel	kommerzielle Säfte	
					klar n=3	trüb n=21
Hydroxyzimtsäuren	517	270	315	360	69-122	94-259
Dihydrochalkonderivate	61	80	91	171	9-54	28-87
Flavan-3-ole	393	198	208	118	14-32	46-120
Flavonole	--	23	27	23	0-7	3-14
Summe	970	570	641	671	110-173	182-459

Bei den zu untersuchenden phenolischen Substanzen handelt es sich um Sekundärprodukte des Pflanzenmetabolismus. Licht [Manach *et al.*, 2004], saisonale Schwankungen während verschiedener Jahrgänge [van der Sluis *et al.*, 2001], Reifegrad der Früchte [de Jager und Roelofs, 1996] und Stress [Golding *et al.*, 2001] spielen bei der Bildung solcher Verbindungen eine große Rolle. Zwischen den Jahrgängen, auch schon bei verschiedenen Standorten der Apfelbäume und innerhalb eines Apfelbaumes sind daher bedeutende Unterschiede bezüglich des Polyphenolgehaltes und –profils der Früchte zu erwarten.

3.5.2.2 Technologische Aspekte

Phenol-Oxidase-Aktivität

Während der Obstverarbeitung kommt es zu Verlusten von phenolischen Verbindungen. Dabei spielen die Phenol-Oxidase-Aktivität und der eintretende Sauerstoff während der Pressung und Mahlung eine große Rolle [Lu und Foo, 1997]. Trotz verschiedener Schutzmaßnahmen, z.B. Ascorbinsäurezugabe, ist das Ausmaß meist nicht unerheblich. Chlorogensäure ist sehr reaktiv und kann nach Oxidation zur chinoiden Form andere phenolische Verbindungen oxidieren [Rechner *et al.*, 1999]. Katechine und Chlorogensäure sind als Substrate für die Phenol-Oxidase bekannt. Während der Aufarbeitung der Äpfel sind die Gehalte nach 30 min schon um 25% gesunken. Phloridzin- und Quercetinglykosidgehalte dagegen ändern sich unter diesen Bedingungen nicht [van der Sluis *et al.*, 2001], sie sind also kein Substrat für die Phenol-Oxidase [van der Sluis *et al.*, 2002].

Phenolverteilung im Apfel

Ein weiterer Faktor für Verluste während der Verarbeitung ist die ungleiche Phenolverteilung im Apfel: während die Flavonolglykoside und Anthocyane fast ausschließlich in der Schale enthalten sind, kommen die Katechine und deren Oligomere zwar hauptsächlich in der Schale vor, zu geringeren Anteilen aber auch in Fruchtfleisch und Kerngehäuse, einschließlich der Samen. Chlorogensäure und Phloretinglykoside befinden sich bevorzugt im Kerngehäuse, jedoch auch im Fruchtfleisch [Mihalev *et al.*, 2004, Thielen *et al.*, 2004]. Dies hat Auswirkungen auf den Polyphenolgehalt des Apfelsafts, da durch die Pressung der überwiegende phenolische Anteil der festen Apfelbestandteile (Schale und Gehäuse), vor allem Proanthocyanidine und Flavonolglykoside, im Trester verbleiben und nicht mit in den Saft überführt werden [Schieber *et al.*, 2001]. Dies führt zu Einbußen von ca. 50% der Polyphenole [Rechner *et al.*, 1999]. Eine weitere Ursache für die ungleiche Überführung der einzelnen Polyphenole ist ihre Wasserlöslichkeit: Chlorogensäure ist am besten wasserlöslich und hat daher den größten Anteil im Saft [van der Sluis *et al.*, 2002]. Mittels so genannter Tresterverflüssigung durch Enzymbehandlung des Pressrückstandes (Trester) mit Pektinasen und Zellulasen lassen sich die im Trester gebundenen Polyphenole herauslösen und in den Trestereextraktionssaft überführen [Will *et al.*, 2000]. Hydroxyzimtsäurederivate wie Chlorogensäure überstehen diese Behandlung nicht und kommen nur noch zu geringen Teilen im Saft vor. Dieser technologische Aspekt wurde durch den Extrakt APE03 in dieser Arbeit mit berücksichtigt.

3.5.3 Herstellung von Apfelsaftextrakt

Bei der Herstellung von Apfelsaftextrakt für diese Arbeit erfolgt zunächst eine Festphasenextraktion der Polyphenole an Adsorberharzen, z.B. XAD16. Zucker, organische Säuren und Mineralien werden durch Spülen mit destilliertem Wasser entfernt. Die Elution phenolischer Substanzen erfolgt mittels 96%igem Ethanol. Der alkoholische Extrakt wird eingeeengt und in die wässrige Phase überführt. Abschließend erfolgt eine Gefriertrocknung. [Will und Dietrich, 2002-2004]

3.5.4 Zusammensetzung der Apfelsaftextrakte

Für die vier Extrakte, die in dieser Arbeit untersucht werden sollten, wurden verschiedene Apfelsorten und Technologien verwendet, um das Polyphenolprofil in seiner Zusammensetzung zu variieren.

Apfelsaftextrakt 01 (AE01)

Ausgangsmaterial des AE01 sind Äpfel der Sorte Boskoop (Tafelapfel) aus der Ernte 2001.

Apfelsaftextrakt 02 (AE02)

Apfelsaftextrakt AE02 entstammt Äpfeln verschiedener Sorten der Ernte 2002, darunter ein hoher Anteil von Mostapfelsorten (25% Topaz, 17,5% Bohnapfel, 22,5% Winterrambur und 15% Bittenfelder, 20% gemischtes Tafelobst).

Trestersaftextrakt 03 (APE03)

Dieser Apfelsaftextrakt APE03 unterscheidet sich von den anderen Apfelsaftextrakten durch seine Herstellungsweise. Der Apfelsaft wurde aus verschiedenen Tafelapfelsorten (Melrose, Granny Smith, Golden Delicious und Jonagold) der Ernte 2003 hergestellt. Der normale Apfelsaft wurde für die Herstellung jedoch nicht berücksichtigt. Stattdessen wurde der gepresste Rückstand (Trester) für zwei Stunden mit Zellularase und Pektinasen behandelt, um die im Trester verbliebenen Polyphenole ebenfalls herauszulösen. Der daraus resultierende „Tresterextraktionssaft“ wurde für die Extraktgewinnung eingesetzt.

Apfelsaftextrakt 04 (AE04)

Apfelsaftextrakt AE04 entstammt einer Mischung von Apfelsäften der Ernte 2002 und 2003. Dabei wurden 250 L des Apfelsaftes von 2002 (identisch mit dem eingesetzten Apfelsaft für AE02), 50 L Tresterextraktionssaft (s. APE03) und je 200 L der naturtrüben Mostapfelsäfte Schafsnase, Bohnapfel und Winterrambur vermischt.

Für die einzelnen Extrakte ergibt sich folgende Zusammensetzung, identifiziert und quantifiziert durch HPLC/DAD in der FA Geisenheim (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Zusammensetzung der eingesetzten Apfelsaftextrakte, persönliche Mitteilung [Will und Dietrich, 2002-2004].

Inhaltsstoffe	AE01 [mg/g]	AE02 [mg/g]	APE03 [mg/g]	AE04 [mg/g]
Σ Quercetinglykoside	7,3	8,9	116,2	12,1
davon Rutin	1,8	2,6	49,1	4,5
Σ Phloretinyglykoside	103,4	127,8	110,6	121,1
davon Phloridzin	34,7	27,9	78,9	48,0
Chlorogensäure	171,8	181,5	19,2	183,2
Kaffeensäure	102,7	4,8	4,0	7,5
Epicatechin	11,8	19,2	17,7	12,5
Katechin	n.n.	n.n.	2,7	n.n.
Proanthocyanidin B1	2,9	7	6,2	n.n.
Proanthocyanidin B2	16,0	15,1	18,4	12,1
3-Cumaroyl-Chinasäure	16,0	9,5	3,0	9,4
4-Cumaroyl-Chinasäure	72,4	77,3	5,0	66,0
5-Cumaroyl-Chinasäure	7,0	10,4	3,8	39,8
Σ bekannte Substanzen	511,3	461,5	310,9	478,3

3.6 Testmethoden

3.6.1 Zellsysteme

3.6.1.1 Caco-2 Zellen

Die Zelllinie Caco-2 entstammt einem menschlichen Adenokarzinom und wurde aus dem Kolon eines männlichen 72-jährigen Kaukasiern gewonnen [DSMZ, 1995]. Sie ist eine adhärent wachsende, d.h. als Monolayer zu kultivierende Zelllinie und zeigt sowohl spezialisierte enterozytische als auch kolonozytische Zellfunktionen. Die Zellen exprimieren viele intestinale Enzyme mit zur normalen Kolonmukosa vergleichbaren Aktivitäten [Duthie und Dobson, 1999]. Ihre geringe Aktivität an Cytochrom P450 ist ähnlich zu humanen Dickdarmzellen. Einige Phase-II- Enzyme zeigen katalytische Eigenschaften, die mit denen des menschlichen Dünndarms vergleichbar sind [Prueksaritanont *et al.*, 1996]. Expressionsraten von UDPGT1A1 und GST sind geringer als in primärem humanen Enterozyten [Petri *et al.*, 2003]. Außerdem sind sie in der Lage, Vitamine, Ionen und Glukose zu transportieren.

Caco-2-Zellen werden üblicherweise in Untersuchungen zu Stoffmetabolismus, Gen-toxizität, Einfluss von Nahrungsbestandteilen auf Eisenverfügbarkeit, Calciumtransport und Bürstensaumenzym-Aktivitäten herangezogen. Trotz einiger Unterschiede zu normalen Darmepithelzellen sind Caco-2 Zellen bis heute das Modell der Wahl zur Untersuchung des intestinalen Transports und zur Toxikologie von Fremdstoffen sowie deren präsystemischen Metabolismus [Sambroy *et al.*, 2001].

3.6.1.2 HT29 Zellen

Die Zelllinie HT29 wurde als erste Kolontumorzelllinie 1964 von Fogh aus einem Adenokarzinom eines 44-jährigen Kaukasiers gewonnen und etabliert. Sie ist ebenfalls adhärent wachsend mit einer Verdopplungszeit von 40-60 h [DSMZ, 1995] und zeichnet sich im undifferenzierten Zustand durch einen hohen Glukosekonsum aus. HT29 Zellen zeigen keinerlei spezifischen Charakteristika von epithelialen Intestinalzellen. Durch Zugabe von Butyrat oder Austausch von Glukose gegen Galaktose lassen sich diese Zellen redifferenzieren, so dass sie ebenfalls einen Bürstensaum und tight junctions ausbilden. [Zweibaum *et al.*, 1991]

Haupteinsatzgebiete dieser Zelllinie sind Untersuchungen zu Glukosemetabolismus und zu Hormonrezeptoren, z.B. EGF, Neurotensin oder Prostaglandine. Durch die Möglichkeit zur Differenzierung eignen sich HT29 Zellen ebenfalls zur Aufklärung molekularer Mechanismen und deren Modulation [Rousset, 1986].

3.6.2 Induktion von moderatem oxidativen Stress

Im *in vitro*-Zellsystem sind Basisschäden meist in derart geringen Mengen vorhanden, dass es mit den gewählten Methoden fast unmöglich ist, verringerte Effekte durch Antioxidanzien zu untersuchen. Daher ist es notwendig, sich einer zusätzlichen Inkubation zu bedienen, in der moderater Stress erzeugt wird. Das Zweistufenprotokoll basiert auf einer Vorinkubation mit den Antioxidanzien und einer anschließenden Behandlung mit dem Oxidans. Dadurch wird zum einen gewährleistet, dass nur die Antioxidanzien Wirkung zeigen, die in die Zelle gelangt sind, und zum anderen verhindert, dass abfangende Reaktionen bereits im Medium stattfinden können. Das Ausmaß des oxidativen Stresses soll in einem Bereich liegen, der auch *in vivo* bei pathologischen Situationen auftreten kann. In Hämodialysepatienten wurden z.B. oxidative Schäden von ca. 10 TI% (tail intensity) und dreimal höhere Malondialdehydkonzentrationen im Plasma gefunden als in gesunden Probanden [Müller *et al.*, 2004]. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Oxidanzien verwendet, die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

3.6.2.1 Menadion

Menadion (2-Methyl-1,4-naphthochinon, Abbildung 3.22) ist ein gut untersuchtes, synthetisches Vitamin-K-Analogon ohne isoprene Seitenkette [Eisenbrand und Schreier, 2005]. Es kann im Darm durch die Mikroflora aus Vitamin K gebildet werden.

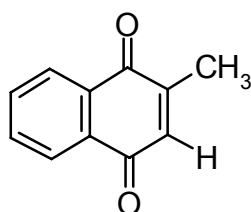


Abbildung 3.22: Strukturformel von Menadion.

Menadion kann wie alle *p*- und *o*-Chinone einer Ein-Elektronen- oder Zwei-Elektronen-Reduktion unterliegen (Abbildung 3.23).

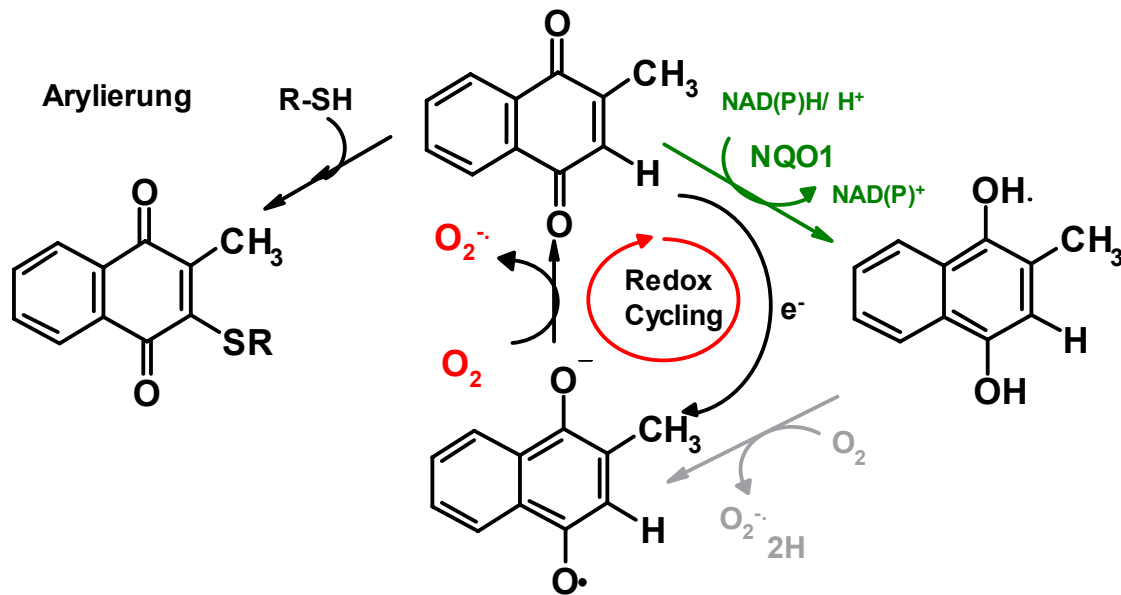


Abbildung 3.23: Redox-Cycling von Menadion nach [Klotz *et al.*, 2002].

Bei der Ein-Elektronen-Reduktion entsteht ein Semichinonradikal. Die Oxidation eines solchen Semichinonradikals durch molekularen Sauerstoff führt zur Regeneration zurück zur Ausgangsverbindung unter gleichzeitiger Bildung eines Superoxidations, das vor allem enzymatisch zu Wasserstoffperoxid dismutiert [Aherne und O'Brien, 2000b, Sun *et al.*, 1997]. In einer sich anschließenden Fenton-Reaktion mit Eisen als Katalysator kann dann das noch viel reaktivere Hydroxylradikal gebildet werden. Bei der Zwei-Elektronen-Reduktion werden die Chinone durch die NADPH-Chinon-Oxidoreduktase 1 (NQO1) (veraltet DT-Diaphorase) zum entsprechenden Hydrochinon umgesetzt, jedoch ohne Bildung des Semichinonradikals. Letzterer Mechanismus bedeutet eine Detoxifizierung der Chinone [Chiou und Tzeng, 2000].

Während z.B. 2,3-Dimethoxy-1,4-naphthochinon nur über das Redox-Cycling seine toxische Wirkung entfaltet, kann Menadion auch über Arylierung oxidativen Stress verursachen. Durch die Adduktbildung mit Glutathion über eine Art Michael-Addition der Sulfhydrylgruppen [Boatman *et al.*, 2000] wird GSH der antioxidativen Abwehr entzogen und andere Elektrophile und ROS können nicht mehr durch GSH abgefangen werden. Die gebildeten GSH-Chinonaddukte können wieder zum Semichinon reduziert werden und damit durch Redox-Cycling Superoxidationradikale bilden [Monks *et al.*, 1992]. Daneben können auch DNA-Methylierungsreaktionen stattfinden [Hargreaves *et al.*, 2000].

Neben Arylierung und Redox-Cycling beeinflusst Menadion verschiedene Stress-responsive Signalkaskaden, z.B. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) oder Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K/Akt-Kaskade) [Abdelmohsen *et al.*, 2003]. Arylierungs-

reaktionen von Menadion mit Cysteinresten von Tyrosinphosphatasen führen zu deren Inaktivierung und zu einer vermehrten Tyrosinphosphorylierung. Dadurch wird die „extrazelluläre Signal-regulierte Kinase“ (ERK1 und ERK 2) aktiviert [Klotz *et al.*, 2002].

3.6.2.2 *tert*-Butylhydroperoxid

tert-Butylhydroperoxid (TBH) ist ein organisches Hydroperoxid (Abbildung 3.24).

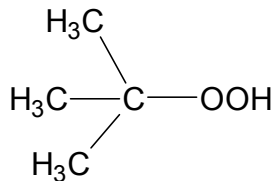


Abbildung 3.24: Struktur von *tert*-Butylhydroperoxid.

Die Toxizität von TBH beruht auf zwei Mechanismen:

1. Reduktion durch GPx nach der Gleichung



Dies führt zu einer Störung der Glutathionhomöostase und zu einer Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration, was letztlich zu Schäden an der Membran führen kann [Bartoli *et al.*, 1994]. Störungen des Calciumgleichgewichts werden häufig in Zellen beobachtet, die oxidativem Stress unterliegen. Ein Teil der Ionen wandert in den Kern, wo Nukleasen aktiviert werden, die DNA-Schäden induzieren. [Meneghini, 1997]

2. Bildung von ROS

Durch Dekomposition des organischen Peroxids kann das Peroxyl- (ROO·) oder das Alkoxyl- (RO·)-Radikal gebildet werden, erleichtert durch Anwesenheit von Metallionen, z.B. Methämoglobin oder durch Cytochrom P-450 (in Mikrosomen). Die beiden Spezies können H· von anderen Molekülen abstrahieren und spielen bei der Lipidperoxidation eine große Rolle. [Halliwell und Gutteridge, 1999] Außerdem kann durch Fenton-Reaktion das hochreaktive HO· gebildet werden [Bartoli *et al.*, 1994]

3.6.2.3 *Fenton-Reagens*

Beim Fenton-Reagens handelt es sich um eine äquimolare Mischung von Wasserstoffperoxid und Eisen-(II)-sulfat. Dabei wird das HO· gebildet (Kapitel 3.2).

3.6.3 Detektion von (oxidativer) DNA-Schädigung

Zur Detektion von DNA-Strangbrüchen wurde in dieser Arbeit die alkalische Einzelzellgelelektrophorese, auch Comet Assay genannt, herangezogen. Der Comet Assay ist zurückzuführen auf eine Beobachtung von Rydberg und Johanson, dass die Zellkerne nach Behandlung von Zellen mit ionisierender Strahlung mit zunehmender Dosis immer diffuser im Mikroskop erschienen [Rydberg und Johanson, 1978]. Ostling und Johanson entwickelten daraus eine Technik, bei der die DNA durch Elektrophorese in Abhängigkeit von der Strahlendosis unterschiedlich weit aus dem Zellkern herausragt [Ostling und Johanson, 1984].

Zur Durchführung des Comet Assay werden die zu untersuchenden Zellen in ein Agarosegel eingebettet und lysiert. Anschließend wird in einer Elektrophoresekammer unter alkalischen Bedingungen die DNA denaturiert (entwunden), eine Elektrophorese durchgeführt, die Objektträger neutralisiert und die DNA mit Ethidiumbromid gefärbt (Abbildung 3.25).

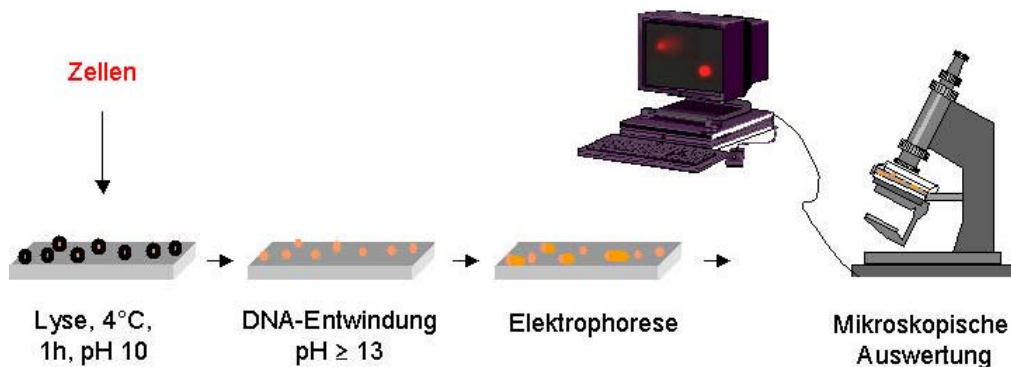


Abbildung 3.25: Durchführung des Comet Assays (schematische Darstellung).

An einem Fluoreszenzmikroskop wird die DNA mit Hilfe einer Digitalkamera Computer-gestützt ausgewertet. Die DNA ungeschädigter Zellkerne erscheint als runder Punkt, geschädigte DNA bildet charakteristische Formen, die Kometen ähneln (s. Abbildung 3.26) und dem Test seinen Namen gaben. Als Maß für die DNA-Strangbrüche wurde die Fluoreszenzintensität im Schweif (Maß für den prozentualen Anteil an DNA im Kometen-Schweif, „tail intensity“, TI%) verwendet.

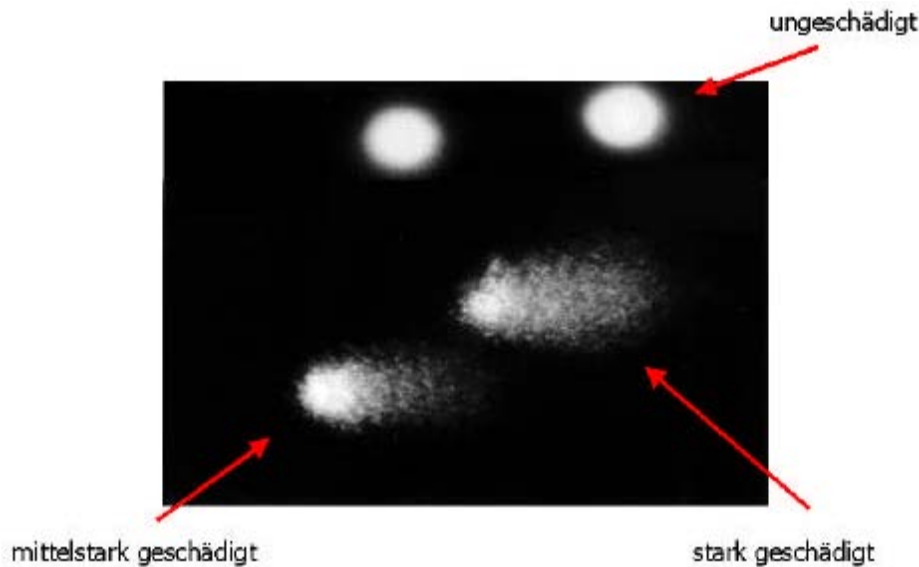


Abbildung 3.26: Beispiele für Kometen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit unterschiedlichem Schädigungsmaß.

Neben der oben beschriebenen Methode können durch Variation des pH-Wertes weitere Informationen über die Art der Strangbrüche erhalten werden [Horvathova *et al.*, 1998]: Bei einer DNA-Denaturierung unter neutralen Bedingungen werden nur DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) erfasst. Im alkalischen Milieu dagegen (DNA liegt in Einzelsträngen vor) werden neben DSB ab einem pH-Wert von 12,1 auch Einzelstrangbrüche (SSB) und ab einem $\text{pH} \geq 13$ alkali-labile Stellen detektiert [Fairbairn *et al.*, 1995]. Der Comet Assay wird mittlerweile überwiegend im alkalischen Milieu ($\text{pH} \geq 13$) durchgeführt [Fairbairn *et al.*, 1995, Kassie *et al.*, 2000, Singh *et al.*, 1988].

Um zusätzlich eine Aussage über das Ausmaß oxidativer DNA-Schäden zu erhalten, ist es möglich, die Zellkerne in den Agarosegelen mit Reparaturenzymen wie Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) oder Endonuklease III zu behandeln. Durch die DNA-Glykosylaseaktivität werden oxidierte Basen (v.a. 8-OxoG durch FPG) sowie deren ringgeöffnete Imidazole herausgeschnitten, wobei eine Lücke verbleibt. Durch die AP-Lyaseaktivität kann nun die Entfernung des Deoxyribosephosphats erfolgen, woraus ein Strangbruch resultiert [Laval, 1996] und zu einer Verstärkung der Schweifintensität führt (Abbildung 3.27). Die Differenz aus Strangbrüchen nach Enzymbehandlung und direkten Strangbrüchen (ohne Enzymbehandlung) entspricht den spezifisch oxidativen DNA-Schäden. [Collins, 2000]

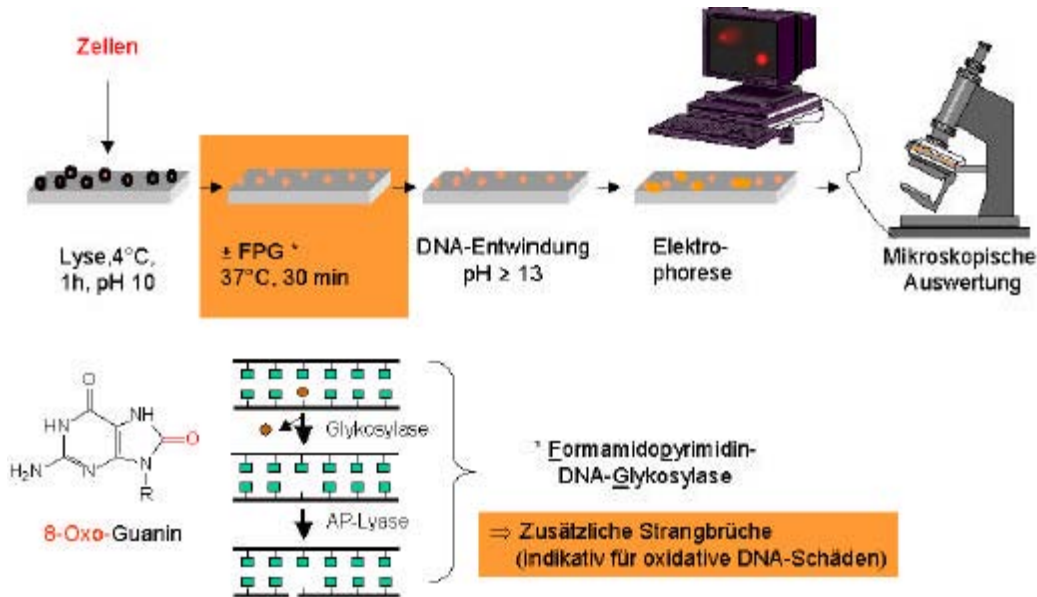


Abbildung 3.27: Durchführung des Comet Assays zur Detektion von Gesamtschäden (schematische Darstellung).

3.6.4 Dichlorofluorescein (DCF)-Assay

Der DCF-Assay ermöglicht die Detektion von ROS in der Zelle. Er beruht auf der Oxidation des Fluoreszenzfarbstoffs Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA, Strukturformel siehe Abbildung 3.28). Entwickelt wurde diese Methode von Keston und Brandt zur Detektion von Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Peroxidase in einem zellfreien System [Keston und Brandt, 1965]. Die Messung intrazellulärer ROS in lebenden Zellen erfolgte im DCF-Assay erstmals durch [Bass *et al.*, 1983]. Seitdem wurde diese Methode häufig eingesetzt, um intrazelluläre ROS mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie sowie in neueren Arbeiten fluorimetrisch (Plattenphotometer) [Wang und Joseph, 1999] zu detektieren. Auch wenn die Spezifität des Tests nicht geklärt ist [Frank *et al.*, 2000], ist dieser Assay eine Screening-Methode, die in Verbindung mit anderen Markern eine Aussage über das Ausmaß oxidativer Zellschädigung und deren Modulation durch Antioxidanzien zulässt.

Prinzip der Methode

Der unpolare, nicht fluoreszierende Farbstoff Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA) diffundiert durch die Zellmembran ins Innere der Zelle und wird dort durch intrazelluläre Esterasen zu der nicht fluoreszierenden Substanz Dichlorofluorescein (DCFH) deacetyliert. DCFH wird durch ROS zu dem fluoreszierenden Farbstoff Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert (Abbildung 3.28). Aufgrund seiner höheren Polarität kann der Farbstoff die Zellmembran nicht passieren und verbleibt in der Zelle. Der Farbstoff

wird bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 525 nm gemessen [LeBel *et al.*, 1992].

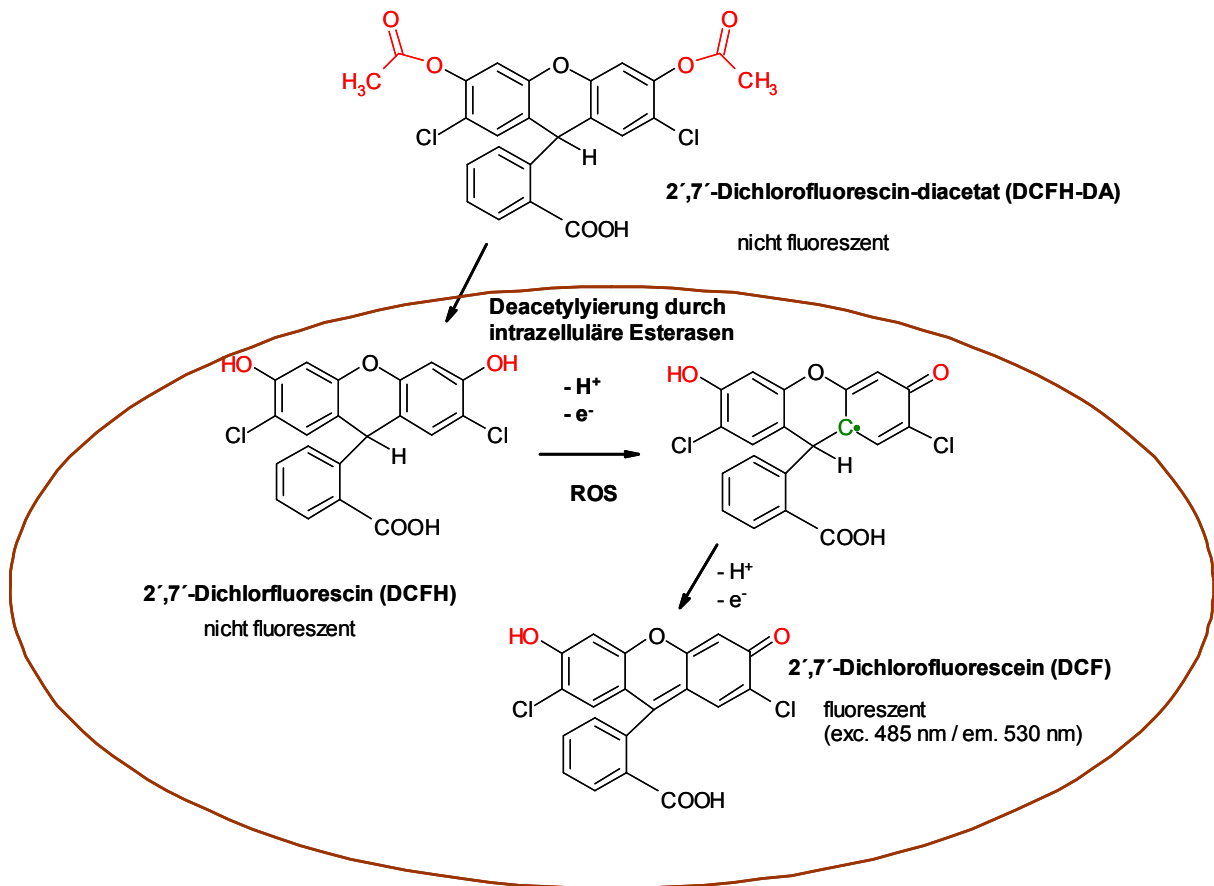


Abbildung 3.28: Reaktionen von DCFH zur der fluoreszierenden Form DCF, nach [LeBel *et al.*, 1992]

Die Vermutung, dass die im DCF-Assay ermittelte Fluoreszenz direkt proportional zur Konzentration von Wasserstoffperoxid ist, wurde in den letzten Jahren mehrfach widerlegt. Der Farbstoff reagiert nicht spezifisch mit einer bestimmten reaktiven Sauerstoffspezies, vielmehr stellt er einen Detektor für eine Reihe oxidierender Reaktionen dar [Hempel *et al.*, 1999]. Im Gegensatz zum Hydroxylradikal [Myhre *et al.*, 2003, Zhu *et al.*, 1994] kann Wasserstoffperoxid alleine DCFH nicht direkt zu DCF oxidieren, dazu ist die Anwesenheit von Peroxidase [Halliwell und Gutteridge, 1999, Myhre *et al.*, 2003, Rota *et al.*, 1999] oder Eisenionen [Crow, 1997] notwendig. Der DCF-Assay bietet also die Möglichkeit, den Redoxstatus der Zelle zu erfassen und die Modulation von ROS unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen [Wang und Joseph, 1999]. Er lässt jedoch keine Aussage zu, welche ROS im Testsystem vorliegen.

3.6.5 Glutathionbestimmung

Der Glutathiongehalt in Zellen wurde mit einem Verfahren bestimmt, das sich an die Bestimmung von Akerboom und Sies anlehnt und von Gallagher *et al.* modifiziert wurde [Akerboom und Sies, 1981, Gallagher *et al.*, 1994]. Bei diesem Verfahren wird der Gesamtglutathiongehalt über einen kinetischen Test bestimmt, in dem GSH, GSSG und Glutathionreduktase (GSR) kontinuierlich in einer NADPH-abhängigen Reaktion 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) zum chromophoren 5-Thio-2-Nitrobenzoat (TNB) reduzieren (Abbildung 3.29).

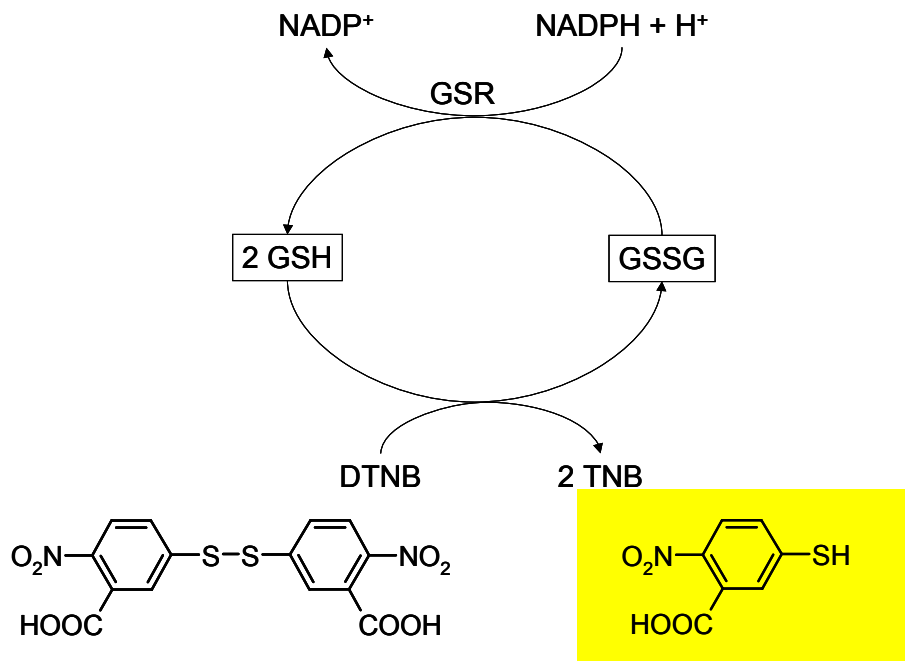


Abbildung 3.29: Schematische Darstellung der Reaktion von GSH mit DTNB.

Die Bildung von TNB kann über die Extinktion bei 412 nm zeitlich verfolgt werden. Die Geschwindigkeit der TNB-Bildung, also die Extinktionszunahme in einer bestimmten Zeit, ist proportional zur tGSH-Konzentration, da alle übrigen Reaktionspartner (NADPH, GSR, DTNB) in einem deutlichen Überschuss vorhanden sind. Die Berechnung der tGSH Konzentration erfolgt durch Vergleich mit entsprechenden Standardlösungen.

Zur Messung von GSSG wird GSH mit dem Nukleophil 2-Vinylpyridin kovalent gebunden (Abbildung 3.30) und anschließend die oben beschriebene Messung durchgeführt. Durch Differenzbildung werden der GSH-Anteil und der GSH-Status (Quotient GSH/tGSH) berechnet.



Abbildung 3.30: Derivatisierung von GSH durch Reaktion mit 2-Vinylpyridin.

3.6.6 Bestimmung der Lipidperoxidation

Zur Bestimmung von Malondialdehyd (MDA) als ein Marker der Lipidperoxidation wird die Thiobarbitursäurereaktion verwendet. Hierbei reagiert ein Molekül MDA mit zwei Molekülen Thiobarbitursäure unter Bildung eines pink fluoreszierenden Komplexes (Abbildung 3.31).

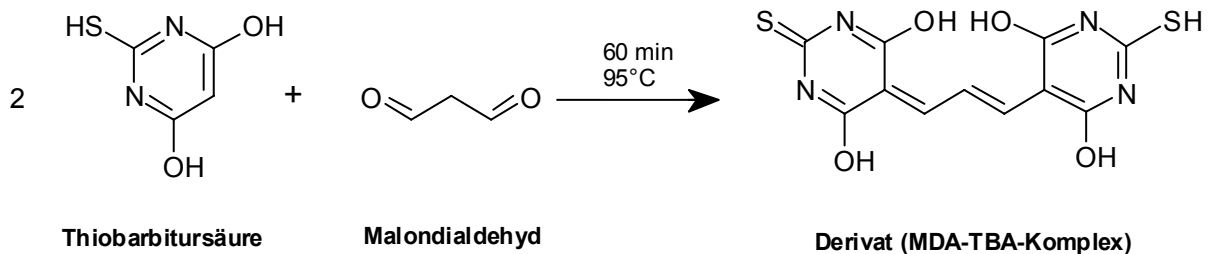


Abbildung 3.31: Derivatisierung von Malondialdehyd mit Thiobarbitursäure.

Neben MDA reagieren auch andere Verbindungen mit TBA, die zusammengefasst als Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) bezeichnet werden. Zu ihnen zählen andere Aldehyde sowie Strukturen, die nicht bei der LPO entstehen, z.B. Ketone, Ketosteroide Säuren, Ester, Zucker, Imide und Amide, u.a. [Guillen-Sans und Guzman-Chozas, 1998], so dass die fluorimetrische Bestimmung der TBARS sehr unspezifisch ist. Eine spezifische Erfassung des MDA gelingt nach flüssigkeitschromatographischer Auftrennung (HPLC, Fluoreszenzdetektor: Anregung. 532 nm, Emission. 553 nm) [Draper *et al.*, 1993].

Ist eine Kettenreaktion im Gange, laufen auch nach Oxidansinkubationen unspezifische Reaktionen weiter. Durch Zugabe eines Antioxidans, z.B. *tert*-Butylhydroxytoluol (BHT) nach der Inkubation verhindert solche Reaktionen und es wird nur der MDA/TBARS-Gehalt gemessen, der durch die Oxidansinkubation induziert wird [Draper *et al.*, 1993].

3.6.7 Bestimmung der antioxidativen Kapazität

Eine Reihe zellfreier Tests ermöglichen es, Aussagen über die Effektivität der einzelnen antioxidativ wirksamen Substanzen zu machen. Diese Tests basieren auf der

Generierung eines meist farbigen, stabilen, langlebigen Radikals, welches im Verlauf des Assays abgefangen oder durch Anwesenheit des Antioxidans verzögert gebildet wird.

Zu diesen Tests gehören:

- TRAP (**T**otal peroxy **r**adical trapping **p**otential) [Frankel und Meyer, 2000]
- ORAC (**O**xxygen **r**adical **a**bsorbance **c**apacity) [Cao *et al.*, 1997]
- FRAP (**F**erric reducing **a**ntioxidant capacity of **p**lasma) [Frankel und Meyer, 2000]
- DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical assay [Burda und Oleszek, 2001]
- Superoxide Anion Scavenging [Frankel und Meyer, 2000]
- CUPRAC (**C**upric reducing **a**ntioxidant **c**apacity) [Apak *et al.*, 2004]
- TAC (**T**otal **a**ntioxidant **c**apacity) [Kampa *et al.*, 2002]
- TEAC (Trolox equivalent antioxidative capacity) [Miller *et al.*, 1993, Re *et al.*, 1999]

Der TEAC-Test wurde in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Er beruht auf der Generierung des stabilen ABTS-Radikals durch die Oxidation von 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat):

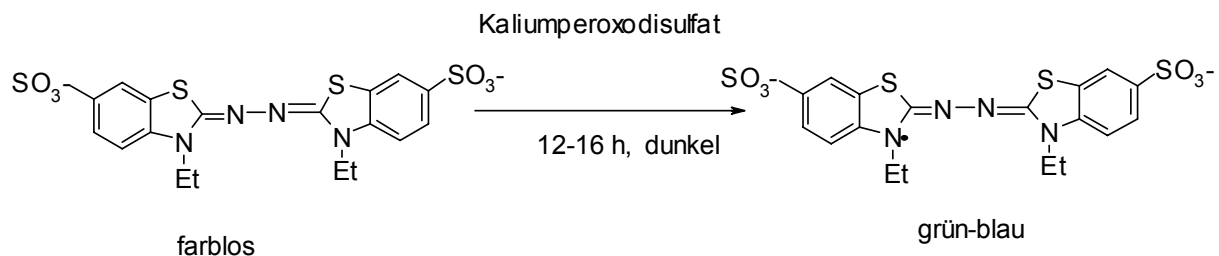


Abbildung 3.32: Oxidation von ABTS.

Die Generierung dieses langlebigen Radikals kann auf zwei Wegen erfolgen. ABTS kann mit Metmyoglobin in einer Pufferlösung gemischt werden, zum Starten der Reaktion wird anschließend H_2O_2 hinzu gegeben [Miller *et al.*, 1993] Alternativ kann ABTS zusammen mit Kaliumperoxodisulfat ($K_2S_2O_8$) in Wasser gelöst werden [Re *et al.*, 1999].

Das ABTS-Kation hat drei Absorptionsbanden mit Maxima bei 645, 734 und 815 nm. Zur Bestimmung des TEAC-Wertes wird dieses zum Antioxidans gegeben. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass nur die Fähigkeit zum Abfangen des Radikals beobachtet wird. Bei früheren Tests wurde ein langlebiges Radikal erst in Gegenwart der Antioxidanzien generiert. Dies kann zu einer Überschätzung der antioxidativen

Kapazität der jeweiligen Substanzen führen, da bei diesen Assays zusätzlich die Inhibition der Radikalbildungsreaktion erfasst wird. So kommt es dazu, dass auch bei Substanzen, die eigentlich nicht in der Lage sind, Radikale abzufangen, eine antioxidative Kapazität festgestellt wurde (z.B. KCN) [van den Berg *et al.*, 1999].

Beim TEAC-Test wird Trolox, ein wasserlösliches Vitamin E-Analogon, als Vergleichssubstanz verwendet. Der TEAC-Wert gibt an, welche Konzentration Trolox [mM] nötig ist, um dieselbe Wirksamkeit zu erreichen wie eine Lösung der Konzentration 1 mM (Reinsubstanzen) oder 1 mg/ml (Mischungen) der untersuchten Probe [Pellegrini *et al.*, 1998].

Während des Messzeitraums finden sowohl schnelle als auch langsame Radikalabfangreaktionen statt. Zur Standardisierung wurde ein einheitlicher Messzeitraum von 6 min gewählt, um die einzelnen Antioxidanzien miteinander vergleichen zu können. [Re *et al.*, 1999]

3.6.8 Wachstumshemmung

Wie bereits in Kapitel 3.4.6.3 beschrieben haben Flavonoide/Polyphenole Einfluss auf das Zellwachstum. Zur Kontrolle des Wachstums wurde diese orientierend bestimmt mittels des Sulforhodamin-B-Tests (SRB-Test). Der Test basiert auf einer schnellen und empfindlichen Messung des zellulären Proteingehaltes adhären wachsender Zellkulturen.

Zur Proteinbestimmung wird der stark pinkfarbene Aminoxanthan-Farbstoff Sulforhodamin-B eingesetzt (Abbildung 3.33).

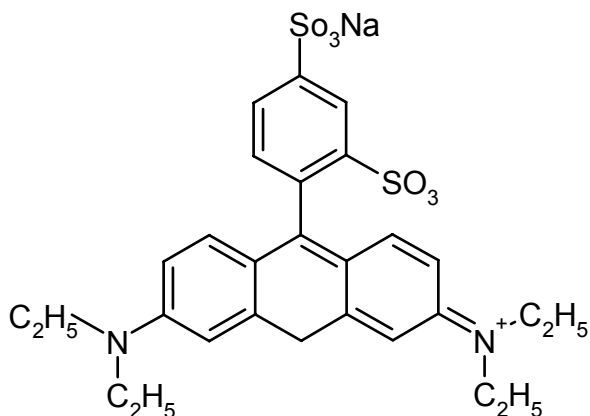


Abbildung 3.33: Struktur des Farbstoffs Sulforhodamin B.

Im Sauren bindet Sulforhodamin-B stabil und mit hoher Empfindlichkeit an Proteine [Skehan *et al.*, 1990]. Der Vorteil des SRB-Tests im Vergleich zu anderen Verfahren, wie

zum Beispiel dem Tetrazolium-Test (MTT), liegt in der besseren Linearität zur Zellzahl, der höheren Sensitivität und Reproduzierbarkeit [Keepers *et al.*, 1991].

3.6.9 Stabilität von Polyphenolen unter Inkubationsbedingungen

Flavonoide und Polyphenole zeigen aufgrund ihrer aromatischen phenolischen Struktur charakteristische Absorptionsbanden im UV-Bereich, die photometrisch bzw. mittels HPLC UV/Vis-Detektion ermittelt werden können [Schieber *et al.*, 2001]. Diese Art der Detektion ist gängig in der Polyphenolanalytik. Wie bereits in Kapitel 3.4.7.2 erwähnt, unterliegen die untersuchten Strukturen unter physiologischen pH-Bedingungen und in wässriger Lösung Abbau-, Umlagerungs- und Kondensationsreaktionen. Insbesondere Zellkulturbedingungen begünstigen Oxidationsreaktionen durch den dort herrschenden erhöhten Sauerstoff-Partialdruck. Bei längeren Inkubationszeiten muss damit gerechnet werden, dass die Ausgangsstrukturen nicht stabil sind, und evtl. neu entstehende Produkte für die biologische Wirksamkeit ebenfalls bedeutsam sind. Vergleicht man die Chromatogramme von Inkubationen in An- und Abwesenheit von Zellen, so lassen sich durch das Auftreten neuer Peaks Aussagen über Zelleinflüsse auf die Substanz (z.B. metabolische Aktivität) treffen.

Für eine genaue Identifizierung neu entstehender Strukturen kann man sich der UV/Vis-Detektion über einen Wellenlängenbereich (DAD) oder der LC-MS-Technik bedienen.

4 Materialien und Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Materialien

Geräte

Brutschrank:	Heraeus Cytoperm BBD 6220 WTC (Binder)
Sterilbank:	Heraeus Instruments Herasafe HS 12 Heraeus Instruments Laminair HLB 2472 BS
Mikroskop:	Auflicht, Zeiss
Zentrifugen:	Heraeus Instruments Biofuge fresco Sigma 3-1
Biofreezer:	Herafreeze (Heraeus)
Multipette:	(Eppendorf, Abimed)
Pipettierhilfe:	Pipettus-Akku (Technomara)
Ultraschallbad:	SONOREX RK 100 (Bandelin)
Wasserbad:	Julabo SW-20C

Chemikalien/Nährlösungen

Medium:	- Caco-2: Dulbecco's MEM/Nutrient-Mix F12 (DNM) (Gibco) - HT29, primäre Kolonzellen: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco)
Zusätze:	- 5 mL Penicillin/Streptomycin (Gibco/Invitrogen: 10.000 units/mL Penicillin G Natrium; 10.000 units/mL Streptomycin-sulfat) - 25-100 mL Fetales Kälberserum (FKS) (Gibco, Invitrogen)
Viabilität:	- Trypanblaulösung:(Sigma), mit Zellsuspension 1:1 verdünnen - Neubauer-Zählkammer

Trypsin, 3,5 U/mg (Serva)

EDTA, NaCl, KCl, NaOH, KH_2PO_4 , Methanol, jeweils p.A.-Qualität (Merck)

Na_2HPO_4 , p.A. (Riedel-de-Häen)

Ethanol, p.A., HEPES (Roth)

DMSO für die UV-Spektroskopie (Fluka)

NaHCO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, Glukose (Merck)

Verbrauchsmaterialien: Gewebekulturflaschen, Kryoröhrchen steril, PP-Röhrchen 15 ml, 50 mL steril, 1,5 bzw. 2,2 mL Reaktionsgefäße, Gewebekulturschalen 94/16 mm, 60/15 mm, steril Wellplatten (96, 24), Pipettenspitzen (Greiner, Sarstedt)

Sterilfilter 0,2 μm , (Sartorius)

Spritzen, Kanülen (Braun)

PBS (Stammlösung 10x): - 90 g NaCl

- 7,26 g Na_2HPO_4

- 2,1 g KH_2PO_4

mit aqua bidest. auf 1L auffüllen; pH 7,2-7,4
vor Gebrauch 1/10 verdünnen und steril autoklavieren

Trypsin/EDTA: - 125 mg Trypsin (3,5 U/mg, Serva)

- 65,5 mg EDTA

auf 250 mL mit PBS auffüllen, kalt rühren lassen, pH =7,2

4.1.2 Kultivierung

Das Arbeiten mit Zellkulturen erforderte sterile Bedingungen. Die Kultivierung erfolgte in Kulturflaschen als Monolayer im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit.

4.1.2.1 Mediumwechsel

Ziel der Zellkultur ist es, den Zellen möglichst gute Wachstumsbedingungen zu bieten und die Vitalität zu erhalten. Im Laufe der Kultivierung entstehen einerseits saure

Ausscheidungsprodukte der Zellen sowie Zerfallsprodukte des Mediums, die das Wachstum der Zellen beeinträchtigen können.

Spätestens nach Farbumschlag des Mediums (Phenolrotindikator) von rot nach gelb wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um tote Zellen und Stoffwechselprodukte zu eliminieren. Dazu wurde das Medium abgegossen und die Zellen einmal mit PBS-Lösung gespült. Anschließend kultivierte man mit ca. 50 mL Kulturmedium. [Lindl, 2000]

4.1.2.2 *Subkultivierung*

Wenn Zellen zu dicht wachsen, verändert sich ihr Stoffwechsel. Einzelne Zellen sterben ab oder hören auf, sich zu teilen (Kontaktinhibition). Ist der Boden der Kulturflasche mit Zellen konfluent bewachsen, war es notwendig, die Zellen zu subkultivieren (=passagieren). Die Passagehäufigkeit hängt dabei von der Generationszeit der jeweiligen Zelllinie ab. Für die in dieser Arbeit verwendeten HT29 bzw. Caco-2 Zellen beträgt die Verdopplungszeit ca. 80 h. Für eine Passage wurde das Medium abgegossen und die Zellen zwei- bis dreimal mit PBS-Lösung gespült, um tote Zellen und Mediumreste zu entfernen. Die Zellen wurden mit ca. 2 mL Trypsinlösung bei 37°C bis zum beginnenden Ablösen inkubiert und dann durch vorsichtiges Abklopfen vom Boden gelöst. Durch Zugabe von 5 mL FKS-haltigem Medium wurde das Trypsin inaktiviert, da eine zu lange Behandlung mit dem Verdauungsenzym ein Absterben der Zellen zur Folge hat. Die Zellsuspension wurde anschließend durch mehrmaliges Resuspendieren mit einer Pipette gut durchmischt und die Zellen dadurch vereinzelt. Anschließend streute man in eine neue Flasche je nach Bedarf eine entsprechende Anzahl von Zellen aus und kultivierte mit 50 mL frischem Kulturmedium.

4.1.2.3 *Einfrieren von Zellen*

Da die Lebenszeit von Zellen im Tiefkühlschrank bei -80°C bzw. im flüssigen Stickstoff begrenzt ist, sollte der Vorrat an Zellen regelmäßig erneuert werden, d.h. eingefrorene Zellen in Kultur bringen und mit wenigen Passagen wieder einfrieren. Eine konfluent gewachsene Kulturflasche wurde mit minimaler Menge Trypsin-EDTA-Lösung behandelt und mit möglichst wenig Medium abgestoppt, um die Zellsuspension konzentriert zu halten. Eine entsprechende Anzahl an Kryo-Tubes wurde mit 150 µL FKS und 150 µL DMSO und 1.200 µL Zellsuspension gefüllt. Die Zellzahl sollte sich bei ungefähr einer Million pro Kryo-Röhrchen bewegen. Die Zugabe von DMSO war trotz seiner Zytotoxizität unerlässlich, da es die Kristallbildung innerhalb

und außerhalb der Zelle sowie die partielle Dehydratation des Zytoplasmas verhindert [Lindl, 2000].

Zunächst wurden sie bei -20°C, am folgenden Tag bei -80°C eingelagert. Zur längerfristigen Lagerung ist flüssiger Stickstoff günstiger.

4.1.2.4 Auftauen von Zellen

Um die Zellen in Kultur zu bringen, mussten die Zellen aus dem Tiefkühlschrank aufgetaut werden. Dies sollte möglichst schnell passieren, um die toxische Wirkung des zugesetzten DMSO gering zu halten. Deshalb wurden die Kryoröhrchen bei 37°C angetaut und sobald sich die Suspension vom Rand löst in ein PP-Röhrchen mit 10-12 mL vorgewärmtem Medium gegeben und dann abzentrifugiert (1.500 Upm, 3 min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit etwas Medium wieder aufgenommen. Das Einsäen erfolgte in 25 cm²- Kulturflaschen. Am nächsten Tag sollte unbedingt ein Mediumwechsel erfolgen, damit die toten und stark geschädigten Zellen entfernt wurden und das Wachstum der lebenden Zellen nicht beeinträchtigt wird. [Lindl, 2000]

4.1.2.5 Kontrolle der Zellkultur auf Mykoplasmen

Mykoplasmen sind die kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryonten, die parasitär in enger Vergesellschaftung mit Pflanzen- oder Tierzellen leben. Sie sind wechselnd in ihrer Morphologie und leicht verformbar, ihre Größe schwankt zwischen 0,2 µm und 2 µm. Dementsprechend sind sie in der Lage, die üblichen Sterilfilter aus Cellulose- und Polyvinylidderivaten der Kulturflaschen (Porengröße 0,2 µm) zu passieren und so in die Zellkultur zu gelangen. Mykoplasmen sind in der Zellkultur unerwünscht, da sie nicht nur die Zellen und deren Stoffwechsel verändern, sondern auch die Ergebnisse von Versuchen beeinträchtigen können.

Als Nachweismethode für Mykoplasmenkontaminationen hat sich die Fluorochromierung mit DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) bewährt. Die DNA der Mykoplasmen und der Zellen wird mit DAPI/Sulforhodamin 101-Lösung angefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop erscheint die DNA der Mykoplasmen als kleine, hell leuchtende Punkte auf oder in den Zellen, deren Zytoplasma rot leuchtet. Zur Durchführung des Nachweises wurden wenige Tropfen der zu untersuchenden Zellsuspension auf einem sterilen Objektträger in einer bereits mit Medium gefüllten 94 mm Petrischale ausgestreut und für mindestens 24 h im Brutschrank kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen werden mit eiskaltem Methanol gespült

und anschließend mindestens 30 min in eiskaltem Methanol bei -20°C fixiert. Nach dem Trocknen wurden die Zellen mit 40 μL DAPI-Lösung angefärbt, mit einem Deckglas bedeckt und anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregung bei 365 nm betrachtet. Im Fall einer Mykoplasmenkontamination wurden die Zellen nach Herstelleranweisung mit BM Cyclin[®] (Roche) behandelt.

4.2 Isolierung von primären humanen Kolonzellen

4.2.1 Materialien

Collagenase P (Boehringer Mannheim)

Proteinase K (Roche)

DMEM-Medium: Dulbecco`s Modified Eagle Medium high Glucose, ohne Pyruvat
+ 584 mg/l L-Glutamin

HBSS: 6,3 g NaCl
 0,32 g KCl
 0,27 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
 0,15 g KH_2PO_4
 1,81 g NaHCO_3

3,58 g HEPES

1,5 g Glukose H_2O

mit aqua bidest. auf 1 L auffüllen

4.2.2 Isolierung der primären Kolonzellen

Primäre humane Kolonzellen wurden aus Biopsieproben des *colon sigmoideum* in Kooperation mit dem Westpfalzlinikum Kaiserslautern gewonnen. Die Gewebeproben wurden nach ihrer Entnahme in HBSS-Lösung bei 4°C aufbewahrt und danach innerhalb von zwei bis vier Stunden aufgearbeitet. Die Isolierung der Zellen lehnt sich an die von Pool-Zobel *et al.* veröffentlichte Methode an [Pool-Zobel *et al.*, 1999]. Das Gewebe wurde zunächst mechanisch mittels einer Schere zerkleinert. Die zerkleiner-

ten Gewebeproben wurden mit einer Enzymlösung, die aus Proteinase K (6 mg/mL HBSS) und Collagenase (3 mg/mL HBSS) besteht, in ein Zentrifugationsröhrchen mit rundem Boden (12 mL) überführt, Schere und Uhrglas wurden mit je 0,5 mL HBSS abgespült und die Spüllösung ebenfalls in das Röhrchen eingebracht. Die Desintegration erfolgte bei 37°C im Schüttelwasserbad für 40-60 min, alle 10 min wurde zusätzlich die Suspension mit einer Pipette gemischt. Anschließend wurde die Zellsuspension auf 10 mL mit HBSS verdünnt, durchmischt und bei 20-25°C 10 min bei 2.500 Upm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 mL DMEM (ohne FKS) resuspendiert. Nach der Zellzahl- und Viabilitätsprüfung wurde jeweils $2,5 \cdot 10^5$ bzw. $1,25 \cdot 10^5$ Zellen zum Versuch eingesetzt.

4.3 Zellinkubation

4.3.1 Materialien

Quercetin-Dihydrat, > 99% (Riedel-de Haen)

Phloretin (ungefähr dünnschichtchromatographisch rein, Roth)

Menadion (>97% HPLC), TBH (70% in Wasser), (-)-Epicatechin (>90% HPLC), Rutin (>95% HPLC), Chlorogensäure (>95%), Kaffeesäure (>98%) , Phloridzin-Dihydrat (>99% HPLC), Eisen-(II)-Sulfat (Sigma, Aldrich)

Dimethylsulfoxid (DMSO) für die UV-Spektroskopie (Fluka)

Wasserstoffperoxid 30% (Riedel-de Haen)

Für die Oxidans- und Kolonbiopsieinkubation wurde serumfreies Medium (= S-Med) bzw. PBS, bei den Antioxidans-Inkubationen wurde, soweit nicht anders angegeben, ein um die Hälfte FKS reduziertes Medium (= Inkubationsmedium, „I-Med“) verwendet. Für die Versuche wurden Zellpassagen zwischen 20 und 48 herangezogen. Der Lösungsmittelanteil (DMSO) betrug in Suspensionskultur 1% (v/v), in Monolayerkultur 0,1% (v/v).

4.3.2 Substanzen

Reinsubstanzen

Die Stammlösung war 100 mM, in Einzelfällen 300 mM in DMSO. Daraus wurden, ebenfalls in DMSO, Verdünnungen hergestellt, so dass Lösungen von 30, 10, 3, und

1 mM entstanden. In einzelnen Versuchen wurden entsprechende kleinere Stammlösungen/Verdünnungen hergestellt.

Apfelsaftextrakte

Die Apfelsaftextrakte wurden in DMSO gelöst, wobei die Stammlösung 250 mg/mL betrug. Diese wurden jeweils verdünnt zu 100, 50, 10 und 5 mg/ml, in einzelnen Versuchen entsprechend weiter.

Rekonstituierte Mischungen

Die Mischungen wurden hergestellt, indem entsprechend konzentrierte Lösungen der Einzelstoffe in DMSO angesetzt wurden und nach ihrem Anteil im Extrakt zu einer Lösung pipettiert wurden (Tabelle 4.1)

Tabelle 4.1: Pipettierschema der rekonstituierten Mischungen (rAEs), Lösungen hergestellt in DMSO.

Einzelstoff (c [mg/mL])	rAE01 [µL]	rAE02 [µL]	rAPE03 [µL]
Rutin (125)	7,3	8,9	116,2
Phloridzin (250)	51,9	63,9	55,3
Chlorogensäure (250)	85,9	90,8	9,6
Kaffeensäure (250)	51,4	2,4	2,0
Epicatechin (125)	11,8	19,2	17,7
+ DMSO	41,7	64,9	49,2
≈ Konz. [mg/mL]	397,0	342,2	246,1

Durch Verdünnen mit DMSO wurden die Lösungen auf 250 mg/mL gebracht und entsprechend den Versuchen weiter verdünnt und eingesetzt.

Menadion

Die Stammlösung betrug 20 bzw. 3-5 mM bei Endkonzentrationen (0,1% DMSO) 20 µM bzw. 3-5 µM; bei den Versuchen in Zellsuspensionen war die Stammlösung entsprechend um einen Faktor 10 kleiner, da der Lösungsmittelanteil im Medium 1% (v/v) betrug.

4.3.3 Zellinkubationen für Comet Assay, GSH-, MDA-Bestimmung

Für Caco-2-Inkubationen im Comet Assay wurde eine Zellzahl von $2,5 \cdot 10^5$ Zellen, für die HT29-Inkubationen $1 \cdot 10^6$ Zellen verwendet. Für die anderen Zellversuche (GSH, Lipidperoxidation) wurden $5 \cdot 10^5$ bis $1 \cdot 10^6$ Caco-2 Zellen in 94 mm und bis zu $1,5 \cdot 10^6$ HT29 Zellen in 60 mm Zellkulturschalen eingesetzt.

Bei der Oxidans-Charakterisierung erfolgte die Inkubation in 10 mL-Reaktionsgefäßen bei 37°C im Wasserbad. Bei dem zweistufigen Inkubationsprotokoll mit Flavonoiden bzw. Apfelsaftextrakten in Anlehnung an die Versuche von Aherne und O'Brien wurden die Zellen in Petrischalen ausgesät und 24 h anwachsen gelassen [Aherne und O'Brien, 2000b].

1. Stufe: Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurde das Inkubationsmedium mit den Testsubstanzen in gewünschter Konzentration dazugegeben und entsprechende Zeit im Brutschrank inkubiert.

2. Stufe: Die Zellen wurden erneut zweimal mit PBS gewaschen, um Reste der Testsubstanzen aus Stufe 1 zu entfernen. Nun wurde das serumfreie Medium bzw. PBS mit den enthaltenen Oxidanzien zugegeben und im Brutschrank inkubiert. [Aherne und O'Brien, 2000b, Aherne und O'Brien, 1999]

Danach wurden die Zellen mit 250 µL bzw. 500 µL Trypsin/EDTA-Lösung trypsinisiert und nach zwei bis drei Minuten mit gleicher Menge N-Medium abgestoppt. Inkubationen mit PBS hatten eine Ablösung der Zellen zur Folge. In diesem Falle entfiel der Trypsinierungsschritt, stattdessen wurde nach erfolgter Inkubation 1 mL N-Med in die Petrischale gegeben und entsprechend weiter verfahren. Die Zellen wurden nun mit einer Eppendorff-Pipette resuspendiert und in 2 mL-Reaktionsgefäße (bei großen Petrischalen in 15 mL-PP-Röhrchen) überführt. Danach wurden mit zweimal 500 µL S-Med die verbliebenen Zellen abgeschabt und wiederum in das Gefäß überführt. Nach Mischen wurde 25 µL für die Viabilität entnommen und der Rest wurde entsprechend weiter aufgearbeitet. Bei Versuchen zur Modulation der Grundschädigung entfiel die 2. Stufe und die Zellen wurden sofort nach Waschen mit PBS trypsinisiert.

4.3.3.1 *Zweistufenprotokoll für primäre Kolonzellen*

Für die Oxidans-Charakterisierung wurde wie oben beschrieben, in 10 mL-Röhrchen für eine Stunde im Wasserbad (37°C) inkubiert. Da bei der zweistufigen Arbeitsweise mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte notwendig waren, war der Zellverlust während der Inkubation so groß, dass am Ende keine Zellen mehr für eine aussagekräftige Auswertung vorhanden waren. Die Inkubation wurde, wie im Folgenden be-

schrieben, so modifiziert, dass sich dieser Verlust weitgehend verhindern ließ. Aufgrund der niedrigen Zellzahl wurde beim Comet Assay auf die Erfassung der Grundschädigung verzichtet und nur der Gesamtschaden (Grund- plus oxidativer DNA-Schaden) betrachtet.

$1,25 \cdot 10^5$ Zellen wurden nach Isolierung in je zwei 1,5 mL-Reaktionsgefäße pro Konzentration aliquotiert und auf 500 μ L Medium aufgefüllt, indem sich schon die gewünschte Inkubationssubstanz, gelöst in DMSO, befindet (Endkonzentration DMSO 1%). Nach kurzem Schütteln wurden die Reaktionsgefäße im Thermomixer bei 37°C und 700 Upm für 2 h belassen. Nach Inkubation wurden die Proben bei Raumtemperatur 20 min (2.500 Upm) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig unter Beobachtung des Pellets mit einer Pipette abgesaugt. Die Zellen wurden nun mit 500 μ L HBSS gewaschen und noch mal zentrifugiert. Nach erneutem Absaugen des HBSS mit der Pipette wurden 500 μ L des Menadion-enthaltenden Mediums (Kontrolle nur DMSO, 1%) in das Reaktionsgefäß gegeben und erneut im Thermomixer für 1 h inkubiert. Nach dieser Stunde wurden die Zellen auf Eis gestellt und wiederum bei 2.500 Upm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums mit einer Pipette wurde das Pellet sofort in Agarose aufgenommen und wie in Kapitel 4.4 beschrieben aufgearbeitet.

4.3.3.2 *Postinkubation zur Erfassung der DNA-Reparatur*

Um die Wirkung der Flavonoide/Polyphenole auf die DNA-Reparaturleistung der Zelle zu ermitteln, wurde nach der in 4.3.3 beschriebenen Zellinkubation eine Postinkubation mit Nährmedium nachgeschaltet, wie bei [Aherne und O'Brien, 2000a] beschrieben, und entsprechend aufgearbeitet. Für die Reparaturversuche wurden 14 Ansätze für eine bzw. 20 für zwei Substanzen mit je $1 \cdot 10^6$ HT29 Zellen ausgesät und 24 h anwachsen gelassen. Pro gewählte Nachinkubationszeit (0, 1, 3, 6, 9, 24 h) wurde eine Petrischale mit Substanz in I-Med inkubiert, eine mit DMSO (0,1%), zusätzlich wurden zwei Kontrollen für die Zeitpunkte 0 h und 24 h mitgeführt. Nach wiederum 24 h Inkubation mit den Antioxidanzien wurde das Medium entfernt und nach Waschen mit PBS 1 h mit Menadion (20 μ M) inkubiert. Nun wurde wiederum mit PBS gewaschen und für 1, 3, 6, 9 oder 24 h mit Nährmedium nachinkubiert. Das Abstoppen der Proben geschah wie in Kapitel 4.3.3, die Versuchsaufarbeitung wie in Kapitel 4.4 beschrieben.

4.3.4 Viabilitätsbestimmung

4.3.4.1 Zellzahlbestimmung

Die Anzahl der Zellen wird mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Diese besteht aus neun großen Quadraten. Jedes dieser Quadrate hat eine Fläche von 1 mm^2 , dies ergibt bei einer Tiefe der Kammer von $0,1 \text{ mm}$ ein Volumen von $0,1 \text{ }\mu\text{L}$. Für die direkte Zellzählung wird ein Aliquot der Zellsuspension entnommen und in die Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop kann anschließend die Zellzahl pro $0,1 \text{ }\mu\text{L}$ bestimmt werden. [Lindl, 2000]

4.3.4.2 Bestimmung der Viabilität

Mittels Trypanblauausschluss-Test können lebende von toten Zellen unterschieden und so die Lebendzellzahl bzw. Viabilität bestimmt werden. Hierfür wurden in einem Mikroreaktionsgefäß ein Aliquot Zellsuspension mit einem Aliquot Trypanblau gemischt und in die Zählkammer gebracht. Aufgrund der permeablen Membran von geschädigten Zellen lagert sich der Farbstoff in diese ein, sie erscheinen blau gefärbt. Lebende Zellen erscheinen im Mikroskop hell leuchtend. Die Viabilität ergibt sich aus dem Verhältnis der intakten, viablen Zellen zur Gesamtzellzahl und wird in % angegeben. [Lindl, 2000] Die relative Lebendzellzahl ergibt sich aus dem Verhältnis der Zellzahl viabler Zellen der Probe zu derjenigen der Kontrolle.

4.3.4.3 SRB-Test

Geräte, Materialien, Lösungen:

- 96-Lochplatten, steril (Greiner)
- EIA-Reader mit Filter 570 nm (Biorad)
- 50%ige Trichloressigsäure (TCA)
- 0,4% SRB gelöst in 1% Essigsäure (v/v)
- 10 mM Tris-Lösung (pH 10,5)

Durchführung

Für die Bestimmung des Lebendproteingehaltes wurden 2.500 Caco-2 Zellen pro Loch ausgesät, wobei die äußeren Löcher ausgespart wurden und stattdessen mit PBS gefüllt wurden und 24 h anwachsen lassen. Danach wurde das Medium auf Substanz-haltiges I-Med (0,1% DMSO v/v) gewechselt ($100 \text{ }\mu\text{L}$) und 24 h inkubiert.

Das Medium wurde abgesaugt und mit neuem Md-(bzw. für die Kontrolle DMSO (0,1% v/v)-haltigen Medium für 1 h inkubiert und dann mit 50 µL TCA abgestoppt und bei 4°C 1 h fixiert. Nach fünfmaligem Spülen mit Wasser wurde die Platte getrocknet und dann mit 50 µL SRB-Lösung für 30 min die Zellen belassen. Nach fünfmaligem Waschen mit 1%iger Essigsäure wurde die Platte wieder getrocknet. Am Tag der Messung wurde die gebundene Farbe mit Tris-Base gelöst und bei 570 nm vermessen. Die Bestimmung erfolgte als 5-6fach. Die Auswertung erfolgte nach Bildung des Mittelwertes über das Verhältnis der Extinktion der Probe zu derjenigen der Kontrolle.

4.4 Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay)

4.4.1 Materialien

- Objektträger einseitig komplett mattiert; 26 x 76 x 1,0 mm (Menzel, Braunschweig)
- Deckgläser 24 x 24 mm (Menzel, Braunschweig)
- Agarose: Low melting point [37°C] (LMA) (Biorad)
Normal melting point [42°C] (NMA) (Biorad)
- Elektrophoresekammer für horizontale Gelelektrophorese (Biorad Sub Cell GT)
- Wasserbad (Julabo)
- Färbekammern für die Mikroskopie
- Zeiss Axioskop 20; Filter Set 15 (Anregung BP 546/12; Emission LP 590)
mit Cohu High Performance CCD Camera
- Auswertungsprogramm: Comet II (perspective Instruments, Suffolk, England)

Chemikalien:

- Phosphatpuffer (PBS):
 - 8,0 g NaCl
 - 0,2 g KCl
 - 0,2 g KH₂PO₄
 - 1,15 g Na₂HPO₄
 - mit aqua bidest. auf 1L auffüllen, mit 1N NaOH auf pH 7,4 einstellen

Material und Methoden

- NMA (Beschichtung der Objektträger) 0,5% in PBS
- LMA (Suspendieren der Zellen) 0,7% in PBS
- Lyse-Puffer: (Stammlösung) : 2,5 M = 146,1 g NaCl
100 mM = 37,2 g EDTA-Dinatriumsalz
10 mM = 1,2 g Tris
in 1 L aqua bidest. lösen und mit NaOH auf pH 10 einstellen
danach 10 g N-Laurylsarcosin-Na-Salz dazugeben, auf 1 L auffüllen
- Lyse-Gebrauchslösung: 89% Lyse-Stammlösung
10% DMSO
1% Triton X-100 (Aldrich)
- Enzypuffer (Stammlösung) 40 mM = 9,5 g HEPES
0,1 mM = 7,46 g KCl
0,5 mM = 0,146 g EDTA
0,2 mg/L = 0,2 g BSA
auf 1 L aqua bidest. auffüllen, mit KOH auf pH 8 einstellen; als 10x-Stammlösung bei -20°C aufzubewahren in 35 ml Portionen
- Gebrauchslösung: Verdünnung der Stammlösung 1/10; kühlen
- FPG-Enzym: 200 µL Enzypuffer
200 µL Glycerin
auf 2 mL mit aqua bidest auffüllen
davon 990 µL + 10 µL Enzym = 1/100
aufzuteilen auf 25 µL- Portionen
Lagerung im Tiefkühlschrank bei -84°C
- Enzym-Gebrauchslösung: 25 µL Enzym + 725 µL Enzypuffer
= Verdünnung 1/30; insgesamt 1/3000

Elektrophoresepuffer (Stammlösungen):	10 mM = 200 g NaOH auf 500 mL aqua bidest.
	200 mM = 14,9 g EDTA auf 200 mL aqua bidest.
Gebrauchslösung	30 mL NaOH-Lösung 5 mL EDTA-Lösung auf 1 L mit aqua bidest auffüllen, kühl stellen
Neutralisationspuffer:	0,4 M = 48,5 g Tris auf 1 L aqua bidest. auffüllen, auf pH 7,5 (mit HCl)
Ethidiumbromidlösung (Stammlösung):	10 mg in 50 mL aqua bidest.
Gebrauchslösung:	10% (v/v) in aqua bidest.

4.4.2 Durchführung

Die Durchführung des alkalischen Comet Assays entspricht weitestgehend der Beschreibung nach Collins *et al.*, die schematisch in Abbildung 3.27 dargestellt ist [Collins *et al.*, 1996].

Vor der Durchführung wurden die Objektträger mit NMA präpariert: 40 μ L wurden auf die matte Seite pipettiert, ausgestrichen und trocknen gelassen. Sodann wurden darauf zweimal nebeneinander je 65 μ L NMA pipettiert und sofort mit je einem Deckglas bedeckt. Die Aufbewahrung, die max. eine Woche betragen sollte, erfolgte bei 4°C in angefeuchteten Präparationskästen.

Die Zellsuspension wurde gut vereinzelt und auf je vier Reaktionsgefäße á 60-70.000 Zellen verteilt und für 10 min bei 4°C und 2.000 Upm abzentrifugiert. Der Rest wurde für die Bestimmung der Viabilität verwendet.

Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 65 μ L verflüssigte LMA aufgenommen, auf die zuvor mit NMA präparierten Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas bedeckt. Nach Festwerden der LMA und nach Abziehen der Deckgläser wurden die Objektträger in eine mit Lysepuffer gefüllte Kammer gestellt und für mindestens 1 h bei 4°C belassen. Nach der Lyse wurden die Objektträger dreimal mit Enzympuffer gewaschen.

Auf die Objektträger wurden nun 50 µL Enzypuffer als Kontrolle bzw. 50 µL FPG-Lösung pipettiert und nach Auflegen von Deckgläsern wurden sie 30 min im Wasserbad bei 37°C belassen. Nach Ablauf der Zeit wurden die Deckgläser wieder entfernt und die Objektträger in die horizontale Elektrophoresekammer gelegt. Bedeckt mit Elektrophoresepuffer (pH 13) wurde 20 min inkubiert (Entwindung der DNA) und sodann die Elektrophorese bei einer angelegten Spannung von 25 V (0,86 V/cm) und einer Anfangsstromstärke von 300 mA gestartet. Die Dauer betrug 20 min.

Nun wurden die Objektträger dreimal mit Neutralisationspuffer neutral gewaschen. Am Ende wurde der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid auf die Gele aufgetragen (40 µl) und mit Deckgläsern bedeckt.

Die Visualisierung erfolgte mit einem Zeiss Axioskop, die Auszählung der Zellen bzw. die Quantifizierung mit dem Computerprogramm Comet II. Dazu wurden je Gel 50 Zellen ausgezählt, das Programm errechnete die entsprechenden Parameter.

Zur Auswertung wurde die tail intensity (die prozentuale Fluoreszenzintensität des Schweifes relativ zur Gesamtintensität) herangezogen.

4.5 Dichlorofluorescein (DCF)-Assay

4.5.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen

Geräte und Verbrauchsmaterialien

- 96-Lochplatten, steril, schwarz, mit klarem Boden (Corning)
- 48-Lochplatten, steril, klar (Greiner)
- Multipette (Abimed) mit sterilen Aufsätzen (Eppendorf, Axon)
- braune 1,5 mL-Reaktionsgefäße (Sarstedt)
- Rotlichtlampe (Osram)
- Multiplattenphotometer (Sirius HT) mit Software KC4 v.3.3. BioTek®

Lösungen

- Inkubationsmedien, Antioxidanzien, Oxidanzien, (Kapitel 4.3.1)
- PBS aus Zellkultur, auf pH 7,0 eingestellt

- 2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat-Lösung (Fluka): 10 mM in DMSO lösen (= 4,89 mg/mL) im braunen Reaktionsgefäß einwiegen, im Dunkeln bis zur Messung aufbewahren, pro Tag frisch ansetzen
- Gebrauchslösung: 5 µL Lösung pro mL PBS (7,0) = 50 µM (dunkel!)

4.5.2 Durchführung

Basierend auf der Methode nach Wang und Joseph wurde in der Diplomarbeit von M. Bloch dieser Assay etabliert und weiter verbessert [Wang und Joseph, 1999].

Da die beiden verwendeten Zellen unterschiedliche Größe und Wachstumseigenschaften besitzen, mussten zur Umsetzung verschiedene Platten verwendet werden: Für HT29 Zellen wurden schwarze 96-Lochplatten mit klarem Boden verwendet. Pro Loch wurden $3,5-4 \cdot 10^4$ Zellen in einem Volumen von 100 µL ausgestreut, wobei der äußere Rand nur mit PBS gefüllt wurde. Caco-2 Zellen wurden in 48-Lochplatten zu je $2 \cdot 10^4$ Zellen pro Loch ausgestreut. Die Zellen wurden für 24 h in Kulturmedium im Brutschrank anwachsen lassen. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit den Antioxidanzien, für Kontrollversuche mit 0,1% DMSO im Inkubationsmedium inkubiert.

Inkubation mit DCFH-DA und Oxidanzien

Nach Absaugen des Inkubationsmediums wurden die Zellen mit PBS (pH 7,4) gewaschen. Danach wurden die Zellen 30 min mit 50 µM DCFH-DA im Brutschrank inkubiert. Alle Arbeiten ab Zugabe von DCFH-DA erfolgten aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Farbstoffs im Dunkeln (Rotlicht).

Nach dem Entfernen des überschüssigen Farbstoffs und zweimaligem Waschen mit PBS (pH 7,4) wurden die Zellen mit dem Oxidans versetzt und die Fluoreszenzintensität sofort mittels Plattenreader gemessen.

Messung und Auswertung

Die fluorimetrische Messung erfolgte sofort (0 min) und nach 40 min. Folgende Messparameter lagen der Messung zugrunde:

Messmodus:	Fluoreszenz
Temperatur:	37°C
Anregungswellenlänge:	485 nm
Emissionswellenlänge:	525 nm
Lesemodus:	Bottom
Sensitivität:	75 (HT29)
	70 (Caco2)

Berechnet wurde der Anstieg der Fluoreszenzintensität (FI%) pro Loch analog der Rechnung nach [Wang und Joseph, 1999] wie folgt:

$$FI\% = \frac{F_{40 \text{ min}} - F_{0 \text{ min}}}{F_{0 \text{ min}}} \cdot 100$$

$F_{40 \text{ min}}$ = Fluoreszenzintensität nach 40 min Inkubationsdauer

$F_{0 \text{ min}}$ = Fluoreszenzintensität bei 0 min Inkubationsdauer]

Aus den Ergebnissen für die einzelnen Löcher wird der Mittelwert berechnet und grafisch aufgetragen.

4.6 Glutathionbestimmung

4.6.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen

Geräte und Verbrauchsmaterialien

Photometer (Kontron Uvikon 810) bzw. Multiplattenreader (Sirius HT)

Halbmikroküvetten (Brandt) bzw. 96-Lochplatte (Greiner)

Mikroreaktionsgefäße 2,2 und 1,5 mL (Greiner)

Minifuge (Heraeus)

Megafuge 1.0R (Heraeus)

Lösungen

- Puffer A: 1,7 g KH_2PO_4 ,
234 mg Na_2 -EDTA,
in 100 mL aqua bidest. lösen, Lagerung bei 4 °C
- Puffer B: 2,175 g K_2HPO_4 ,
234 mg Na_2 -EDTA,
in 100 mL Aqua bidest. lösen, Lagerung bei 4 °C
- Gebrauchslösung: ((A+B)-Puffer): 15 mL Puffer A + 85 mL Puffer B; pH 7,5
am Tag des Versuchs frisch ansetzen
- NaHCO_3 , 0,5%ig: 500 mg NaHCO_3 lösen in 100 mL aqua bidest.
Lagerung bei 4 °C
- NADPH-Lösung: 20 mmol/L in 0,5%iger NaHCO_3 -Lösung = 18 mg
NADPH/ mL
- DTNB-Lösung (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)) (Sigma): 6 mmol/L
24 mg DTNB lösen in 10 ml (A+B)-Puffer, frisch an-
setzen
- Glutathion-Reduktase (GSR) (Sigma-Aldrich)
0,5 U Glutathion-Reduktase/ 10 μL (A+B)-Puffer
- 5-Sulfosalicylsäure (5-SSA) 10%ig: 100 g 5-SSA in 1 L aqua bidest.
5%ig: 50 g 5-SSA in 1 L aqua bidest.
Lagerung bei 4°C
- Glutathion, oxidiert (GSSG) (Acros)
- Glutathion, reduziert (GSH) (Sigma-Aldrich)
- Vinylpyridin (Fluka)
- Triethanolamin (Fluka) (TEA) 50%ig in aqua bidest.

4.6.2 Durchführung

4.6.2.1 Zellaufarbeitung

Nach Inkubation und Abtrypsinieren gemäß 4.3.3 wurden die Zellen für 10 min, 4°C und 2.000 Upm (Megafuge 1.600 Upm) abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgegossen, das Pellet in dreimal 250 µL PBS resuspendiert und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt, in dem 250 µL PBS vorgelegt waren. Nach guter Durchmischung wurden 25 µL für die Viabilität in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Dieser Überführungsschritt entfiel bei Inkubation in 6 cm-Petrischalen, dafür wurde mit 1 mL PBS resuspendiert und bei 4°C und 2.000 Upm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen, das Pellet in 370 µL (A+B)-Puffer resuspendiert und zweimal je 10 µL für die Proteinbestimmung entnommen. Zur Lyse wurde der Rest der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit 10% 5-Sulfosalicylsäure (SSA) gemischt und 5 min auf Eis belassen. Entweder wurden die Proben an dieser Stelle für max. zwei Wochen bei -80°C gelagert oder sofort zur Messung eingesetzt.

4.6.2.2 Messung von tGSH

Nach dem Auftauen bzw. direkt wurden die Proben bei 4°C und 13.000 Upm für 15 min zentrifugiert.

GSH-Standardreihe

Ausgehend von einer GSH-Stammlösung von 1 mM wurden mit 5% SSA Glutathion-Standards folgender Konzentrationen [µM GSH] hergestellt: 80 40 20 10 5 2,5 0 (Blindwert).

Messung per Küvettenphotometer

Die tGSH-Messung erfolgt analog der Methode, die von Gallagher beschrieben wurde [Gallagher *et al.*, 1994]:

In die Messküvetten werden folgende Lösungen vorgelegt:

Puffer A+B	700 µL
H ₂ O (bidest.)	150 µL
DTNB (6 mM)	100 µL
NADPH (20 mM)	20 µL

Da alle Proben und Standards grundsätzlich als Doppelbestimmung vermessen werden, benötigt man für jede Probe zwei Küvetten.

Als Probensubstanz für die tGSH-Messung wurde der Überstand der vorher zentrifugierten Zellsuspension verwendet. In jede Küvette wurden 20 µL Probe, Standard bzw. Blank gegeben. Die erste Messung erfolgte am Küvettenphotometer bei 412 nm und 25°C (Messung bei 0 min).

Zum Starten der Farbreaktion wurde in jede Küvette 10 µL Glutathion-Reduktase (GSR) pipettiert und mit einer Pipette gemischt. Die zweite Messung erfolgte genau 10 min nach der ersten Messung mit denselben Messparametern (Messung bei 10 min).

Nach der Zugabe der Glutathion-Reduktase in die Küvette startet das Redox-Cycling. Die Extinktion der Lösung steigt linear über mehr als 20 min an. Daher war es wichtig, dass das Zeitintervall zwischen GSR-Zugabe und Messung immer genau gleich ist. Um dies zu bewerkstelligen, war die Reduktase in dem Rhythmus zuzugeben, in dem das Gerät die Proben liest.

Auswertung

Zur Auswertung wurde die Differenz der Extinktionen bei $t=10$ min und $t=0$ min gebildet:

$$\Delta E = E(t=10 \text{ min}) - E(t=0 \text{ min})$$

Diese Werte wurden noch korrigiert, indem der ΔE -Wert des Blindwerts subtrahiert wurde. Die korrigierten ΔE -Werte der GSH-Standards wurden in einem Diagramm gegen ihre Konzentrationen aufgetragen und so die Regressionsgerade bestimmt.

Anhand der Geradengleichung ließen sich nun die Extinktionen (korr. ΔE -Werte) der Proben in die tGSH-Konzentration (in µM) umrechnen.

Messung per Mikroplattenphotometer

Da jede Vertiefung der Mikrotiterplatte nur 200 µL fasst, konnte der Messansatz hier entsprechend geringer ausfallen.

Folgende Parameter sind im Protokoll festgelegt:

Messmodus:	Absorption
Lesemodus:	Endpunkt
Temperatur:	25°C
Wellenlänge:	412 nm
Lesemodus:	Top

4.6.2.3 Messung von GSSG

GSSG-Standardreihe

Ausgehend von einer GSSG-Stammlösung von 1 mM wurden mit 5% SSA GSSG-Standards folgender Konzentrationen [μM GSSG] hergestellt: 20 10 5,0 2,5 1,25 0,625 0 (Blindwert).

Derivatisierung

Zur Derivatisierung des Glutathions wurden in dieser Reihenfolge

Probe/ Standard/ Blank	500 μL
2-Vinylpyridin	20 μL
50% TEA	100 μL

in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß gegeben und gut geschüttelt. Die Derivatisierung erfolgte im Thermomixer für 1 h bei 26°C und 600 Upm.

Messung

Der Messablauf entsprach weitgehend dem der tGSH-Messung. Aufgrund der normalerweise geringeren GSSG-Konzentration wurden beim Küvettenphotometer aber 100 μL statt 20 μL Probe/ Standard/ Blank pro Küvette und nur 70 μL aqua bidest. (statt 150 μL) eingesetzt. Der Messablauf und die Auswertung änderten sich nicht.

4.7 Malondialdehyd/TBARS-Bestimmung

4.7.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Lösungen

Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Reaktionsgefäße 1,5 mL (Greiner), Schraubröhren, 1,5 mL (Sarstedt)
- Vortexer-Rühraufsatz (Roth)
- Thermomixer Comfort (Eppendorf)
- Schwarze 96-Lochplatten (Nunc)
- Multiplattenreader (Sirius HT)
- HPLC-Anlage (Jasco)
 - Pumpe PU 1580,
 - Degaser DG 1580-53,
 - Gradientenmischer LG 1580-02,
 - Fluoreszenzdetektor FP 1520,
 - UV-Detektor UV 1575,
 - Autosampler AS 1550
- Säule: LichroSpher 100 (5 µm) RP-18 250mm x 4 mm [Merck]
- Autosampler-Vials, 1,5 mL ; 300 µL-Inserts, Septen, Ø 9 mm (Jasco)

Lösungen

- tButylhydroxytoluol (BHT)-Lösung: 1%ig in Ethanol (w/v)
 - Gebrauchslösung: 0,05 %ig in aqua bidest.
- MDA-Detektionskit (Sobioda)
- n-Butanol (Merck)

4.7.2 Durchführung

4.7.2.1 Zellaufarbeitung

Die Zellsuspension, aus 4.3.3 erhalten, wurde bei 1.600 Upm, 4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in dreimal 250 µL PBS re-

suspendiert, in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und dann auf einen Milliliter aufgefüllt. Daraus wurden 25 µL für die Viabilität entnommen, der Rest nochmals zentrifugiert (10 min, 4°C, 2.000 Upm). Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 100 bzw. 200 µL aqua bidest mit/ohne BHT aufgenommen. Nach einer Minute im Ultraschallbad wurden die Proben für fünf Sekunden mit dem Vortexer gemischt. Nach 10maligem Aufziehen mit einer Pipette wurden zweimal 10 µL in Schraubröhrchen und zweimal 5 µL + 15 µL aqua bidest. in 1,5 mL Reaktionsgefäße zur Proteinbestimmung gegeben. Die Proben wurden nun bei -80°C bis zur Messung gelagert, mindestens aber 24 h, um die Zellen zu zerstören.

4.7.2.2 Messung

Der Gehalt von Malondialdehyd (MDA) bzw. von „Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen“ (TBARS) in Zellen wurde mit den Komponenten eines kommerziell erhältlichen Kits der Firma Sobioda in veränderter Durchführung bestimmt. Zwei Teile der TBA-Lösung wurden zu einem Teil Perchlorsäurelösung gegeben und davon 80 µL zu den 10 µL Probe oder Standard in ein Schraubröhrchen pipettiert. Der Ansatz wurde nach dem Vortexen 1 h auf 95°C (600 Upm) erhitzt, anschließend 5 min auf Eis gekühlt und zentrifugiert (5 min, 6.000 Upm). Nach Zugabe von 200 µL Butanol wurde 1 min mit dem Vortexer gemischt und 5 min bei 6.000 Upm zentrifugiert. Aus der Butanolphase wurden 150 µL entnommen und in ein HPLC-Vial mit 300 µL Einsatz gegeben und vermessen. Die Identifikation erfolgte über die Retentionszeit, die Quantifizierung durch Vergleich der Peakflächen mit denen externer MDA-TBA-Standards. Es wurden Doppelbestimmungen mit maximal acht Proben durchgeführt, die direkt vermessen wurden, um eine ausreichende Stabilität des Derivats zu gewährleisten.

Fließmittel:	57% Phosphat-Puffer (12,5 mM, Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4) 43% Methanol
Flow:	1 mL/ min
Injektionsvolumen:	50 µL
Fluoreszenzdetektor:	
Anregungswellenlänge:	485 nm
Emissionswellenlänge:	525 nm

Für die Bestimmung der TBARS wurde die Derivatisierung genauso durchgeführt, am Ende wurden jedoch 150 µL der Butanolphase in schwarze 96-Lochplatten pipettiert und mittels Sirius HT gemessen. Folgende Einstellungen wurden hierzu gewählt:

Messmodus:	Fluoreszenz
Anregungswellenlänge:	516 nm
Emissionswellenlänge:	590 nm
Lesemodus:	Top
Sensitivität:	90
Anzahl der Anregungen pro Messung:	10
Messpunkte in Loch:	1

Die Quantifizierung erfolgte über eine Regressionsgerade der MDA-Standards über die resultierenden Fluoreszenzeinheiten.

Für erste vergleichende Bestimmungen MDA/TBARS wurde der Messansatz verdoppelt. 200 µL der Butanolphase wurde in die Lochplatte, 150 µL in die HPLC-Vials pipettiert.

4.8 Proteinbestimmung (BCA)

4.8.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen

Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Photometer (Kontron Uvikon 810) bzw. Multiplattenreader (Sirius HT)
- Halbmikroküvetten (Brandt), 96-Lochplatten (Greiner)
- Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml (Greiner)
- Schüttelwasserbad (Julabo)

Lösungen

- BCA-Protein Kit Uptima [KMF Laborchemie, Lohmar]:

Reagenz A: Na_2CO_3 , NaHCO_3 , BCA (Bichinonic Acid), Na-Tartrat

Reagenz B: CuSO_4

Gebrauchslösung: Gemisch aus Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis 50:1

Proteinstandards: BSA 2 mg/mL (Kit, Uptima)

4.8.2 Durchführung

Die Messung wurde grundsätzlich als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Angaben in Klammern entsprechen den Volumina der Küvettenmessung. Aus dem BSA-Proteinstandard (2 mg/mL) wurde eine Standardreihe von 0,1 bis 1,6 mg/mL angesetzt: dann wurde je zweimal Probe, Standard und Blindwert (Aqua bidest.) in 1,5 mL-Reaktionsgefäße pipettiert und mit jeweils 500 μL (1 mL) BCA-Reagenz C versetzt. Die Inkubation erfolgte im Schüttelwasserbad bei 37°C für 30 min. Die Lösungen wurden dann kurz auf Eis gestellt, um die Reaktion zu stoppen und je zweimal 200 μL in die Lochplatte bzw. komplett in die Messküvetten überführt und umgehend gegen den Blindwert gemessen.

4.8.3 Auswertung

Aus den Extinktionswerten der Standardlösungen wird eine Standardgerade erhalten. Nach linearer Regression werden die entsprechenden Extinktionen der Proben in die errechnete Gleichung eingesetzt und so der jeweilige Proteingehalt [$\mu\text{g/mL}$] bestimmt.

4.9 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

4.9.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen

Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Multiplattenreader (Sirius HT)
- 96-Lochplatte, unsteril (Greiner)

- Achtkanalpipette (Abimed)
- Gewebekulturschalen (60/15 mm, Greiner)

Chemikalien/ Lösungen

- 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)-diammoniumsalz ABTS(Sigma)
7 mM in aqua bidest.
- Aktivierung der Radikallösung durch Kaliumperoxodisulfat (Sigma)
2,45 mM in ABTS-Lösung
über Nacht im Dunkeln
Gebrauchslösung: ca. 1:30 Verdünnung: Absorption auf
0,70±0,02 einstellen
- Trolox: Stammlösung 3 mM in DMSO

4.9.2 Durchführung

Die Methode entspricht weitgehend der Beschreibung von [Re *et al.*, 1999]. Von den zu messenden Einzelsubstanzen wurden zunächst 1-3 mM Stammlösungen in DMSO angesetzt. Aus diesen wurde dann jeweils eine Reihe mit den Konzentrationen [mM] 1,5 1 0,75 0,5 0,25 0,125 und 0,0625 durch Verdünnen mit DMSO hergestellt. Zur Messung der Apfelsaftextrakte wurden zunächst Stammlösungen der Konzentration 1 mg/mL in DMSO und aus diesen für jeden Apfelsaftextrakt eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen [mg/mL] 0,5 0,25 0,125 und 0,0625 durch Verdünnung mit DMSO hergestellt.

Zur Messung des TEAC-Wertes wurden aus jeder Lösung 2 µl entnommen und in eine 96-Lochplatte pipettiert. Ferner wurden noch 2 µl des Lösungsmittels DMSO als Nullwert in die Platte pipettiert. Die äußeren Löcher der Platte blieben frei. Auf jeder Platte wurde eine Doppelbestimmung der Referenzsubstanz Trolox und zwei Doppelbestimmungen der zu messenden Antioxidanzien durchgeführt.

Zu den vorgelegten 2 µl in der Platte wurden nun 198 µl der eingestellten und auf 30°C temperierte ABTS-Radikal-Lösung hinzu gegeben, was einer Verdünnung von 1:100 entspricht. Bei der „klassischen“ TEAC-Bestimmung erfolgte die Messung nach 6 min bei der Wellenlänge 734 nm am Mikroplattenphotometer.

Auswertung:

Für die Bestimmung der TEAC-Werte wurde zunächst das Ausmaß der Entfärbung, bezogen auf die DMSO-Kontrolle [E%], berechnet:

$$E\% = \frac{Ex_K - Ex_P}{Ex_K} \cdot 100$$

Ex_K = Absorption der DMSO-Kontrolle

Ex_P = Extinktion der Probe

Die E%-Werte von Trolox bzw. der zu untersuchenden Substanzen wurden gegen die Konzentration aufgetragen und die Steigungen der erhaltenen Geraden miteinander verrechnet.

$$TEAC = \text{Steigung}_{\text{Probe}} / \text{Steigung}_{\text{Trolox}}$$

4.9.3 Bestimmung des TEAC-Wertes während 24 h Inkubation

Zunächst wurden 3 mM (bzw. 5 mg/mL AEs) Stammlösungen in DMSO, aus diesen weitere Verdünnungsreihen hergestellt.

Unter der Sterilbank wurden jeweils 6 µL entnommen und mit 6 ml sterilem PBS verdünnt. Für den Blindwert wurden entsprechend 6 µL DMSO mit 6 mL PBS verdünnt. Die Lösungen wurden in 6 cm Petrischalen gegeben und im Brutschrank 24 h inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0-24 h) wurden 100 µL entnommen und in eine 96-Lochplatte vorgelegt. Zum Zeitpunkt 0 h wurde ebenfalls eine Troloxreihe mitgeführt, auf die alle folgenden Messungen bezogen wurden. Dazu wurde Trolox in DMSO gelöst, eine entsprechende Verdünnungsreihe erstellt und dann jeweils 1 µL auf 1 mL PBS gegeben, um den Lösungsmittelanteil von Standard und Probe gleich zu halten. 100 µL dieser Lösungen wurden ebenfalls in die Platte gegeben. Nun wurden jeweils 200 µL der ABTS-Radikal-Lösung hinzu gegeben, die, wie bereits beschrieben, durch Verdünnen mit PBS auf eine Extinktion von $0,7 \pm 0,02$ eingestellt wurde. Die Messung erfolgte 6 min nach Zugabe des Radikals. Die Berechnung erfolgte nicht über die Berechnung der Steigungen sondern durch Einsetzen der erhaltenen E%-Werte in die Trolox-Regressionsgerade.

4.10 Messung von Absorptionsspektren

4.10.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen

Geräte, Verbrauchsmaterialien

- Multiplattenreader (Sirius HT)
- 96-Lochplatten (Greiner)
- 96- Lochplatten für UV-Messung (Corning)
- Gewebekulturschalen, 60/15 mm (Greiner)
- pH-Meter

Chemikalien/ Lösungen

- PBS für die Zellkultur
- DMEM ohne Phenolrot (Invitrogen)
- DMEM/Nutrient-Mix F12 ohne Phenolrot (Invitrogen)
- FKS, Penicillin/ Streptomycin (Invitrogen)
- (L)-Ascorbinsäure (Merck)
 - Stammlösung 30 mM in PBS
 - (10 μ L pro mL Medium ergibt 300 μ M)
- Eisen(II)sulfat
 - Stammlösung 30 mM in PBS
- Wasserstoffperoxid
 - Stammlösung 30 mM in PBS
 - (1 μ L pro mL Medium ergibt 30 μ M)

4.10.2 Aufnahme der Spektren über 24 h

Zur Messung der Absorptionsspektren der Verbindungen wurden zunächst eine 30 mM Stammlösung in DMSO hergestellt. Unter der Sterilbank wurden nun jeweils 3 μ L entnommen und mit 3 mL der verschiedenen Inkubations- und serumfreien Medien (ohne Phenolrot) bzw. in PBS versetzt. 2·300 μ L der Lösungen wurden nun in

96-Lochplatten pipettiert und bei 37°C (Brutschrank) bis zu 24 h inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten bei 200-500 nm (UV-Platte) bzw. 280-500 nm (PP-Platte) gemessen. Als jeweilige Kontrolle wurden die Medien mit entsprechender Menge DMSO mitgeführt. Die erhaltenen Absorptionswerte der Kontrolle wurden nach dem Versuch von denen der Substanz abgezogen und die Differenz gegen die Wellenlänge aufgetragen.

4.10.3 Zugabe von Ascorbinsäure

Zur Untersuchung von möglichen Oxidationsreaktionen wurden bei der Inkubation zusätzlich 300 µM Ascorbinsäure (gelöst in PBS) dazu gegeben.

4.10.4 pH-Abhängigkeit und Reversibilität

Um zu untersuchen, welche Rolle der pH-Wert beim Zerfall von Phenolen spielt, wurde Quercetin (30 µM) in PBS mit unterschiedlichem pH-Wert (5, 7, 7,5, 9, 10,5) bei 37°C und Raumtemperatur inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten vermessen. Bei Prüfung auf Reversibilität wurde Quercetin in PBS pH 9 bzw. pH 10,5 für eine 20 bzw. 5 min inkubiert und vermessen, danach wurde der pH auf 7 eingestellt und das Spektrum noch einmal aufgenommen und über 24 h bei 37°C inkubiert.

4.11 *Stabilität der Einzelverbindungen*

4.11.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen

HPLC

Flow: 1 mL/min

Range: 0,2 bis 0,05

Säule: Phenomenex aqua mit Vorsäule

Fließmittel:

A: Wasser/ Essigsäure (98:2)

B: Wasser/Acetonitril/ Essigsäure (100:100:1)

C: Acetonitril (5% in Wasser)

Gradient 1 (nur A angegeben): 0 min 90%, 10 min 45%, 20 min 0%, 22 min 90%, 23 min 0%, 24 min 90%, 26 min 0% 28 min 90%.

Gradient 2 (nur A angegeben): 0 min: 90%, 30 min: 45%, 50 min: 0%, 55 min: 90%.

Tabelle 4.2: Wellenlängen der Absorptionsmaxima und verwendete Gradienten für die Einzelstoffe.

Substanz	Wellenlänge [nm]	Gradient
Quercetin	370	1
Rutin	370	2
Chlorogensäure	320	2
Kaffeensäure	320	2
Phloretin	280	1
Phloridzin	280	2
Epicatechin	280	2

4.11.2 Probenvorbereitung

Die Messungen zur Stabilität wurden unter Inkubationsbedingungen (s. 4.3.3) mit und ohne Zellen durchgeführt. Die Substanzen wurden in 10-20 μ molarer Konzentration bis zu 24 h im Brutschrank inkubiert. Alle 30 bzw. 60 min wurden 200 μ L Medium entnommen, mit 400 μ L Aceton versetzt und gevortext. Danach wurde die Probe 5 min bei 13.000 Upm und 4°C zentrifugiert und der klare Überstand zur Messung eingesetzt.

4.12 Statistik

Für die Ergebnisse wurden die Ergebnisse gemittelt und als solche dargestellt. Bei zwei unabhängigen Versuchen wurde der Standardfehler (\pm SE), bei $n > 2$ die Standardabweichung (\pm SD) als Fehler angegeben.

4.12.1 Signifikanzen

Zur Berechnung der signifikanten Abnahme der oxidativen Schädigung wurde der Einstichproben-t-Test (einseitig) angewendet. Dazu wurden die Differenzen zwischen Oxidans-Kontrolle und (Polyphenol+Oxidans)-Proben gemittelt und mit der Nullhypothese $H_0=0$ verglichen. Bei Untersuchungen ohne Oxidansbehandlung erfolgte der Vergleich mittels unabhängigem student t-Test. Als signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ angenommen. Die Signifikanzen wurden der Tabelle für die t-Verteilung entnommen [Gottwald, 2000]

4.12.2 Ausreißer-Test

Zur Prüfung, ob ein Wert aufgrund seiner hohen Abweichung aus der Mittelwertbildung entfernt werden kann, wurde der Ausreißertest nach NALIMOV durchgeführt.

Es müssen für den Test mindestens drei Werte vorliegen. Die Kontrolle erfolgt auf den kleinsten und auf den größten Wert. Anschließend wird eine Prüfgröße PG nach der Formel

$$PG = \frac{|x^* - MW|}{s_x} * \sqrt{\frac{N}{N-1}}$$

x^* = aureißverdächtiger Wert

MW = Mittelwert

s_x = Standardabweichung

N = Anzahl der Stichproben

berechnet und mit dem Tabellenwert für die entsprechende Stichprobenzahl verglichen. Ist der Prüfwert kleiner als der Tabellenwert, liegt nach NALIMOV kein Ausreißer vor. Die Tabelle und weitere Grundlagen sind der entsprechenden Literatur zu entnehmen [Gottwald, 2000].

5 Ergebnisse und erste Diskussion

5.1 Charakterisierung der Oxidanzien

Um in den Zelllinien oxidativen Stress zu induzieren, wurden verschiedene Oxidanzien (Menadion, *tert*-Butylhydroperoxid, Wasserstoffperoxid, Fenton-Reagens) eingesetzt, deren oxidative Schädigung auf Radikalbildung beruhen. Ziel war es, für die jeweiligen Endpunkte ein geeignetes System zu finden, um die im Folgenden beschriebenen antioxidativen Wirkungen von Apfelsaftinhaltsstoffen zu prüfen. Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass der Basislevel der (oxidativen) Zellschädigung, der durch die Lösungsmittelkontrolle erfasst wird, bei HT29 und Caco-2 Zellen in den gewählten Endpunkten nur sehr gering waren (DNA-Schäden: <4 TI%, ROS-Level: <200 FI%). Eine Reduktion durch Apfelsaftinhaltsstoffe konnte nicht beobachtet werden [Bloch, 2005, Fritzen, 2003]. Zu Quantifizierung der protektiven Wirksamkeit war es daher erforderlich, ein höheres Ausgangsniveau der Schädigung zu schaffen. Dazu wurde ein Zweistufenprotokoll etabliert, bei dem nach einer Vorinkubation mit den potenziellen Antioxidanzien eine Behandlung mit einem Oxidans folgte. Durch eine nachgeschaltete Oxidansbehandlung werden nur zellvermittelte Effekte erfasst, mögliche Interaktionen zwischen Apfelsaftinhaltsstoffen und Oxidanzien im Medium, die bei einer Co-Inkubation auftreten können werden so umgangen.

Zunächst sollten geeignete Oxidanzien gefunden werden, um einen moderaten oxidativen Stress zu erzeugen, wie er auch bei pathologischen *in vivo*-Situationen zu erwarten ist. Es wurden dabei nur Konzentrationen verwendet, die im Trypanblauschluss-Test keine Zytotoxizität (Viabilität größer als 75%) zeigten.

5.1.1 Induktion (oxidativer) DNA-Schäden

5.1.1.1 Menadion

Caco-2 und HT29 Zellen wurden in Suspension mit dem Redox-Cycler Menadion (Md) für eine Stunde in serumfreiem Medium inkubiert (Abbildung 5.1).

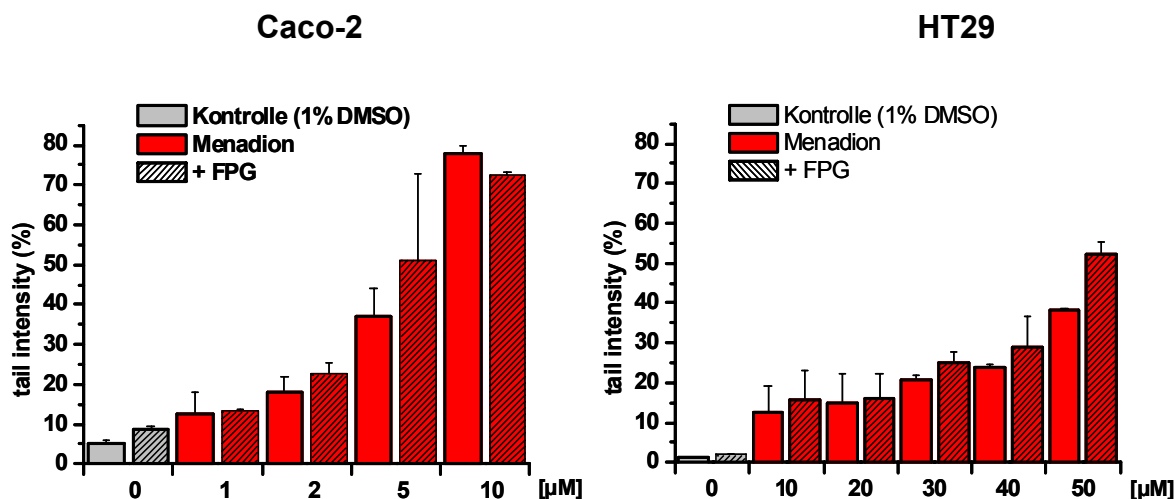


Abbildung 5.1: Induktion (oxidativer) DNA-Schäden in Caco-2 Zellen (links) und HT29 Zellen (rechts, [Fritzen, 2003]) durch Menadion (n=2-4; unabhängige Versuche; Suspension; 1% DMSO)

In den Zelllinien Caco-2 (links) und HT29 (rechts) wurde ein Anstieg der DNA-Schäden mit steigender Menadionkonzentration erhalten. Caco-2 Zellen waren wesentlich empfindlicher als HT29 Zellen gegenüber Md, da bei kleineren Konzentrationen ein vergleichbare Wirksamkeit zu beobachten war. In der Literatur wurden für Caco-2 Zellen ähnliche Konzentrationsbereiche beschrieben [Aherne und O'Brien, 2000b]. Die unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Zelllinien gegenüber Md lässt sich über die Aktivität der NADPH-Chinon-Oxidoreduktase (NQO1) erklären. Dieses Enzym entgiftet chinoide Strukturen durch ein Zwei-Elektronenübertragung (Kapitel 3.6.2.1). Caco-2 Zellen sind als NQO1-defizient beschrieben, während in HT29 Zellen dieses Enzym sehr aktiv ist (394 nmol pro min und mg Protein) [Karczewski *et al.*, 1999]. Dort waren ebenfalls höhere Konzentrationen des Oxidans nötig, um eine ähnliche GSH-Depletion in HT29 Zellen zu erreichen.

Obwohl im zu etablierenden Zweistufenprotokoll die Inkubation in Monolayerkultur erfolgt, wurden diese Inkubationen in Suspensionskultur durchgeführt, um die Empfindlichkeit besser mit der primären humanen Kolonzellen (PKZ) vergleichen zu können (Abbildung 5.2).

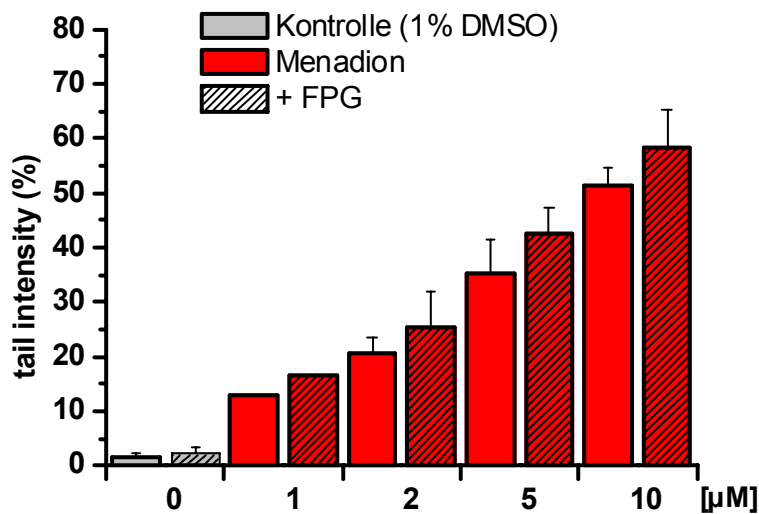


Abbildung 5.2: Induktion (oxidativer) DNA-Schäden in primären humanen Kolonzellen (PKZ) durch Menadion (n=1-2; unabhängige Versuche; Suspension; 1% DMSO)

Die DNA-Schäden stiegen ebenfalls konzentrationsabhängig an. Die Viabilität lag bei den Untersuchungen über 90%. Beim Vergleich der drei Diagramme fällt auf, dass die PKZ ähnlich empfindlich gegenüber Md sind wie die Zelllinie Caco-2. Dies lässt vermuten, dass die Aktivität unterhalb einer Schwelle liegt, die erreicht werden muss, um eine Wirkung des Enzyms zu beobachten [de Haan *et al.*, 2005].

Die Differenz zwischen Gesamt-DNA-Schäden (+ FPG, schraffiert) und den Grundschäden (ohne FPG) ergibt die spezifisch oxidativen DNA-Schäden (siehe Kapitel 3.6.3). Durch Menadionbehandlung wurden bereits hohe DNA-Grunds Schäden sowie nur geringe spezifisch oxidative DNA-Schäden beobachtet. Da bei den gewählten Menadionkonzentrationen hauptsächlich Schäden oxidativer Natur zu erwarten sind, sind auch die oxidativen DNA-Schäden dermaßen manifestiert, dass sie größtenteils durch die Grunds Schäden miterfasst werden.

5.1.1.2 Wasserstoffperoxid

Um auszuschließen, dass die oben genannte Beobachtung speziell für Menadion gilt und doch Arylierungsreaktionen (siehe Kapitel 3.6.2.1) eine Rolle spielen, wurde zum Vergleich in Caco-2 Zellen das Oxidans Wasserstoffperoxid (H₂O₂) eingesetzt (Abbildung 5.3)

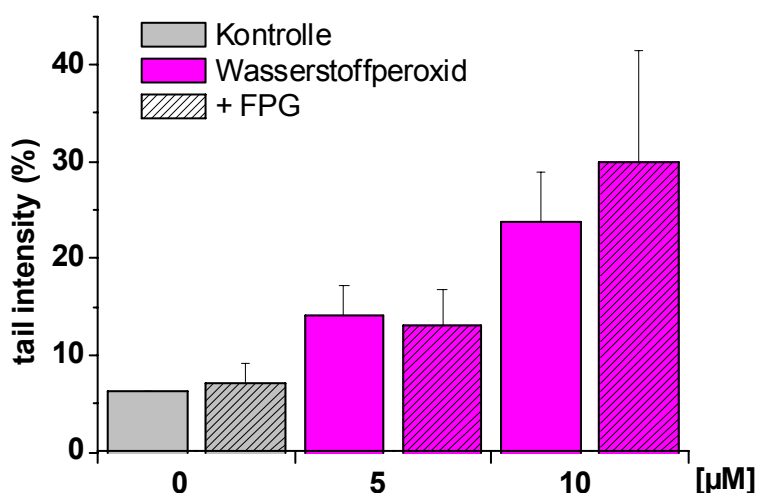


Abbildung 5.3: Induktion (oxidativer) DNA-Schäden in Caco-2 Zellen durch H₂O₂ (5 min auf Eis; n=2-3; unabhängige Versuche; Suspension)

Der spezifisch oxidative Schaden ist nicht sehr ausgeprägt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen, die für Menadion erhalten wurden sowie mit Erfahrungen aus der Arbeitsgruppe [Glaab *et al.*, 2001].

5.1.1.3 *tert*-Butylhydroperoxid (TBH)

Als weiteres Oxidans wurde TBH vergleichend eingesetzt, um DNA-Schäden zu induzieren (Abbildung 5.4). Im Hinblick auf die geplanten Untersuchungen mit den Apfelsaftinhaltsstoffen als potenzielle Antioxidanzien (Zweistufenprotokoll) wurde anstelle des Antioxidans 24 h mit 0,1% DMSO in Inkubationsmedium mit reduziertem FKS-gehalt (I-Med) inkubiert. Die TBH-Behandlung erfolgte für 1 h in serumfreiem Medium (S-Med).

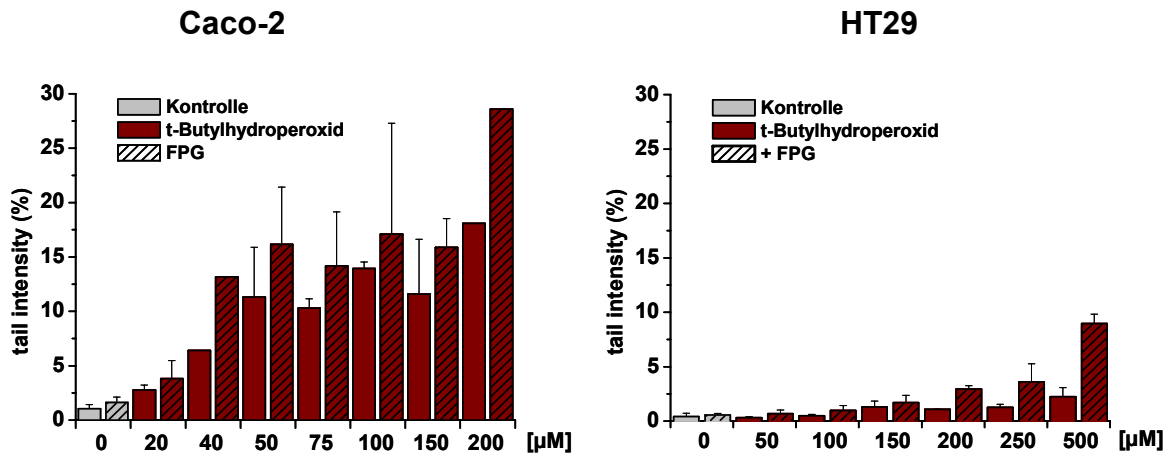


Abbildung 5.4: Induktion (oxidativer) DNA-Schäden in Caco-2 Zellen (links) und HT29 Zellen (rechts) durch TBH (1h S-Medium; n=1-3; unabhängige Versuche; Monolayer)

Auch bei diesem Oxidans waren die Caco-2 Zellen wesentlich empfindlicher: Die Induktion erfolgte hier konzentrationsabhängig, während in den HT29 Zellen erst bei Konzentrationen >250 µM geringe Effekte zu beobachten waren. Da Effektunterschiede der Antioxidanzien zwischen den beiden Zelllinien verglichen werden sollten, erwies sich dieses Oxidans als weniger geeignet für die Induktion von DNA-Schäden.

5.1.2 Induktion des zellulären ROS-Levels

Der Dichlorfluorescein-(DCF-)Assay zur Bestimmung des zellulären ROS-Levels wurde im Rahmen einer Diplomarbeit in HT29 Zellen etabliert [Bloch, 2005]. Während sich HT29 Zellen ($3,5 \cdot 10^4$ Zellen/Loch) in schwarzen 96-Lochplatten mit klarem Boden gut kultivieren ließen, mussten Caco-2-Zellen aufgrund ihrer Größe in klaren 48-Lochplatten ($2,6 \cdot 10^4$ Zellen/Loch) ausgestreut werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 5.5 für die Zelllinie Caco-2 dargestellt.

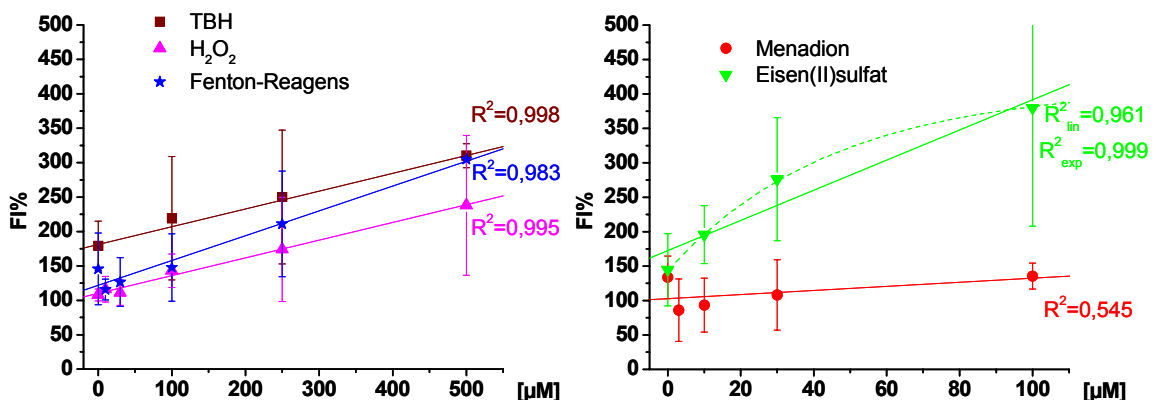


Abbildung 5.5: ROS-Level in Caco-2 Zellen, induziert durch verschiedene Oxidanzien (FI%: Fluoreszenzanstieg nach 40 min vgl. zu 0 min; n=3, Md: n=2, unabhängige Versuche); TBH: tert-Butylhydroperoxid, Fenton-Reagens: H₂O₂/ Fe²⁺ in äquimolarer Mischung.

Alle Oxidanzien außer Menadion (rot) erwiesen sich als geeignet, den intrazellulären ROS-Level konzentrationsabhängig zu erhöhen. Da das Ausmaß der ROS-Induktion vergleichbar ist, kann bestätigt werden, dass der Test nicht ausschließlich sensitiv gegenüber H_2O_2 ist [Hempel *et al.*, 1999], sondern der Farbstoff durch verschiedene Radikale oxidiert werden kann. Ausnahme bildet das O_2^- -Radikal, welches während des Redox-Cycling des Menadions gebildet wird. Unter den gewählten Bedingungen konnte nur ein geringer Fluoreszenzanstieg detektiert werden, wobei der ROS-Level der kleinsten Md-Konzentrationen weit unter dem der Lösungsmittelkontrolle lagen. Möglicherweise ist die Bildung des O_2^- -Radikals unter den gewählten Bedingungen zu gering, um DCFH zu oxidieren. Eisen(II)sulfat (grün) dagegen erwies sich als besonders potent. Bis 30 μM wurde ein linearer Anstieg in höheren Konzentrationen ein Plateau beobachtet. In der Fenton-Reaktion (Gl. 3.6) entsteht das hochreaktive Hydroxylradikal, welches auch als gutes Oxidans des Dichlorofluorescein beschrieben ist [Myhre *et al.*, 2003].

5.1.3 Glutathion-Depletion

Es ist beschrieben, dass Menadion mit Glutathion (GSH) Addukte bildet und dadurch den Gesamt-GSH (tGSH)-Gehalt depletiert [Monks *et al.*, 1992].

In Abbildung 5.6 sind die Ergebnisse für die beiden Zelllinien dargestellt.

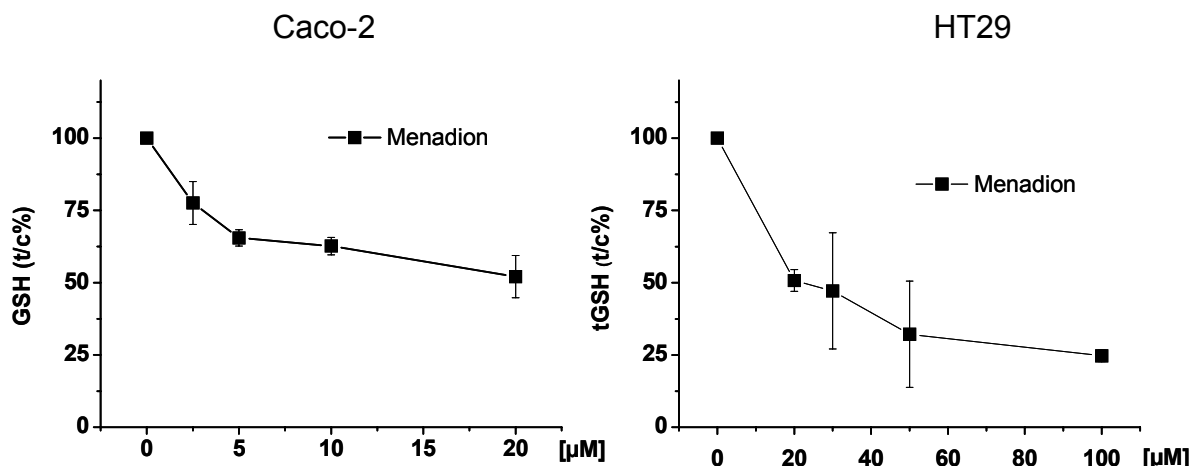


Abbildung 5.6: tGSH-Depletion durch Menadion in Caco-2-Zellen (links) und HT29 Zellen (rechts); tGSH-Gehalte der Kontrolle: Caco-2 : HT29: $31,6 \pm 15,0$ nmol GSH/ mg Protein (n=3; unabhängige Versuche; 1h in S-Med, Monolayer).

In beiden Zelllinien wurde der Gesamtglutathiongehalt (tGSH) konzentrationsabhängig depletiert. In beiden Zelllinien kam es bei höheren Konzentrationen zu einem Plateauwert (Caco-2 >5 μM, HT29 > 30 μM), jedoch lag dieses bei Caco-2 Zellen wesentlich höher (>50%) als bei den HT29 Zellen (30%). Damit scheint in Caco-2 Zellen weniger Glutathion für Abfangreaktionen zur Verfügung zu stehen, so dass bereits in kleinen Md-Konzentrationen DNA-Schäden induziert werden können. Eine effiziente Glutathionneusynthese der Caco-2 Zellen, die den tGSH-Level auf ein bestimmtes Niveau hält, kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Höhere Md-Konzentrationen wurden aufgrund einsetzender Zytotoxizität in Caco-2 Zellen nicht untersucht.

In den untersuchten Md-Konzentrationen blieb der GSSG-Level der Zellen im Bereich der Lösungsmittelkontrolle, der Glutathionstatus (gibt den Redoxstatus der Zelle an) blieb ebenfalls unbeeinflusst.

5.1.4 Induktion der Lipidperoxidation

Das Ausmaß der Lipidperoxidation (LPO) wurde über deren Sekundärprodukte in Zellen bestimmt. Die Bestimmung von Malondialdehyd (MDA) nach [Sergent *et al.*, 1995] führte mit keinem verwendeten Oxidans zu einem Anstieg des zellulären MDA im Medium verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle. In einem Kontrollversuch wurde nur Medium mit 10 mM H₂O₂ für 2 h inkubiert, und dort wurde ein deutlicher Anstieg des MDA-Gehaltes gemessen, in Anwesenheit von Zellen blieb dieser Effekt aus. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Reaktion des Wasserstoffperoxids mit der im

DMEM/NutrientMix enthaltenen Linolsäure. Diese Reaktion wird durch die Aufnahme von H_2O_2 in die Zellen möglicherweise abgefangen, da unter den Bedingungen DNA-Schäden detektierbar waren. Die Phospholipidschicht wird während dieser Passage nicht geschädigt. In einer anderen Studie wurde in Jurkat-Zellen ebenfalls keine Bildung von MDA durch H_2O_2 beobachtet [Erba *et al.*, 2003].

Die weiteren Messungen erfolgten in Zelllysaten nach Abtrennung des Mediums. Menadion in Caco-2 Zellen (2,5-20 μM , bis zu 24 h) und TBH in HT29 Zellen (250 μM -1,5 mM, 1 h) zeigten keine Erhöhung des MDA-Gehaltes. Diese Ergebnisse stehen nicht im Einklang mit der Literatur: Menadion [Chiou *et al.*, 1998] und TBH [Nardini *et al.*, 1998] sind als LPO-induzierende Agentien beschrieben, jedoch zeigten sich auch dort zellspezifische Unterschiede gegenüber LPO-Induktion durch Menadion. Der Einsatz des Fenton-Reagens führte dagegen zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der LPO in beiden Zelllinien (Abbildung 5.7).

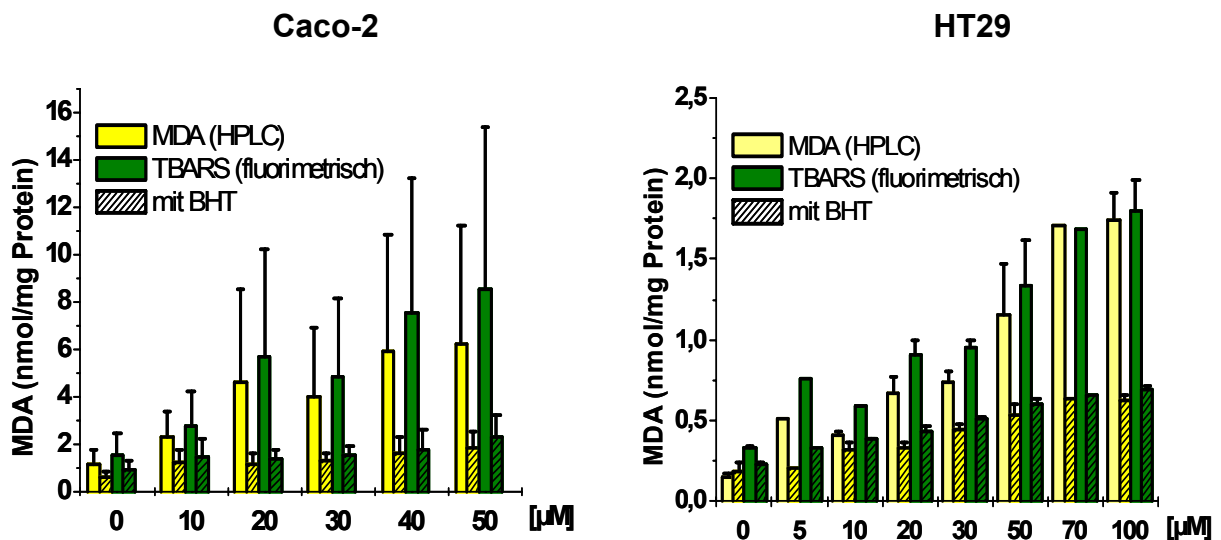


Abbildung 5.7: Induktion der Lipidperoxidation durch Fenton-Reagens (3 h in PBS), gemessen als MDA (gelb) bzw. TBARS (grün), in Caco-2 (links) und HT29 Zellen (rechts); n=2-6 (unabhängige Versuche) Monolayer; BHT: *tert*-Butylhydroxytoluol.

Eine Zugabe des Antioxidans *tert*-Butylhydroxytoluol (BHT) (schraffierte Balken) nach erfolgter Inkubation mit Fenton-Reagens zeigt deutlich, dass ohne BHT-Zugabe nach der Zellaufarbeitung die MDA-Bildung nicht abgeschlossen ist. In Caco-2 Zellen war das Ausmaß dieser Folgereaktionen (Differenz MDA-Gehalt mit/ohne BHT-Zugabe) sehr unterschiedlich für die einzelnen Versuche, was die großen Fehler erklärt. Der Anteil, der vom Oxidans ausgeht, steigt bei Zugabe von BHT noch konzentrationsabhängig an..

In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich der MDA-Gehalt und die Menge der TBARS miteinander verglichen. Es zeigt sich, dass die Konzentrationen der TBARS

(berechnet als MDA-Derivat; grüne Balken) nur unwesentlich höher liegen als die mittels HPLC bestimmte MDA-Gehalte (gelbe Balken). Zudem war in den Chromatogrammen keine weiteren Peaks zu finden (Abbildung 5.8).

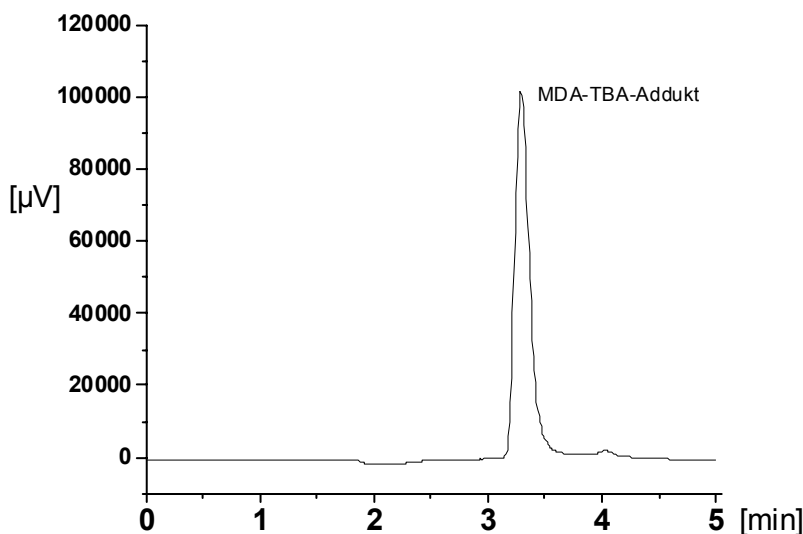


Abbildung 5.8: Beispielchromatogramm des MDA-TBH-Adduktes (RT=3,3 min); Inkubation von HT29 Zellen mit Fenton-Reagens (30 µM, 3 h in PBS;)

Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich bei den fluorimetrisch erfassten TBARS überwiegend um das TBA-MDA-Derivat handelt, so dass auf die zeit- und kostenaufwändigere HPLC-Bestimmung verzichtet werden kann.

5.1.5 Zusammenfassung zur Oxidanziencharakterisierung

Für die Untersuchungen wurden Oxidanzien gewählt, die unterschiedliche ROS bilden können (siehe Kapitel 3.2 und 3.6.2). Zum Einsatz kamen das O_2^- -Radikal (Menadion), Alkoxyradikal (TBH) und das OH-Radikal (Fenton-Reagens).

Es wurde kein Oxidans gefunden, das in den Zelllinien bei allen Endpunkten gleichermaßen gut geeignet war. Da die Induktion erhöhter oxidativer Zellschädigung wesentlich für das Zweistufenprotokoll ist, wurde das Oxidans gewählt, das sich im jeweiligen Test als das beste erwies. Für die induzierten (oxidativen) DNA-Schäden (10-20 TI%) und der tGSH-Depletion (ca. 10-20%) wurde Menadion (2-5 µM für Caco-2, 10-20 µM für HT29 Zellen) verwendet. Der ROS-Level ließ sich durch verschiedene Oxidanzien induzieren. Da die Chelatbildung mit Eisen zur Oxidation der o-Catecholstruktur führen kann und die Polyphenole selbst prooxidativ sein können, sollten eisenhaltige Oxidanzien nach Möglichkeit vermieden werden. Daher war *tert*-Butylhydroperoxid (250 µM) ein geeignetes Oxidans. Die Induktion der Lipidperoxidation ließ sich nur durch Einsatz des Fenton-Reagens (30 µM für Caco-2

Zellen, 50 μM für HT29 Zellen) beobachten. Caco-2 Zellen erwiesen sich empfindlicher gegenüber den Oxidanzien, nur bei der Induktion des ROS-Levels war der verwendete Konzentrationsbereich für beide Zelllinien ähnlich. Dies lässt darauf schließen, dass die verschiedenen Oxidanzien gleichermaßen in beide Zelllinien gelangen und im Cytoplasma als ROS vorliegen, die den Farbstoff oxidieren können. Der ROS-Level scheint damit unabhängig vom Zellsystem zu sein.

5.2 Antioxidative Wirksamkeit der Aglyka

Die Aglyka Quercetin und Phloretin kommen als solche nicht im Apfelsaft vor. Sie spielen jedoch *in vivo* eine Rolle, da sie im (Dünn)Darm durch lumenständige Hydrolasen/Glukosidasen (siehe Kapitel 3.4.3.1) aus den entsprechenden Glykosiden freigesetzt werden [Day *et al.*, 2000, Kahle *et al.*, 2005b] und dort ihre Wirkung entfalten können. Da Quercetin in der Literatur bezüglich seiner antioxidativen Eigenschaften gut beschrieben ist (Kapitel 3.4.5), wurde diese Substanz zusammen mit Phloretin als Referenzsubstanzen eingesetzt.

5.2.1 Antioxidative Kapazität (TEAC)

Eine gängige Maßzahl zur Charakterisierung der antioxidativen Kapazität ist der so genannte TEAC-Wert [mM Trolox]. Dieser gibt an, um wieviel stärker als Trolox eine Substanz/ -mischung das ABTS-Radikal im zellfreien System abgefangen werden kann. Für Quercetin wurde ein TEAC-Wert von 4,8 bestimmt, der mit der Literatur gut übereinstimmt [Rice-Evans *et al.*, 1996]. Der TEAC-Wert von Phloretin ist mit 3,8 geringer, Literaturwerte sind nicht bekannt. Damit zeigen beide Stoffe ausgeprägte Radikal-abfangende Wirksamkeit.

Eine Veränderung der antioxidativen Kapazität unter Zellkulturbedingungen kann auch für dort erhaltene Ergebnisse Bedeutung haben. Daher wurden TEAC-Werte zu Beginn und nach 24 h-Inkubation von Quercetin und Phloretin in PBS bestimmt. Der TEAC-Wert von Quercetin sank auf $60 \pm 9\%$ des Ausgangswertes, der TEAC-Wert von Phloretin dagegen stieg auf $116 \pm 2\%$ an (jeweils $n=4$).

5.2.2 Zytotoxizität/Wachstumshemmung

Polyphenole und Flavonoide haben Einfluss auf die Zellproliferation und Zelltod (Kapitel 3.4.6). Unter den gewählten Inkubationsbedingungen sollten Einfluss auf die Viabilität bzw. auf die rel. Lebendzellzahl (Trypanausschlusstest) sowie auf das Lebendprotein (SRB-Test) nach 24 h Inkubation mit den beiden Aglyka und nachfolgender Menadionbehandlung geprüft werden (Abbildung 5.9), da gerade bei der Bestimmung des ROS-Levels keine Zellkontrolle mitgeführt wird, und eine Wachstumshemmung zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen kann.

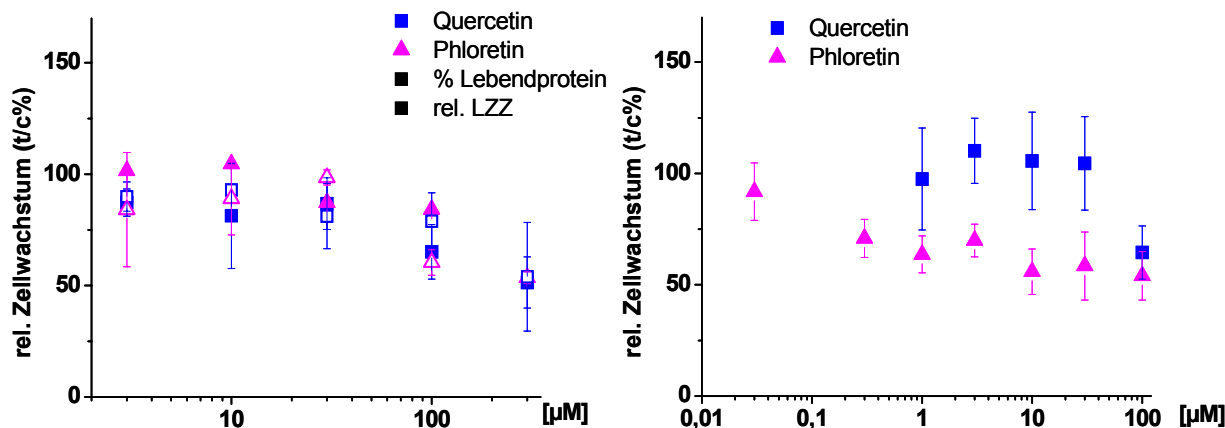


Abbildung 5.9: Modulation des relativen Zellwachstum (Trypanblau offene Symbole, SRB geschlossene Symbole) in Caco-2 (links) und HT29 Zellen (rechts) nach 24 h-Inkubation mit Quercetin und Phloretin (0,3-300 µM) und nachfolgender Md-Behandlung ((Md) 3-5 µM bzw. 20 µM, 1 h; Monolayer; n=3-4 (unabhängige Versuche, mean, ± SD).

Menadion selbst zeigte keinen Einfluss auf das Zellwachstum oder auf die Zytotoxizität. Die beiden Aglyka zeigten in Caco-2 Zellen eine konzentrationsabhängige Hemmung insbesondere in den höchsten eingesetzten Konzentrationen (> 10 µM). In HT29 Zellen wurde durch Phloretin das Zellwachstum bereits ab einer Konzentration von 0,3 µM, durch Quercetin nur bei der höchsten eingesetzten Konzentration gehemmt. Die Viabilität wurde nicht beeinflusst und lag immer über 85%. Für Caco-2 Zellen wurden die beiden Methoden zur Bestimmung des Zellwachstums gegenüber gestellt. Die erhaltenen Ergebnisse für das Zellwachstum sind vergleichbar. Eine ähnliche Korrelation der beiden Methoden wurde bereits in einer früheren Dissertation beobachtet [Kamp, 2004]. Agullo *et al.* beobachtete ebenfalls wachstumshemmende Effekte durch Quercetin, besonders ausgeprägt in proliferierenden Zellen [Agullo *et al.*, 1994].

5.2.3 Modulation Md-induzierter (oxidativer) DNA-Schäden

Für Phloretin ist in Abbildung 5.10 die Modulation der Md-induzierten DNA-Grundschiädigung und DNA-Gesamtschiädigung (+ FPG, schraffiert) dargestellt.

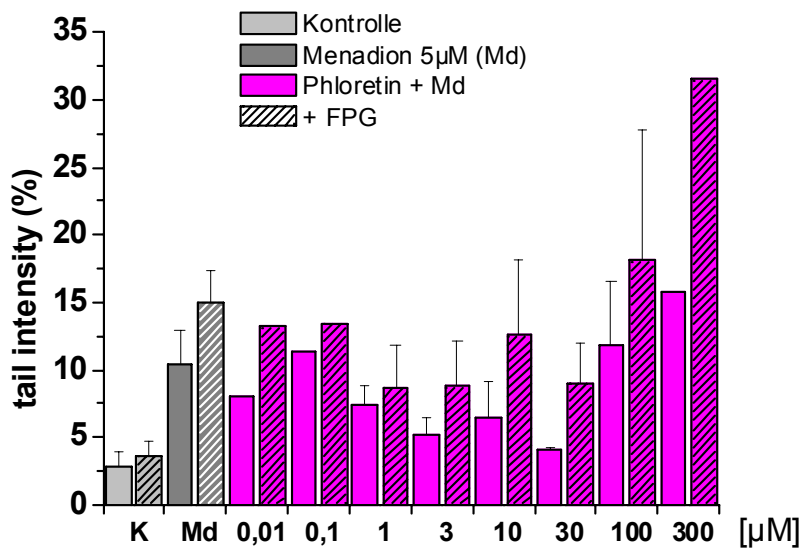


Abbildung 5.10: Modulation Md-induzierter (oxidativer) DNA-Schädigung in Caco-2 Zellen durch Phloretin (24 h) und nachfolgender Menadionbehandlung (5 μM, 1 h); n=1-3 (unabhängige Versuche) Monolayer, (mean ± SD).

Ein konzentrationsabhängiger, U-förmiger Wirkungsverlauf (= U-Kurve) ist zu erkennen. In sehr kleinen Konzentrationen (bis 0,1 μM) ist noch keine protektive Wirkung zu beobachten. Mit steigender Konzentration nahmen die induzierten DNA-Schäden bis hin zu einem optimalen Konzentrationsbereich ab (1-3 μM bei den Gesamtschäden, 1-30 μM bei den Grundschäden) und bei weiter steigenden Konzentrationen wieder zu. In den beiden höchsten Konzentrationen ging der Gesamtschaden sogar über den des Menadions hinaus. Dieser Anstieg kann mit den prooxidativen Eigenschaften der phenolischen Struktur begründet werden, die durch den erhöhten Sauerstoffpartialdruck unter den Inkubationsbedingungen [Halliwell, 2003] sowie die Anwesenheit von Übergangsmetallen (z.B. aus FKS) begünstigt werden [Lapidot *et al.*, 2002b]. Dies kann im Medium zur Bildung H₂O₂ führen, was möglicherweise indirekt für die DNA-Schäden verantwortlich ist [Halliwell, 2003, Lapidot *et al.*, 2002a].

Wie unter Kapitel 5.1 beschrieben, wurden mit den untersuchten Oxidanzien nur wenige spezifische oxidative DNA-Schäden erzeugt. Im Folgenden soll deshalb nur die Modulation der Gesamt-DNA-Schäden (+ FPG) betrachtet werden. Die vergleichende Darstellung erfolgt als relative TI%, d.h. das Ausmaß der Gesamt-DNA-Schäden im Vergleich zur Md-Kontrolle (=100%).

In Abbildung 5.11 ist die modulierende Wirkung der beiden Aglyka in Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation dargestellt.

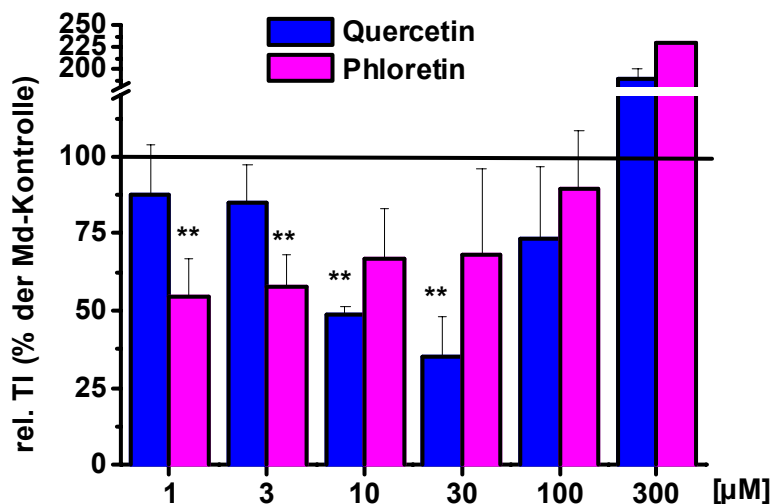


Abbildung 5.11: Modulation induzierter Gesamt-DNA-Schäden in Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit Quercetin und Phloretin und Nachbehandlung mit Menadion (Md) 3-5 μM , 1 h; Monolayer; n=3 (unabhängige Versuche, mean \pm SD); ** p<0,01.

Quercetin war in ähnlicher Weise wie Phloretin in der Lage, Md-induzierte DNA-Schäden um bis zu 70% (Phloretin um 40%) zu verringern. Der Konzentrationsbereich mit der besten Wirksamkeit (Optimum) lag bei 10-30 μM . Ähnliche Effekte von Quercetin (50 μM) wurden auch von [Aherne und O'Brien, 2000b] in Caco-2 Zellen gefunden. Der Mechanismus beruht sowohl auf Radikal-abfangenden als auch Metall-chelatierenden Wirkungen [Aherne und O'Brien, 2000b]. Bei den höchsten eingesetzten Konzentrationen kam es zu einem Wiederanstieg bis weit über die Md-Kontrolle. Auch hier können prooxidative Wirkungen der Flavonoide selbst beitragen. Yamashita *et al.* fanden heraus, dass Quercetin in Anwesenheit von Kupfer(II)-ionen DNA-Schäden induziert [Yamashita *et al.*, 1999]. Die Ursache liegt jedoch nicht in der Entstehung von OH-Radikalen, sondern in einer Reduktion zu Cu(I) und anschließender Bildung von DNA-Cu(I)-Quercetin-Addukten [Yamashita *et al.*, 1999].

In Abbildung 5.12 sind die Ergebnisse für die beiden Aglyka in HT29 Zellen nach 24 h-Inkubation dargestellt.

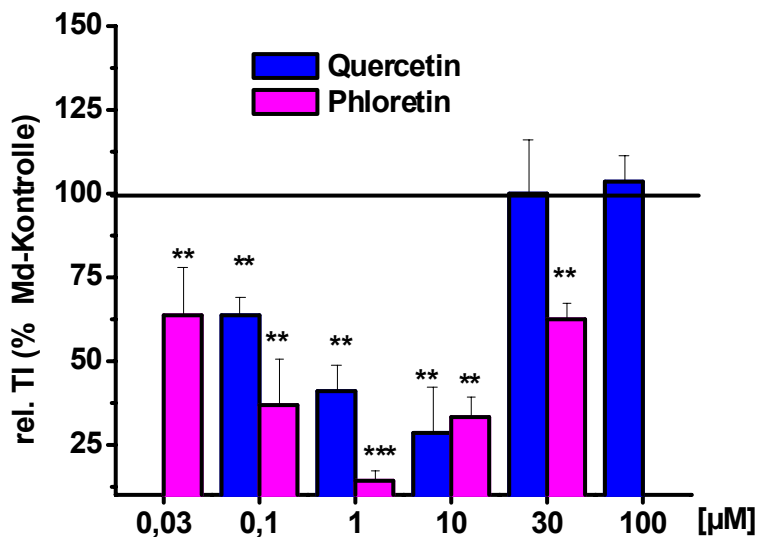


Abbildung 5.12: Modulation induzierter Gesamt-DNA-Schäden in HT29 Zellen nach 24 h Inkubation mit Quercetin und Phloretin und Nachbehandlung mit Menadion (Md) 20 µM, 1 h; Monolayer; n=3 (unabhängige Versuche, mean, ± SD); ** p < 0,01; * p < 0,005.**

Beide Substanzen reduzierten die Md-induzierten DNA-Schäden effektiv. In der erhaltenen U-Kurve wurden die Optima 1 µM für Phloretin und 10 µM für Quercetin gefunden, wobei Phloretin im gesamten eingesetzten Konzentrationsbereich die Gesamt-DNA-Schäden deutlich verringerte. Verglichen zu den in Abbildung 5.11 erhaltenen Ergebnissen für Caco-2 Zellen wurde das Wirkoptimum in HT29 Zellen bei kleineren Konzentrationen erreicht, somit ist die Zelllinie HT29 empfindlicher bzgl. Reduktion von DNA-Schäden.

Bei einer Langzeitinkubation spielen nicht nur direkte antioxidative Wirkungen (Chelatbildung, Radikal-Abfangen) eine Rolle, sondern auch die Zellantwort. Antioxidative Enzyme können induziert werden, so dass ROS, die bei der Oxidanzienbehandlung entstehen, effizient durch die Zellen abgefangen werden. Außerdem können die inkubierten Substanzen metabolisiert werden, so dass die Ausgangssubstanz nicht die einzige wirksame Struktur darstellt. Daher wurde zur Unterscheidung direkter Wirkung/ Zellantwort eine Kurzzeitinkubation (2 h) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.13 dargestellt.

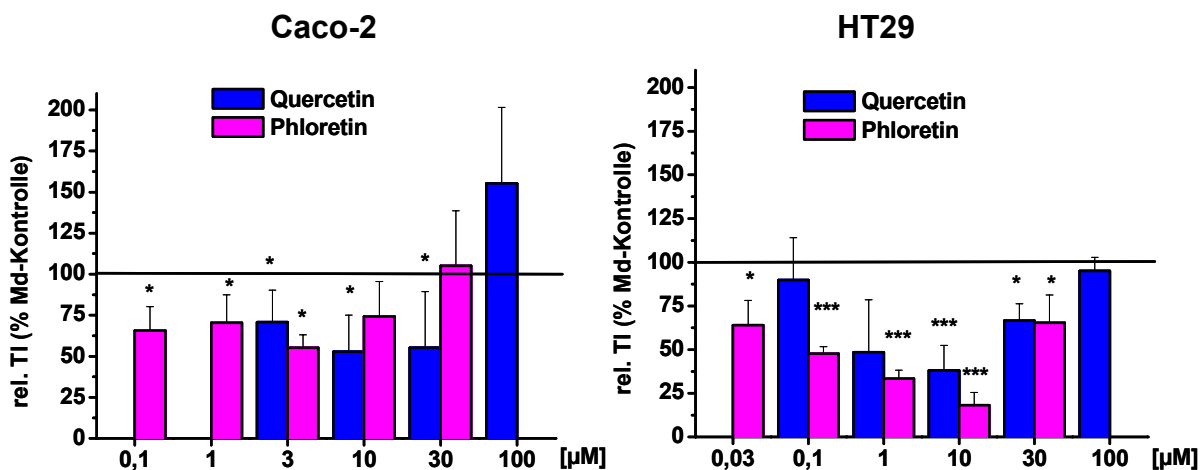


Abbildung 5.13: Modulation induzierter Gesamt-DNA-Schäden in Caco-2 (links) und HT29 Zellen (rechts) nach 2 h Inkubation mit Quercetin und Phloretin und Nachbehandlung mit Menadion (Md) 4 µM bzw. 20 µM, 1 h; Monolayer; n=3-5 (unabhängige Versuche, mean, ± SD); *p < 0,05; *** p < 0,005.

In Caco-2 Zellen war Quercetin wirksam (Optimum 10-30 µM), während Phloretin in höheren Konzentrationen nur schwache Wirkung hatte. Geht man von einem U-förmigen Wirkungsverlauf aus, deutet sich an, dass die wirksamen Konzentrationen von Phloretin in noch kleineren Bereichen liegen. Nach 24 h Inkubation (s.o.) zeigten beide Substanzen eine deutlichere Verringerung der DNA-Schäden. Quercetin war nach zweistündiger Inkubation bei 100 µM stärker prooxidativ als nach 24 h-Inkubation. Dies könnte bedeuten, dass die Caco-2 Zellen in der Lage sind, diesen Schäden nach längerer Inkubation entgegenzuwirken und dass entweder Quercetin eliminiert oder zellspezifische Abwehrmechanismen, z.B. Reparatur induziert werden können.

Bei noch kürzeren Inkubationszeiten (30 min) wurde keine Verringerung der DNA-Gesamtschäden durch Quercetin in Caco-2 Zellen beobachtet (Abbildung im Anhang). Entsprechend des Verlaufs nach 2 h-Inkubation konnte auch hier ein deutlicher Anstieg der DNA-Schäden über 30 µM Quercetin beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Ergebnissen von [Duthie und Dobson, 1999], bei denen eine protektive Wirksamkeit von Quercetin auch nach 30 min-Inkubation beobachtet worden war.

In HT29 Zellen waren beide Aglyka ebenfalls wirksam mit einem Wirkoptimum bei 10 µM. Während die Länge der Quercetininkubation keine deutlichen Unterschiede zeigte, war Phloretin nach 24 h Inkubation in noch kleineren Mengen wirksam. Dies könnte durch unterschiedliche Aufnahmeraten in die Zelle erklärbar sein. Weitere Möglichkeiten wären die oben angesprochene Enzyminduktion oder die Umwandlung der Substanzen in ebenfalls wirksame Strukturen.

Die primären humanen Kolonzellen (PKZ) wurden ebenfalls für 2 h mit den beiden Aglyka inkubiert (Abbildung 5.14).

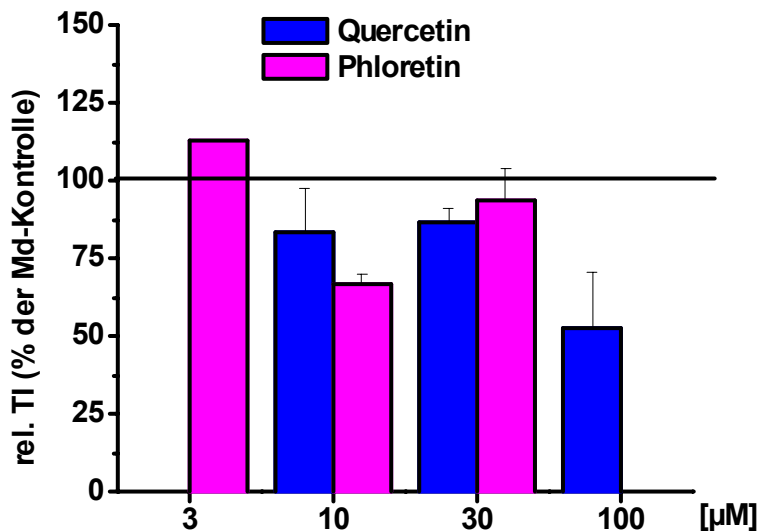


Abbildung 5.14: Modulation induzierter Gesamt-DNA-Schäden in PKZ nach 2 h Inkubation mit Quercetin und Phloretin und Nachbehandlung mit Menadion (Md) 2 µM, 1 h; Suspension; Que: n=3, Pit: n=2 (unabhängige Versuche, mean, + SD bzw. + SE).

Phloretin zeigte bei 10 µM gute Wirksamkeit, während bei Inkubation mit Quercetin erst bei der höchsten Konzentration eine Verringerung der DNA-Schäden auftrat. Aufgrund der geringen Ausgangszellzahl war es nur in Einzelfällen möglich, die Viabilität/Zellzahl zu bestimmen. In diesen wurde bei der höchsten Quercetinkonzentration eine verminderte Zellzahl und mit 70% Viabilität Einbußen gefunden (Viabilität der Kontrolle ca. 80%).

5.2.4 Einfluss auf DNA-„Reparatur“

Inwieweit Quercetin und Phloretin den DNA-Reparaturprozess beeinflussen können, ist Gegenstand folgender Untersuchung. Die Inkubation erfolgte analog dem Zweistufenprotokoll (24 h Prüfsubstanz/ 1 h Menadion) in HT29 Zellen, die Modulation der Reparatur wurde in einer anschließenden Nachkultivierung bis zu 24 h in Nährmedium (ohne Substanz) untersucht (Abbildung 5.15).

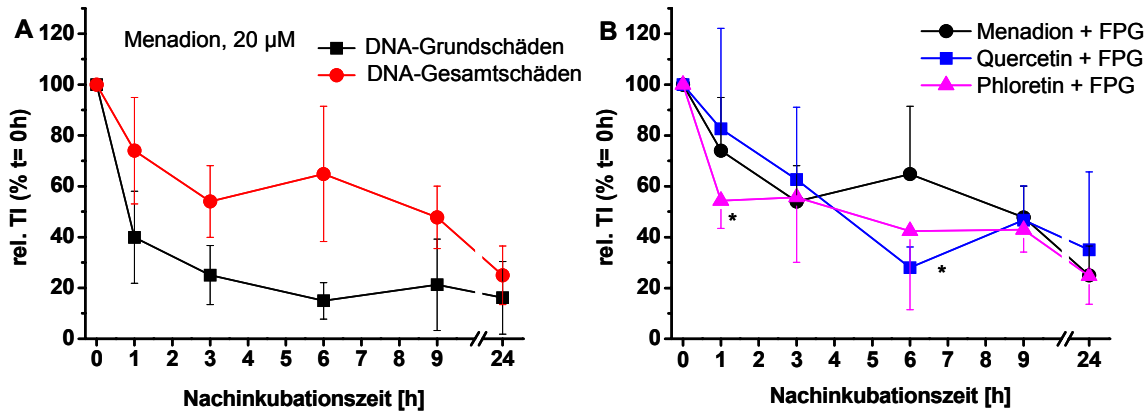


Abbildung 5.15: Zeitlicher Verlauf der (oxidativen) DNA-Schädigung von Menadion (20 µM, links) und die Modulation der Gesamt-DNA-Schäden durch 24 h Vorbehandlung mit Quercetin (30 µM) und Phloretin (10 µM) (rechts) in HT29 Zellen; n=3-7 (unabhängige Versuche, mean ± SD); *p<0,05.

Die Md-induzierten Grund- und Gesamt-DNA-Schäden (+ FPG) wurden innerhalb 24 h vollständig repariert (Lösungsmittelkontrolle lag bei ca- 20% rel. TI), wobei die Gesamtschäden langsamer abnahmen (Abb. A). Die Beobachtung, dass die DNA-Grundschiäden wesentlich schneller repariert werden können als die DNA-Gesamtschiäden, konnte bereits in anderen Zelllinien gemacht werden [Collins *et al.*, 1995]. Möglicherweise werden während des Reparaturprozesses (siehe auch Kapitel 3.3.4.2) von oxidierten Basen langlebige Intermediate (z.B. AP-Stellen) gebildet, die noch über eine längere Zeit als Strangbrüche detektiert werden können, bevor sie durch eine Ligase verschlossen werden.

Der Verlauf der Md-induzierten DNA-Grundschiäden (schwarze Kurve links) wurde durch Vorbehandlung mit Quercetin (30 µM) bzw. Phloretin (10 µM) nicht moduliert (s. Anhang). Dies wurde bereits für Quercetin und andere Flavonole in Caco-2 Zellen beschrieben [Aherne und O'Brien, 2000a]. Die Gesamtschiäden dagegen wurden durch beide Substanzen verringert (Abbildung 5.15, rechts). Sie unterschieden sich jedoch in dem Zeitpunkt ihrer Wirkung: Phloretin reduzierte die DNA-Schäden zu Beginn schneller im Vergleich zur Md-Kontrolle und auch im Vergleich zu Quercetin. Eine Vorbehandlung mit diesem zeigte zunächst keinen Einfluss auf die DNA-Gesamtschiäden, erst nach 6 h kam es zu einer Abnahme und später zu einer Annäherung mit der Md-Kontrolle. Aufgrund der Wahl der Nachinkubationszeiten lassen sich keine Aussagen darüber machen, ob die beiden untersuchten Substanzen auch einen Einfluss auf die Dauer der vollständigen Reparatur haben, da zwischen 9 und 24 h keine Messwerte ermittelt wurden.

Die präventive Wirksamkeit von Stoffen besteht nicht nur darin, kritische Zellkompartimente vor einem Angriff von ROS zu schützen, sondern die Antioxidanzien können

auch in Reparaturprozesse eingreifen. Je schneller z.B. die DNA repariert werden kann, desto kleiner ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich DNA-Schäden manifestieren. In der Literatur wurden keine Hinweise gefunden, welche Zielstrukturen im Reparaturapparat der Zelle durch die beiden Antioxidanzien beeinflusst werden. Da Reparaturenzyme über das Antioxidant response element (ARE) aktiviert werden können [Li *et al.*, 2002], wäre es möglich, dass Quercetin und Phloretin Einfluss auf die Genexpression von Reparaturenzymen hat.

5.2.5 Modulation des TBH-induzierten zellulären ROS-Levels

Im Gegensatz zur DNA-Schädigung werden beim Dichlorfluorescein(DCF)-Assay hauptsächlich ROS erfasst, die sich im Zytoplasma befinden, bevor sie Zellkompartimente schädigen. Der Fluoreszenzanstieg, verursacht durch die Oxidation des Farbstoffs in seine oxidierte, fluoreszierende Form wurde im Monolayer nach 40 min gemessen.

Die Effekte auf den ROS-Level durch 24 h Inkubation von Caco-2 Zellen mit den beiden Aglyka ist in Abbildung 5.16 dargestellt:

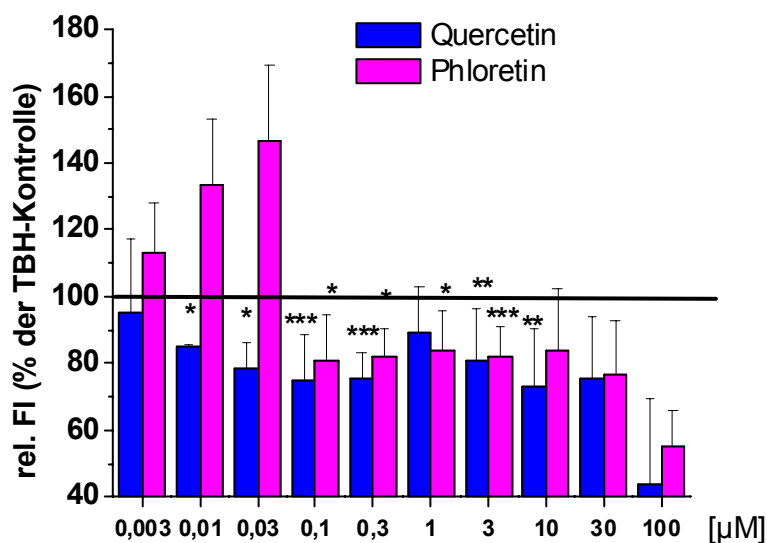


Abbildung 5.16: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in Caco-2 Zellen durch 24 h-Inkubation mit Quercetin und Phloretin (0,003-100 µM) und nachfolgende TBH-Behandlung (250 µM, 40 min); n=3-9 (unabhängige Versuche; mean ± SD); signifikant: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005.

Quercetin verringerte bereits bei geringsten Konzentrationen (> 0,003 µM) den ROS-Level signifikant. Nach einem geringen Anstieg bei 1 µM sinkt der ROS-Level danach wieder ab. Dieser Trend wurde in allen Einzelversuchen beobachtet, so dass zufällige Messfehler auszuschließen sind. Bei den höchsten Konzentrationen kann es auf-

grund zytotoxischer Effekte zu Zellverlusten während der Inkubation führen und dadurch auch einen geringeren Fluoreszenzanstieg verursachen. In die Berechnung des Fluoreszenzanstieges geht zwar die Anfangsfluoreszenz mit ein, so dass die Zellzahl mit berücksichtigt wird; bei zu geringen Fluoreszenzwerten, wie es bei denen der höchsten eingesetzten Konzentrationen von Quercetin und Phloretin zu vermuten ist, waren zu wenige Zellen zum Zeitpunkt der Messung vorhanden, um die Fluoreszenz quantifizieren zu können.

In HT29 Zellen (Abbildung 5.17) zeigten Quercetin und Phloretin nach 24 h Inkubation ebenfalls ROS-abfangende Wirkung.

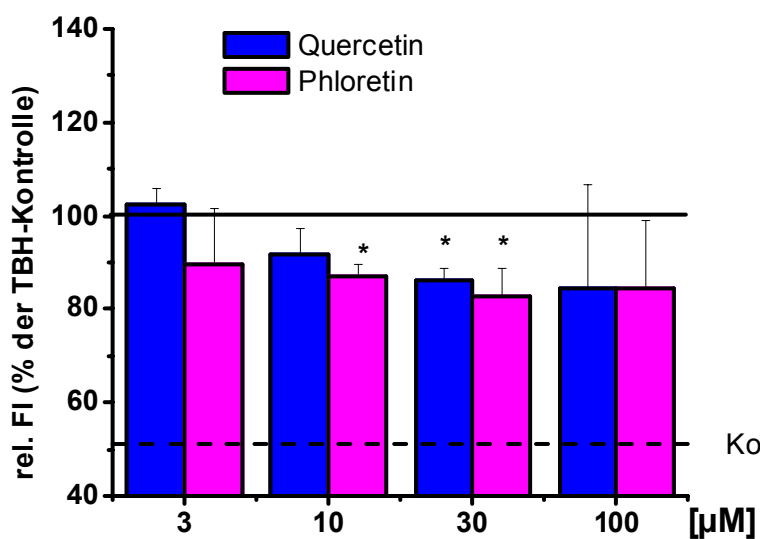


Abbildung 5.17: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in HT29 Zellen durch 24 h-Inkubation mit Quercetin und Phloretin und nachfolgende TBH-Behandlung (250 µM, 40 min) K₀: DMSO-Kontrolle; n=3 (unabhängige Versuche; mean ± SD); signifikant: *p < 0,05.

Das Wirkoptimum lag dabei für beide Substanzen bei 30 µM. Im Gegensatz zu den Caco-2 Zellen ist der extrem geringe Fluoreszenzanstieg bei den höchsten Konzentrationen nicht zu beobachten. In der Literatur wurden für Quercetin in HepG2-Zellen ebenfalls eine Abnahme des TBH-induzierten ROS-Levels beobachtet [Musonda *et al.*, 1997].

Die Ergebnisse für eine verkürzte Inkubationszeit auf 2 h nur ist in Abbildung 5.18 dargestellt.

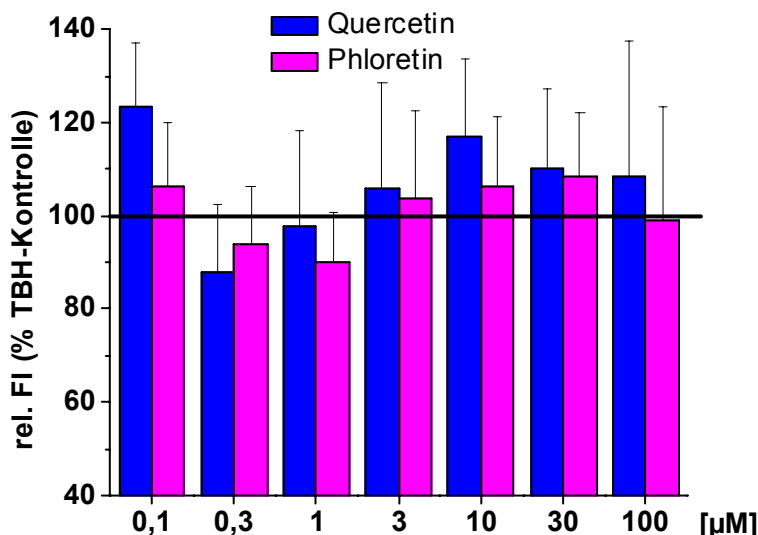


Abbildung 5.18: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in HT29 Zellen durch 2 h-Inkubation mit Quercetin und Phloretin und nachfolgende TBH-Behandlung (250 µM, 40 min); n=3-5 (unabhängige Versuche; mean ± SD).

Nach 2 h Inkubation wurde im Gegensatz zur 24 h-Inkubation nur eine schwache Verringerung des TBH-induzierten ROS-Levels bei 0,3-1 µM Phloretin- bzw. bei 0,3 µM Quercetinkonzentration erhalten. Nach der kurzen Inkubationszeit ist zu erwarten, dass die Substanzen, wenn sie in die Zelle aufgenommen werden, auf direktem Wege, d.h. über Abfangen von ROS, wirksam sind und dass die Aktivierung der Zellantwort erst später zum Tragen kommt. Das Ergebnis bestätigt diese Hypothese nicht. Daraus lässt sich schließen, dass die ROS durch andere zellspezifische Mechanismen beseitigt werden, die erst nach einigen Stunden aktiv werden.

5.2.6 Einfluss auf den Glutathionspiegel

5.2.6.1 Modulation der Md-induzierten GSH-Depletion

Das endogene Glutathion (GSH) ist für die ROS-Abwehr in Zellen von besonders großer Bedeutung (siehe Kapitel 3.3.4). In Kapitel 5.1 wurde Menadion als ein GSH-depletierendes Agens charakterisiert. Phloretin und Quercetin wurden nun auf ihren Einfluss auf die Depletion untersucht. Dazu wurde nach dem Zweistufenprotokoll vorgegangen. In Abbildung 5.19 ist der Gesamtglutathion(tGSH)-gehalt, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, für Quercetin und Phloretin in Caco-2 Zellen dargestellt. Die Md-Konzentration wurde so gewählt, dass sie den Versuchen zur DNA-Schädigung weitgehend entsprachen. Der relative tGSH-Gehalt der Md-Kontrolle ist als Parallele zur x-Achse dargestellt.

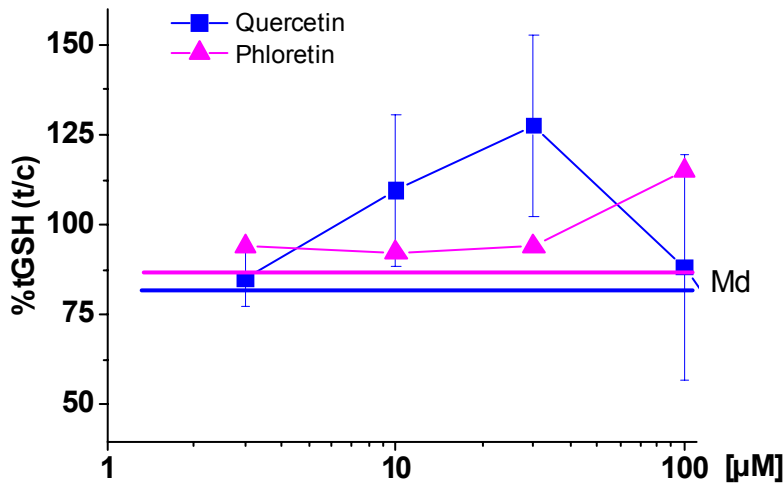


Abbildung 5.19: Modulation Md-induzierter GSH-Depletion (Gerade) in Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit Quercetin und Phloretin (3-100 µM) und nachfolgender Md-Behandlung (2-5 µM); n=1 (Pit) bzw. n=3.

Die Depletion konnte durch beide Substanzen verringert werden, bei Quercetin sogar über den Wert der DMSO-Kontrolle hinaus mit einem Maximum bei 30 µM. Bei Phloretin kam es nur in der höchsten Konzentration zu einem Anstieg. In HepG2 Zellen konnte eine ähnliche Aufhebung TBH-induzierter tGSH-Depletion durch Quercetin von [Alia *et al.*, 2005b] beobachtet werden.

Die Ergebnisse für HT29 Zellen sind in Abbildung 5.20 dargestellt.

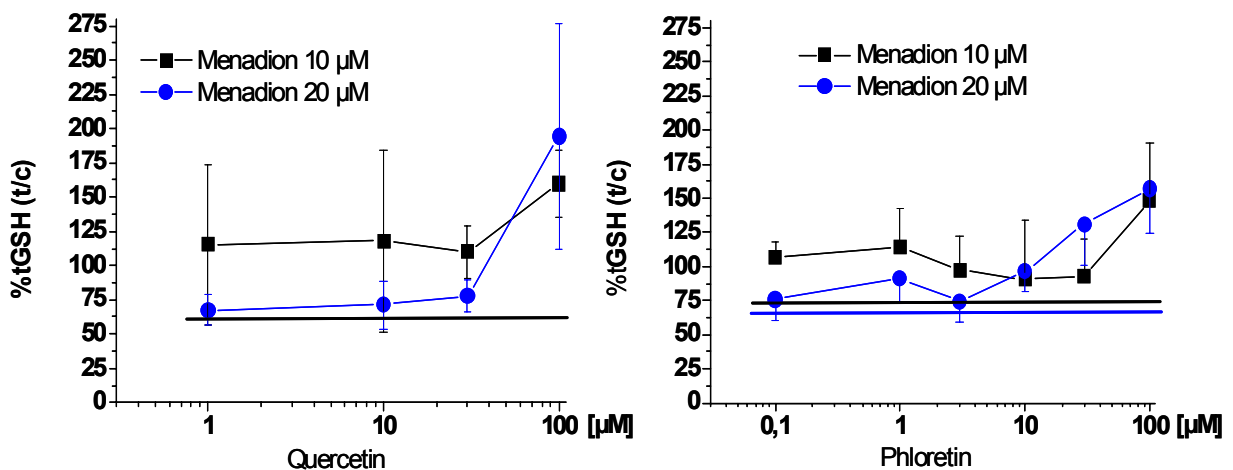


Abbildung 5.20: Modulation Md-induzierter GSH-Depletion (Gerade) in HT29 Zellen nach 24 h Inkubation mit Quercetin und Phloretin (0,1-100 µM) und nachfolgender Md-Behandlung (10, 20 µM); DMSO-Kontrolle = 100% ≈ 21,3 ± 3,1 nmol tGSH/mg Protein; n=3-4.

In der Menadionkonzentration, bei der eine Modulation von DNA-Schäden möglich war (20 µM), wurde die tGSH-Depletion durch beide Aglyka nicht aufgehoben. Nur bei niedrigerer Menadionkonzentration (10 µM) konnte die Depletion verringert werden. Unabhängig von der Menadionkonzentration kam es in der höchsten

Flavonoidkonzentration zu einer deutlichen Erhöhung des tGSH-Spiegels. Dies stimmt überein mit dem in dieser Konzentration ebenfalls beobachteten Anstieg der (oxidativen) DNA-Schädigung. Der erhöhte tGSH-Spiegel lässt sich vermutlich auf eine Gegenregulierung der Zelle auf den induzierten oxidativen Stress zurückführen, der auf die beiden Substanzen zurückzuführen ist, da sie unter bestimmten Voraussetzungen auch prooxidativ wirksam sein können. Der Level reicht jedoch nicht aus, um die Menadion/Quercetin bzw. Phloretin vermittelte DNA-Schädigung abzuwenden.

5.2.6.2 Modulation des Basis-tGSH-Spiegels

Die Modulation tGSH-Gehaltes ohne Menadionbehandlung (Basis-tGSH-Gehalt) durch Quercetin und Phloretin (1-100 μM) wurde in 24-stündiger Inkubation ohne nachfolgende Menadionbehandlung in beiden Zelllinien untersucht (Abbildung 5.21).

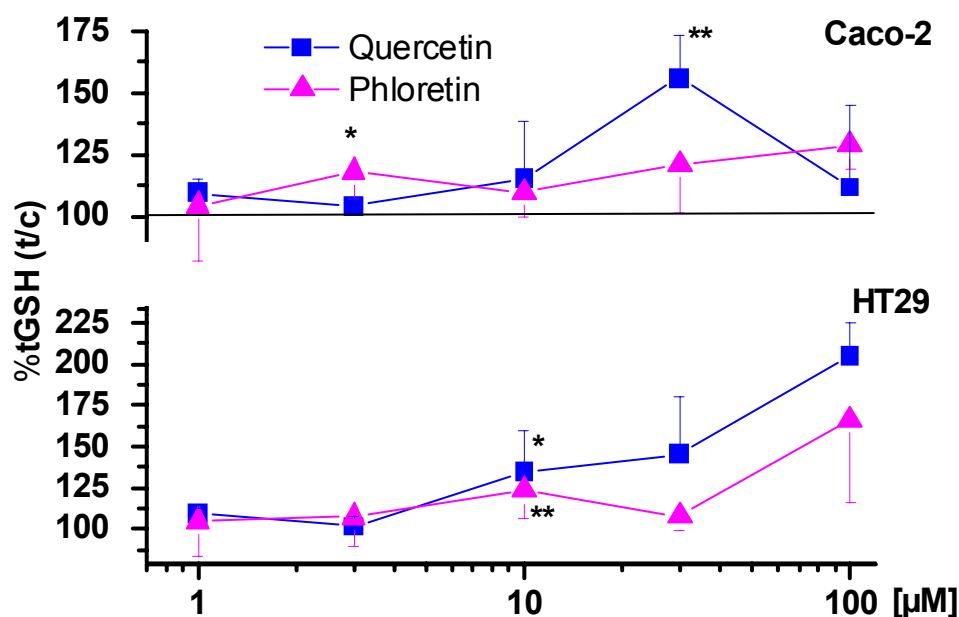


Abbildung 5.21: Modulation des tGSH in Caco-2 (oben) und HT29 Zellen (unten) nach 24 h Inkubation mit Quercetin und Phloretin (1-100 μM); n=3 (unabhängige Versuche, mean \pm SD); *p<0,05; **p<0,01.

Bei alleiniger Quercetininkubation wurde eine Erhöhung des Glutathionspiegels bei 30 μM in Caco-2 Zellen beobachtet, die möglicherweise auf eine Induktion der GSH-Synthese zurückzuführen ist. Beschrieben ist eine Quercetin-vermittelte Induktion der γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase (GCS) in Leberzellen [Scharf *et al.*, 2003].

Phloretin induzierte ebenfalls den tGSH-Spiegel in Caco-2 Zellen in bei einer Konzentration von 3 μM . Auch hier wird die Induktion der GCS als protektiver Effekt ver-

mutet. Die Erhöhung des tGSH-Spiegels durch die beiden Verbindungen wurde in dem Konzentrationsbereich beobachtet, in denen auch die Verringerung der DNA-Schäden optimal war. Dies deutet darauf hin, dass die Zellantwort eine Rolle bei der präventiven Wirksamkeit von Quercetin und Phloretin spielt.

Auch in HT29 Zellen wurde ab 10 μM Quercetin und Phloretin eine deutliche Erhöhung des tGSH-Spiegels beobachtet. Der weitere Anstieg bei 100 μM könnte auf eine Zellabwehr gegen substanzbedingten oxidativen Stress hinweisen, der zusätzlich durch die Zellkulturbedingungen begünstigt sein kann, da der Sauerstoffpartialdruck dort wesentlich höher liegt als unter physiologischen Bedingungen [Halliwell, 2003].

Das oben erwähnte Enzym GCS ist Bestandteil des Antioxidant response element (ARE). Erfährt die Zelle einen moderaten oxidativen Stress, kann das ARE z.B. durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 aktiviert werden, so dass vermehrt Enzyme exprimiert werden, die dem Phase-II-Metabolismus angehören. GCS als limitierendes Schlüsselenzym der Glutathionsynthese kann ebenfalls induziert werden, so dass der Zelle mehr GSH zur Verfügung steht und die endogene antioxidative Abwehr gestärkt wird. [Nguyen *et al.*, 2003]

Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen leiden an einem gestörten GSH-Haushalt im Darm [Sido *et al.*, 1998]. Eine Induktion der GSH-Synthese könnte also der antioxidativen Abwehr im Darm nützlich sein.

5.2.7 Modulation der OH⁻-induzierten Lipidperoxidation

Analog zu der Modulation der oben genannten oxidativen Zellschädigung sollte auch die modulierende Wirkung von Quercetin auf die Lipidperoxidation untersucht werden. In Abbildung 5.22 sind die Ergebnisse in beiden Zelllinien dargestellt.

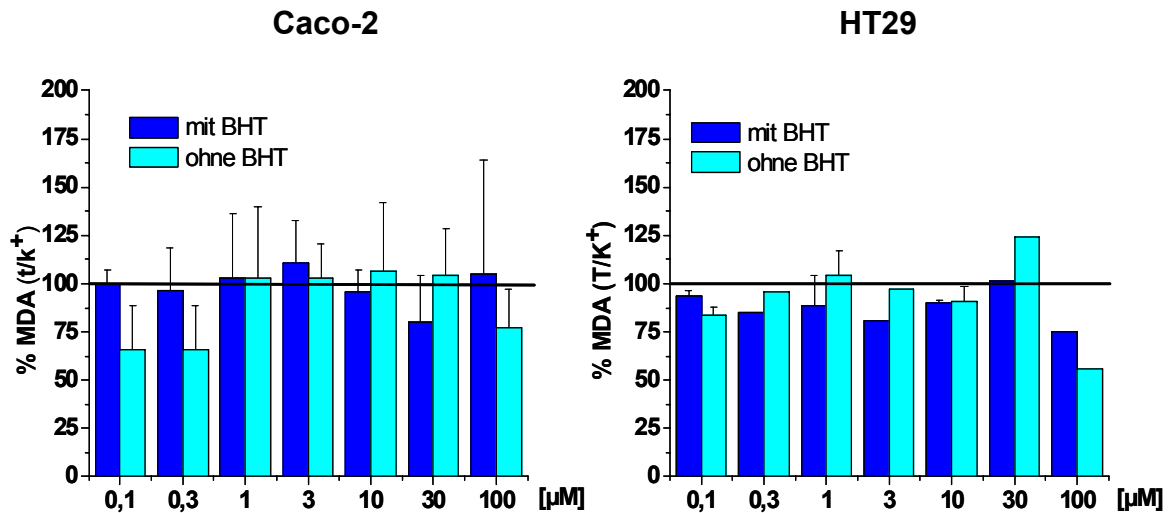


Abbildung 5.22: Effekte auf die OH•-induzierte Lipidperoxidation in Caco-2 Zellen (links, n=3-5) und HT29 (rechts, n=1-2) nach 24 h Inkubation mit Quercetin (0,1-100 μM) und nachfolgender Behandlung mit Fe²⁺/H₂O₂ (30 bzw. 50 μM); 100% entspricht der jeweiligen Oxidationskontrolle mit/ohne BHT-Zusatz (MW mit BHT/ohne BHT: 1,9/5,3 nmol MDA/mg Protein (Caco-2); 1,6/4,0 nmol MDA/mg (HT29) Protein.

Nach 24-stündiger Inkubation mit Quercetin wurde in beiden Zelllinien keine Verringerung der TBARS beobachtet. Lediglich die unspezifischen Schäden, die nach der Zellaufarbeitung und während der Lagerung entstehen können, konnten in Caco-2 Zellen mit kleinsten Quercetinkonzentrationen (0,1-0,3 μM) schwach reduziert werden.

Lipide machen den größten Membrananteil aus. Da die Substanzen diese passieren müssen, kann die LPO während dessen verringert werden. Nach 24 h Inkubation konnte keine Modulation beobachtet werden. Es ist davon auszugehen, dass sich die Antioxidanzien nicht mehr in der Nähe der Zellmembran befinden und so die LPO nicht modulieren konnten. Daher wurde die Inkubationszeit auf 1 h verkürzt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 5.23 aufgeführt.

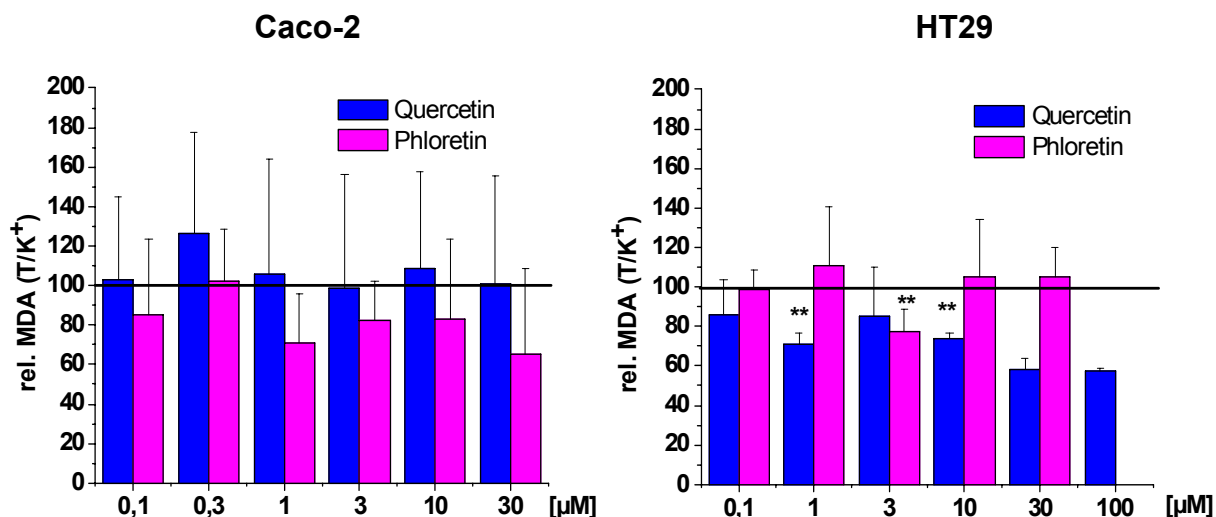


Abbildung 5.23: Effekte auf die OH⁻-induzierte Lipidperoxidation in Caco-2 Zellen (links, n=3) und HT29 (rechts, n=3; 30, 100 μM: n=2) nach 1 h Inkubation mit Quercetin und Phloretin (0,1-100 μM) und nachfolgende Behandlung mit Fe²⁺/H₂O₂ (30 bzw. 50 μM); **p < 0,01.

In Caco-2 Zellen war keine Verringerung der TBARS nach 1-stündiger Vorinkubation mit Quercetin zu beobachten. Durch Phloretin wurde eine schwache, nicht signifikante Abnahme der TBARS-Menge erhalten. In HT29 Zellen dagegen konnte das Ausmaß der LPO durch Quercetin (1; > 3 μM) in geringerem Ausmaß durch Phloretin um ca. 20% reduziert werden.

Bei den hohen Quercetinkonzentrationen kam es zu einem weiteren Abfall des TBARS-Gehaltes. Ein Verlust der stark geschädigten Zellen während der Aufarbeitung kann nicht ausgeschlossen werden, da der Proteingehalt um dieser Proben um ca. 20% niedriger war als bei den Kontrollen. Außerdem kam es bei 100 μM teilweise zu Viabilitätseinbußen und einer gelblich-grünen Verfärbung des Zellpellets während der Aufarbeitung.

Wie in der Literatur beschrieben [Peng und Kuo, 2003] wurde eine Co-Inkubation mit Quercetin und des Fenton-Reagens (30 min Quercetin allein, danach die Oxidansmischung für 3 h dazu), durchgeführt. Dies führte zu hohen zytotoxischen Effekten bei Konzentrationen größer 10 μM, sowie einer deutlichen Grünfärbung des Inkubationsmediums und des Zellpellets bei Aufarbeitung, was auf eine Oxidation des Quercetin hindeutet. Daher wurde diese Inkubationsart nicht weiter verfolgt.

5.2.8 Zusammenfassung der Wirksamkeit der Aglyka

Die Biomarker, die für die Charakterisierung der oxidativen Zellschädigung in humanen Kolonzellen herangezogen werden sollen, müssen empfindlich genug sein, auch

präventive Effekte von Apfelsaftinhaltsstoffen zuverlässig zu erfassen. Die Untersuchung der Aglyka in Darmzellen verfolgte zwei Ziele: Zum einen ist Quercetin ein gut beschriebenes Antioxidans, welches bereits in vielen Testsystemen eingesetzt wurde. Zum anderen sind die Aglyka Quercetin und Phloretin selbst keine Bestandteile des Apfelsaftes, sie können jedoch *in vivo* im Gastrointestinaltrakt aus den entsprechenden Glykosiden freigesetzt werden und dort ihre Wirkung entfalten.

Die für die Aglyka gefundenen Effekte sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Ergebnisse zur antioxidativen Wirksamkeit der Aglyka Quercetin und Phloretin; angegeben ist der wirksame Konzentrationsbereich, hinter dem Schrägstrich das Wirkoptimum.

Modulation von		Caco-2		HT29	
		Que [μ M]	Plt [μ M]	Que [μ M]	Plt [μ M]
(oxidativen) DNA-Schäden	(24 h)	10-30/30	1-30/10	0,1-10/10	0,03-30/1
	(2 h)	10	<10	1-30/10	0,03-30/10
ROS-Level	(24 h)	0,01-30/0,1	0,1-10/0,3	10	10-30
	(2 h)	n.b.	n.b.	0,3	0,3-1
tGSH-Gehalt	(24 h)	30	3	10	10
LPO	(24 h)	--	n.b.	--	n.b.
	(1 h)	--	1-3	>1	3

--: keine Wirksamkeit

n.b.: nicht bestimmt

Die Aglyka zeigen in den meisten Testsystemen gute präventive Wirksamkeit im unteren μ molaren Konzentrationsbereich. Auffällig für den Wirkungsverlauf ist die meistens erhaltene U-Form. Die beiden Substanzen zeigen nicht nur ausgeprägte antioxidative, sondern in einigen Endpunkten in hohen Konzentrationen auch prooxidative Effekte. Durch die Inkubation mit Quercetin und Phloretin wurden geeignete Bedingungen gefunden, das antioxidative Potenzial von Apfelsaftinhaltsstoffen in humanen Kolonzellen zu bestimmen.

Wie schon bei den Oxidanzien zeigten die untersuchten Zellsysteme unterschiedliche Empfindlichkeit bzgl. protektiver Wirksamkeit, so dass es für eine Bewertung der antioxidativen Wirksamkeit notwendig ist, verschiedene Systeme einzusetzen. Unterschiede in Aufnahmeraten von Substanzen, Enzymausstattung für Metabolisierung und Ausscheidung von Stoffen können unterschiedliche Wirkungen zur Folge haben.

5.3 Antioxidative Wirksamkeit der Apfelsaftextrakte

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die antioxidative Wirksamkeit von Apfelsaftinhaltsstoffen in humanen Kolonzellen geprüft. Hierzu wurden von der Forschungsanstalt Geisenheim vier verschiedene Apfelsaftextrakte zur Verfügung gestellt, die sich in ihrer Sortenauswahl bzw. ihrer technologischen Gewinnung unterscheiden. Die genaue Zusammensetzung ist in Kapitel 3.5 beschrieben.

5.3.6 Antioxidative Kapazität (TEAC)

Zunächst wurde die antioxidative Kapazität im zellfreien System bestimmt. Die vier Extrakte zeigten eine miteinander vergleichbare antioxidative Kapazität mit folgender Abstufung (TEAC-Wert jeweils in Klammern [mM Trolox], n=3)

$$\text{APE03 (4,2)} > \text{AE04 (4,0)} > \text{AE02 (3,7)} > \text{AE01 (3,4)}.$$

Der Tresterextrakt APE03 enthält die antioxidativ wirksamsten Substanzen, während AE01 der am schwächsten Wirksame ist.

Da während der Inkubation Abbaureaktionen stattfinden können, wurde ebenfalls der TEAC nach 24 h-Inkubation bei 37°C (Brutschrank) in PBS gemessen. Unabhängig von der Zusammensetzung der Extrakte nahm der TEAC nach 24 h um ca. 25% des Ausgangs-TEAC ab. Während der Inkubation wird die antioxidative Kapazität möglicherweise durch Abbaureaktionen oder Polymerisationen beeinflusst. Ausfallen von Apfelsaftinhaltsstoffen konnte bei der geringen Menge der eingesetzten Extrakte (5 µg/mL) nicht beobachtet werden.

In den jeweiligen Zellkulturmedien (ohne Zusatz von FKS) konnte der TEAC nicht bestimmt werden, da die blaue ABTS-Radikallösung bereits durch das Medium selbst entfärbt wurde. Möglicherweise spielen Mediumzusätze wie Vitamine und redox-sensitive Aminosäuren eine Rolle.

5.3.7 Modulation Md-induzierter DNA-Schäden

Nach 24 h-Inkubation mit den Apfelsaftextrakten AE01 und APE03 wurde eine ausgeprägte Abnahme Md-induzierter (oxidativer) DNA-Schäden in Caco-2 Zellen beobachtet (Abbildung 5.24).

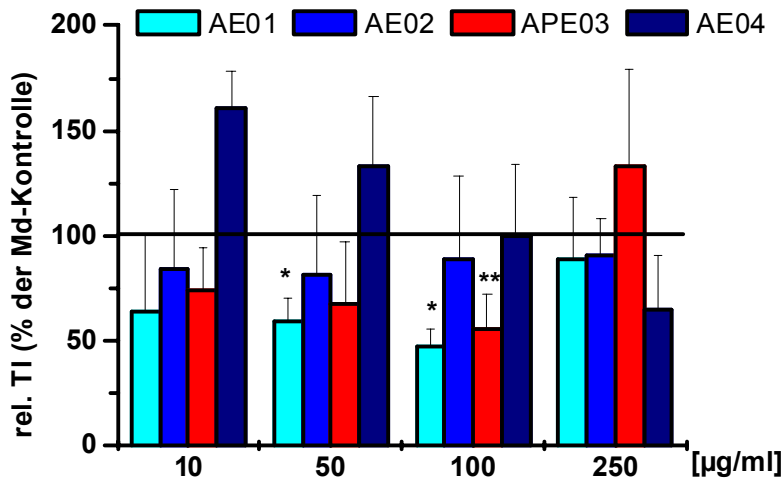


Abbildung 5.24: Modulation induzierter Gesamt-DNA-Schäden in Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit Apfelsaftextrakten und Nachbehandlung mit Menadion (Md) 5 µM, 1 h; Monolayer; n=3-6 (unabhängige Versuche, mean, ± SD); *p<0,05; **p<0,01.

Die optimalen Wirkkonzentrationen lagen bei 50-100 µg/mL. Wie bei den Aglyka ist eine unterschiedlich ausgeprägte U-förmige Kurve erkennbar. AE02 war wesentlich schwächer, AE04 war nur bei der höchsten eingesetzten Konzentration schwach wirksam, in kleinen Konzentrationen (10-50 µg/mL) wies er eine deutliche Erhöhung der Gesamt-DNA-Schäden auf. Höhere Konzentrationen wurden aufgrund Löslichkeitsprobleme nicht mehr eingesetzt. Während der Zellinkubation wurden speziell bei AE02 Hinweise auf Reaktionen der Apfelinhaltsstoffe erhalten: sichtbare Verfärbungen bei 250 µg/mL weisen auf Polymerisationsprozesse hin

In HT29 Zellen (Abbildung 5.25) konnte nur AE01 die Md-induzierten DNA-Schäden signifikant reduzieren. Das Wirkoptimum lag etwas niedriger als bei den Caco-2 Zellen bei 50 µg/mL.

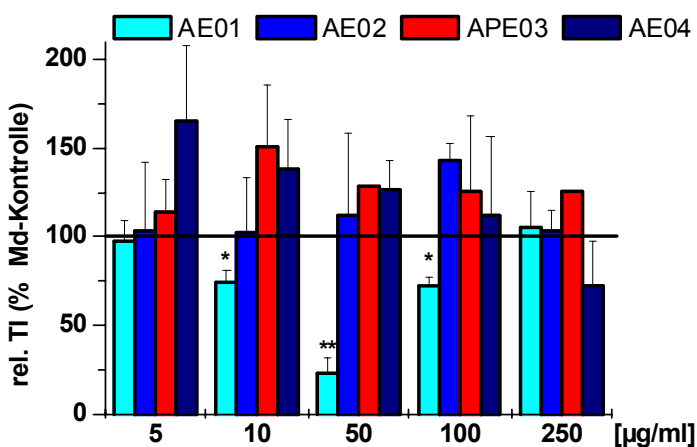


Abbildung 5.25: Modulation induzierter Gesamt-DNA-Schäden in HT29 Zellen nach 24 h Inkubation mit Apfelsaftextrakten und Nachbehandlung mit Menadion (Md) 20 µM, 1 h; Monolayer; n=3-7 (unabhängige Versuche, mean, ± SD); *p < 0,05; **p < 0,01.

Alle anderen Extrakte waren unwirksam. AE04 zeigt auch hier neben APE03 prooxidative Effekte in kleinen Konzentrationen. Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse, die in den beiden Zellsystemen erhalten wurden, liegt die Vermutung nahe, dass bei der präventiven Wirksamkeit von Apfelsaftextrakten zellspezifische Faktoren eine große Rolle spielen. Caco-2 Zellen sind insgesamt das sensitivere System zur Erfassung der Verringerung von Md-induzierten DNA-Schäden, da fast alle Extrakte Wirkung zeigten.

Für die Apfelsaftextrakte wurde neben der Langzeitinkubation (24 h) auch eine kurze Inkubationszeit (2 h) gewählt, um direkte antioxidative und indirekte Zellantwort-vermittelte Wirkungen der Apfelsaftextrakte zu untersuchen (Abbildung 5.26).

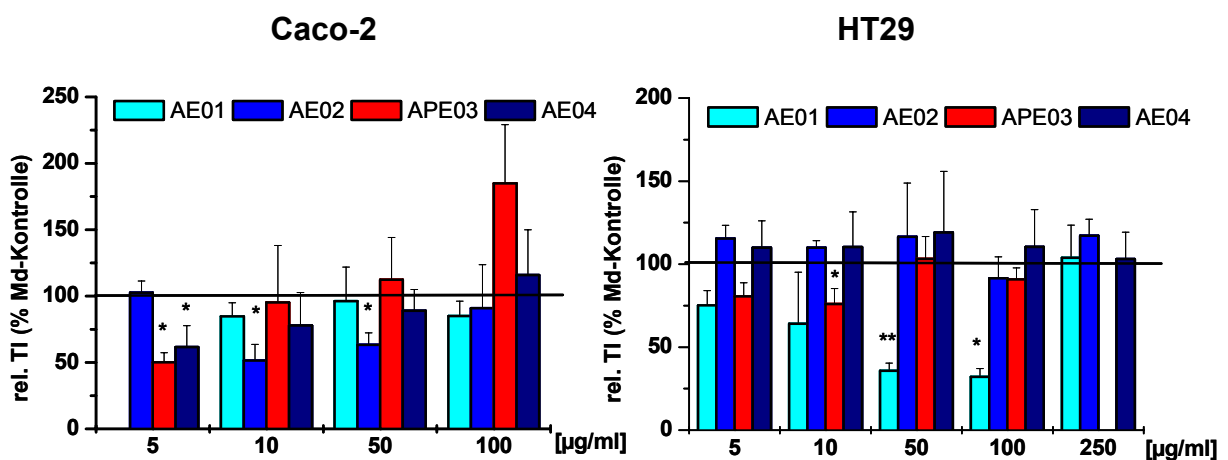


Abbildung 5.26: Modulation induzierter Gesamt-DNA-Schäden in Caco-2 (links) und in HT29 Zellen (rechts) nach 2 h Inkubation mit Apfelsaftextrakten und Nachbehandlung mit Menadion (Md) 5 bzw. 20 µM, 1 h; Monolayer; n=2-4 (unabhängige Versuche, mean, ± SD); *p < 0,05; **p < 0,01.

Nach 2-stündiger Inkubation waren die Unterschiede der Wirksamkeit der Apfelsaftextrakte noch deutlicher: APE03, AE04 und AE02 waren in Caco-2 Zellen bereits bei 5 bzw. 10 µg/mL präventiv wirksam. 1 µg/mL zeigte keine Effekte (s. Anhang). In hohen Konzentrationen (100 µg/mL) wurden bei APE03 starke prooxidative Effekte beobachtet. AE01 dagegen zeigte keine Wirkung im eingesetzten Konzentrationsbereich. Da AE01 nach 24 h sehr wirksam war, müssen hier andere als direkte antioxidative Effekte eine Rolle spielen. Im Gegensatz dazu war AE01 in HT29 Zellen (rechts) der einzige wirksame Extrakt nach 2 h-Inkubation, was die Vermutung zellspezifischer Reaktionen bestärkt.

In PKZ wurde die präventive Wirksamkeit von Apfelsaftextrakten ebenfalls untersucht (Abbildung 5.27).

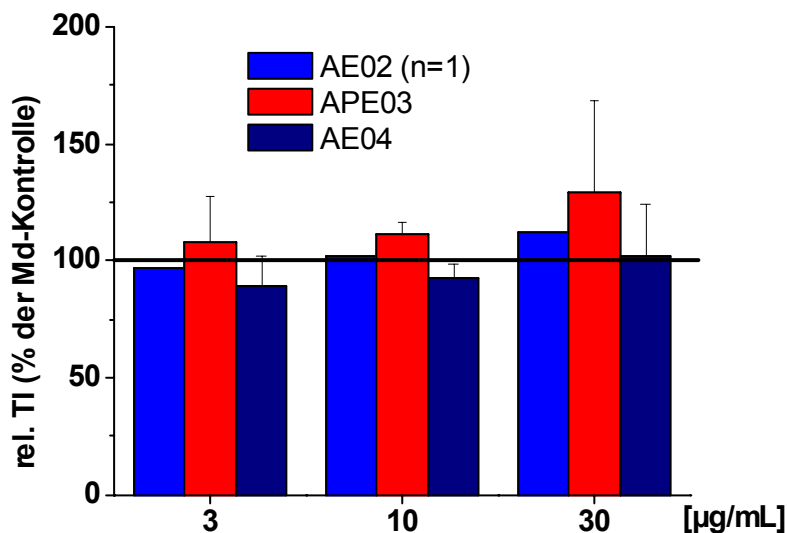


Abbildung 5.27: Modulation induzierter Gesamt-DNA-Schäden in PKZ nach 2 h Inkubation mit Apfelsaftextrakten und Nachbehandlung mit Menadion (Md) 2 µM, 1 h; Suspension; n=3 (AE02: n=1) (unabhängige Versuche, mean, ± SD).

Die Gesamt-DNA-Schäden wurden durch die Apfelsaftextrakte nicht reduziert. Die fehlende Wirksamkeit kann drei Ursachen haben: Aufgrund des limitierten Zellmaterials wurden nur wenige Konzentrationen getestet, im Hinblick auf die Sensitivität gegenüber der Aglyka (Kapitel 5.2.3) erscheint es jedoch unwahrscheinlich, dass die Extrakte in noch kleineren Konzentrationen wirksam sind. Des Weiteren reagieren PKZ, wenn sie aus dem Zellverband vereinzelt sind, möglicherweise weniger sensitiv gegenüber Antioxidantien. Eine dritte Möglichkeit für die im Gegensatz zu den Zelllinien fehlenden Effekte könnte die Art der Inkubation sein. Während die Zelllinien in Monolayerkultur inkubiert wurden, ist die Substanzbehandlung bei den PKZ nur in Suspension möglich.

Um die letzte Möglichkeit zu prüfen, wurde APE03 in Caco-2 Zellen, der sich dort als besonders wirksam gezeigt hatte (Abbildung 5.26), auf drei verschiedene Arten inkubiert: Zweistufenprotokoll im Monolayer in Petrischalen, Zweistufenprotokoll in Suspension, Co-Inkubation (2 h Inkubation des Extrakts, in das gleiche Medium Md für eine weitere Stunde). Die genaue Vorgehensweise ist in Tabelle 5.2 dargestellt.

Tabelle 5.2: Inkubationsbedingungen für Monolayer- und Suspensionskultur von Caco-2 Zellen ($2,5 \times 10^5$ pro Gel) im Vergleich.

	Monolayer 2 Stufen	Suspension 2 Stufen	Suspension Co-Inkubation
Vorbereitung	24 h Anwachsen 6 cm Petrischalen	Abtrypsinieren, Zellzahl einstellen ein 1,5 mL- Reaktionsgefäß pro Gel	Abtrypsinieren, Zellzahl einstellen ein 1,5 mL- Reaktionsgefäß pro Gel
Inkubation mit APE03	0,1% DMSO I-Med (6 mL) 2 h	1% DMSO I-Med (500 µL) 2 h	0,5% DMSO I-Med (500 µL) 2 h
Waschen	Absaugen, PBS	Zentrifugieren ¹ PBS, resuspendieren Zentrifugieren ¹	--
Menadionbehandlung	0,1% DMSO S-Med (6 mL) 1 h	1% DMSO S-Med (500 µL) 1 h	nach 1 h APE03 Zugabe von Md (0,5 % DMSO) 1 h
Zellaufarbeitung	Absaugen, Waschen, Trypsin Abschaben, auf Eis	direkt auf Eis	direkt auf Eis

Zentrifugieren (10 min, 2.000 Upm, 4°C)

Zentrifugieren: 3.000 Upm, 20 min, danach Überstand vorsichtig mit Pipette absaugen

Aufgrund des Zweistufenprotokolls waren während der Inkubation als Suspensionszellen viele Wasch- und Zentrifugationsschritte notwendig, die jeweils zu erhöhtem Stress und Zellverlust führten, so dass das Protokoll oft zur Optimierung modifiziert werden musste.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.28 dargestellt.

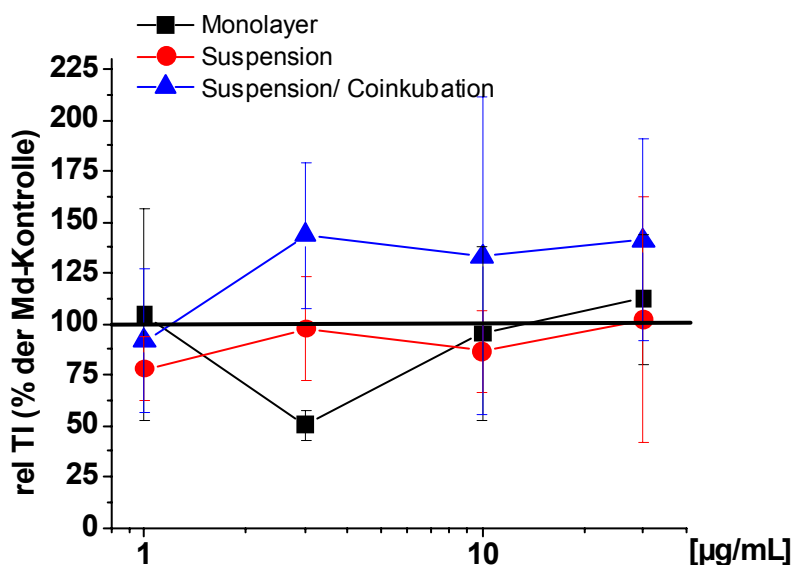


Abbildung 5.28: Modulation Md-induzierter Gesamt-DNA-Schäden in Caco-2 Zellen durch 2 h Inkubation mit APE03 (1-30 µg/mL); (■): Monolayer; (●): Suspension; (▲): Suspension mit Co-Inkubation; je n=3 (unabhängige Versuche, mean, ±SD).

In Caco-2 Zellen, als Monolayerkultur inkubiert, zeigt die Behandlung mit APE03 eine deutliche Verringerung der Md-induzierten DNA-Schäden bei 3 µg/mL. In Suspension dagegen wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Bei der Co-Inkubation, bei der zwar die Waschschriffe wegfallen, Antioxidans und Oxidans jedoch zusammen im Medium vorliegen, kommt es sogar zu einer Erhöhung der Schäden, wobei die Schwankungen der Ergebnisse in dieser Inkubationsform am größten sind.

Sofern Caco-2 Zellen mit den PKZ vergleichbar reagieren, kann daraus gefolgert werden, dass die beobachtete geringe Wirksamkeit der Substanzen nicht nur auf der geringen Empfindlichkeit der PKZ beruht, sondern auch die Art der Inkubation Bedeutung hat.

5.3.8 Modulation des TBH-induzierten zellulären ROS-Levels

Die Beeinflussung des Redoxstatus von Caco-2 und HT29 Zellen durch Apfelsaftextrakte wurde mit dem Oxidans *tert*-Butylhydroperoxid (TBH, 250 µM) im DCF-Assay untersucht (Abbildung 5.29).

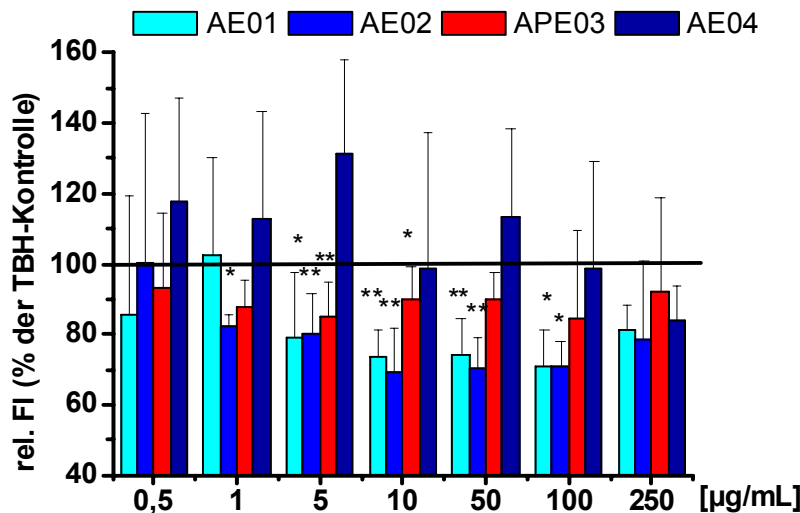


Abbildung 5.29: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in Caco-2 Zellen durch 24 h-Inkubation mit Apfelsaftextrakten und nachfolgende TBH-Behandlung (250 µM, 40 min); n=3-6 (unabhängige Versuche; mean ± SD); signifikant: *p<0,05; **p<0,01.

Der TBH-induzierte ROS-Level wurde durch die Apfelsaftextrakte AE01, AE02 und APE03 vermindert. AE02 zeigte die höchste Wirksamkeit, AE04 war unwirksam. Da die beiden Extrakte in ihrer Zusammensetzung (soweit bekannt) sehr ähnlich sind, liegt nahe, dass für die unterschiedliche Wirksamkeit andere Inhaltsstoffe verantwortlich sind.

Die Ergebnisse mit HT29 Zellen sind in Abbildung 5.30 dargestellt:

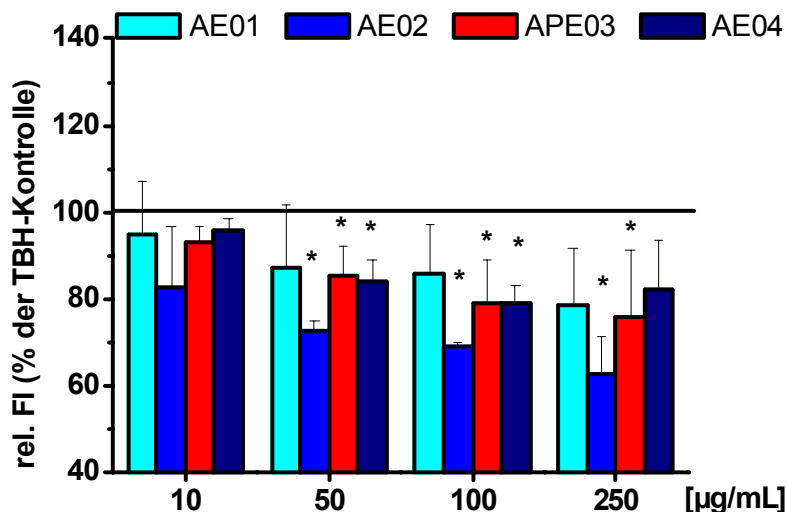


Abbildung 5.30: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in HT29 Zellen durch 24 h-Inkubation mit Apfelsaftextrakten und nachfolgende TBH-Behandlung (250 µM, 40 min); n=3 (unabhängige Versuche; mean ± SD); signifikant: *p < 0,05.

TBH-induzierte intrazelluläre ROS wurden durch alle Apfelsaftextrakte deutlich verringert. AE02 war am wirksamsten, während sich APE03, AE04 und AE01 nicht we-

sentlich unterschieden. Es waren jedoch für alle Extrakte höhere Konzentrationen nötig, um ähnliche Effekte wie in Caco-2 Zellen zu erzielen. Eine Verkürzung der Inkubationszeit auf 2 h hatte keine Verringerung des ROS-Levels durch die Apfelsaftextrakte in HT29 Zellen zur Folge (Abbildung 5.31).

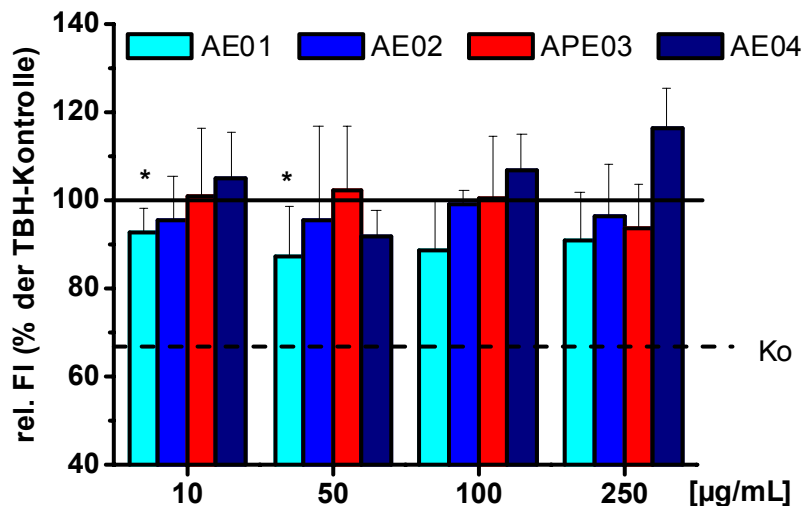


Abbildung 5.31: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in HT29 Zellen durch 2 h-Inkubation mit Apfelsaftextrakten und nachfolgende TBH-Behandlung (250 µM, 40 min); n=3 (unabhängige Versuche; mean ± SD); signifikant: *p<0,05.

Lediglich AE01 reduzierte den ROS-Level um ca. 10%.

Dies könnte bedeuten, dass die Zelle durch die Extrakte ihre endogene Abwehr aktiviert, so dass das nachfolgende Oxidans effektiv abgefangen werden kann.

5.3.9 Modulation des tGSH-Spiegels

Der Einfluss der Apfelsaftextrakte auf den Grund-tGSH-Gehalt ohne Md-Behandlung wurde in beiden Zelllinien untersucht. Abbildung 5.32 zeigt die Ergebnisse für Caco-2 Zellen.

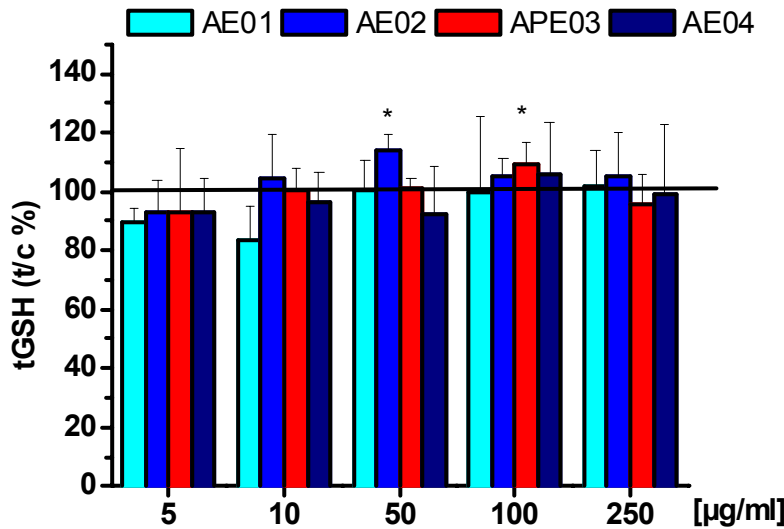


Abbildung 5.32: Modulation des tGSH in Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit Apfelsaftextrakten; n=3 (unabhängige Versuche, mean \pm SD); gemittelter tGSH-Gehalt der DMSO-Kontrolle: 95 ± 20 nmol/mg Protein; * $p < 0,05$.

AE02 und APE03 erhöhten den tGSH-Gehalt schwach, jedoch signifikant bei Konzentrationen von 50 bzw. 100 µg/mL. Das Wirkoptimum entspricht dabei der Konzentration, bei der auch die DNA-Schädigung optimal reduziert wurden (Abbildung 5.24).

In HT29 Zellen konnten diese Effekte nicht beobachtet werden (Abbildung 5.33).

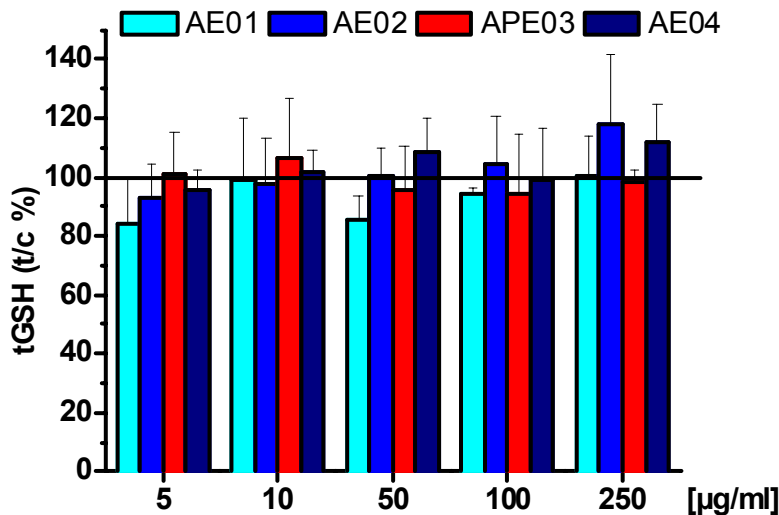


Abbildung 5.33: Modulation des tGSH in HT29 Zellen nach 24 h Inkubation mit Apfelsaftextrakten; n=3 (unabhängige Versuche, mean \pm SD) gemittelter tGSH-Gehalt der DMSO-Kontrolle: 95 ± 20 nmol/mg Protein.

AE01 zeigte im Gegenteil eine schwache Depletion bei 50 µg/mL.

Die Ergebnisse für die Modulation einer Menadion-vermittelten tGSH-Depletion durch die Apfelsaftextrakte ist in Abbildung 5.34 dargestellt.

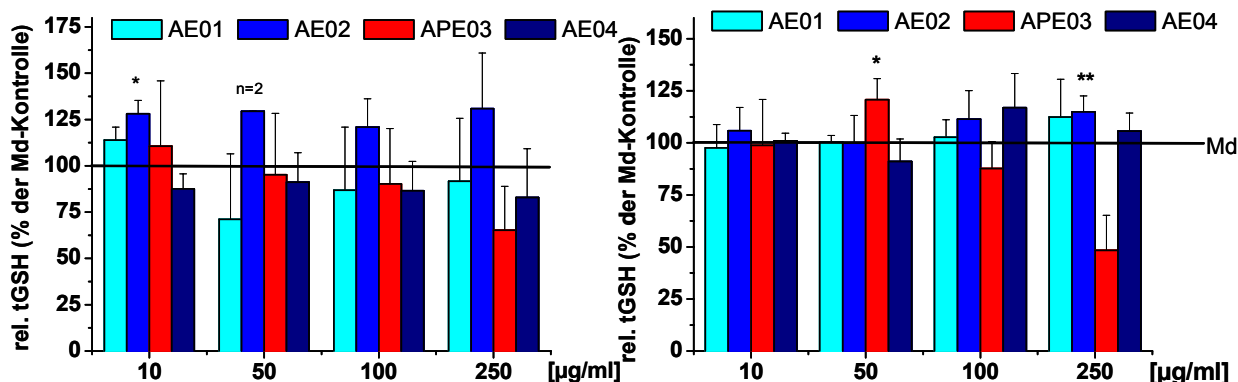


Abbildung 5.34: Modulation Md-vermittelter tGSH-Depletion durch die Apfelsaftextrakte in Caco-2 (links) und HT29 Zellen (rechts) nach 24 h-Vorinkubation und nachfolgende Behandlung mit Md (4 µM in Caco-2, 20 µM in HT29); n=3-5 (unabh. Versuche; mean ± SD); Signifikanz: *p< 0,05, ** p< 0,01.

Der Extrakt AE02 hob in Caco-2 Zellen die Md-induzierte tGSH-Depletion im gesamten eingesetzten Konzentrationsbereich auf, in HT29 nur in den höheren Konzentrationen. APE03 war in HT29 Zellen bei einer Konzentration von 50 µg/mL ebenfalls wirksam, in der höchsten Konzentration führte die Inkubation des Extraktes zu einer deutlichen Depletion in beiden Zelllinien. Da letzterer Effekt ohne Menadion nicht beobachtet wurde, liegt nahe, dass die Zellen bereits durch APE03 geschädigt waren, was durch die Behandlung mit Menadion verstärkt wurde. Im Vergleich zur Menadionkontrolle wurde eine Abnahme der Viabilität durch die Vorinkubation mit APE03 von ca.90% auf 75% beobachtet. Eine so deutliche Abnahme der Viabilität wurde ohne nachfolgende Md-Behandlung nicht erhalten.

Aussagen über den zellulären GSH-Status konnten nicht zuverlässig getroffen werden, da der GSSG-Gehalt bei den meisten Messungen im Bereich der Nachweisgrenze lag und daher nicht zur Berechnung des Status herangezogen werden konnte.

5.3.10 Zusammenfassung der Wirksamkeit von Apfelsaftextrakten

Die Apfelsaftextrakte zeigten protektive Wirksamkeit, jedoch unterschieden sie sich innerhalb der Testsysteme.

Die antioxidative Kapazität (TEAC) zeigt für die Apfelsaftextrakte keine deutlichen Unterschiede. Dieses Testsystem kann nur die direkte Radikal-abfangende Eigenschaft einer Verbindung wiedergeben. Faktoren wie Bioverfügbarkeit, Abbaureaktio-

nen und Zellantwort bleiben dabei unberücksichtigt. Eine Korrelation zu den biologischen Endpunkten ist nur mit der Modulation der DNA-Schäden nach 2 h-Inkubation mit den Extrakten erkennbar.

Die untersuchten phenolischen Apfelsaftextrakte (AE) sind in humanen Kolonzelllinien (Caco-2, HT29) präventiv wirksam. Caco-2 Zellen erwiesen sich als das empfindlichere System zur Detektion präventiver Effekte. Oxidative Zellschäden wurden durch die Saftextrakte AE01, AE02 und AE04 und dem Trestersaftextrakt APE03 in unterschiedlichem Ausmaß verringert. Die Extrakte zeigen nur relativ schwache Unterschiede in ihrer präventiven Wirksamkeit: DNA-Schäden wurden besonders effektiv durch AE01 und APE03, der zelluläre ROS-Level durch AE02 und AE01 bzw. AE03 (v.a. in HT29 Zellen) verringert; eine Erhöhung des tGSH-Spiegels wurde durch AE02 und APE03 erreicht, AE04 war insgesamt nur wenig wirksam.

Die Auswahl der Apfelsorten bzw. Technologie der Saffherstellung haben für die antioxidative Wirksamkeit nicht die überragende Bedeutung, obwohl sich die Zusammensetzung der untersuchten polyphenolischen Saftextrakte (AE01, 02, 04) wesentlich im Gehalt an Kaffeesäure unterscheidet, der bei AE01 15-20mal höher ist als bei AE02 und AE04. Andere bekannte Hauptkomponenten (Quercetinglykoside, Phloridzin, Epicatechin, Chlorogensäure) sind in vergleichbaren Gehalten präsent. Das Polyphenolmuster des Tresterextraktes APE03 zeigt v.a. hohe Gehalte an Phloretin- und Quercetinglykoside, die durch die enzymatische Behandlung des Tresters herausgelöst wurden [Thielen *et al.*, 2004]. Demgegenüber werden einige Phenolcarbonsäuren, wie z.B. Chlorogensäure bei der Enzymbehandlung abgebaut.

Während der Zellinkubation wurden speziell bei AE02 Hinweise auf Reaktionen der Apfelinhaltsstoffe erhalten: sichtbare Verfärbungen bei 250 µg/mL weisen auf Polymerisationsprozesse hin. Es ist jedoch bei allen Extrakten zu berücksichtigen, dass nur rund 50% der Polyphenole bisher identifiziert und quantifiziert sind. So können für die unterschiedliche biologische Wirksamkeit auch bisher nicht untersuchte Substanzen wie z.B. höhermolekulare Proanthocyanidine oder noch nicht charakterisierte Verbindungen eine Rolle spielen.

5.4 Antioxidative Wirksamkeit der Apfelsaftinhaltsstoffe

Die zuvor untersuchten Apfelsaftextrakte zeigen in unterschiedlichem Maße antioxidative Wirksamkeit in den eingesetzten Systemen. In diesem Kapitel soll der Frage nachgegangen werden, ob und in welchem Ausmaß sich die beobachteten Effekte auf bestimmte Inhaltsstoffe zurückführen lassen. Dazu wurden Mischungen aus fünf Hauptkomponenten in der Zusammensetzung hergestellt (Kapitel 4.3.2), wie sie in den entsprechenden Apfelsaftextrakten vorkommen unter der Annahme, dass der Extrakt zu 100% aus diesen Substanzen bestünde. Da sich die Gehalte der gewählten Verbindungen für AE02 und AE04 nahezu gleich sind, wurde auf die vierte Mischung verzichtet. Es ergab sich folgende prozentuale Zusammensetzung (Tabelle 5.3):

Tabelle 5.3: Prozentuale Zusammensetzung der rekonstituierten Mischungen (rAEs)

Substanz	rAE01 (%)	rAE02 (%)	rAPE03 (%)
Quercetin-Glykoside (als Rutin)	1,8	2,6	47,2
Phloretin-Glykoside (als Phloridzin)	26,1	37,3	44,9
Chlorogensäure	43,3	53,0	7,8
Kaffeensäure	25,9	1,4	1,6
Epicatechin	2,9	5,6	7,2
Anteil am Gesamtextrakt	39,7	34,2	24,6

5.4.6 Antioxidative Kapazität

In der folgenden Tabelle sind die Standard-TEAC-Werte und die rel. TEAC-Werte (nach 24 h-Inkubation in PBS) für die Einzelstoffe (a) sowie die der rekonstituierten Mischungen (b) zusammengefasst.

Tabelle 5.4: TEAC-Werte und rel. TEAC nach 24 h Inkubation von a) Einzelstoffen und b) rekonstituierten Mischungen.

(a)			(b)			
Substanz	TEAC [mM]	rel. TEAC [% t ₀]		rAE01	rAE02	rAPE03
Kaffeensäure	1,26	150	TEAC [mM]	5,0	5,3	7,9
Chlorogensäure	1,24	155	Σ-TEAC ¹ [mM]	5,2	5,2	7,6
Epicatechin	3,6	79	Anteil am AE-TEAC ² [%]	58	50	45
Rutin	3,7	85				
Phloridzin	3,6	103	rel. TEAC [% t ₀]	100	93	90

¹ Σ-TEAC: TEAC-Werte der Einzelsubstanzen nach ihren Gewichtsanteilen in den Mischungen aufsummiert

² Anteil am AE-TEAC: Berechneter Anteil, wieviel die rekonstituierte Mischung als Teil des natürlichen Extrakts an dessen antioxidative Wirksamkeit ausmacht.

Die beiden Glykoside Phloridzin und Rutin und Epicatechin zeigen rel. hohe TEAC-Werte, die beiden Hydroxycimtsäurederivate dagegen geringere antioxidative Kapazität. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Chlorogensäure und Kaffeensäure nur die *o*-Catecholgruppe als relevante Gruppe für antioxidative Wirksamkeit aufweisen, die Flavonoide dagegen haben mehrere Gruppen, die für ihre Radikal-abfangende Eigenschaften eine Rolle spielen [Rice-Evans *et al.*, 1996]. Die TEAC-Werte stimmten mit der Literatur überein. Nur für Rutin, Epicatechin und Phloridzin wurden um 0,5-1 höhere Werte erhalten als in der Literatur beschrieben [Miller *et al.*, 1995, Rice-Evans *et al.*, 1996]. Dies könnte damit begründet werden, dass der TEAC sehr pH-Wert-abhängig ist und kleine Schwankungen schon andere Ergebnisse liefern können [Lemanska *et al.*, 2001]. Absolute Aussagen über die antioxidative Kapazität sind daher nur unter identischen Testbedingungen möglich.

Die antioxidative Kapazität der rekonstituierten Mischungen (5,0-7,9) war insgesamt höher als die der natürlichen Extrakte (3,4-4,2), die Rangfolge der Mischungen entsprach der der Extrakte. Eine Summierung der TEAC-Werte der Einzelsubstanzen (Tabelle 5.4, b) nach ihrem Mengenanteil in der Mischung ergaben vergleichbare Werte, so dass in diesem System synergistische Effekte zwischen den Einzelsubstanzen weitgehend ausgeschlossen werden können.

Die rekonstituierten Mischungen machen zwischen 25 und 40% der Menge der Extrakte aus. Wird die antioxidative Kapazität der rekonstituierten Mischungen auf den

Massenanteil der Mischungen im Extrakt bezogen (25-40%) und vergleicht diese mit der antioxidativen Kapazität der Extrakte, so erhält man den prozentualen Anteil der Mischungen am TEAC der natürlichen Extrakte (Tabelle 5.4, b). Da dieser Anteil höher ist als der Massenanteil, müssen die Mischungen überproportional an der antioxidativen Kapazität der Extrakte beteiligt sein.

Analog zu den natürlichen Apfelsaftextrakten wurde auch hier die antioxidative Kapazität über 24 h verfolgt. Die antioxidative Kapazität der rekonstituierten Mischungen war stabiler als die der Extrakte, die maximale Abnahme betrug 10%. Die unbekanntenen Inhaltsstoffe der Extrakte könnten damit bei der verstärkten Abnahme der TEAC-Werte der Extrakte eine Rolle spielen. Welchen Beitrag die Einzelsubstanzen an der Abnahme leisten, ist nur orientierend zu beurteilen: Die antioxidative Kapazität der beiden Hydroxycimtsäurederivate nahm nach 24 h Inkubation um 50% zu, Phloridzin blieb konstant, Rutin und Epicatechin nahmen in ihrer antioxidativen Kapazität um 20 bzw. 10% ab. Dies legt strukturelle Änderungen (Abbau) während der Inkubation nahe (Kapitel 5.5).

5.4.7 Modulation Md-induzierter DNA-Schäden

Analog zu den Apelsaftextrakten wurden auch die rekonstituierten Mischungen (0,5-250 µg/mL) auf Modulation induzierter (oxidativer) DNA-Schäden in beiden Zelllinien untersucht. Abbildung 5.35 zeigt die Ergebnisse in Caco-2 Zellen.

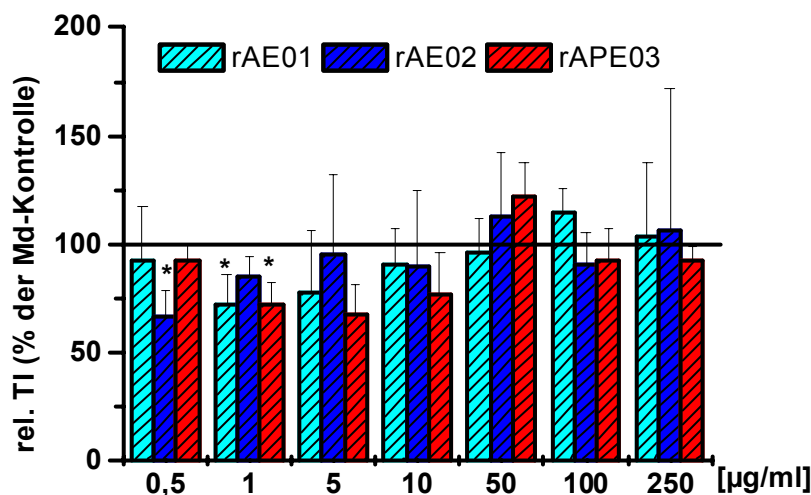


Abbildung 5.35: Modulation induzierter Gesamt-DNA-Schäden in Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit rekonstituierten Mischungen und Nachbehandlung mit Menadion (Md) 5 µM, 1 h; Monolayer; n=3-5 (unabhängige Versuche, mean, ± SD); *p<0,05.

Nach 24 h Inkubation reduzierten die Mischungen rAE01 und rAPE03 bei Konzentration um 1 µg/mL die induzierten DNA-Schäden, rAE02 war bereits bei 0,5 µg/mL wirksam. In höheren Konzentrationen (>10 µg/mL) wurde analog zu den Untersuchungen der natürlichen Extrakte (Abbildung 5.24) ein Wiederanstieg der DNA-Schäden beobachtet, während die natürlichen Extrakte erst bei höheren Konzentrationen (>10 µg/mL) wirksam waren. Dies weist darauf hin, dass die untersuchten Einzelstoffe zu einem wesentlichen Anteil der präventiven Wirksamkeit der Extrakte beteiligt sind.

Die modulierende Wirkung der einzeln untersuchten Saftinhaltsstoffe ist in Abbildung 5.36 dargestellt:

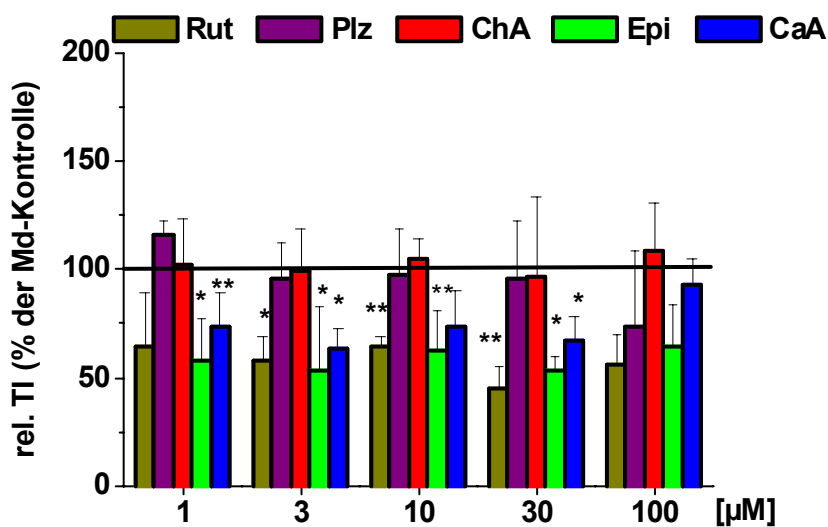


Abbildung 5.36: Modulation induzierter Gesamt- DNA-Schäden in Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit Einzelstoffen und Nachbehandlung mit Menadion (Md) 5 µM, 1 h; Monolayer; n=3-5 (unabhängige Versuche, mean, ± SD); *p<0,05; **p<0,01.

Rutin (Rut), Kaffeesäure (CaA) und Epicatechin (Epi) waren im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich in der Lage, DNA Schäden in Caco-2 Zellen um nahezu 40-50% zu reduzieren. Erst in der höchsten eingesetzten Konzentration wurde ein leichter Wiederanstieg beobachtet. Chlorogensäure (ChA) und Phloridzin (Plz) dagegen zeigten keine Wirksamkeit.

Der hohe Anteil an Kaffeesäure in rAE01 lässt darauf schließen, dass diese Mischung deshalb sehr günstig für Reduktion oxidativer DNA-Schäden ist. Die Mischung rAPE03 enthält viel Rutin; Chlorogensäure macht dagegen nur ein Zehntel gegenüber den anderen beiden Mischungen aus. Damit scheint Rutin einen großen Anteil an der beobachteten Wirksamkeit des rAPE03 zu besitzen.

In HT29 Zellen wurden die rekonstituierten Mischungen ebenfalls untersucht (Abbildung 5.37).

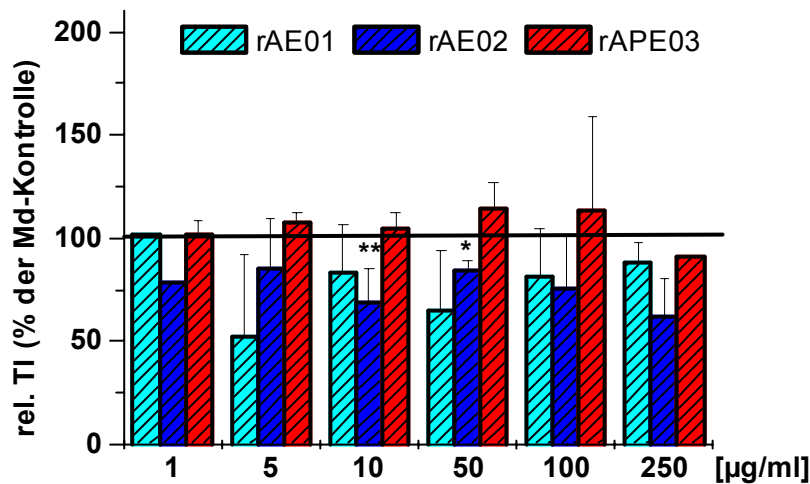


Abbildung 5.37: Modulation induzierter Gesamt-DNA-Schäden in HT29 Zellen nach 24 h Inkubation mit rekonstituierten Mischungen und Nachbehandlung mit Menadion (Md) 20 µM, 1 h; Monolayer; n=1-5 (unabhängige Versuche, mean, ± SD); *p<0,05; **p<0,01.

Die DNA Schäden wurden durch die rekonstituierten Mischungen in unterschiedlichem Ausmaß verringert, Im Vergleich zu Caco-2 Zellen waren höhere Konzentrationen erforderlich, um entsprechende Wirksamkeit zu erhalten. rAPE03 hatte keine Wirkung, rAE01 und rAE02 waren schwach wirksam bei 10 bzw. 50 µg/mL. AE01 war der einzig wirksame Apfelsaftextrakt in HT29 Zellen, dessen wirksamer Konzentrationsbereich vergleichbar zur Mischung war. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Substanzen in der Mischung zwar einen Beitrag zur Wirksamkeit des Extrakts leisten, dass aber auch andere Verbindungen für die beobachteten Effekte relevant sind. Insbesondere im AE01 müssen unbekannte Stoffe vorhanden sein, die spezifisch in HT29 Zellen Wirkung zeigen.

Die Ergebnisse zur Modulation Md-induzierter Gesamt-DNA-Schäden durch die Einzelsubstanzen sind in Abbildung 5.38 dargestellt.

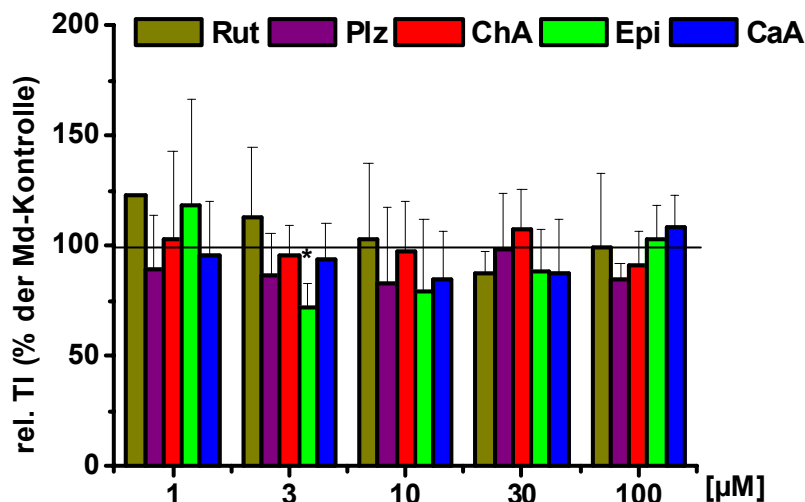


Abbildung 5.38: Modulation induzierter Gesamt- DNA-Schäden in HT29 Zellen nach 24 h Inkubation mit Einzelstoffen und Nachbehandlung mit Menadion (Md) 20 µM, 1 h; Monolayer; n=3 (unabhängige Versuche, mean, ± SD); *p<0,05.

Nur Epicatechin verminderte die induzierten DNA-Schäden. Da der Gehalt von Epicatechin in den Mischungen unter 10% liegt und der Effekt auch relativ schwach ausgeprägt ist, kann diese Substanz die Wirksamkeit der Mischungen nicht begründen. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen der Wirksamkeit der Mischungen und der Einzelsubstanzen könnten synergistische Effekte der Einzelstoffe in der Mischung sein [Laranjinha, 2001]. Die beiden Glykoside spielen beim Synergismus keine Rolle, da rAPE03 sich als unwirksam erwiesen hat. Dagegen könnte Chlorogensäure mit einer der anderen Substanzen synergistische Wirkungen entfalten.

5.4.8 Zytotoxizität und Wachstumshemmung

Die Untersuchung zur Zytotoxizität wurde mittels Trypanblauausschluss durchgeführt, wobei die Viabilität in allen Versuchen über 85% lag. Die Wachstumshemmung wurde bei den Einzelstoffen nur orientierend aufgrund der Lebendzellzahl (Trypanblauausschluss), bezogen auf die jeweilige DMSO-Kontrolle bestimmt. Bei keinem der Einzelstoffe oder den rekonstituierten Mischungen wurde eine Wachstumshemmung unter den gewählten Inkubationsbedingungen beobachtet. Eine ähnliche Mischung des AE02, bestehend aus den Quercetinglykosiden, Phloridzin, Epicatechin, Chlorogensäure und Kaffeesäure zeigte in Untersuchungen innerhalb des BMBF-Netzwerkes eine wachstumshemmende Wirkung, nach 24 h-Inkubation lag der IC₅₀-Wert allerdings bei umgerechnet 419 µg/mL und erst nach 48 h-Inkubation

lag der IC₅₀ im Bereich der hier untersuchten höchsten Konzentration [Veeriah *et al.*, 2005]. Kern *et al.* fanden heraus, dass Kaffeesäure starke und Chlorogensäure schwächere wachstumshemmende Eigenschaften besitzen. Der IC₅₀-Wert nach 72-stündiger Inkubation lag jedoch über den hier getesteten Konzentrationen [Kern *et al.*, 2005]. Kampa *et al.* fanden für Kaffeesäure über einem Zeitraum von fünf Tagen ebenfalls eine Wachstumshemmung in T47D-Zellen (Brustkrebszelllinie), jedoch blieb die Zellzahl in den ersten beiden Tagen auf dem Kontrolllevel und erst danach wurde eine sigmoidal verlaufende Abnahme der Zellzahl beobachtet [Kampa *et al.*, 2004]. Rutin ist in der Literatur als nicht proliferationshemmend beschrieben [Alia *et al.*, 2005a, Kuo, 1996].

5.4.9 Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels

Die Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in Caco-2 Zellen durch die rekonstituierten Mischungen nach 24 h-Inkubation ist in Abbildung 5.39 dargestellt.

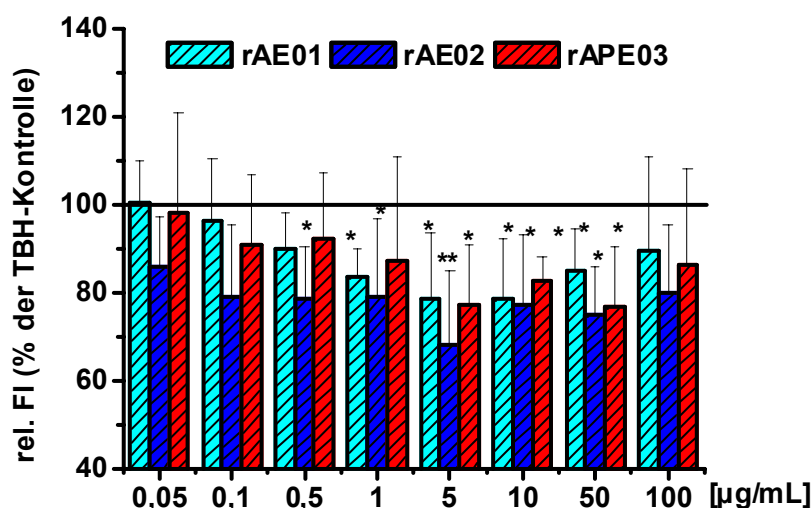


Abbildung 5.39: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in Caco-2 Zellen durch 24 h-Inkubation mit rekonstituierten Mischungen und nachfolgende TBH-Behandlung (250 µM, 40 min); n=3-6 (unabhängige Versuche; mean ± SD); signifikant: *p<0,05; **p<0,01.

Der TBH-induzierte ROS-Level wurde durch alle rekonstituierten Mischungen um bis zu 30% reduziert. rAE02 erwies sich als besonders wirksam, rAE01 und rAPE03 waren geringfügig schwächer antioxidativ. Die optimale Konzentration war bei 5 µg/mL erreicht und entspricht ungefähr dem Wirkoptimum der natürlichen Saftextrakte.

rAPE03 ist wirksamer als der entsprechende natürliche Extrakt; in dem bisher nicht charakterisierten Anteil (75%) befinden sich möglicherweise Komponenten, die die Wirkung abschwächen oder sogar aufheben. Die Mischungen und Extrakte 01 und

02 entsprechen sich weitgehend in ihrer Wirksamkeit. Die fünf Inhaltsstoffe tragen wesentlich zur Wirksamkeit der natürlichen Extrakte bei, aufgrund des Masseanteils der Mischungen im Extrakt jedoch nicht ausschließlich.

Die einzelnen Inhaltsstoffe wurden ebenfalls auf Modulation des ROS-Levels getestet (Abbildung 5.40).

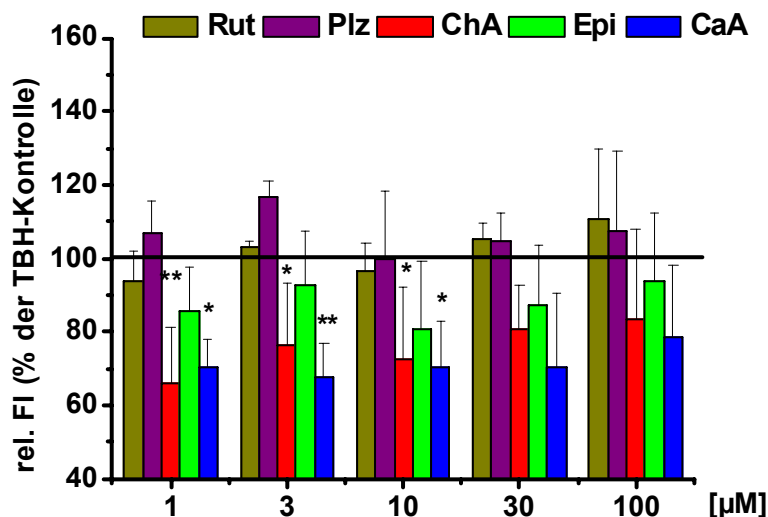


Abbildung 5.40: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in Caco-2 Zellen durch 24 h-Inkubation mit Einzelstoffen und nachfolgende TBH-Behandlung (250 µM, 40 min); n=3-6 (unabhängige Versuche; mean ± SD); signifikant: *p<0,05; **p<0,01.

Die beiden Hydroxyzimtsäurederivate Chlorogensäure und Kaffeesäure waren schon bei Konzentrationen von 1 µM protektiv, kleinere Konzentrationen (0,1-0,3 µM) waren unwirksam, die beiden Glykoside hatten jedoch keinen Einfluss auf den ROS-Level. Epicatechin zeigte schwache (nicht signifikante) antioxidative Effekte. Chlorogensäure macht in den beiden rekonstituierten Mischungen rAE01 und rAE02 einen hohen Massenanteil (ca. 50%) aus und scheint deren antioxidative Wirkung wesentlich zu bestimmen. Obwohl in rAE01 zusätzlich Kaffeesäure zu 26% enthalten ist, wurde die Wirksamkeit der Mischung nicht gesteigert. Da in rAPE03 beide Säuren in nur sehr kleinen Mengen und die unwirksamen Glykoside zu nahezu 90% enthalten sind, ist die gute Wirksamkeit dieser Mischung nicht auf einzelne Inhaltsstoffe zurückzuführen. Möglicherweise spielen hier synergistische Effekte eine Rolle.

Auch in HT29 Zellen wurden die rekonstituierten Mischungen im gleichen Konzentrationsbereich wie die natürlichen Extrakte (10-250 µg/mL) eingesetzt (Abbildung 5.41).

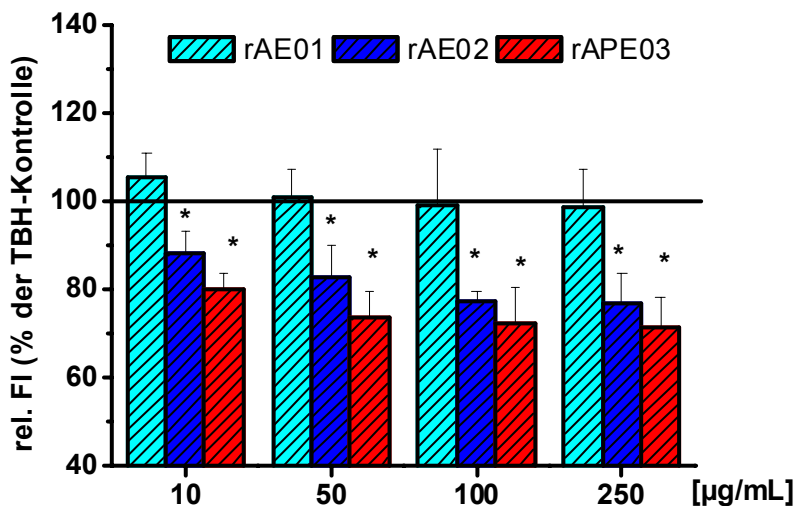


Abbildung 5.41: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in HT29 Zellen durch 24 h-Inkubation mit rekonstituierten Mischungen und nachfolgende TBH-Behandlung (250 µM, 40 min); n=3 (unabhängige Versuche; mean ± SD); signifikant: *p<0,05.

Die rekonstituierten Mischungen reduzierten mit Ausnahme von rAE01 den induzierten ROS-Level in HT29 Zellen. Eine untere unwirksame Grenze wurde nicht beobachtet, rAE02 und rAPE03 sind möglicherweise in noch kleineren Konzentrationen wirksam. rAPE03 hatte die größte Wirksamkeit: Der ROS-Level konnte um fast 25% reduziert werden. Ein Vergleich mit den natürlichen Extrakten ergibt, dass AE01 und AE02 stärker wirksam sind als die entsprechenden rekonstituierten Mischungen. Daher müssen für die Wirksamkeit der natürlichen Extrakte eher andere Stoffe eine Rolle spielen. rAPE03 und APE03 sind in ihrer Wirkung vergleichbar.

Die Effekte auf den ROS-Level durch die Einzelsubstanzen sind in Abbildung 5.42 dargestellt:

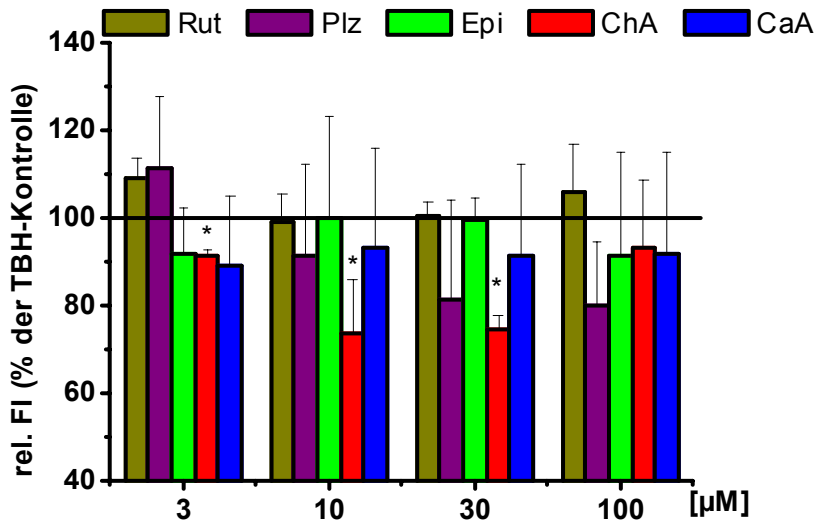


Abbildung 5.42: Modulation des TBH-induzierten ROS-Level in HT29 Zellen durch 24 h-Inkubation mit Einzelstoffen und nachfolgende TBH-Behandlung (250 µM, 40 min); n=3-4 (unabhängige Versuche; mean ± SD); signifikant: *p < 0,05.

Chlorogensäure reduzierte den ROS-Level, Phloridzin zeigte schwache, Epicatechin, Kaffeesäure und Rutin dagegen keine Wirkung. Obwohl Chlorogensäure mehr als ein Drittel des rAE01 ausmacht, konnte bei dieser Mischung kein protektiver Effekt beobachtet werden. Dies weist auf mögliche antagonistische Effekte hin. Die mengenmäßig vorherrschenden Glykoside des rAPE03 haben in diesem Test keine bzw. nur schwache Erniedrigung des ROS-Level gezeigt. Die Mischung selbst ist dagegen sehr gut wirksam, hier sind synergistische Effekte denkbar.

Bei einer Verkürzung der Inkubationszeit wurde keine protektive Wirksamkeit der rekonstituierten Mischungen in HT29 Zellen beobachtet (Abbildung 5.43).

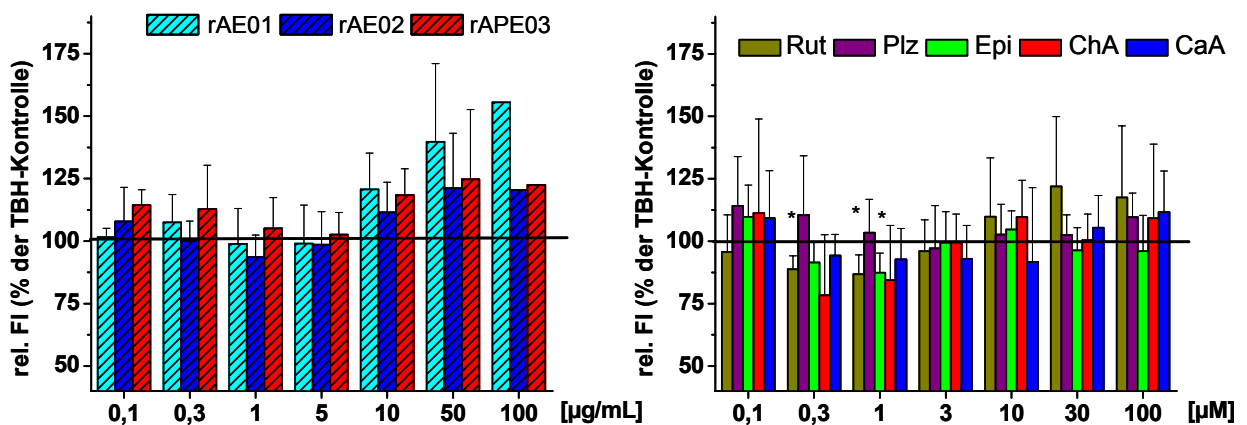


Abbildung 5.43: Modulation des TBH-induzierten ROS-Level in HT29 Zellen durch 2 h-Inkubation mit rekonstituierten Mischungen (links) bzw. Einzelstoffen (rechts) und nachfolgende TBH-Behandlung (250 µM, 40 min); n=3-4; 100, 250 µg/mL rAEs: n=1 (unabhängige Versuche; mean ± SD); signifikant: *p<0,05.

Dagegen zeigen die Einzelstoffe Rutin und Epicatechin eine schwache, jedoch statistisch signifikante Verringerung des ROS-Levels, Chlorogensäure nur eine Tendenz bei jeweils 0,3-1 μM Konzentration. Hohe Konzentrationen der rekonstituierten Mischungen ($> 5 \mu\text{g/mL}$) sowie von Rutin ($> 3 \mu\text{M}$) und Kaffeesäure ($>30 \mu\text{M}$) führten zu einem Anstieg des ROS-Levels über die TBH-Kontrolle hinaus. Nach 24 h dagegen ist dieser Effekt nicht mehr zu beobachten.

5.4.10 Einfluss auf den tGSH-Gehalt

In Caco-2 Zellen konnte eine Korrelation zwischen der Modulation von DNA-Schäden und der Erhöhung des tGSH-Spiegels von Apfelsaftextrakten gefunden werden (siehe Kapitel 5.3). Durch die rekonstituierten Mischungen wurde der Gesamt-Glutathionspiegel nicht erhöht, dagegen war eine Depletion im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich (Abbildung 5.44) erkennbar:

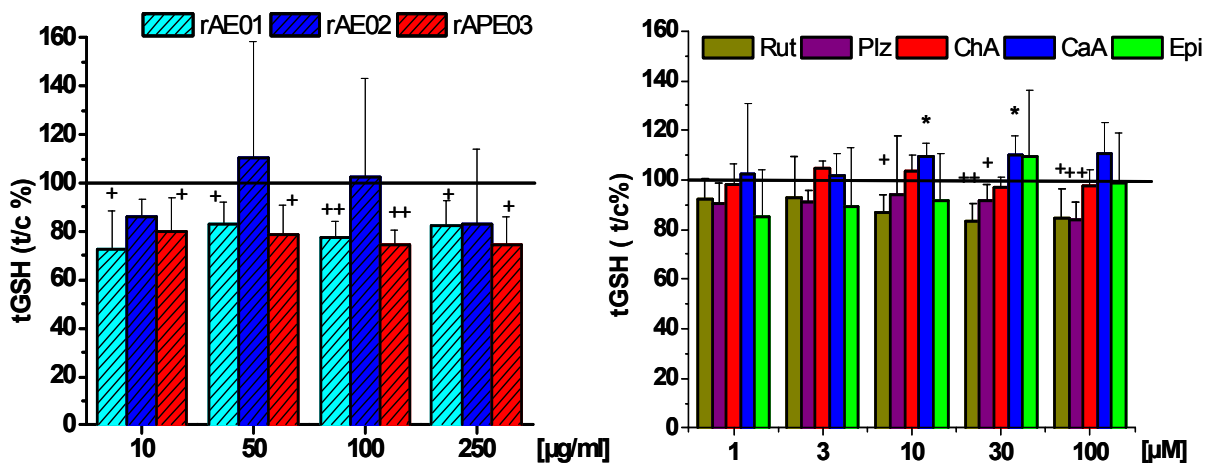


Abbildung 5.44: Modulation des tGSH in Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit rekonstituierten Mischungen (links) bzw. Einzelstoffen (rechts); $n=3$ (unabhängige Versuche, mean \pm SD); * $p<0,05$; signifikante Depletion: + $p<0,05$; ++ $p<0,01$.

Neben den Mischungen wurden auch die Einzelsubstanzen auf ihre modulierende Wirkung des tGSH-Gehaltes in Caco-2 Zellen untersucht (Abbildung 5.44, rechts). Nur Kaffeesäure war in der Lage, den tGSH-Gehalt signifikant zu erhöhen, Chlorogensäure und Epicatechin hatten keinen Einfluss auf den tGSH-Gehalt, die beiden Glykoside Rutin (ab 10 μM) und Phloridzin (ab 30 μM) depletierten den Gehalt sogar. Die erhaltenen Ergebnisse erklären somit die fehlende Wirksamkeit der rekonstituierten Mischungen. Für Rutin wurde eine ähnliche Depletion auch in HepG2 Zellen beobachtet [Alia *et al.*, 2005a].

Die bekannten Substanzen können für die Wirksamkeit der natürlichen Extrakte keine Rolle spielen. Im natürlichen Extrakt sind andere, bisher noch nicht charakterisierte Wirkkomponenten enthalten, die möglicherweise für die tGSH-Erhöhung verantwortlich sind.

In HT29 wurde eine ähnliche tGSH-Depletion durch die rekonstituierten Mischungen beobachtet (n=2, s. Anhang) wie in den Caco-2 Zellen. Die Ergebnisse für die Einzelstoffe in HT29 Zellen (Abbildung 5.45) geben ebenfalls keine Hinweise auf eine induzierte tGSH-Synthese, für Kaffeesäure und Epicatechin wurde in höheren Konzentrationen eine schwach depletierende Wirkung beobachtet, die jedoch insgesamt weniger ausgeprägt war als in Caco-2 Zellen.

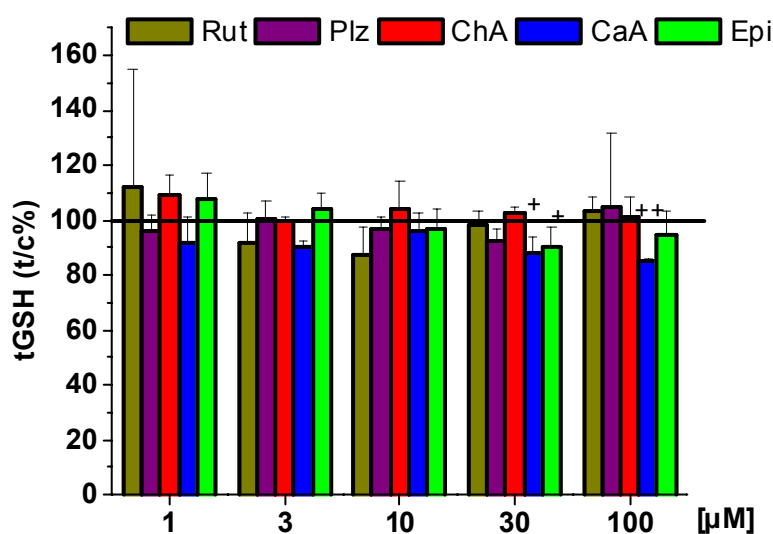


Abbildung 5.45: Modulation des tGSH in HT29 Zellen nach 24 h Inkubation mit Einzelstoffen; n=3 (unabhängige Versuche, mean \pm SD); signifikante Depletion: +p<0,05; ++p<0,01.

Ein Einfluss auf den Glutathionspiegel spielt daher in HT29 Zellen keine Rolle für die beobachtete Verringerung von DNA-Schäden oder des ROS-Levels durch die Extrakte und einiger Einzelverbindungen.

5.4.11 Zusammenfassung der Wirksamkeit von Einzelsubstanzen

Apfelsaftextrakte sind komplexe Mischungen mit vielen, strukturell unterschiedlichen Substanzen, von denen ca. 50% unbekannt sind.

Das Modell, ausgewählte, charakteristische phenolische Saftinhaltsstoffe (Rutin, Phloridzin, Epicatechin, Chlorogensäure, Kaffeesäure) vergleichend als rekonstituierte Mischungen sowie als Einzelsubstanzen zu prüfen, sollte Hinweise darauf geben, ob diese Komponenten für die beobachteten Wirksamkeit der Extrakte eine Rolle

spielen. Die Ergebnisse für Caco-2 Zellen zeigen, dass die rekonstituierten Mischungen (rAEs) deutlich zu der Wirksamkeit der Extrakte beitragen, insbesondere bei der Verringerung der DNA-Schäden (alle rAEs) und in geringerem Umfang auch bei der Verringerung des ROS-Levels (rAPE03). Der Glutathionspiegel dagegen wurde durch die rekonstituierten Mischungen nicht erhöht, d.h. für die Erhöhung dieses wichtigsten intrazellulären Antioxidans durch die natürlichen Extrakte sind andere, bisher nicht charakterisierte Inhaltsstoffe verantwortlich.

Die vergleichende Untersuchung der einzelnen Saftinhaltsstoffe sollten Hinweise geben, welche dieser Substanzen an der Wirkung besonders beteiligt sind und ob synergistische/antagonistische Interaktionen in den Mischungen von Bedeutung sind. Die Ergebnisse legen nahe, dass Kaffeesäure und Rutin für die beobachtete Verringerung oxidativer DNA-Schäden maßgeblich sind. Chlorogensäure reduzierte effektiv den ROS-Level, während die Mischung rAE01 nur schwach wirksam war. Dies weist auf antagonistische Interaktionen der Inhaltsstoffe in rAE01 hin. Mit rAPE03 dagegen wurde eine effektive Erniedrigung des ROS-Levels in Caco-2 Zellen beobachtet, die sich anhand der Wirksamkeit einzelner Inhaltsstoffe nicht erklären lässt und somit das Vorhandensein von synergistischen Effekte nahelegt.

Die Anwendung des Modells auf HT29 Zellen ist bedingt möglich, da die Originalextrakte selbst nur in einigen Endpunkten Wirkung zeigten. Es zeigte sich, dass die Mischung rAE01 nicht wesentlich zur Reduktion der DNA-Schäden beiträgt, die durch den AE01 beobachtet wurde. Für dessen Wirkungen spielen möglicherweise andere Substanzen eine Rolle. Dies gilt ebenfalls für die Modulation des ROS-Levels. rAE02 zeigte ähnliche, rAPE03 sogar höhere Wirksamkeit in der Reduktion des ROS-Levels als der entsprechende natürliche Extrakt. Die Wirksamkeit der Mischungen lassen sich daher nur vereinzelt durch die Einzelstoffe erklären.

5.5 Untersuchungen zur Stabilität

In den vorherigen Kapiteln wurde die antioxidative Wirksamkeit von Apfelsaftinhaltsstoffen in zwei Zellsystemen diskutiert. Die Inkubationszeit betrug dabei meistens 24 h, in Einzelfällen auch 2 h. Die dabei beobachteten Unterschiede in der Wirksamkeit zwischen den beiden Zelllinien als auch bei den einzelnen Inkubationszeiten wurden z.T. auf einen Einfluss der Verbindungen auf die Zellantwort zurückgeführt. Für die Bewertung antioxidativer Wirkungen von Flavonoiden und Polyphenolen kann ebenfalls von zentraler Bedeutung sein, welche Substanzen zu diesen Zeitpunkten im Kulturmedium vorhanden sind. Demnach wäre denkbar, dass sich die antioxidative Wirksamkeit der Ausgangsverbindungen u.U. ganz wesentlich von derjenigen mit von mit der Zeit gebildeten Abbauprodukten/Metaboliten unterscheiden.

5.5.6 Stabilität unter Inkubationsbedingungen (HPLC)

Um erste Anhaltspunkte auf die Stabilität der Apfelsaftinhaltsstoffe zu erhalten, wurden über max. 24 h die Absorptionsmaxima mittels HPLC-UV unter Inkubationsbedingungen (I-Med, 37°C, 95% Luftfeuchte, 5% CO₂) verfolgt. Die Absorptionsmaxima (λ max) und die Retentionszeiten (RT) sind in Tabelle 5.5 aufgeführt.

Tabelle 5.5: Retentionszeiten (RT) und Absorptionsmaxima der Einzelstoffe.

Substanz	λ max [nm]	Gradient ¹	RT [min]
Quercetin	370	A	21,1
		B	42,2
Phloretin	280	A	22,8
		B	46,3
Rutin	370	B	23,5
Phloridzin	280	B	31,0
Chlorogensäure	320	B	14,6
Kaffeensäure	320	B	18,1
Epicatechin	320	B	18,4

¹ Fließmittelsystem: 1: Wasser/ Essigsäure; 2: Wasser/Acetonitril/ Essigsäure

Gradient A: Laufzeit 30 min; Gradient B: Laufzeit 60 min; Angaben zum Gradienten s. Kap. 4.11.

Abbildung 5.46 zeigt den zeitlichen Verlauf der relativen Peakflächen, bezogen auf $t=0$ min in DMEM/Nutrient-Mix mit und ohne Caco-2 Zellen, die Detektion erfolgte in den jeweiligen Absorptionsmaxima:

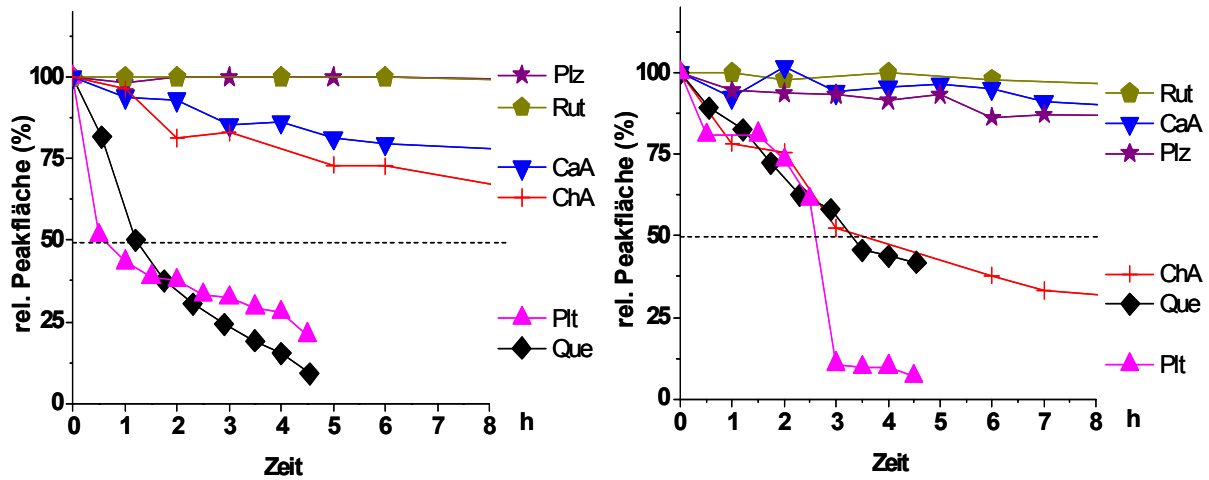


Abbildung 5.46: Zeitlicher Verlauf der Stabilität der Einzelsubstanzen unter Inkubationsbedingungen ohne (links) bzw. mit Caco-2 Zellen (rechts) (DMEM/NutrientMix, 10% FKS, 37°C); rel. Fläche: Peakfläche zur Zeit x bez. auf Fläche $t=0$ h; $n=1-2$ (mean \pm SE)

Die beiden Aglyka Quercetin (30 μ M) und Phloretin (20 μ M) wurden unter den Inkubationsbedingungen (zellfrei) am schnellsten abgebaut ($t_{1/2} = 1,4$ bzw. 0,6 h). Die beiden Hydroxyzimtsäurederivate dagegen waren wesentlich stabiler, für Chlorogensäure wurde $t_{1/2} = 12$ h ermittelt, für die weitgehend stabile Kaffeesäure lag die Halbwertszeit über 24 h. Die beiden Glykoside Rutin und Phloridzin waren ebenfalls sehr stabil, nach 24 h waren noch über 95% der Ausgangsmenge detektierbar.

Die Anwesenheit von Zellen beeinflussten die Einzelstoffe auf unterschiedliche Weise: Während auf die Glykoside kein Einfluss zu beobachten war, hatten die Zellen auf Quercetin und Kaffeesäure eine stabilisierende, auf Chlorogensäure dagegen eine destabilisierende Wirkung. Für Phloretin zeigt der Kurvenverlauf in Gegenwart von Zellen zunächst eine höhere Stabilität (Abbildung 5.46, rechts), entspricht jedoch nicht der Kinetik des exponentiellen Abbaus erster oder zweiter Ordnung. Dies deutet auf zusätzliche zellspezifische Einflüsse hin.

In Anwesenheit von Zellen wurden keine zusätzlichen Peaks detektiert. Es ist nicht auszuschließen, dass mögliche Metabolite ein anderes Absorptionsmaximum besitzen, jedoch erscheint die metabolische Aktivität der Caco-2 Zellen gering wie für Quercetin bereits beschrieben wurde [Boulton *et al.*, 1999].

Die Stabilität der Einzelstoffe wurde auch in DMEM mit 5% FKS in Ab- und Anwesenheit von HT29 Zellen über max. 24 h verfolgt (Abbildung 5.47).

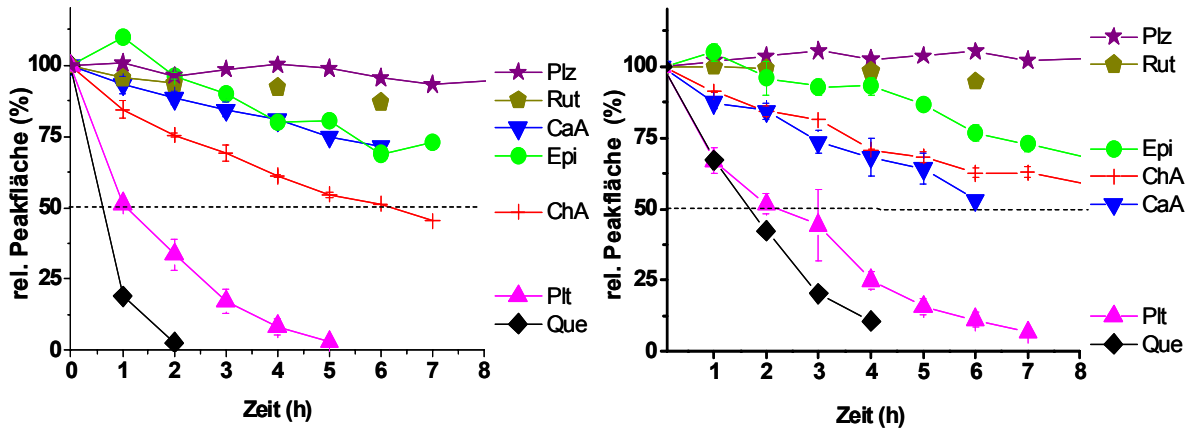


Abbildung 5.47: Zeitlicher Verlauf der Stabilität der Einzelsubstanzen unter Inkubationsbedingungen ohne (links) bzw. mit HT29 Zellen (rechts) (DMEM, 5% FKS, 37°C); rel. Fläche: Peakfläche zur Zeit x bez. auf Fläche t=0 h; n=1-2 (mean, ±SE).

Wie die Kurvenverläufe in Abbildung 5.47 (links) zeigen, ist der Abbau der Substanzen ohne Zellen auch hier strukturabhängig: die Glykoside waren über 24 h weitgehend stabil, während die beiden Aglyka einem schnellen Abbau unterlagen. Dies lässt einen stabilisierenden Einfluss des Zuckerrestes vermuten. Epicatechin war mit einer Halbwertszeit von 14 h ebenfalls relativ stabil. Kaffeesäure zeigte eine höhere Stabilität als Chlorogensäure. Die Anwesenheit von Zellen während der Inkubation wirkt sich für die beiden Aglyka sowie für Chlorogensäure stabilisierend aus, Kaffeesäure dagegen wurde in Anwesenheit von Zellen schneller abgebaut. Die Chromatogramme gaben keine Hinweise auf Spaltung der Glykoside und der Esterbindung der Kaffeesäure. Bei der Inkubation von Quercetin, Phloretin und Chlorogensäure wurden zusätzliche Peaks detektiert, die zeitabhängig zunahmten und bei Inkubation ohne Zellen nicht auftraten. In Tabelle 5.6 sind die Retentionszeiten der Nebenpeaks sowie ihr erstes Erscheinen aufgeführt.

Tabelle 5.6: Auftretende Nebenpeaks (NP) bei Inkubation der drei Substanzen in DMEM in Anwesenheit von HT29 Zellen; angegeben Retentionszeit (RT) und ihr erstes Erscheinen (beides in min)

Substanz (RT)	NP 1		NP2		NP3	
	RT	Zeit	RT	Zeit	RT	Zeit
Quercetin (21,1)	13,8	30	19,3	150	22,2	150
Phloretin (46,3)	37,7	60	33,5	180	--	--
Chlorogensäure (14,6)	15	60	--	--	--	--

Beispielhaft ist in Abbildung 5.48 ein Chromatogramm von Phloretin in DMEM (+ HT29 Zellen) dargestellt.

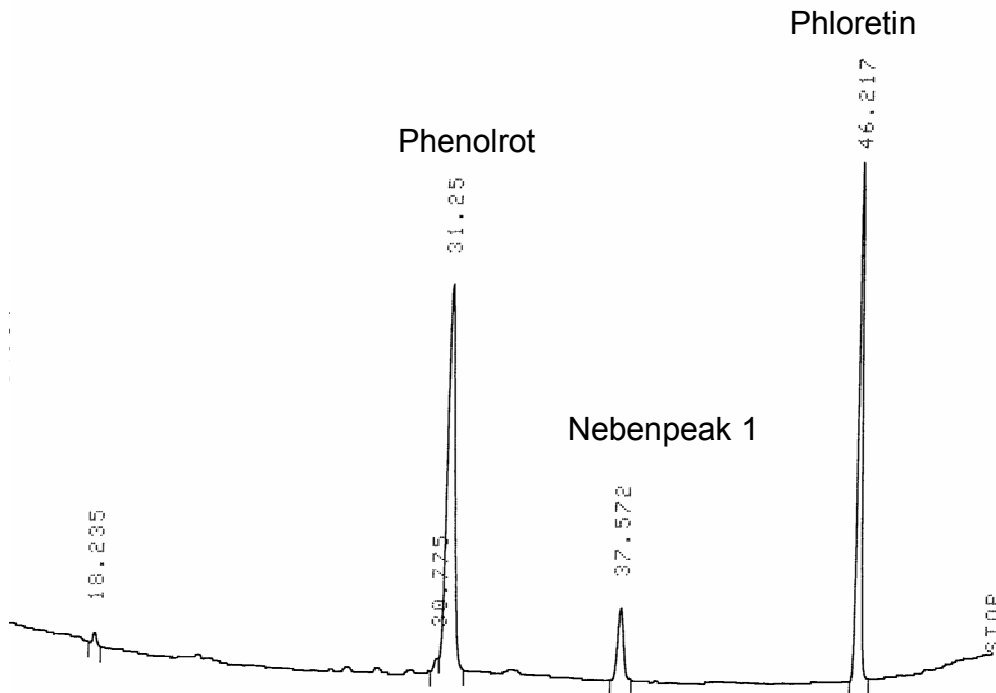


Abbildung 5.48: Beispielchromatogramm: Inkubation von HT29 Zellen (DMEM, 5% FKS) mit Phloretin (20 μ M, 0,1% DMSO), Zeitpunkt 120 min (range 0,1).

Ein Vergleich der Abbauraten in beiden verwendeten Zellkulturmedien zeigt, dass die Substanzen im DMEM/NutrientMix (Abbildung 5.46) stabiler waren als im DMEM (Abbildung 5.47). Dies ist vermutlich auf den niedrigeren pH-Wert (höhere Pufferkapazität durch HEPES) des DMEM/NutrientMix (pH 7,6, DMEM pH 8,1) zurückzuführen [Agullo *et al.*, 1994, Friedman und Jurgens, 2000]. Stellt man den pH-Wert von DMEM auf 7,4 vor der ersten Inkubation ein, so ergibt sich ein verlangsamer Abbau von Quercetin (s. Anhang).

Die Aglyka Quercetin und Phloretin, die in beiden Zellsystemen die geringste Stabilität aufwiesen, waren in den biologischen Tests besonders wirksam. Dies lässt darauf schließen, dass während der Inkubation gebildete Produkte eine ausgeprägte präventive Wirksamkeit haben. Zellspezifische Einflüsse (unterschiedliche Aufnahme/Metabolismus), die sich aus den Kurvenverläufen ebenfalls ableiten lassen, könnten zur unterschiedlichen biologischen Wirksamkeit von z.B. Kaffeesäure in beiden Systemen beitragen.

5.5.7 Stabilität unter Inkubationsbedingungen (UV-Spektren)

In den vorhergehenden Untersuchungen zur Stabilität wurde die Veränderung der Peakflächen bei einer Wellenlänge (λ_{\max}) verfolgt. Entstehende Abbauprodukte und Metabolite können nur erfasst werden, wenn ihre Absorptionsmaxima im ähnlichen Wellenlängenbereich liegen. Nun sollte geprüft werden, ob im Laufe der Inkubation mit Quercetin auch Veränderungen im Absorptionsspektrum auftreten, da Reaktionsprodukte oftmals andere funktionelle Gruppen und damit andere Absorptionsmaxima aufweisen.

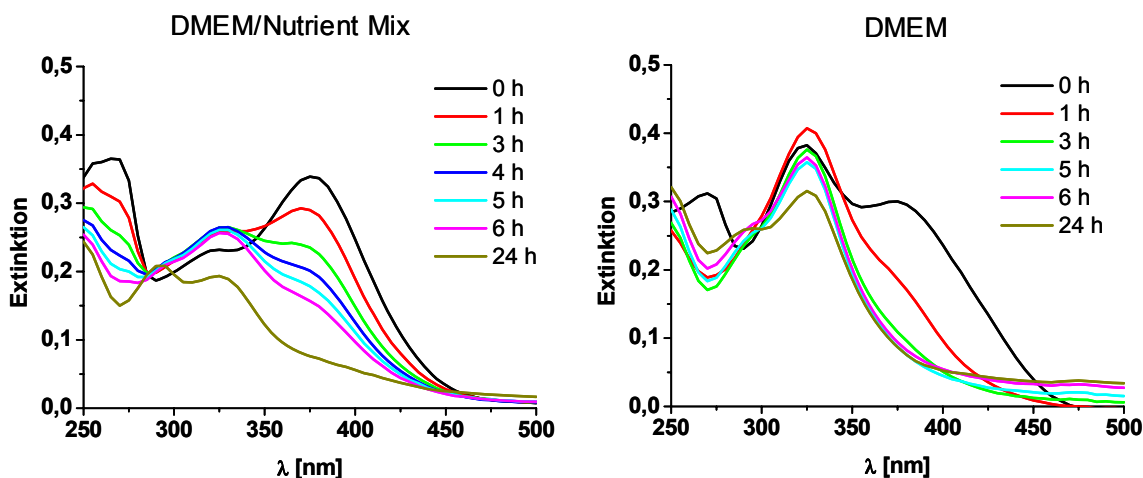


Abbildung 5.49: Absorptionsspektren von Quercetin während der Inkubation in den beiden Inkubationsmedien (DMEM/NutrientMix, links; DMEM, rechts) über 24 h im Brutschrank.

Quercetin zeigt ein für Flavonoide charakteristisches UV-Spektrum mit einem Absorptionsmaximum von 370 nm (B-Bande), welches auf die Zimtsäure-ähnliche Struktur in B- und C-Ring zurückzuführen ist, und ein Maximum bei 260 nm (A-Bande), welches durch die Kombination A- und C-Ring verursacht wird [Zsila *et al.*, 2003]. Dieses Spektrum ist zur Zeit 0 h in DMEM/NutrientMix deutlich, in DMEM dagegen nicht mehr zu erkennen (Abbildung 5.49). Bereits nach einer Stunde werden die Banden in DMEM/NutrientMix breiter. Dies ist auf eine Deprotonierung der aciden OH-Gruppen (3, 7, 4') zurückzuführen, so dass sowohl neutrale als auch anionische Moleküle in der Mischung vorliegen [Zsila *et al.*, 2003]. Im Laufe der Inkubation wurden A- und B-Bande kleiner. Dagegen entsteht eine neue Bande bei 320 nm, diese ist in DMEM bereits am Anfang erkennbar und nahm nach 3 h wieder ab. Yamashita *et al.* fanden in Anwesenheit von Cu(II) ebenfalls eine starke Bande bei 320 nm. Sie führten diese Veränderung auf die Bildung eines Ladung-Transfer-Komplexes und Autoxidation des Quercetinmoleküls zurück [Yamashita *et al.*, 1999]. Da die Bande bereits am Anfang der Messung auftrat, laufen solche Reaktionen in

DMEM spontan ab. Nach Elektrolyse an einer Silberelektrode [Yang *et al.*, 2001] konnte die Bildung dieser Bande ebenfalls beobachtet werden. Ein denkbarer Reaktionsmechanismus verläuft über ein Phenoxyradikal und nachfolgende Ein-Elektronen-Oxidation. Ein mögliches Endprodukt ist z.B. 2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxy-3(2H)-benzofuranon [Yang *et al.*, 2001]. Nach Zugabe von H₂O₂ wurde ebenfalls diese neue Bande detektiert. Peroxidase-vermittelte Reaktionsprodukte wurden als 2,4,6-Trihydroxyphenylglykoxyssäure bzw. 3,4-Dihydroxybenzoesäure identifiziert [Takahama und Hirota, 2000].

Im Puffer PBS war keine Bildung der 320 nm-Bande über den gesamten Messzeitraum zu beobachten. Nach einer Stunde kam es zu einer leichten hypsochromen Verschiebung um ca. 10 nm.

Auch Phloretin wurde unter diesen Bedingungen geprüft (Abbildung 5.50):

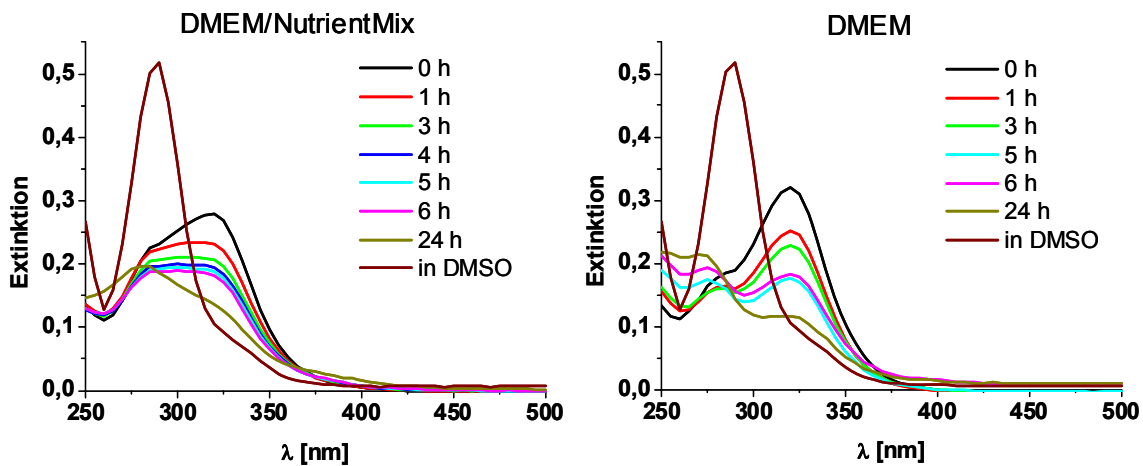


Abbildung 5.50: Absorptionsspektren von Phloretin (30 µM) während der Inkubation in den beiden Inkubationsmedien (DMEM/NutrientMix, links; DMEM, rechts) über 24 h im Brutschrank; zusätzlich Phloretin (30 µM) in DMSO bei t=0 h.

Das Absorptionsspektrum von Phloretin in DMSO zeigt eine scharfe Bande bei 280 nm. Wird Phloretin jedoch in wässriges Medium gegeben, kommt es zur Bildung einer weiteren Struktur mit einem Absorptionsmaximum bei 320 nm. Auch hier ist eine Deprotonierung denkbar. Bei DMEM/NutrientMix ist dieser Effekt nicht so deutlich ausgeprägt wie im DMEM. Im Laufe der Inkubationszeit wurden bei kleineren Wellenlängen die Bildung weiterer breiter Banden beobachtet.

5.5.2.1 Zugabe von Ascorbinsäure

Da eine Autoxidation des Quercetins während der Inkubation aufgrund der Anwesenheit von Übergangsmetallionen (Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺) im Medium und des erhöhten Sauerstoffpartialdruckes im Brutschrank [Halliwell, 2003, Lapidot *et al.*, 2002a]

wahrscheinlich sind, sollte geprüft werden, ob Zugabe des Antioxidans Ascorbinsäure (300 μM) diese Reaktionen verhindern oder zumindest verlangsamen kann (Abbildung 5.51). Eine pH-Wert-Änderung wurde durch die Zugabe von Ascorbinsäure nicht zu beobachten.

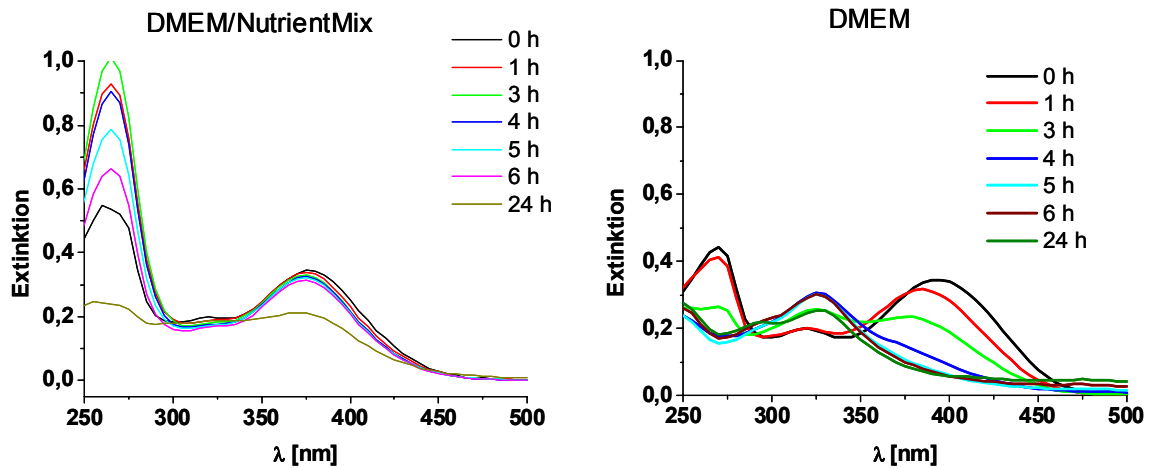


Abbildung 5.51: Absorptionsspektren von Quercetin während der Inkubation in den beiden Inkubationsmedien (DMEM/NutrientMix, links; DMEM, rechts) nach Zugabe von Ascorbinsäure (300 μM) über 24 h im Brutschrank.

Durch die Zugabe von Ascorbinsäure konnte die Autoxidation von Quercetin in DMEM/NutrientMix über 6 h verhindert werden. Erst nach 24 h nahm die Absorption bei 370 nm deutlich ab. Die Bande bei 320 nm wurde nicht beobachtet. Die A-Bande war bei Zugabe von Ascorbinsäure besonders hoch und nahm während der Inkubation weiter zu. Bei 3 h erreichte sie ihr Absorptionsmaximum, danach wurde sie wieder kleiner. Denkbar ist eine Anlagerung der Ascorbinsäure über z.B. H-Brücken. Warum der Effekt nur in diesem Medium beobachtet wurde, kann zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt werden.

In DMEM verlangsamte die Zugabe von Ascorbinsäure ebenfalls die Bildung der 320 nm-Bande, konnte sie jedoch nicht völlig verhindern. Bereits nach 3 h nahm die Bande zu und erreichte nach 4 h ihr Maximum. Nach 24 h waren alle Banden nur noch breit und niedrig. Die A-Bande wurde durch Ascorbinsäure nicht beeinflusst.

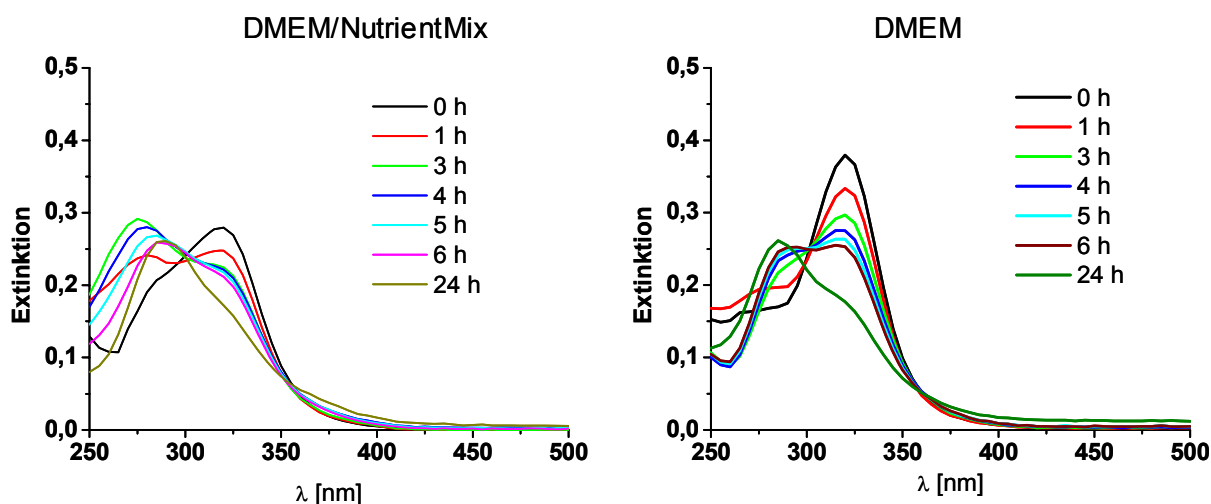


Abbildung 5.52: Absorptionsspektren von Phloretin während der Inkubation in den beiden Inkubationsmedien (DMEM/NutrientMix, links; DMEM, rechts) nach Zugabe von Ascorbinsäure (300 μ M) über 24 h im Brutschrank

Die Zugabe von Ascorbinsäure zu Phloretin ergab keine wesentlichen Änderungen im Spektrum (Abbildung 5.52). autoxidative Prozesse scheinen eine untergeordnete Rolle zu spielen

5.5.7.1 pH-Abhängigkeit und Reversibilität

Die Spektren von Quercetin in den beiden Kulturmedien unterscheiden sich wesentlich voneinander. Wie schon in Kapitel 5.5.1 beschrieben, kann der pH-Wert eine wichtige Rolle spielen, da der pK_a -Wert von Quercetin bei 7,38 [Lemanska *et al.*, 2001] liegt und DMEM einen pH-Wert von ca. 8 aufweist. Es wurde nun versucht, die Spektren von Quercetin bei verschiedenen pH-Werten zu verfolgen, um einen Hinweis auf mögliche pH-Abhängigkeit zu erhalten. Quercetin wurde in PBS bei verschiedenen pH-Werten (5; 7; 7,5; 9 und 10) inkubiert. Abbildung 5.53 zeigt die Ergebnisse drei ausgewählter Zeitpunkte.

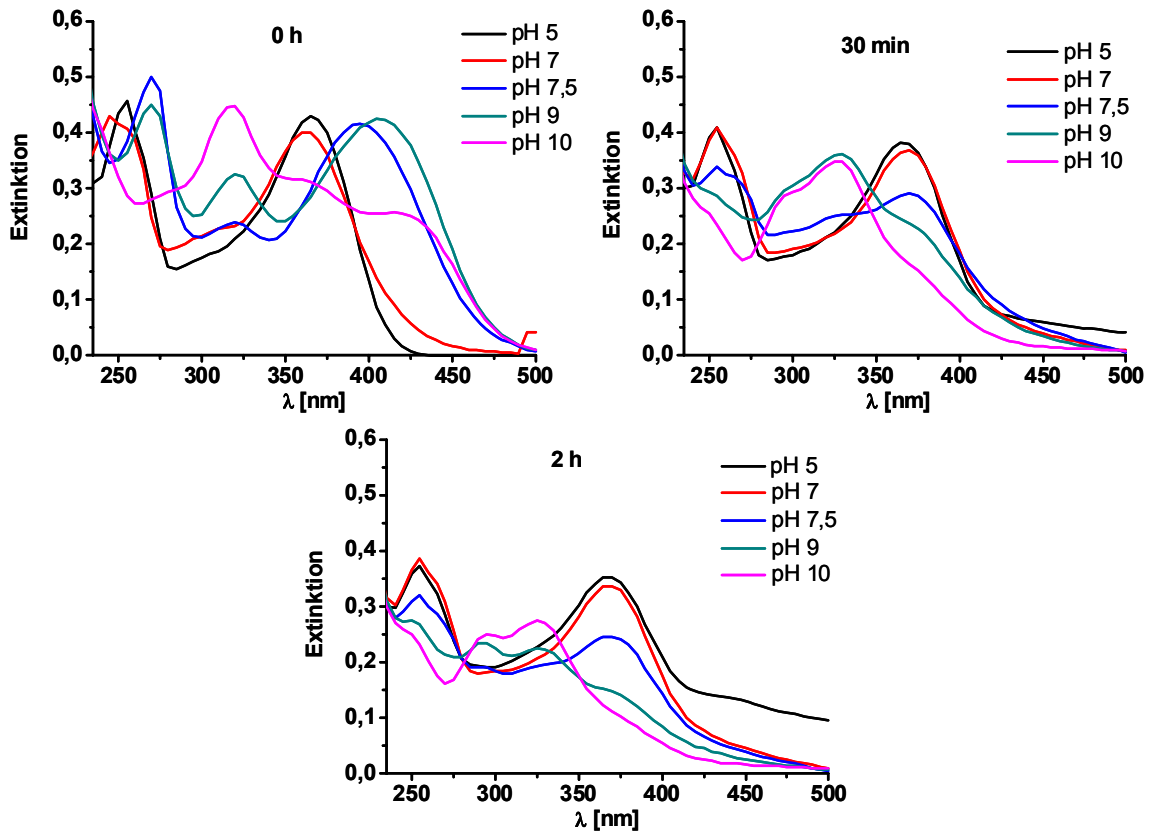


Abbildung 5.53: Absorptionsspektren von Quercetin in PBS nach 0 h (links), 30 min (rechts) und 2 h (unten) bei 5 verschiedenen pH-Werten; Inkubation im Brutschrank.

Zu Beginn des Versuchs waren alle Lösungen gelb, je höher der pH-Wert, desto schneller wurde eine Entfärbung beobachtet. pH 5 und 7 waren nach 24 h noch immer gelblich gefärbt, während in den Anderen teilweise eine rötliche Färbung auftrat. Zu Beginn (Spektrum bei 0 h) erkennt man einen ähnlichen Kurvenverlauf für die Proben mit den geringsten pH-Werten mit einem Absorptionsmaximum der B-Bande von 360 nm. Bei höherem pH-Wert waren die Banden wesentlich breiter und rotverschoben. Deprotoniertes Quercetin hat ein Absorptionsmaximum bei 442 nm [Dangles *et al.*, 1999], das mit den hier gemessenen Banden gut übereinstimmt (pH 9). Je höher der pH-Wert, desto ausgeprägter war schon zu Anfang die neu entstehende Bande bei 320 nm, was auf Reaktionsprodukte schließen lässt. Nach bereits 30 min Inkubation ist die B-Bande bei pH 9 und 10 völlig verschwunden, dafür wurde neben der 320 nm-Bande noch eine weitere bei ca. 300 nm beobachtet. Dies lässt vermuten, dass sofort (Zersetzungs-)Reaktionen stattfinden. Nach 2 h tritt die 300 nm-Bande noch deutlicher hervor, bei pH-Werten kleiner 8 sind diese Reaktionsprodukte nicht detektierbar. Im Laufe der Inkubation kommt es zu einer Verringerung der Absorption, wobei die B-Bande nach 24 h immer noch deutlich bei pH 5 und 7 zu erkennen ist. Ein möglicher Autoxidationsprozess von Quercetin lässt sich folgendermaßen postulieren (Abbildung 5.54):

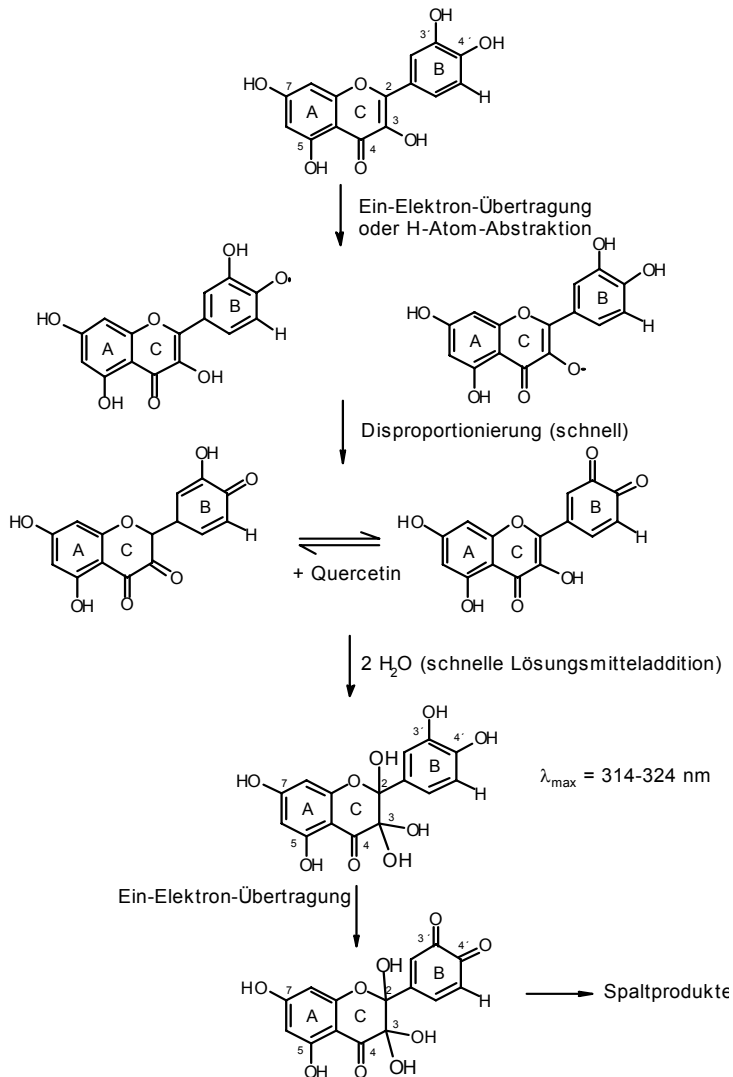


Abbildung 5.54: Möglicher Mechanismus der Autoxidation von Quercetin [Dangles *et al.*, 1999].

Eine Ein-Elektronen-Oxidation führt zu primären Radikalen, die jedoch schnell in eine Mischung aus Quercetin und Chinon disproportionieren und durch Charge-Transfer-Komplex in Wechselwirkung stehen. Addition von Wasser oder Hydroxylanion an o- oder p-Chinonintermediate führt zur Bildung sekundärer Radikale und zu möglichen Ringspaltungen [Dangles *et al.*, 1999].

Brachte man Proben mit den pH-Werten von 9 oder 10 nach 15 bzw. 30 min auf pH 7, so wurde keine Veränderungen der Spektren beobachtet, die auf eine Regenerierung der Quercetinstruktur schließen lässt. Die Reaktionen, die zu Anfang stattfinden, sind demnach keine Gleichgewichtsreaktionen, sondern bringen irreversible Strukturänderungen mit sich (s. Anhang).

Untersuchungen weiterer apfelrelevanter Polyphenole ergaben ebenfalls starke pH-abhängige Strukturveränderungen von Kaffeesäure und Chlorogensäure, die irrever-

sibler Natur waren. Bei Rutin konnte auch über 72 h und pH 10,5 keine wesentlichen spektralen Veränderungen beobachtet werden [Friedman und Jurgens, 2000].

5.5.8 Zusammenfassung zur Stabilität von Polyphenolen

Für die Untersuchungen zur Stabilität von Apfelsaftinhaltsstoffen unter Inkubationsbedingungen wurden zum einen die Veränderung der Peakflächen (HPLC) im Absorptionsmaximum erfasst, zum anderen wurden beispielhaft für Quercetin und Phloretin UV/Vis-Spektren aufgenommen. Bei beiden Methoden wurde eine starke pH-Abhängigkeit beobachtet: Im DMEM/NutrientMix (Caco-2 Medium) lag der pH-Wert bei 7,5 und die Stabilität war besser als im DMEM (HT29 Medium) mit einem pH-Wert über 8.

Die Anwesenheit von Zellen verbesserte die Stabilität der Einzelstoffe in den meisten Fällen, was z.T. auf eine Neutralisierung des pH-Wertes durch die sauren Ausscheidungsprodukte der Zellen zurückzuführen ist. Auch hier gibt es struktur- und zellspezifische Unterschiede, die die unterschiedliche biologische Wirksamkeit zumindest teilweise erklären können. Kaffeesäure wurde in Anwesenheit von Caco-2 Zellen nach 24 h noch zu 90% im Medium detektiert, in Anwesenheit von HT29 Zellen wurde nach 6 h nur noch 50% der Verbindung im Medium gefunden. Inwieweit die Stoffe in die Zelle aufgenommen wurden, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Es lassen sich daher keine Aussagen darüber treffen, ob eine hohe Aufnahme in die Zelle oder Abbaureaktionen z.B. durch extrazelluläre Enzymaktivität Ursachen für diese Unterschiede sind. Für drei Substanzen (Quercetin, Phloretin, Chlorogensäure) wurden in Anwesenheit von HT29 Zellen, jedoch nicht von Caco-2 Zellen zusätzliche Peaks in den Chromatogrammen detektiert. Dies lässt auf eine unterschiedliche metabolische Aktivität der Zellen schließen, was für die Beurteilung der biologischen Wirksamkeit durchaus eine Rolle spielen kann.

Die Zugabe von Ascorbinsäure verlangsamte die oxidativen Veränderungen von Quercetin, damit spielen autoxidative Prozesse während der Inkubation ebenfalls eine wichtige Rolle.

6 Diskussion und Ausblick

Epidemiologische Studien geben Hinweise, dass eine obst- und gemüsereiche Kost präventiv gegen verschiedene ROS-assoziierte Krankheiten wirksam ist. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung von Nahrungsmitteln ist schwer zu erfassen, welche Inhaltsstoffe für die Wirksamkeit maßgeblich sind.

Ziel dieser Arbeit war es, das antioxidative Potenzial von phenolischen Apfelsaftinhaltsstoffen/ -extrakten mittels Markern (oxidativer) Zellschädigung und Zellantwort in humanen Kolonzelllinien (Caco-2, HT29) zu charakterisieren und Hinweise zu erhalten, welche Verbindungen für die Prävention im Darm eine Rolle spielen.

Für die Erfassung des antioxidativen Potenzials wurde ein **zweistufiges Inkubationsprotokoll** etabliert, bei dem nach Vorinkubation mit Apfelsaftinhaltsstoffen (Stufe 1) Oxidantien zum Einsatz kamen, um oxidativen Stress zu erzeugen (Stufe 2). Dessem Ausmaß sollte in der Größenordnung liegen, die auch krankheitsbedingt *in vivo* vorkommen, z.B. bei Hämodialysepatienten [Müller *et al.*, 2004]. Durch diese nachgeschaltete Inkubation wird vermieden, dass Antioxidans/Oxidans bereits im Medium interagieren können und ermöglicht so eine intrazelluläre Wirkung. Als **Oxidantien** wurden der Redox-Cycler Menadion (Md), Wasserstoffperoxid, Eisen(II)-Sulfat (mit bzw. ohne Wasserstoffperoxid) und *tert*-Butylhydroperoxid (TBH) untersucht. Ihre oxidative Wirkung beruht dabei auf der Generierung unterschiedlicher ROS.

Menadion induzierte DNA-Schäden, eignete sich jedoch nicht zur Oxidation des Fluoreszenzfarbstoffvorläufers Dichlorfluorescein (DCFH). Verantwortlich ist die schlechte Reaktivität des Superoxidanionradikals, das während des Redox-Cyclings von Menadion entsteht [Crow, 1997]. TBH oder Wasserstoffperoxid waren für die Induktion des ROS-Levels besser geeignet. Da Eisen-vermittelte Oxidationen unspezifisch sind und dabei auch Polyphenole oxidiert werden können, wurde das Fenton-Reagens ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$) nur bei der Lipidperoxidation (LPO) verwendet, da es für diesen Endpunkt keinen alternativen Induktor gab. Eine Induktion der LPO durch Menadion in Caco-2 und TBH in HT29 Zellen wurden nicht beobachtet.

Insgesamt wurde kein Oxidans gefunden, das für alle Endpunkte vergleichbaren oxidativen Stress induzierte, so dass für jeden Endpunkt das am besten geeignete Oxidans zum Einsatz kam. In Untersuchungen von Chiou *et al.* wurden in verschiedenen eingesetzten Zelllinien keine einheitliche LPO-Induktion durch Menadion erhalten [Chiou *et al.*, 1998]. Vergleichbare Empfindlichkeitsunterschiede der Zellen wurden auch bei den in dieser Arbeit verwendeten Endpunkten beobachtet.

Bei den Endpunkten der Zellschädigung (DNA-Schäden, LPO) waren Caco-2-Zellen empfindlicher gegenüber der Oxidanswirkung. Ein Beispiel für zellspezifische Unterschiede ist die Aktivität des Enzyms NADPH-Chinon-Oxidoreduktase (NQO1), das an der Inaktivierung des Menadions beteiligt ist [Karczewski *et al.*, 1999]. Entsprechend waren bei Inkubationen mit HT29 Zellen höhere Konzentrationen des Oxidans nötig, um vergleichbare Effekte zu erhalten. Primäre humane Kolonzellen reagierten ähnlich empfindlich auf Menadion wie Caco-2 Zellen. Dies gibt einen Hinweis auf eine vergleichbare geringe NQO1-Aktivität wie in der Zelllinie. In humanem Kolongewebe wurde die Expression dieses Enzyms immunchemisch detektiert [Siegel und Ross, 2000]. In Untersuchungen zu NQO1-Aktivitäten in verschiedenen humanen Geweben wurde jedoch gezeigt, dass im Kolongewebe der „Schwellenlevel“ des Enzyms nicht erreicht wird, um eine Aktivität zu beobachten [de Haan *et al.*, 2005].

Lediglich bei der Induktion des ROS-Levels waren die Oxidanzien in beiden Zelllinien im gleichen Konzentrationsbereich wirksam. Bei diesem Endpunkt werden ROS detektiert, die im Zytoplasma DCFH in seine fluoreszierende Form oxidieren. Die intrazelluläre Reaktion der ROS mit dem Farbstoff geht möglicherweise schneller vonstatten als Abfangreaktionen durch antioxidative Enzyme oder andere zellspezifische Mechanismen.

Im zweistufigen Inkubationsprotokoll wurden zunächst die Wirkungen der **Aglyka** Phloretin und Quercetin geprüft. Quercetin wurde bereits in der Literatur als Antioxidans im biologischen System (siehe auch Kapitel 3.4.6) beschrieben und beide haben eine physiologische Relevanz *in vivo*, da sie aus den weit verbreiteten Glykosiden im Dünndarm freigesetzt werden können.

DNA-Schäden wurden durch beide Aglyka nach 24 h-Inkubation in den Zelllinien reduziert. Die Konzentrations-Wirkungskurve verlief dabei U-förmig. Bei niedrigen Konzentrationen war der Effekt schwach, mit steigenden Konzentrationen wurden DNA-Schäden bis hin zu einem Wirkoptimum verringert, in noch höheren Konzentrationen stieg das Ausmaß der DNA-Schäden wieder an. Phloretin war besser wirksam als Quercetin. Im Vergleich zu HT29 Zellen waren bei Caco-2 Zellen höhere Konzentrationen der Aglyka zum Erreichen des Wirkoptimums notwendig.

Nach 2 h-Inkubation, bei der vor allem direkt substanzvermittelte, antioxidative Wirkungen (Abfangen von Radikalen, Chelatbildung mit Übergangsmetallen) zu erwarten sind, wurde durch beide Aglyka ebenfalls eine Verringerung der DNA-Schäden beobachtet, damit ist die Wirksamkeit auf ihre radikalabfangenden Eigenschaften zurückzuführen. Die noch ausgeprägteren Effekte nach 24 h Inkubationszeit lassen

sich durch den Einfluss auf die Zellantwort als ein weiterer möglicher Wirkmechanismus erklären.

Beobachtete Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien beruhen neben zellspezifischen Eigenschaften wie Aufnahme rate in die Zelle möglicherweise auch auf Art und Umfang von Metabolismus sowie von Abbaureaktionen. Es wurde gezeigt, dass die beiden Substanzen abhängig von der Art des Mediums unterschiedlich lange in der Ausgangsverbindung vorliegen und der Abbau nach 2 h Inkubation schon beträchtlich ist (bis zu 50%). Da die Stabilität der Verbindungen bei Inkubation der HT29 Zellen geringer ist und zusätzlich Hinweise auf metabolische Aktivität erhalten wurden, sind die beobachteten Wirkungen vermutlich auch auf neu entstehende Produkte zurückzuführen. Dangles *et al.* zeigten, dass Quercetin mehrfach Radikale abfangen konnte und die gebildeten Produkte nach erfolgter Ringspaltung von Quercetin ebenfalls antioxidativ wirksam sind [Dangles *et al.*, 1999].

Der TBH-induzierte ROS-Level wurde nach 24 h Inkubation durch geringere Aglykonkonzentrationen in Caco-2 Zellen (0,01-10 μM) verringert als in HT29 Zellen (10-30 μM). Caco-2 Zellen waren in diesem Testsystem die empfindlichere Zelllinie. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration (100 μM) lag der ROS-Level in Caco-2 Zellen weit unter der Lösungsmittelkontrolle. Dies lässt sich möglicherweise auf eine einsetzende Zellwachstumshemmung einhergehend mit einer zu geringen Zellzahl für eine Quantifizierung zurückführen. Aufgrund des Versuchsaufbaus konnte dies nicht direkt kontrolliert werden.

Nach 2 h Inkubation mit den Aglyka wurde nur ein geringer Effekt auf den ROS-Level in HT29 Zellen beobachtet. Möglicherweise entfalten die Ausgangsverbindungen und die bis dahin gebildeten Produkte keine TBH-abfangenden Wirkungen, sondern erst später gebildete Abbauprodukte und Metabolite. Eine ebenfalls denkbare Induktion antioxidativer Enzyme (z.B. Superoxiddismutase, Katalase) oder eine Hemmung TBH-aktivierender Enzyme (z.B. GPx) nach 24 h Inkubation wurde in verschiedenen Zellsystemen (HepG2, Caco-2) nicht beobachtet [Aherne und O'Brien, 1999, Alia *et al.*, 2005a], so dass die „primäre“ zelluläre Abwehr gegen ROS ebenfalls wenig Beitrag zu den beobachteten Effekten leistet.

Durch die Aglyka wurde eine Erhöhung des tGSH-Spiegels bei Konzentrationen von 1-30 μM beobachtet. Die unter diesen Bedingungen erhaltene Verringerung der DNA-Schäden ist vermutlich auf die erhöhte tGSH-Synthese zurückzuführen. Für Quercetin ist in HepG2 Zellen ebenfalls eine Erhöhung des tGSH-Gehaltes nach 12 bzw. 24 h Inkubation beschrieben [Alia *et al.*, 2005a, Scharf *et al.*, 2003], die auf einer erhöhten Aktivität des Schlüsselenzyms γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase (GCS) beruht [Scharf *et al.*, 2003]. Das Enzym wird durch Aktivierung des „Antioxidant responsive e-

lement“ (ARE) exprimiert. Für Phloretin wurden keine Anhaltspunkte gefunden, es ist jedoch beschrieben, dass Chalkone NQO1 induzieren [Dinkova-Kostova *et al.*, 2001], welches ebenfalls ARE-vermittelt exprimiert wird. Hohe Konzentrationen (>30 µM) der Aglyka führten zu einer Erhöhung des tGSH-Gehaltes bei gleichzeitigem starken Anstieg der DNA-Schäden. Unter bestimmten Bedingungen agieren die Aglyka damit als Oxidanzien und rufen eine Gegenregulierung der Zelle auf oxidativen Stress hervor, wie sie für Oxidanzien, z.B. Bleomycin [Day *et al.*, 2002] beschrieben ist.

Hauptaufgabe dieser Arbeit war es, das antioxidative Potenzial von **Apfelsaftinhaltsstoffen** zu charakterisieren. Für die vergleichenden Untersuchungen wurden phenolische **Extrakte** aus Boskoop-Äpfeln (AE01) und aus verschiedenen Apfelsaftmischungen (AE02 und AE04) eingesetzt. Zusätzlich wurde ein Extrakt aus einem mit Zellulase- und Pektinase-behandelten Pressrückstand gewonnen (APE03). In Tabelle 6.1 sind die Wirkungen noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 6.1: Zusammenfassung der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur antioxidativen Wirksamkeit von Apfelsaftextrakten; angegeben ist der wirksame Konzentrationsbereich in [µg/mL], Ausnahme TEAC [mM Trolox] sowie die Wirkstärke.

Testmethoden				AE01	AE02	APE03	AE04
antioxidative Kapazität (TEAC) [mM Trolox]				3,4	3,6	4,2	4,0
Verringerung DNA-Schäden	24 h	Caco-2	oC ¹ [µg/mL]	50-100	50	100	250
			WS ² [%]	-40-50	-20	-40	-35
	2 h	HT29	oC ¹ [µg/mL]	10-100	--	--	250
			WS ² [%]	-75			-30
		Caco-2	oC ¹ [µg/mL]	10	(≤)10	(≤)5	(≤)5
			WS ² [%]	-15	-50	-50	-40
Verringerung ROS-Level	24 h	Caco-2	oC ¹ [µg/mL]	10-50	10	5	250
			WS ² [%]	-25	-30	-15	-15
	2 h	HT29	oC ¹ [µg/mL]	100-250	50-250	100-250	50-100
			WS ² [%]	-15-20	-30-40	-20	-20
		HT29	oC ¹ [µg/mL]	--	--	--	--
			WS ² [%]				
Erhöhung tGSH-Spiegel	24 h	Caco-2	oC ¹ [µg/mL]	--	50	100	--
			WS ² [%]		+15	+10	
		HT29	oC ¹ [µg/mL]	--	--	--	--

¹ oC: Konzentrationsbereich mit optimaler Wirkstärke

² WS: Wirkstärke: gibt an, um wie viel Prozent der „Marker“ im Vergleich zur (Oxidans)-Kontrolle moduliert wurde

--: kein Effekt

Die Extrakte zeigen protektive Wirksamkeit in Konzentrationen, die in polyphenolreichem Apfelsäften enthalten sind [Kahle *et al.*, 2005a, Thielen *et al.*, 2004]. Optimale Wirkkonzentration und Wirkstärke der Extrakte unterscheiden sich jedoch z.T. deutlich voneinander.

Die antioxidative Kapazität (TEAC) der Extrakte korreliert nicht mit der antioxidativen Wirksamkeit im zellulären System. Eine Übereinstimmung wurde einzig bei der Modulation (oxidativer) DNA-Schäden in Caco-2 Zellen nach einer kurzen Inkubationszeit (2 h) beobachtet, die möglicherweise durch die direkte radikalabfangende Eigenschaft der Inhaltsstoffe bedingt ist. Eine Reduktion des TBH-induzierten ROS-Levels lässt ebenfalls eine direkte Radikal-abfangende Wirkung vermuten. Dies wurde nach 2 h Inkubationszeit jedoch nicht bestätigt. Erst nach 24 h wurde eine deutliche Reduktion des TBH-induzierten ROS-Levels durch die Extrakte erzielt. Nach 24 h-Inkubation trägt neben einer unterschiedlichen Aufnahme der Stoffe in die Zellen vermutlich auch die Zellantwort zur Reduktion der Md-induzierten DNA-Schäden bei, da wie bei den Aglyka eine gleichzeitige Erhöhung des tGSH-Spiegels in Caco-2 Zellen und in geringerem Maße auch in HT29 Zellen beobachtet wurde. Untersuchungen eines Netzwerkpartners (AG Pool-Zobel) zur Modulation der Genexpression durch AE02 in HT29 Zellen ergaben eine erhöhte Expression von verschiedenen ARE-abhängigen Phase-II-Enzymen, z.B. Glutathion-S-Transferasen, [Veeriah *et al.*, 2005]. Damit scheint auch bei den Apfelsaftextrakten die Aktivierung des ARE involviert.

Inwieweit entstehende Abbauprodukte bzw. Metabolite bei der Wirkung eine Rolle spielen oder die Zellantwort z.B. bei der Beseitigung der TBH-Radikale maßgebliche Bedeutung hat, geht aus diesen Untersuchungen nicht hervor, beide Effekte sind jedoch in Betracht zu ziehen.

Weiterhin ist auffällig, dass auch die Antioxidans-Effekte zellspezifisch sind. Caco-2 Zellen waren empfindlicher, da dort die meisten Extrakte Wirkung zeigten und die notwendigen Konzentrationen geringer waren. Dies könnte, wie bereits bei den Aglyka beschrieben, auf unterschiedliche Aufnahmeraten in die Zelle, auf zellspezifischen Metabolismus sowie auf unterschiedliche Aktivierung der Zellantwort zurückgeführt werden.

In einer weiteren *in vitro*-Studie des Netzwerkes (AG Marko) mit dem AE02 wurde eine wachstumshemmende Wirkung in HT29 Zellen ($IC_{50}=134 \mu\text{g/mL}$ nach 72 h-Inkubation) sowie eine hemmende Wirkung der Tyrosinkinase-Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) beobachtet [Kern *et al.*, 2005]. In einer Fütterungsstudie in Ratten (AG Briviba/ Barth) wurden Diazomethan-induzierte genotoxische Schäden durch den entsprechenden trüben Apfelsaft reduziert [Barth *et al.*, 2005].

Somit wurden auch andere chemopräventive Effekte durch polyphenolische Apfelsaftinhaltsstoffe erhalten.

Die für die antioxidative Wirksamkeit verantwortlichen Flavonoide und (Poly-)phenole stellen eine heterogene Gruppe von Strukturen dar, die verschiedene Mechanismen protektiver Wirkung im Organismus induzieren können [Birt *et al.*, 2001, Breinholt *et al.*, 2003]. Die untersuchten (poly-)phenolischen Apfelsaftextrakte sind zu ca. 30-50% hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe charakterisiert. Um zu klären, inwieweit die bekannten Inhaltsstoffe eine Bedeutung bei der protektiven Wirkung der Extrakte haben, wurden **rekonstituierte Mischungen** aus fünf Hauptphenolen (Chlorogensäure, Rutin, Phloridzin, Epicatechin und Kaffeesäure) in dem Verhältnis hergestellt, wie sie in den Apfelsaftextrakten enthalten sind.

Die rekonstituierten Mischungen waren ebenfalls antioxidativ wirksam, jedoch unterschieden sie sich in ihrer Wirksamkeit untereinander sowie im Vergleich zu den natürlichen Extrakten.

Die antioxidative Kapazität (TEAC) und die Verringerung von DNA-Schäden in Caco-2 Zellen wurden im Vergleich zu den natürlichen Extrakten überproportional von den fünf bekannten Apfelsaftinhaltsstoffen in der Mischung bestimmt. Andere Inhaltsstoffe des Extrakts spielen für die antioxidative Wirkung in diesen Testsystemen nur eine untergeordnete Rolle. Der ROS-Level wurde in Caco-2 Zellen durch die rekonstituierten Mischungen in ähnlichem Maße reduziert, wie sie im Extrakt vorkommen. Damit haben die bekannten und die unbekannt Strukturen gleichermaßen Anteil an der protektiven Wirksamkeit. Eine Erhöhung des tGSH-Gehaltes in beiden Zelllinien durch die rekonstituierten Mischungen wurde nicht beobachtet, sondern im Gegenteil eine leichte Depletion um ca. 10% im gesamten eingesetzten Konzentrationsbereich. Die schwache Erhöhung des tGSH-Spiegels, v.a. durch AE02, lässt sich somit auf bisher nicht charakterisierte Verbindungen zurückführen.

In HT29 Zellen tragen die Einzelstoffe als Mischung innerhalb eines Endpunktes sehr unterschiedlich zur Wirksamkeit des Extraktes bei. In diesem Zellsystem scheint die genaue Zusammensetzung von Mischung/Extrakt ausschlaggebend für eine Wirksamkeit zu sein. Aus den vergleichenden Ergebnissen zwischen Extrakten und rekonstituierten Mischungen lassen antagonistische Interaktionen unter den Saftinhaltsstoffen vermuten.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Schwierigkeit, komplexe Mischungen auf ihr antioxidatives Potenzial zu charakterisieren. Verschiedene Stoffe tragen in unterschiedlichem Maße zu einer Wirkung bei, und nicht alle Biomarker wurden durch die Mischungen/Extrakte in gleichem Maße beeinflusst. Daher wurden auch die **Einzelstoffe** auf ihre protektive Wirkung hin untersucht. Dies sollte der Identifizierung ein-

zelner wirksamer Strukturen sowie synergistischer oder antagonistischer Interaktionen dienen.

Die Summe der TEAC-Werte der Einzelstoffe entspricht weitgehend dem der entsprechenden Mischung. Die beiden Glykoside Rutin und Phloridzin weisen eine hohe antioxidative Kapazität auf. Dies spiegelt sich im hohen TEAC-Wert des rAPE03 sowie auch des Originalextrakts wider. Chlorogensäure und Kaffeesäure tragen mit ihrer vergleichsweise geringen antioxidativen Kapazität wenig hierzu bei und erklären den vergleichsweise geringen TEAC-Wert des rAE01 sowie des Originalextrakts.

In Caco-2 Zellen wurden DNA-Schäden durch Kaffeesäure, zu 26% in rAE01, und das Quercetinglykosid Rutin, zu 47% in rAPE03 enthalten, bereits bei geringen Konzentrationen reduziert. Diese beiden Substanzen könnten somit eine wichtige Rolle bei der Wirkung der genannten Mischungen sowie der entsprechenden Extrakte spielen. Bei der Mischung rAE02 machen 90% der unwirksamen Einzelstoffe (Chlorogensäure, Phloridzin) aus. Die Mischung zeigte dennoch Wirkung bei kleinsten Konzentrationen. In diesem Falle muss von synergistischen Interaktionen ausgegangen werden. Solche Effekte sind für Ascorbinsäure und Kaffeesäure [Laranjinha, 2001] sowie für eine Mischung aus Grüntee-Extrakt/Quercetin/Folsäure [Jeong *et al.*, 2005] bereits beobachtet worden. Auch in einer anderen Studie im Rahmen des BMBF-Netzwerkprojektes wurde ein ähnlicher synergistischer Effekt bei der Wachstumshemmung von HT29 durch eine künstliche Mischung im Vergleich zu deren Einzelkomponenten erhalten [Veeriah *et al.*, 2005].

Der ROS-Level wurde in Caco-2 Zellen in besonderem Maße durch die beiden Hydroxycimtsäurederivate Kaffeesäure und Chlorogensäure reduziert. Die beiden Substanzen machen in rAE01 69% bzw. in rAE02 54% der Masse aus, rAE02 war jedoch die wirksamere Mischung. rAPE03 war ähnlich wirksam wie rAE01, in der Summe machen die wirksamen Substanzen jedoch nur 10% aus. Ähnlich wie bei den Einzelsubstanzen könnte auch hier eine U-Kurve vorliegen, in der ein zu geringer (in rAPE03) und ein zu hoher Anteil (in rAE01) der Einzelstoffe zu einer geringeren Gesamtwirkung führen. Der Anteil der Mischung rAE02 könnte dagegen optimal für die Verringerung des ROS-Levels sein.

In HT29 Zellen reduzierte nur Chlorogensäure den TBH-induzierten ROS-Level. rAE01, die 43% Chlorogensäure enthält, war jedoch unwirksam. Dies ist möglicherweise auf antagonistische Wechselwirkungen zurückzuführen, wie sie von Pinelo *et al.* für eine Mischung aus Resveratrol, Quercetin und Katechin beobachtet wurden [Pinelo *et al.*, 2004]. rAPE03 war die beste untersuchte Mischung bezüglich Reduktion des ROS-Levels, enthält jedoch nur 8% Chlorogensäure.

Sowohl die Mischungen als auch die Einzelstoffe Rutin, Phloridzin (Caco-2) sowie Kaffeesäure und Epicatechin (HT29) depletierten den tGSH-Level. Dies steht im Einklang mit der Literatur, da sowohl Katechine [Moridani *et al.*, 2001b] als auch Hydroxycimtsäurederivate [Moridani *et al.*, 2001a] mit Glutathion Addukte bilden können und dadurch eine Depletion verursachen. Bei Rutin wurde ebenfalls eine tGSH-depletierende Wirkung in HepG2 Zellen beobachtet [Alia *et al.*, 2005a].

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass Apfelsaftextrakte ausgeprägte antioxidative Eigenschaften besitzen und auf verschiedenen Ebenen in der Zelle wirksam sind. Bereits charakterisierte Inhaltsstoffe tragen als Mischung in unterschiedlichem Maße zu der Wirksamkeit der Extrakte bei. Als relevante Einzelstoffe wurden Rutin, Kaffeesäure und Chlorogensäure identifiziert. Die Wirkungen der untersuchten Substanzen können jedoch nicht die ganze Wirksamkeit der Extrakte erklären, so dass in zukünftigen Arbeiten weitere Apfelsaftinhaltsstoffe (z.B. Proanthocyanidine, Cumaroyl-Chinasäuren) bzw. einzelne Extraktfraktionen auf ihr antioxidatives Potenzial untersucht werden sollten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden außerdem Anhaltspunkte gefunden, die auf Abbaureaktionen bzw. zellspezifischer Metabolisierung durch die Zellen hinweisen. Die entstehenden Produkte könnten bei der biologischen Wirksamkeit ebenfalls relevant sein. Ihre Identifizierung könnte einen weiteren Beitrag zur umfassenden Charakterisierung leisten.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung der Ausgangsverbindungen in humanen Kolonzelllinien ohne Berücksichtigung einer möglichen Metabolisierung im Kolon durch die dort angesiedelte Mikroflora. Untersuchungen mit Fermentationsüberständen oder Fäzeswasser bieten eine Möglichkeit, die *in vivo*-Situation besser abzubilden [Halliwell *et al.*, 2005, Rechner *et al.*, 2004].

Apfelsaftinhaltsstoffe zeigten einzeln oder in Mischung auf unterschiedlicher Ebene in der Zelle präventive Effekte. Zellfreie Screening-Tests zur Erfassung der antioxidativen Kapazität (z.B. TEAC) können diese nicht erfassen, da sie nur die Abfangreaktion des im Assay eingesetzten Radikals erfassen können. Daher ist es erforderlich, ein umfassendes Methodenspektrum in verschiedenen biologischen Systemen heranzuziehen. Synergistische oder antagonistische Wirkungen können dabei nicht außer Acht gelassen werden.

Da durch oxidativen Stress auch andere Biomoleküle wie Lipide und Proteine modifiziert werden können, erscheint die Untersuchung zu deren Modulation durch Antioxidanzien ebenfalls interessant. ROS schädigen nicht nur Zellkompartimente, sondern

haben auch modulierende Wirkung auf Zellsignalwege und nukleare Transkriptionsfaktoren, z.B. Nrf2, NF κ B oder AP-1. Diese Mechanismen können für die in dieser Arbeit beobachteten Effekte eine Bedeutung haben, so dass zukünftige Untersuchungen über Wirkmechanismen Auskunft geben können. Laufende Untersuchungen zur Zellantwort ergaben bereits erste Anhaltspunkte auf eine Verringerung des NF κ B-Basislevels [Hanke, 2006] sowie eine induzierte Genexpression der GCS bzw. des Transkriptionsfaktors Nrf2 durch AE02 und APE03 in Caco-2 Zellen [Soyalan, 2006] und stellen damit eine weitere mögliche Ebene der biologischen Wirksamkeit von Apfelsaftinhaltsstoffen dar.

Mit dem zweistufigen Inkubationsprotokoll wurde ein Werkzeug gefunden, die antioxidative Wirksamkeit von polyphenolischen Verbindungen in humanen Kolonzelllinien zu untersuchen. Aufgrund der beiden nachgeschalteten Inkubationen ist es jedoch möglich, dass sich die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber den Agenzien verändern kann. Eine mögliche Erklärung könnte eine Veränderung der NQO1-Aktivität bzw. – Expression im Verlauf der Zellkultur sein, wie dies in anderen Studien beobachtet wurde [de Haan *et al.*, 2005]. Dies erforderte eine stetige Anpassung der Menadionkonzentration. Ähnliche Veränderungen wurden auch beim TBH-induzierten ROS-Level beobachtet. Um dennoch aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden die Polyphenolwirkungen auf die jeweilige Oxidationskontrolle bezogen dargestellt. In primären humanen Kolonzellen aus Biopsiematerial wurden keine protektiven Effekte durch Apfelsaftextrakte und Aglyka detektiert. Primäre humane Kolonzellen aus Biopsiematerial eignen sich zu *ex vivo*-Untersuchungen zum genotoxischen Potenzial von Agenzien, z.B. Menadion (s. Kap. 5.1.1), Alkenale [Glaab *et al.*, 2001] und Wasserstoffperoxid [Pool-Zobel *et al.*, 1999]. Bei einer Vorbehandlung mit Apfelsaftextrakten und den Aglyka dagegen wurde keine Verringerung der DNA-Schäden erhalten. Ein Nachteil des primären Materials ist die nur kurze Viabilität der Zellen, da nur sehr kurze Zeit inkubiert werden kann. Auch das zweistufige Inkubationsprotokoll scheint für Suspensionszellen wenig geeignet, wie vergleichende Untersuchungen von Caco-Zellen in Monolayer- und Suspensionskultur gezeigt haben (s. Kap. 5.3.7).

Beim Vergleich der mit verschiedenen Endpunkten ermittelte Wirksamkeit der Apfelsaftinhaltsstoffe wurde als einziger Zusammenhang der untersuchten Endpunkte eine inverse Korrelation zwischen einer tGSH-Induktion und einer Verringerung der DNA-Schäden beobachtet. Um zu überprüfen, ob die ansonsten fehlende Korrelation auf die in den Tests verwendeten unterschiedlichen Oxidanzien zurückzuführen ist, wurden beispielhaft DNA-Schäden durch das Oxidans TBH statt durch Menadion induziert. Als Antioxidans wurde Chlorogensäure eingesetzt, die den ROS-Level, je-

doch nicht Md-induzierte DNA-Schäden in HT29 Zellen reduzierte. Die Ergebnisse zeigten jedoch keine Verringerung TBH-induzierter DNA-Schäden durch Chlorogensäure. Dies deutet darauf hin, dass die Oxidanzien für die nicht vorhandene Korrelation keine Rolle spielen.

Eine U-förmige Konzentrations-Wirkungskurve, wie sie für Antioxidanzien erhalten wurden, erschwert eindeutige quantitative Aussagen über eine protektive und antioxidative Wirksamkeit, da sowohl die Konzentration, bei der ein optimaler Effekt auftritt als auch die Wirkstärke für die Beurteilung von Apfelsaftinhaltsstoffen relevant sind. Neben den ohnehin herrschenden künstlichen Bedingungen in der Zellkultur, z.B. durch statische Verhältnisse, d.h. Ausscheidungsprodukte der Zellen verbleiben im Medium und können schädigend wirken, ist gerade bei der Erfassung antioxidativer Wirksamkeit der erhöhte Sauerstoffpartialdruck ein Faktor, der autoxidative Reaktionen, v.a. in Anwesenheit von Übergangsmetallen begünstigt [Halliwell, 2003, Lapidot *et al.*, 2002b]. Die Relevanz der prooxidativen Reaktionen *in vivo* und *in vitro* bleiben unklar. Die in der Arbeit eingesetzten hohen Konzentrationen (>30 μM bzw. 250 $\mu\text{g/mL}$) geben daher ein Maximum einzusetzender Konzentration vor.

7 Zusammenfassung

Phenolische Apfelsaftextrakte (AEs) aus Säften unterschiedlicher Apfelsorten und ein Trestereextrakt (APE03) wurden auf ihr Potenzial zur Verringerung oxidativer Zellschäden in Darmzellen untersucht.

Ein zweistufiges Inkubationsprotokoll kam in humanen Kolonzelllinien (Caco-2, HT29) zur Anwendung: basierend auf einer 24 h Behandlung mit phenolischem Antioxidans, gefolgt von einer Induktion von oxidativem Stress (durch Menadion, 1 h bzw. *tert*-Butylhydroperoxid, 40 min), um eine pathologische *in vivo* Situation nachzustellen. Die Apfelsaftextrakte wurden im Vergleich zu als Antioxidanzien beschriebenen Saftinhaltsstoffen (Rutin, Phloridzin, Epicatechin, Kaffeesäure, Chlorogensäure) und zu entsprechenden rekonstituierten Mischungen (rAEs) geprüft. Untersuchte Parameter waren (oxidative) DNA-Schädigung, zellulärer ROS-Level und Glutathionspiegel. Zusätzlich wurden antioxidative Kapazität und die Stabilität der Einzelstoffe unter Inkubationsbedingungen erfasst. Die Apfelsaftextrakte zeigten eine ausgeprägte antioxidative Kapazität (3.6-4.2 mM Trolox), der Trestereextrakt APE03 war dabei wirksamer als die drei Saftextrakte. Die höheren TEAC-Werte der entsprechenden rAEs (4.7-7.3 mM Trolox) deuten auf eine zentrale Rolle der Einzelstoffe in der Mischung hin. Der zelluläre ROS-Level wurde durch die Extrakte AE01, AE02 und APE03 (1-100 µg/mL) und rAEs (0.5-50 µg/mL) in beiden Zelllinien signifikant verringert. AE04 war nur in HT29 Zellen wirksam. Oxidative DNA-Schäden in Caco-2 Zellen wurden durch die Extrakte (50-100 µg/mL) und deutlicher durch die rekonstituierten Mischungen (1 µg/mL) von AE01 und APE03 verringert. Von den Saftinhaltsstoffen zeigten Kaffeesäure und Rutin das höchste Potenzial zur Verringerung von DNA-Schäden; der zelluläre ROS-Level wurde am effektivsten durch Kaffeesäure und Chlorogensäure verringert. Der Glutathionspiegel von Caco-2 Zellen wurde durch AE02 und APE03 sowie durch Kaffeesäure, nicht jedoch durch andere Einzelstoffe oder Mischungen erhöht.

Die Aglyka Quercetin und Phloretin, die aus Glykosiden im Intestinaltrakt freigesetzt werden können, wiesen in allen Endpunkten die höchste Wirksamkeit auf.

Humane primäre Kolonzellen erwiesen sich in den Untersuchungen als ein weniger geeignetes Modellsystem, möglicherweise aufgrund der Art der gewählten Inkubation.

Insgesamt erwiesen sich die phenolischen Apfelsaftextrakte als wirksame Antioxidanzien mit hohem Potenzial zur Verringerung oxidativer Zellschäden in humanen

Kolonzelllinien. Mit den begleitenden Untersuchungen von Mischungen und Einzelstoffen wurden Polyphenole (Kaffeensäure, Rutin, Chlorogensäure) identifiziert, die wesentlich zur protektiven Wirkung der Saftextrakte beitragen. Der gewählte *in vitro*-Prüfansatz erwies sich dabei als geeignet zur Charakterisierung der antioxidativen Wirksamkeit von Apfelsaftinhaltsstoffen in Darmzellen.

Die antioxidative Wirksamkeit kann nicht alleine auf die untersuchten Hauptkomponenten zurückgeführt werden. Es liegt nahe, dass auch bisher nicht charakterisierte Substanzen/ Substanzgruppen ebenfalls einen Beitrag an der antioxidativen Wirksamkeit leisten. Eine möglichst umfassende Charakterisierung von Apfelsaftinhaltsstoffen ist notwendig, gerade im Hinblick auf eine mögliche Prävention von Darmerkrankungen durch die Aufnahme von Apfelsaft.

8 Literaturverzeichnis

- Abdelmohsen, K., Gerber, P. A., von Montfort, C., Sies, H., Klotz, L. O., Epidermal growth factor receptor is a common mediator of quinone-induced signaling leading to phosphorylation of connexin-43: role of glutathione and tyrosine phosphatases, *J Biol Chem* **2003**, 278, 38360-38367.
- Abrahamse, S. L., Pool-Zobel, B. L., Rechkemmer, G., Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells, *Carcinogenesis* **1999**, 20, 629-634.
- Agullo, G., Gamet, L., Besson, C., Demigne, C., Remesy, C., Quercetin exerts a preferential cytotoxic effect on active dividing colon carcinoma HT29 and Caco-2 cells, *Cancer Lett* **1994**, 87, 55-63.
- Aherne, S. A., O'Brien, N. M., Lack of effect of the flavonoids, myricetin, quercetin, and rutin, on repair of H₂O₂-induced DNA single-strand breaks in Caco-2, Hep G2, and V79 cells, *Nutr Cancer* **2000a**, 38, 106-115.
- Aherne, S. A., O'Brien, N. M., Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells, *Free Radic Biol Med* **2000b**, 29, 507-514.
- Aherne, S. A., O'Brien, N. M., Protection by the flavonoids myricetin, quercetin, and rutin against hydrogen peroxide-induced DNA damage in Caco-2 and Hep G2 cells, *Nutr Cancer* **1999**, 34, 160-166.
- Akerboom, T. P., Sies, H., Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples, *Methods Enzymol* **1981**, 77, 373-382.
- Alia, M., Mateos, R., Ramos, S., Lecumberri, E., Bravo, L., Goya, L., Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2), *Eur J Nutr* **2005a**.
- Alia, M., Ramos, S., Mateos, R., Granado-Serrano, A. B., Bravo, L., Goya, L., Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide, *Toxicol Appl Pharmacol* **2005b**.
- Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S. E., Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method, *J Agric Food Chem* **2004**, 52, 7970-7981.

- Aw, T. Y., Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine, *Am J Clin Nutr* **1999**, *70*, 557-565.
- Awad, H. M., Boersma, M. G., Boeren, S., van Bladeren, P. J., Vervoort, J., Rietjens, I. M., The regioselectivity of glutathione adduct formation with flavonoid quinone/quinone methides is pH-dependent, *Chem Res Toxicol* **2002a**, *15*, 343-351.
- Awad, H. M., Boersma, M. G., Boeren, S., van der Woude, H., van Zanden, J., van Bladeren, P. J., Vervoort, J., Rietjens, I. M., Identification of o-quinone/quinone methide metabolites of quercetin in a cellular in vitro system, *FEBS Lett* **2002b**, *520*, 30-34.
- Barth, S. W., Fahndrich, C., Bub, A., Dietrich, H., Watzl, B., Will, F., Briviba, K., Rechkemper, G., Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats, *Carcinogenesis* **2005**, *26*, 1414-1421.
- Bartoli, G. M., Piccioni, E., Agostara, G., Calviello, G., Palozza, P., Different mechanisms of tert-butyl hydroperoxide-induced lethal injury in normal and tumor thymocytes, *Arch Biochem Biophys* **1994**, *312*, 81-87.
- Bass, D. A., Parce, J. W., Dechatelet, L. R., Szejda, P., Seeds, M. C., Thomas, M., Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation, *J Immunol* **1983**, *130*, 1910-1917.
- Becker, B. F., Towards the physiological function of uric acid, *Free Radic Biol Med* **1993**, *14*, 615-631.
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P., Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **2001**.
- Benamira, M., Johnson, K., Chaudhary, A., Bruner, K., Tibbetts, C., Marnett, L. J., Induction of mutations by replication of malondialdehyde-modified M13 DNA in Escherichia coli: determination of the extent of DNA modification, genetic requirements for mutagenesis, and types of mutations induced, *Carcinogenesis* **1995**, *16*, 93-99.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., Biochemie, 5th ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **2003**.
- Berlau, J., Gleib, M., Pool-Zobel, B. L., Colon cancer risk factors from nutrition, *Anal Bioanal Chem* **2004**, *378*, 737-743.
- Betz, E., Mecke, D., Reutter, K., Ritter, H., Biologie des Menschen, Quelle Et Meyer Verlag,, Wiebelsheim, **2001**.
- Biesalski, H. K., in *Ernährungsmedizin* (Eds.: Biesalski, H., Kasper, H., Fürst, P.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1999**, pp. 69-73.

- Birt, D. F., Hendrich, S., Wang, W., Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids, *Pharmacol Ther* **2001**, *90*, 157-177.
- Bitsch, I., Netzel, M., Strass, G., Janssen, M., Kesenheimer, B., Herbst, M., Carle, E., Böhm, V., Harwart, M., Rechner, A. R., Dietrich, H., Bitsch, R., Hochwertige Fruchtsäfte aus speziellen Apfelsorten- Beitrag zu einer gesunden Ernährung im Rahmen der "5 am Tag"-Kampagne, *Ernährungs-Umschau* **2000**, *47*, 428-431.
- Blaut, M., Schoefer, L., Braune, A., Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms, *Int J Vitam Nutr Res* **2003**, *73*, 79-87.
- Bloch, M., Diplomarbeit thesis, TU Kaiserslautern (Kaiserslautern), **2005**.
- Boatman, R. J., English, J. C., Perry, L. G., Fiorica, L. A., Covalent protein adducts of hydroquinone in tissues from rats: identification and quantitation of sulfhydryl-bound forms, *Chem Res Toxicol* **2000**, *13*, 853-860.
- Bock, K. W., Vertebrate UDP-glucuronosyltransferases: functional and evolutionary aspects, *Biochem Pharmacol* **2003**, *66*, 691-696.
- Boersma, M. G., van der Woude, H., Bogaards, J., Boeren, S., Vervoort, J., Cnubben, N. H., van Iersel, M. L., van Bladeren, P. J., Rietjens, I. M., Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases, *Chem Res Toxicol* **2002**, *15*, 662-670.
- Boulton, D. W., Walle, U. K., Walle, T., Fate of the flavonoid quercetin in human cell lines: chemical instability and metabolism, *J Pharm Pharmacol* **1999**, *51*, 353-359.
- Breinholt, V. M., Molck, A. M., Svendsen, G. W., Daneshvar, B., Vinggaard, A. M., Poulsen, M., Dragsted, L. O., Effects of dietary antioxidants and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline (IQ) on preneoplastic lesions and on oxidative damage, hormonal status, and detoxification capacity in the rat, *Food Chem Toxicol* **2003**, *41*, 1315-1323.
- Breinholt, V. M., Offord, E. A., Brouwer, C., Nielsen, S. E., Brosen, K., Friedberg, T., In vitro investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids, *Food Chem Toxicol* **2002**, *40*, 609-616.
- Brown, J. P., Dietrich, P. S., Mutagenicity of plant flavonols in the Salmonella/mammalian microsome test: activation of flavonol glycosides by mixed glycosidases from rat cecal bacteria and other sources, *Mutat Res* **1979**, *66*, 223-240.
- Burda, S., Oleszek, W., Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, *J Agric Food Chem* **2001**, *49*, 2774-2779.
- Buss, H., Chan, T. P., Sluis, K. B., Domigan, N. M., Winterbourn, C. C., Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method, *Free Radic Biol Med* **1997**, *23*, 361-366.

- Calliste, C. A., Le Bail, J. C., Trouillas, P., Pouget, C., Habrioux, G., Chulia, A. J., Duroux, J. L., Chalcones: structural requirements for antioxidant, estrogenic and antiproliferative activities, *Anticancer Res* **2001**, *21*, 3949-3956.
- Canada, A. T., Giannella, E., Nguyen, T. D., Mason, R. P., The production of reactive oxygen species by dietary flavonols, *Free Radic Biol Med* **1990**, *9*, 441-449.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L., Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radic Biol Med* **1997**, *22*, 749-760.
- Chen, Y. C., Shen, S. C., Chow, J. M., Ko, C. H., Tseng, S. W., Flavone inhibition of tumor growth via apoptosis in vitro and in vivo, *Int J Oncol* **2004**, *25*, 661-670.
- Chiou, T. J., Chou, Y. T., Tzeng, W. F., Menadione-induced cell degeneration is related to lipid peroxidation in human cancer cells, *Proc Natl Sci Counc Repub China B* **1998**, *22*, 13-21.
- Chiou, T. J., Tzeng, W. F., The roles of glutathione and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress, *Toxicology* **2000**, *154*, 75-84.
- Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P., Kaina, B., Mechanisms of human DNA repair: an update, *Toxicology* **2003**, *193*, 3-34.
- Collins, A. R., in *Measuring in vivo oxidative damage: a practical approach*, Vol. 7 (Eds.: Lunec, J., Griffiths, H. R.), John Wiley & Sons, **2000**, pp. 83-93.
- Collins, A. R., Dusinska, M., Gedik, C. M., Stetina, R., Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker?, *Environ Health Perspect* **1996**, *104 Suppl 3*, 465-469.
- Collins, A. R., Ma, A. G., Duthie, S. J., The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells, *Mutat Res* **1995**, *336*, 69-77.
- Crow, J. P., Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species, *Nitric Oxide* **1997**, *1*, 145-157.
- Dangles, O., Fargeix, G., Dufour, C., One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, *7*, 1387 - 1396.
- Day, A. J., Canada, F. J., Diaz, J. C., Kroon, P. A., McLauchlan, R., Faulds, C. B., Plumb, G. W., Morgan, M. R., Williamson, G., Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase, *FEBS Lett* **2000**, *468*, 166-170.
- Day, A. J., DuPont, M. S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M. J., Morgan, M. R., Williamson, G., Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity, *FEBS Lett* **1998**, *436*, 71-75.

- Day, A. J., Williamson, G., Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma, *Br J Nutr* **2001**, *86 Suppl 1*, S105-110.
- Day, R. M., Suzuki, Y. J., Lum, J. M., White, A. C., Fanburg, B. L., Bleomycin upregulates expression of gamma-glutamylcysteine synthetase in pulmonary artery endothelial cells, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2002**, *282*, L1349-1357.
- de Haan, L. H., Pot, G. K., Aarts, J. M., Rietjens, I. M., Alink, G. M., In vivo relevance of two critical levels for NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1)-mediated cellular protection against electrophile toxicity found in vitro, *Toxicol In Vitro* **2005**.
- de Jager, A., Roelofs, F. P. M. M., in *Annual Report 1995*, Fruit Research Station, Randwijk, **1996**, pp. 84-86.
- de Pascual-Teresa, S., Johnston, K. L., DuPont, M. S., O'Leary, K. A., Needs, P. W., Morgan, L. M., Clifford, M. N., Bao, Y., Williamson, G., Quercetin metabolites downregulate cyclooxygenase-2 transcription in human lymphocytes ex vivo but not in vivo, *J Nutr* **2004**, *134*, 552-557.
- Dedon, P. C., Plataras, J. P., Rouzer, C. A., Marnett, L. J., Indirect mutagenesis by oxidative DNA damage: formation of the pyrimidopurinone adduct of deoxyguanosine by base propenal, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 11113-11116.
- Delves, P. J., Roitt, I. M., The immune system. First of two parts, *N Engl J Med* **2000**, *343*, 37-49.
- Depeint, F., Gee, J. M., Williamson, G., Johnson, I. T., Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities, *Proc Nutr Soc* **2002**, *61*, 97-103.
- Dinkova-Kostova, A. T., Massiah, M. A., Bozak, R. E., Hicks, R. J., Talalay, P., Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 3404-3409.
- DLR-Newsletter, Darmzellen in Kultur erleichtern die Erforschung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, *DLR* **2002**, *1*, 3-4.
- Donaldson, M. S., Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet, *Nutr J* **2004**, *3*, 19.
- Draper, H. H., Squires, E. J., Mahmoodi, H., Wu, J., Agarwal, S., Hadley, M., A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials, *Free Radic Biol Med* **1993**, *15*, 353-363.
- DSMZ, Human and Animal Cell Line, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*, Braunschweig, **1995**

- Duthie, S. J., Dobson, V. L., Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro, *Eur J Nutr* **1999**, *38*, 28-34.
- Eisenbrand, G., Metzler, M., Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner, Wiley, VCH, Weinheim, **2005**.
- Eisenbrand, G., Schreier, P., Römpp Lexikon der Lebensmittelchemie, 2.8 ed., Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**.
- Erba, D., Riso, P., Criscuoli, F., Testolin, G., Malondialdehyde production in Jurkat T cells subjected to oxidative stress, *Nutrition* **2003**, *19*, 545-548.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., Zollner, H., Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free Radic Biol Med* **1991**, *11*, 81-128.
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L., O'Neill, K. L., The comet assay: a comprehensive review, *Mutat Res* **1995**, *339*, 37-59.
- Ford, E. S., Ajani, U. A., Mokdad, A. H., Brief communication: The prevalence of high intake of vitamin E from the use of supplements among U.S. adults, *Ann Intern Med* **2005**, *143*, 116-120.
- Frank, J., Biesalski, H. K., Dominici, S., Pompella, A., The visualization of oxidant stress in tissues and isolated cells, *Histol Histopathol* **2000**, *15*, 173-184.
- Frankel, E. N., Meyer, A. S., The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1925-1941.
- Friedman, M., Jurgens, H. S., Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds, *J Agric Food Chem* **2000**, *48*, 2101-2110.
- Fritzen, S., Diplomarbeit thesis, TU Kaiserslautern (Kaiserslautern), **2003**.
- Gallagher, E. P., Kavanagh, T. J., Eaton, D. L., Glutathione, oxidized glutathione, and mixed disulfides in biological samples, *Meth. Toxicol.* **1994**, *1B*, 349-366.
- Gee, J. M., DuPont, M. S., Day, A. J., Plumb, G. W., Williamson, G., Johnson, I. T., Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway, *J Nutr* **2000**, *130*, 2765-2771.
- Gee, J. M., Johnson, I. T., Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health, *Curr Med Chem* **2001**, *8*, 1245-1255.
- Gill, C. I., Rowland, I. R., Diet and cancer: assessing the risk, *Br J Nutr* **2002**, *88 Suppl 1*, S73-87.
- Glaab, V., Collins, A. R., Eisenbrand, G., Janzowski, C., DNA-damaging potential and glutathione depletion of 2-cyclohexene-1-one in mammalian cells, compared to food relevant 2-alkenals, *Mutat Res* **2001**, *497*, 185-197.

- Göke, M. A., in *Chronisch entzündliche Darmerkrankungen- Das CED-Handbuch für Klinik und Praxis* (Eds.: Hoffmann, J. C., Kroesen, A. J., Klump, B.), Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **2004**, pp. 72-81.
- Golding, J. B., McGlasson, W. B., Wyllie, S. G., Leach, D. N., Fate of apple peel phenolics during cool storage, *J Agric Food Chem* **2001**, *49*, 2283-2289.
- Gottstein, T., Koop, H., Prävention gastrointestinaler Tumoren, *Forum DKG* **2004**, *2*, 40-45.
- Gottwald, W., Statistik für Anwender, Wiley-VCH-Verlag, **2000**.
- Graefe, E. U., Derendorf, H., Veit, M., Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans, *Int J Clin Pharmacol Ther* **1999**, *37*, 219-233.
- Guerrero, A., Arias, J. M., in *Cell physiology source book*, Vol. 67, 2. ed., Academic Press, **1998**, pp. 1031-1043.
- Guillen-Sans, R., Guzman-Chozas, M., The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: a review, *Crit Rev Food Sci Nutr* **1998**, *38*, 315-330.
- Halliwell, B., Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem?, *FEBS Lett* **2003**, *540*, 3-6.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press, **1999**.
- Halliwell, B., Rafter, J., Jenner, A., Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?, *Am J Clin Nutr* **2005**, *81*, 268S-276S.
- Hanke, E. M., Diplomarbeit, 2006
- Hardigree, A. A., Epler, J. L., Comparative mutagenesis of plant flavonoids in microbial systems, *Mutat Res* **1978**, *58*, 231-239.
- Hargreaves, R. H., Hartley, J. A., Butler, J., Mechanisms of action of quinone-containing alkylating agents: DNA alkylation by aziridinyquinones, *Front Biosci* **2000**, *5*, E172-180.
- Hempel, S. L., Buettner, G. R., O'Malley, Y. Q., Wessels, D. A., Flaherty, D. M., Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123, *Free Radic Biol Med* **1999**, *27*, 146-159.
- Henderson, C. J., Sahraoui, A., Wolf, C. R., Cytochrome P450s and chemoprevention, *Biochem Soc Trans* **2000**, *28*, 42-46.
- Hider, R. C., Liu, Z. D., Khodr, H. H., Metal chelation of polyphenols, *Methods Enzymol* **2001**, *335*, 190-203.

- Hoeijmakers, J. H., Genome maintenance mechanisms for preventing cancer, *Nature* **2001**, *411*, 366-374.
- Hollman, P. C., Bioavailability of flavonoids, *Eur J Clin Nutr* **1997**, *51 Suppl 1*, S66-69.
- Hollman, P. C., de Vries, J. H., van Leeuwen, S. D., Mengelers, M. J., Katan, M. B., Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers, *Am J Clin Nutr* **1995**, *62*, 1276-1282.
- Hollman, P. C., van Trijp, J. M., Buysman, M. N., van der Gaag, M. S., Mengelers, M. J., de Vries, J. H., Katan, M. B., Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man, *FEBS Lett* **1997**, *418*, 152-156.
- Hollman, P. C., vd Gaag, M., Mengelers, M. J., van Trijp, J. M., de Vries, J. H., Katan, M. B., Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man, *Free Radic Biol Med* **1996**, *21*, 703-707.
- Holtmann, M., Neurath, M. F., in *Chronisch entzündliche Darmerkrankungen- Das CED-Handbuch für Klinik und Praxis* (Eds.: Hoffmann, J. C., Kroesen, A. J., Klump, B.), Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **2004**, pp. 28-47.
- Horvathova, E., Slamenova, D., Hlincikova, L., Mandal, T. K., Gabelova, A., Collins, A. R., The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay, *Mutat Res* **1998**, *409*, 163-171.
- Iwai, K., Kishimoto, N., Kakino, Y., Mochida, K., Fujita, T., In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans, *J Agric Food Chem* **2004**, *52*, 4893-4898.
- Janero, D. R., Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury, *Free Radic Biol Med* **1990**, *9*, 515-540.
- Janzowski, C., Glaab, V., Mueller, C., Straesser, U., Kamp, H. G., Eisenbrand, G., Alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds: induction of oxidative DNA damage in mammalian cells, *Mutagenesis* **2003**, *18*, 465-470.
- Jaruga, P., Dizdaroglu, M., Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells, *Nucleic Acids Res* **1996**, *24*, 1389-1394.
- Jeong, Y. M., Choi, Y. G., Kim, D. S., Park, S. H., Yoon, J. A., Kwon, S. B., Park, E. S., Park, K. C., Cytoprotective effect of green tea extract and quercetin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress, *Arch Pharm Res* **2005**, *28*, 1251-1256.
- Jones, D. J., Lamb, J. H., Verschoyle, R. D., Howells, L. M., Butterworth, M., Lim, C. K., Ferry, D., Farmer, P. B., Gescher, A. J., Characterisation of metabolites of the putative cancer chemopreventive agent quercetin and their effect on cyclo-oxygenase activity, *Br J Cancer* **2004**, *91*, 1213-1219.

- Jorgensen, E. M., Marin, A. B., Kennedy, J. A., Analysis of the oxidative degradation of proanthocyanidins under basic conditions, *J Agric Food Chem* **2004**, *52*, 2292-2296.
- Kahle, K., Kraus, M., Richling, E., Polyphenol profiles of apple juices, *Mol Nutr Food Res* **2005a**, *49*, 797-806.
- Kahle, K., Kraus, M., Scheppach, W., Richling, E., Colonic availability of apple polyphenols - A study in ileostomy subjects, *Mol Nutr Food Res* **2005b**.
- Kamp, H. G., Dissertation thesis, TU Kaiserslautern (Kaiserslautern), **2004**.
- Kampa, M., Alexaki, V. I., Notas, G., Nifli, A. P., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtoglou, E., Blekas, G., Boskou, D., Gravanis, A., Castanas, E., Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action, *Breast Cancer Res* **2004**, *6*, R63-74.
- Kampa, M., Nistikaki, A., Tsaousis, V., Maliaraki, N., Notas, G., Castanas, E., A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay, *BMC Clin Pathol* **2002**, *2*, 3.
- Karczewski, J. M., Peters, J. G., Noordhoek, J., Quinone toxicity in DT-diaphorase-efficient and -deficient colon carcinoma cell lines, *Biochem Pharmacol* **1999**, *57*, 27-37.
- Kassie, F., Parzefall, W., Knasmuller, S., Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies, *Mutat Res* **2000**, *463*, 13-31.
- Keepers, Y. P., Pizao, P. E., Peters, G. J., van Ark-Otte, J., Winograd, B., Pinedo, H. M., Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing, *Eur J Cancer* **1991**, *27*, 897-900.
- Kelly, K. A., Havrilla, C. M., Brady, T. C., Abramo, K. H., Levin, E. D., Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems, *Environ Health Perspect* **1998**, *106*, 375-384.
- Kern, M., Tjaden, Z., Ngiewih, Y., Puppel, N., Will, F., Dietrich, H., Pahlke, G., Marko, D., Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract, *Mol Nutr Food Res* **2005**, *49*, 317-328.
- Kern, S. M., Bennett, R. N., Needs, P. W., Mellon, F. A., Kroon, P. A., Garcia-Conesa, M. T., Characterization of metabolites of hydroxycinnamates in the in vitro model of human small intestinal epithelium caco-2 cells, *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, 7884-7891.
- Keston, A. S., Brandt, R., The Fluorometric Analysis of Ultramicro Quantities of Hydrogen Peroxide, *Anal Biochem* **1965**, *11*, 1-5.
- Klaunig, J. E., Xu, Y., Isenberg, J. S., Bachowski, S., Kolaja, K. L., Jiang, J., Stevenson, D. E., Walborg, E. F., Jr., The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis, *Environ Health Perspect* **1998**, *106 Suppl 1*, 289-295.

- Klotz, L. O., Patak, P., Ale-Agha, N., Buchczyk, D. P., Abdelmohsen, K., Gerber, P. A., von Montfort, C., Sies, H., 2-Methyl-1,4-naphthoquinone, vitamin K(3), decreases gap-junctional intercellular communication via activation of the epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase cascade, *Cancer Res* **2002**, 62, 4922-4928.
- Kondo, K., Kurihara, M., Fukuhara, K., Mechanism of antioxidant effect of catechins, *Methods Enzymol* **2001**, 335, 203-217.
- Kucharzik, T., in *Chronisch entzündliche Darmerkrankungen- Das CED-Handbuch für Klinik und Praxis* (Eds.: Hoffmann, J. C., Kroesen, A. J., Klump, B.), Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **2004**, pp. 48-56.
- Kuntz, S., Wenzel, U., Daniel, H., Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines, *Eur J Nutr* **1999**, 38, 133-142.
- Kuo, S. M., Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells, *Cancer Lett* **1996**, 110, 41-48.
- Lairon, D., Amiot, M. J., Flavonoids in food and natural antioxidants in wine, *Curr Opin Lipidol* **1999**, 10, 23-28.
- Lapidot, T., Walker, M. D., Kanner, J., Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic beta-cells in vitro, *J Agric Food Chem* **2002a**, 50, 7220-7225.
- Lapidot, T., Walker, M. D., Kanner, J., Can apple antioxidants inhibit tumor cell proliferation? Generation of H₂O₂ during interaction of phenolic compounds with cell culture media, *J Agric Food Chem* **2002b**, 50, 3156-3160.
- Laranjinha, J., Redox cycles of caffeic acid with alpha-tocopherol and ascorbate, *Methods Enzymol* **2001**, 335, 282-295.
- Laval, J., Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress, *Pathol Biol (Paris)* **1996**, 44, 14-24.
- LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., Bondy, S. C., Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, *Chem Res Toxicol* **1992**, 5, 227-231.
- Lee, J. S., Surh, Y. J., Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention, *Cancer Lett* **2005**, 224, 171-184.
- Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Soffers, A. E., Rietjens, I. M., The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones, *Free Radic Biol Med* **2001**, 31, 869-881.

- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R., Shacter, E., Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol* **1994**, 233, 346-357.
- Li, J., Lee, J. M., Johnson, J. A., Microarray analysis reveals an antioxidant responsive element-driven gene set involved in conferring protection from an oxidative stress-induced apoptosis in IMR-32 cells, *J Biol Chem* **2002**, 277, 388-394.
- Lindberg-Madsen, H., Möller Anderson, C., Viborg Jorgensen, L., Skibsted, L. H., Radical scavenging by dietary flavonoids. A kinetic study of antioxidant efficiencies, *Eur Food Res. Technol* **2000**, 211, 240-246.
- Lindl, T., Zell- und Gewebekultur, Vol. 4. überarbeitete und erweiterte Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **2000**.
- Llopiz, N., Puiggros, F., Cespedes, E., Arola, L., Ardevol, A., Blade, C., Salvado, M. J., Antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract in Fao cells submitted to oxidative stress, *J Agric Food Chem* **2004**, 52, 1083-1087.
- Loft, S., Poulsen, H. E., Cancer risk and oxidative DNA damage in man, *J Mol Med* **1996**, 74, 297-312.
- Lu, Y., Foo, L. Y., Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace, *Food Chemistry* **2000**, 68, 81-85.
- Lu, Y., Foo, L. Y., Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace, *Food Chem* **1997**, 59, 187-194.
- Malencik, D. A., Sprouse, J. F., Swanson, C. A., Anderson, S. R., Dityrosine: preparation, isolation, and analysis, *Anal Biochem* **1996**, 242, 202-213.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am J Clin Nutr* **2004**, 79, 727-747.
- Manthey, J. A., Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation, *Microcirculation* **2000**, 7, S29-34.
- Marnett, L. J., Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde, *Mutat Res* **1999**, 424, 83-95.
- Marquardt, H., Pfau, W., in *Lehrbuch der Toxikologie*, 2. ed. (Eds.: Marquardt, H., Schäfer, S.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **2004**, pp. 157-193.
- Martins, E. A., Meneghini, R., DNA damage and lethal effects of hydrogen peroxide and menadione in Chinese hamster cells: distinct mechanisms are involved, *Free Radic Biol Med* **1990**, 8, 433-440.
- Meister, A., Anderson, M. E., Glutathione, *Annu Rev Biochem* **1983**, 52, 711-760.
- Meneghini, R., Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage, *Free Radic Biol Med* **1997**, 23, 783-792.

- Merken, H. M., Merken, C. D., Beecher, G. R., Kinetics method for the quantitation of anthocyanidins, flavonols, and flavones in foods, *J Agric Food Chem* **2001**, *49*, 2727-2732.
- Metodiewa, D., Jaiswal, A. K., Cenas, N., Dickancaite, E., Segura-Aguilar, J., Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product, *Free Radic Biol Med* **1999**, *26*, 107-116.
- Middleton, E., Jr., Kandaswami, C., Theoharides, T. C., The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol Rev* **2000**, *52*, 673-751.
- Mihalev, K., Schieber, A., Mollov, P., Carle, R., Effect of mash maceration on the polyphenolic content and visual quality attributes of cloudy apple juice, *J Agric Food Chem* **2004**, *52*, 7306-7310.
- Miller, N. J., Diplock, A. T., Rice-Evans, C. A., Evaluation of the antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage, *J Agric Food Chem* **1995**, *43*, 1794-1801.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A., A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin Sci (Lond)* **1993**, *84*, 407-412.
- Monks, T. J., Hanzlik, R. P., Cohen, G. M., Ross, D., Graham, D. G., Quinone chemistry and toxicity, *Toxicol Appl Pharmacol* **1992**, *112*, 2-16.
- Mori, H., Yamada, Y., Kuno, T., Hirose, Y., Aberrant crypt foci and beta-catenin accumulated crypts; significance and roles for colorectal carcinogenesis, *Mutat Res* **2004**, *566*, 191-208.
- Moridani, M. Y., Scobie, H., Jamshidzadeh, A., Salehi, P., O'Brien, P. J., Caffeic acid, chlorogenic acid, and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation, *Drug Metab Dispos* **2001a**, *29*, 1432-1439.
- Moridani, M. Y., Scobie, H., Salehi, P., O'Brien, P. J., Catechin metabolism: glutathione conjugate formation catalyzed by tyrosinase, peroxidase, and cytochrome p450, *Chem Res Toxicol* **2001b**, *14*, 841-848.
- Müller, C., Eisenbrand, G., Gradinger, M., Rath, T., Albert, F. W., Vienken, J., Singh, R., Farmer, P. B., Stockis, J. P., Janzowski, C., Effects of hemodialysis, dialyser type and iron infusion on oxidative stress in uremic patients, *Free Radic Res* **2004**, *38*, 1093-1100.
- Musk, S. R., Stephenson, P., Smith, T. K., Stening, P., Fyfe, D., Johnson, I. T., Selective toxicity of compounds naturally present in food toward the transformed phenotype of human colorectal cell line HT29, *Nutr Cancer* **1995**, *24*, 289-298.

- Musonda, C. A., Helsby, N., Chipman, J. K., Effects of quercetin on drug metabolizing enzymes and oxidation of 2',7-dichlorofluorescin in HepG2 cells, *Hum Exp Toxicol* **1997**, *16*, 700-708.
- Myhre, O., Andersen, J. M., Aarnes, H., Fonnum, F., Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescin diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation, *Biochem Pharmacol* **2003**, *65*, 1575-1582.
- Nakamura, A., Goto, S., Analysis of protein carbonyls with 2,4-dinitrophenyl hydrazine and its antibodies by immunoblot in two-dimensional gel electrophoresis, *J Biochem (Tokyo)* **1996**, *119*, 768-774.
- Nardini, M., Pisu, P., Gentili, V., Natella, F., Di Felice, M., Piccolella, E., Scaccini, C., Effect of caffeic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in U937, *Free Radic Biol Med* **1998**, *25*, 1098-1105.
- Nelson, R. L., Iron and colorectal cancer risk: human studies, *Nutr Rev* **2001**, *59*, 140-148.
- Nguyen, T., Sherratt, P. J., Pickett, C. B., Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2003**, *43*, 233-260.
- Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., van Norren, K., van Leeuwen, P. A., Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am J Clin Nutr* **2001**, *74*, 418-425.
- O'Leary, K. A., Day, A. J., Needs, P. W., Mellon, F. A., O'Brien, N. M., Williamson, G., Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism, *Biochem Pharmacol* **2003**, *65*, 479-491.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C., Buijsman, M. N., van Amelsvoort, J. M., Katan, M. B., Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans, *J Nutr* **2003**, *133*, 1806-1814.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C., Katan, M. B., Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans, *J Nutr* **2001**, *131*, 66-71.
- Ostling, O., Johanson, K. J., Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem Biophys Res Commun* **1984**, *123*, 291-298.
- Owen, R. W., Biomarkers in colorectal cancer, *IARC Sci Publ* **2001**, *154*, 101-111.
- Pacifici, R. E., Davies, K. J., Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited, *Gerontology* **1991**, *37*, 166-180.

- Pellegrini, N., Re, R., Yang, M., Rice-Evans, C., Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay, *Methods Enzymol* **1998**, 299, 379-389.
- Peng, I. W., Kuo, S. M., Flavonoid structure affects the inhibition of lipid peroxidation in Caco-2 intestinal cells at physiological concentrations, *J Nutr* **2003**, 133, 2184-2187.
- Petri, N., Tannergren, C., Holst, B., Mellon, F. A., Bao, Y., Plumb, G. W., Bacon, J., O'Leary, K. A., Kroon, P. A., Knutson, L., Forsell, P., Eriksson, T., Lennernas, H., Williamson, G., Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum in vivo, *Drug Metab Dispos* **2003**, 31, 805-813.
- Pinelo, M., Manzocco, L., Nunez, M. J., Nicoli, M. C., Interaction among phenols in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity, *J Agric Food Chem* **2004**, 52, 1177-1180.
- Pool-Zobel, B., Veeriah, S., Bohmer, F. D., Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens-focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis, *Mutat Res* **2005**, 591, 74-92.
- Pool-Zobel, B. L., Abrahamse, S. L., Collins, A. R., Kark, W., Gugler, R., Oberreuther, D., Siegel, E. G., Treptow-van Lishaut, S., Rechkemmer, G., Analysis of DNA strand breaks, oxidized bases, and glutathione S-transferase P1 in human colon cells from biopsies, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **1999**, 8, 609-614.
- Prueksaritanont, T., Gorham, L. M., Hochman, J. H., Tran, L. O., Vyas, K. P., Comparative studies of drug-metabolizing enzymes in dog, monkey, and human small intestines, and in Caco-2 cells, *Drug Metab Dispos* **1996**, 24, 634-642.
- Radtke, J., Linseisen, J., Wolfram, G., Fasting plasma concentrations of selected flavonoids as markers of their ordinary dietary intake, *Eur J Nutr* **2002**, 41, 203-209.
- Ramadass, P., Meerarani, P., Toborek, M., Robertson, L. W., Hennig, B., Dietary flavonoids modulate PCB-induced oxidative stress, CYP1A1 induction, and AhR-DNA binding activity in vascular endothelial cells, *Toxicol Sci* **2003**, 76, 212-219.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic Biol Med* **1999**, 26, 1231-1237.
- Rechner, A. R., Dietrich, H., Patz, C.-D., Antioxidative Wirkung von naturtrüben Apfelsäften: Einfluss der Apfelsorte und des Polyphenolgehaltes, *Flüssiges Obst* **1999**, 5/99, 227-230.

- Rechner, A. R., Smith, M. A., Kuhnle, G., Gibson, G. R., Debnam, E. S., Srai, S. K., Moore, K. P., Rice-Evans, C. A., Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products, *Free Radic Biol Med* **2004**, *36*, 212-225.
- Reinshagen, M., in *Chronisch entzündliche Darmerkrankungen- Das CED-Handbuch für Klinik und Praxis* (Eds.: Hoffmann, J. C., Kroesen, A. J., Klump, B.), Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **2004**, pp. 58-71.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic Biol Med* **1996**, *20*, 933-956.
- Risch, B., Hermann, K., Die Gehalte an Hydroxyzimtsäure-Verbindungen und Catechinen in Kern- und Steinobst, *Z Lebensm Unters Forsch* **1988**, *186*, 225-230.
- Rota, C., Chignell, C. F., Mason, R. P., Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements, *Free Radic Biol Med* **1999**, *27*, 873-881.
- Rousset, M., The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation, *Biochimie* **1986**, *68*, 1035-1040.
- Rydberg, B., Johanson, K. J., (Eds.: Hanawalt, E. C., Friedberg, E. C., C.F., F.), Academic press, New York, **1978**, pp. 465-468.
- Sadik, C. D., Sies, H., Schewe, T., Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action, *Biochem Pharmacol* **2003**, *65*, 773-781.
- Saito, A., Sugisawa, A., Umegaki, K., Sunagawa, H., Protective effects of quercetin and its metabolites on H₂O₂-induced chromosomal damage to WIL2-NS cells, *Biosci Biotechnol Biochem* **2004**, *68*, 271-276.
- Sambruy, Y., Ferruzza, S., Ranaldi, G., De Angelis, I., Intestinal cell culture models: applications in toxicology and pharmacology, *Cell Biol Toxicol* **2001**, *17*, 301-317.
- Scalbert, A., Williamson, G., Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *J Nutr* **2000**, *130*, 2073S-2085S.
- Scharer, O. D., Chemistry and biology of DNA repair, *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, *42*, 2946-2974.
- Scharf, G., Prustomersky, S., Knasmuller, S., Schulte-Hermann, R., Huber, W. W., Enhancement of glutathione and g-glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme of glutathione synthesis, by chemoprotective plant-derived food and beverage components in the human hepatoma cell line HepG2, *Nutr Cancer* **2003**, *45*, 74-83.

- Schieber, A., Keller, P., Carle, R., Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr A* **2001**, 910, 265-273.
- Schoefer, L., Mohan, R., Schwiertz, A., Braune, A., Blaut, M., Anaerobic degradation of flavonoids by *Clostridium orbiscindens*, *Appl Environ Microbiol* **2003**, 69, 5849-5854.
- Schulte-Hermann, R., Marian, B., Bursch, W., Grasl-Kraupp, B., in *Lehrbuch der Toxikologie* (Eds.: Marquardt, H., Schäfer, S.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **2004**, pp. 195-242.
- Sergent, O., Morel, I., Cogrel, P., Chevanne, M., Padeloup, N., Brissot, P., Lescoat, G., Cillard, P., Cillard, J., Increase in cellular pool of low-molecular-weight iron during ethanol metabolism in rat hepatocyte cultures. Relationship with lipid peroxidation, *Biol Trace Elem Res* **1995**, 47, 185-192.
- Sesink, A. L., O'Leary, K. A., Hollman, P. C., Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside, *J Nutr* **2001**, 131, 1938-1941.
- Sido, B., Hack, V., Hochlehnert, A., Lipps, H., Herfarth, C., Droge, W., Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease, *Gut* **1998**, 42, 485-492.
- Siegel, D., Ross, D., Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues, *Free Radic Biol Med* **2000**, 29, 246-253.
- Sies, H., Oxidative Stress, Academic press, London, **1985**.
- Sies, H., Oxidative stress: from basic research to clinical application, *Am J Med* **1991**, 91, 31S-38S.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L., A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp Cell Res* **1988**, 175, 184-191.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M. R., New colorimetric cytotoxicity assay for anti-cancer-drug screening, *J Natl Cancer Inst* **1990**, 82, 1107-1112.
- Soyalan, B., Diplomarbeit, 2006
- Steinmetz, K. A., Potter, J. D., Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review, *J Am Diet Assoc* **1996**, 96, 1027-1039.
- Stryer, L., Biochemie, 4. Auflage ed., Spektrum Akademischer Verlag, **1996**.
- Sun, J. S., Tsuang, Y. H., Huang, W. C., Chen, L. T., Hang, Y. S., Lu, F. J., Menadione-induced cytotoxicity to rat osteoblasts, *Cell Mol Life Sci* **1997**, 53, 967-976.

- Takahama, U., Hirota, S., Deglucosidation of quercetin glucosides to the aglycone and formation of antifungal agents by peroxidase-dependent oxidation of quercetin on browning of onion scales, *Plant Cell Physiol* **2000**, *41*, 1021-1029.
- Talalay, P., Fahey, J. W., Holtzclaw, W. D., Prestera, T., Zhang, Y., Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction, *Toxicol Lett* **1995**, *82-83*, 173-179.
- Tarozzi, A., Marchesi, A., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P., Cold-storage affects antioxidant properties of apples in Caco-2 cells, *J Nutr* **2004**, *134*, 1105-1109.
- Thews, G., Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, 5. Auflage ed., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1999**.
- Thielen, C., Will, F., Zacharias, J., Dietrich, H., Jacob, H., Polyphenole in Äpfeln: Verteilung von Polyphenolen im Apfelgewebe und Vergleich der Frucht mit Apfelsaft, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **2004**, *100*, 389-398.
- Thompson, H. J., Heimendinger, J., Haegele, A., Sedlacek, S. M., Gillette, C., O'Neill, C., Wolfe, P., Conry, C., Effect of increased vegetable and fruit consumption on markers of oxidative cellular damage, *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 2261-2266.
- Valko, M., Morris, H., Mazur, M., Rapta, P., Bilton, R. F., Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer?, *Biochim Biophys Acta* **2001**, *1527*, 161-166.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem Biol Interact* **2006**.
- van Acker, S. A., van Balen, G. P., van den Berg, D. J., Bast, A., van der Vijgh, W. J., Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids, *Biochem Pharmacol* **1998**, *56*, 935-943.
- van den Berg, R., Haenenb, G. M. M., van den Berga, H., Aalt Bast, A., Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) next term assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures, *Food Chemistry* **1999**, *66*, 511-517.
- van der Sluis, A. A., Dekker, M., de Jager, A., Jongen, W. M., Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions, *J Agric Food Chem* **2001**, *49*, 3606-3613.
- van der Sluis, A. A., Dekker, M., Skrede, G., Jongen, W. M., Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of existing production methods, *J Agric Food Chem* **2002**, *50*, 7211-7219.
- van der Woude, H., Boersma, M. G., Vervoort, J., Rietjens, I. M., Identification of 14 quercetin phase II mono- and mixed conjugates and their formation by rat and human phase II in vitro model systems, *Chem Res Toxicol* **2004**, *17*, 1520-1530.

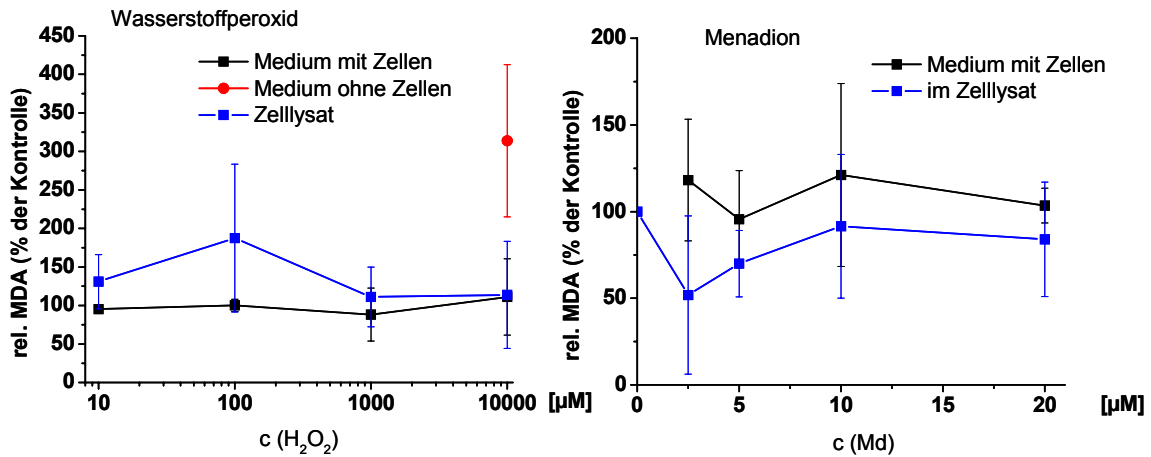
- VdF, Apfelsaft-In aller Munde, *Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie e.V.*, Bonn, **2005**
- Veeriah, S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J., Dietrich, H., Will, F., Pool-Zobel, B. L., Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics, *Mol Carcinog* **2005**, *45*, 164-174.
- Walgren, R. A., Lin, J. T., Kinne, R. K., Walle, T., Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1, *J Pharmacol Exp Ther* **2000**, *294*, 837-843.
- Walle, T., Otake, Y., Walle, U. K., Wilson, F. A., Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption, *J Nutr* **2000**, *130*, 2658-2661.
- Wang, H., Joseph, J. A., Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader, *Free Radic Biol Med* **1999**, *27*, 612-616.
- Wei, Y. H., Mitochondrial DNA mutations and oxidative damage in aging and diseases: an emerging paradigm of gerontology and medicine, *Proc Natl Sci Counc Repub China B* **1998**, *22*, 55-67.
- West, J. D., Marnett, L. J., Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death, *Chem. Res. Toxicol* **2006**, *e-pupl.*, 1-21.
- Will, F., Bauckhage, K., Dietrich, H., Apple pomace liquefaction with pectinases and cellulases: analytical data of the corresponding juices, *Eur Food Res. Technol* **2000**, *211*, 291-297.
- Will, F., Dietrich, H., Gewinnung und Zusammensetzung der Apfelsaftextrakte, Netzwerkprojekt, B., 2002-2004
- Wolf, D. H., Hilt, W., The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal, *Biochim Biophys Acta* **2004**, *1695*, 19-31.
- Yamashita, N., Tanemura, H., Kawanishi, S., Mechanism of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu(II), *Mutat Res* **1999**, *425*, 107-115.
- Yang, B., Arai, K., Kusu, F., Electrochemical behaviors of quercetin and kaempferol in neutral buffer solution, *Anal Sci* **2001**, *17*, 987-989.
- Zhu, C. Y., Loft, S., Effects of Brussels sprouts extracts on hydrogen peroxide-induced DNA strand breaks in human lymphocytes, *Food Chem Toxicol* **2001**, *39*, 1191-1197.
- Zhu, H., Bannenber, G. L., Moldeus, P., Shertzer, H. G., Oxidation pathways for the intracellular probe 2',7'-dichlorofluorescein, *Arch Toxicol* **1994**, *68*, 582-587.
- Zsila, F., Bikadi, Z., Simonyi, M., Probing the binding of the flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modelling methods, *Biochem Pharmacol* **2003**, *65*, 447-456.

Zweibaum, A., Laburthe, M., Grasset, E., Louvard, D., Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function, *Handbook of physiology* **1991**, Section 6: *The Gastrointestinal System*, 223-255.

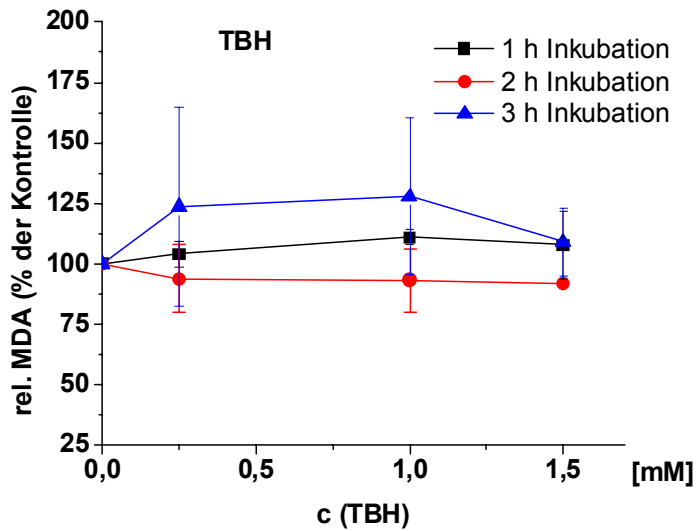
9 Anhang

9.1. Nicht dargestellte Abbildungen

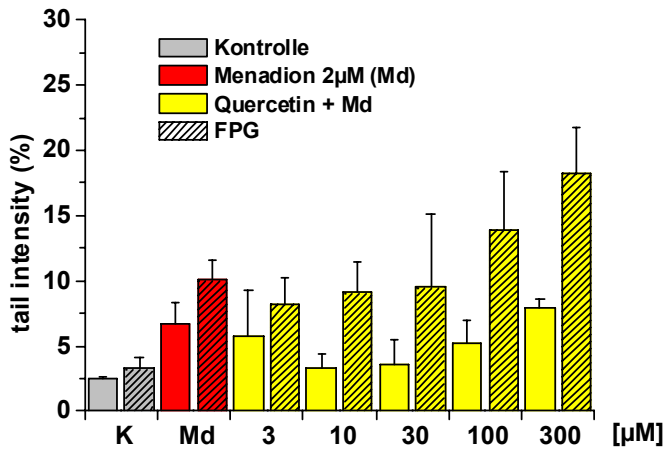
Kap. 5.1.4: Induktion der LPO in Caco-2 durch H₂O₂, Menadion, je 1 h, 37°C, S-Med



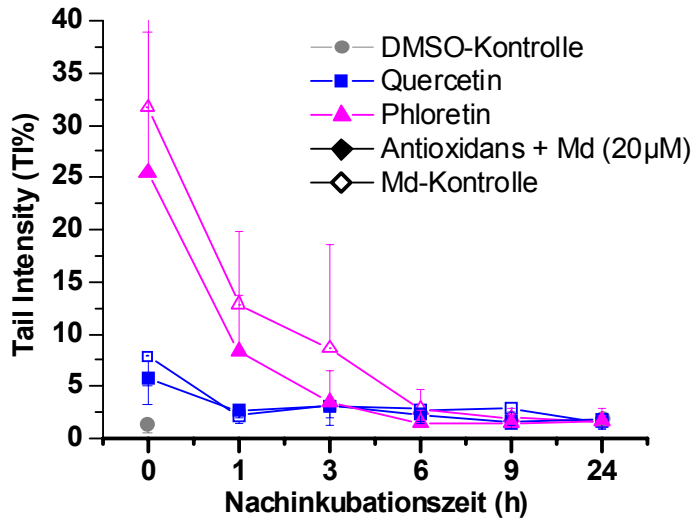
Induktion der LPO in HT29 Zellen durch TBH (1-3 h Inkubation)



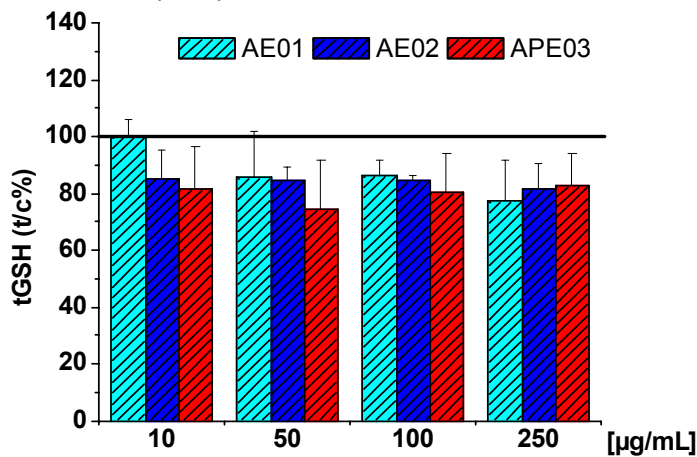
Kap. 5.2.3: 30 min Inkubation mit Quercetin (Caco-2 Zellen), Md 2 μM



Kap. 5.2.3.1: Modulation der DNA-Reparatur (Grundschrden ohne FPG) durch Quercetin und Phloretin

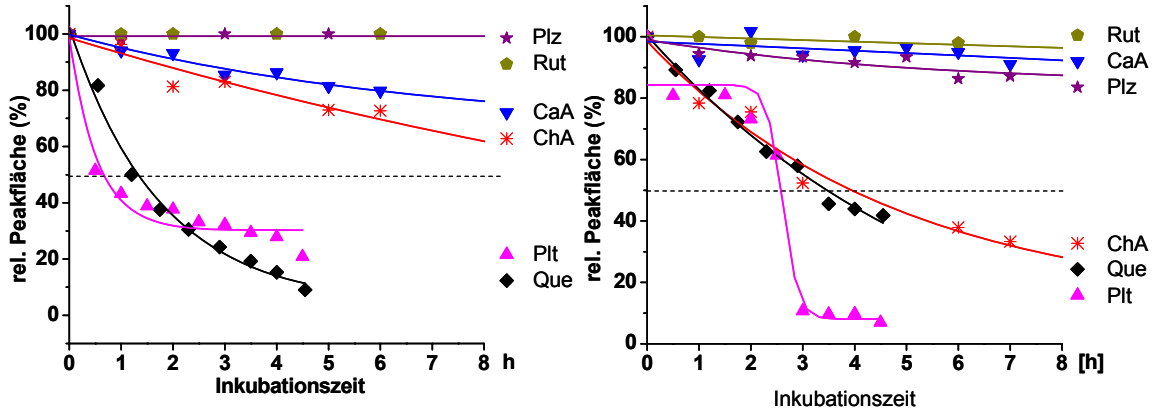


Kap. 5.4.4: Modulation des tGSH-Levels durch die rekonstituierten Mischungen in HT29 Zellen (n=2)

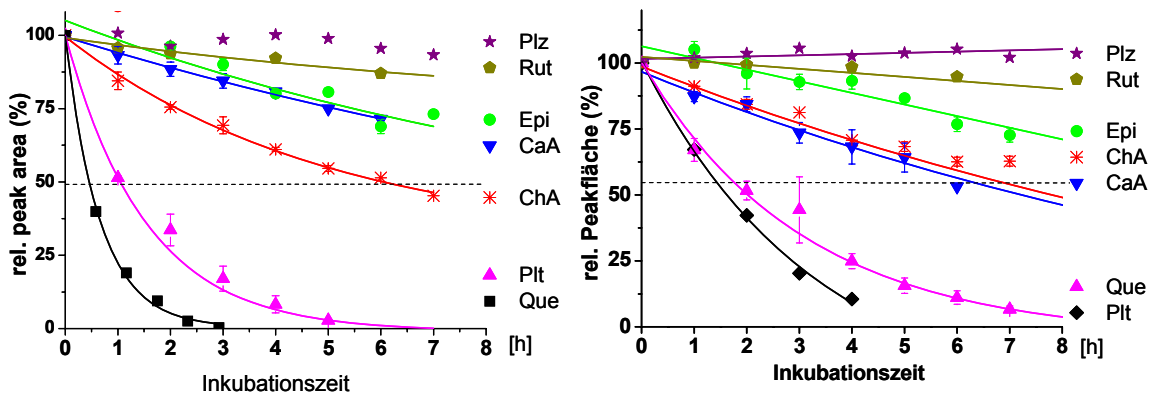


Kap. 5.5.1: graphische Darstellung der Regression (exponentielle Kinetik 1. Ordnung)

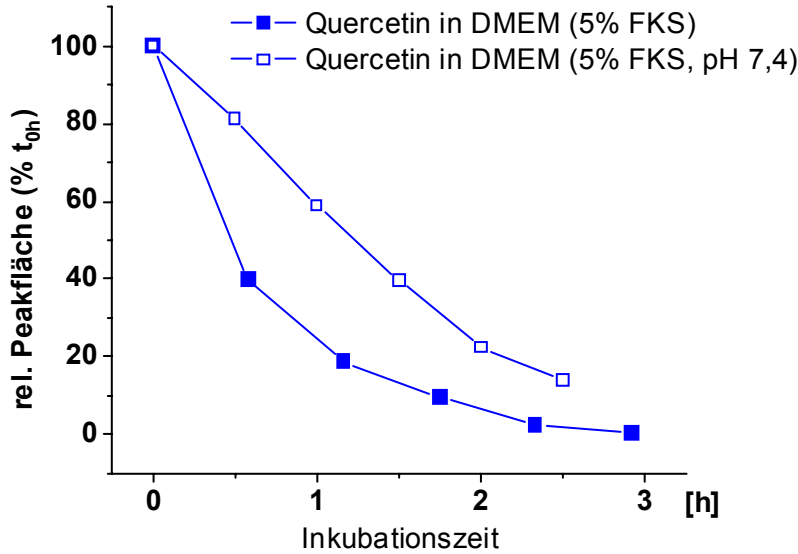
DMEM/NutrientMix (\pm Caco-2 Zellen)



DMEM (\pm HT29 Zellen)

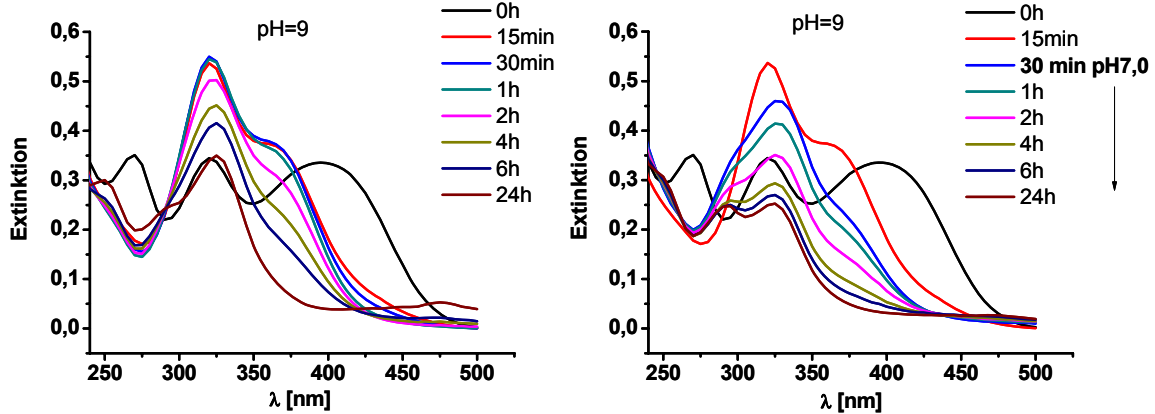


Abbau von Quercetin in DMEM (5% FKS) im Vergleich zu pH-Wert eingestelltem Medium (bei $t=0h$ 7,4)

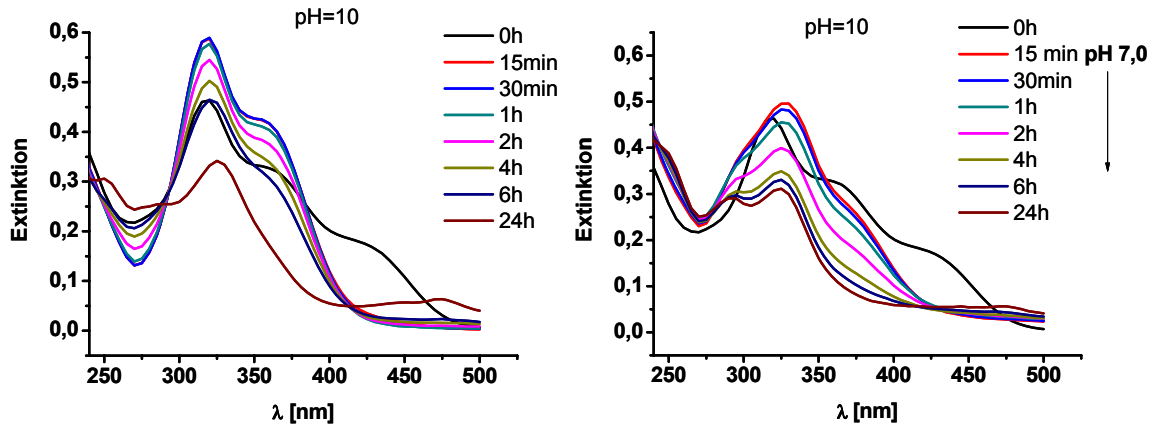


Kap. 5.5.2.2: Reversibilitätsuntersuchungen

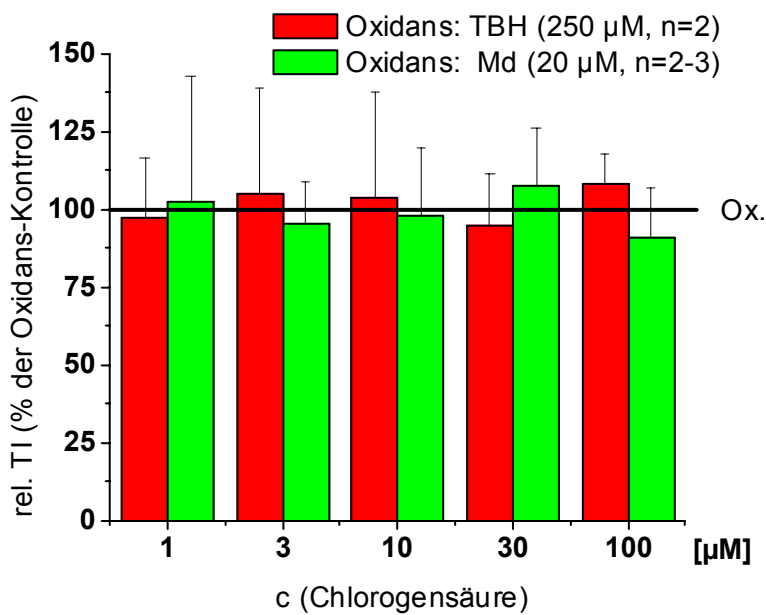
a) Quercetin wurde in PBS (pH 9), nach 20 min pH Wert auf 7,0 gebracht und weiter inkubiert



b) Quercetin wurde in PBS (pH 10), nach 20 min pH Wert auf 7,0 gebracht und weiter inkubiert



Kap. 6 (5.4.2): Modulation TBH/Md-induzierter Gesamt-DNA-Schäden durch Chlorogensäure in HT29 Zellen



9.2 Lebenslauf

PERSÖNLICHES

Sandra Schäfer
geboren am 09.01.1978 in Bad Kreuznach
ledig

SCHULAUSBILDUNG

1984-1988	Grundschule Bockenu
1988-1997	Abitur am Emmanuel-Felke-Gymnasium in Bad Sobernheim

STUDIUM

1997-2002	Studium der Lebensmittelchemie an der Technischen Universität Kaiserslautern
10/1997 – 09/1999	Grundstudium
25.01.2000	staatliche Vorprüfung
09/1999- 09/2002	Hauptstudium
03.05.2002	Abschluss des Studienganges Diplom-Lebensmittelchemie und erste Staatsprüfung Diplomarbeit bei Prof. Dr. Eisenbrand: „In-vitro-Charakterisierung potentieller protektiver Wirkungen eines Ballaststoffes aus Johannisbrotbaumschoten“
06/2002-04/2006	Promotion als wissenschaftliche Angestellte bei Herrn Prof. Dr. Eisenbrand am Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, Technische Universität Kaiserslautern in Zusammenarbeit mit dem Westpfalz-Klinikum Kaiserslautern: „Untersuchungen zur antioxidativen Wirksamkeit von Apfelsaftinhaltsstoffen in humanen Kolonzellen“

9.3 Posterbeiträge und Publikationen

2003

Regionaltagung Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Gießen, 30.03.-01.04.:

S. Schäfer, M. Baum, G. Eisenbrand, H. Dietrich, C. Janzowski:

Das antioxidative Potential von Apfelsaftinhaltsstoffen und Apfelsaftextrakt in der humanen Kolonzelllinie Caco-2. Lebensmittelchemie, 57, 120

GDCh-Jahrestagung der Chemie, München, 06.-11.10.:

S. Schäfer, M. Baum, G. Eisenbrand, H. Dietrich, C. Janzowski:

Das antioxidative Potenzial von Apfelsaftinhaltsstoffen und Apfelsaftextrakt in der humanen Kolonzelllinie Caco-2. Lebensmittelchemie 58, 26 (2004)

1st International Conference on Polyphenols and Health, Vichy, 18.-21.11.:

S. Schäfer, S. Fritzen, M. Baum, G. Eisenbrand, C. Janzowski:

The antioxidative potential of apple juice compounds and apple juice extract on human colon cells.

2004

S. Schäfer, H. G. Kamp, C. Müller, B. Haber, G. Eisenbrand, C. Janzowski:

Modulation of (oxidative) DNA damage by constituents of carob fibre. In: Functional Food Safety Aspects, (Ed. G. Eisenbrand), DFG-Symposium, Senate Commission on Food Safety (SKLM), DFG Publication, Wiley VCH, 334-338.

Regionaltagung Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Würzburg, 08.-09.03.:

S. Schäfer, S. Fritzen, M. Baum, H.G. Kamp, H. Dietrich, F. Will, F.W. Albert, T. Nesbigall, G. Eisenbrand, C. Janzowski:

Das antioxidative Potenzial von Apfelsaftinhaltsstoffen und Apfelsaftextrakt in humanen Kolonzellen. Lebensmittelchemie 58, 123.

95. Jahrestagung der American Association for Cancer Research, Orlando, 27.-31.03.:

C. Janzowski, **S. Schäfer**, S. Fritzen, M. Baum, H. Dietrich, G. Eisenbrand:

Preventive antioxidative effectiveness of polyphenolic apple juice compounds in human colon cells. Proc. Am. Ass. Cancer Res., 45, No. 731.

34. Jahrestagung European Environmental Mutagen Society, Maastricht, 04.-08.09.:

C. Janzowski, **S. Schaefer**, M. Baum, F. Will, H. Dietrich, G. Eisenbrand: Modulation of oxidative cell damage by polyphenolic apple juice compounds/extracts in human colon cells.

Kolloquium des Schwerpunkts Medizin-Naturwissenschaft-Technik, TU Kaiserslautern, 09.11.:

S. Schäfer, M. Baum, F.W. Albert, U. Hermannspahn, G. Eisenbrand, C. Janzowski:

Modulation oxidativer Zellschädigung durch Apfelsaftinhaltsstoffe und –extrakte in humanen Kolonzellen.

2005

Regionaltagung Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Frankfurt, 07.-08.03.:

S. Schäfer, M. Baum, H. Dietrich, F. Will, F.W. Albert, U. Hermannspahn, G. Eisenbrand, C. Janzowski:

Polyphenolische Apfelsaftinhaltsstoffe und Extrakte: antioxidative Kapazität und Modulation oxidativer DNA-Schädigung in humanen Colonzellen. Lebensmittelchemie, 59; 147

46. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 15.-17.03.:

S. Schäfer, M. Baum, H. Dietrich, F. Will, F.W. Albert, U. Hermannspahn, G. Eisenbrand, C. Janzowski:

Polyphenolic apple juice compounds/extracts modulate oxidative cell damage in human colon cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **371**, Suppl. 1; R132.

6th International Comet Assay Workshop, Warschau, 20.-22.10.

S. Schaefer, T. Weisel, M. Baum, H. Dietrich, F. Will, G. Eisenbrand:

Modulation of oxidative DNA damage and other oxidant markers by apple juice phenolics/extracts in human colon cells.

T. Weisel, **S. Schaefer**, M. Baum, H. Dietrich, F. Will, G. Eisenbrand, C. Janzowski:

Reduction of oxidative DNA damage by a flavonoid/polyphenolic rich fruit juice in an intervention study with healthy probands.

2006

S. Schaefer, M. Baum, G. Eisenbrand, H. Dietrich, F. Will and C. Janzowski:

Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines

Mol Nutr Food Res., 50, 24-33; doi: 10.1002/mnfr.200500136

S. Schaefer, M. Baum, G. Eisenbrand, C. Janzowski:

Modulation of oxidative cell damage by reconstituted mixtures of phenolic apple juice extracts in human colon cell lines; *Mol. Nutr. Food Res.*, 50; 413-417; DOI: 10.1002/mnfr.200500194

97. Jahrestagung der American Association for Cancer Research, Washington, 01.04.:

C. Janzowski, **S. Schaefer**, M. Baum, H. Dietrich, F. Will, G. Eisenbrand:

Decrease of oxidative cell damage by phenolic apple juice extracts in the human colon cell lines HT29 and Caco-2; AACR, 97th Annual Meeting, *Proc. Am. Ass. Cancer Res.*, 47; # 3941

...möchte ich DANKEN,...

...allen, die auf ihre Art zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben und v.a. denen, die ich doch in meiner Liste vergessen habe.

...Frau Janzowski für die über vielen fachlichen Anregungen und Diskussionen hinausgehende Betreuung während meiner Promotionszeit, obwohl es (da werden Sie mir zustimmen) manchmal nicht leicht war.

...dem BMBF für die finanzielle Unterstützung sowie den Netzwerkpartnern für die Möglichkeit, über den eigenen Tellerrand zu blicken. Den „Geisenheimern“, Herrn Dietrich und Herrn Will, möchte ich danken für die Bereitstellung der Apfelsaftextrakte.

...Frau Hermannspahn und Frau Bürtel für die reibungslose Bereitstellung der Biopsieproben.

...Herrm Stockis für die nette Hilfe und Einführung in die bunte Welt der Statistik.

...den beiden guten Seelen Heike und Ingrid, die sich unermüdlich den kleinen und großen Problemen angenommen haben.

...den HiWis Phillip, Elena und Andrea für die zuverlässige Arbeit sowie der „Senior-TA“ Maria für ihr Wirken.

...meiner Lieblings-TA Sylvia, die beträchtlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

...den beiden Diplomanden Silke und Monika sowie den Forschis Tine, Phillip, Marjorie, Andrea, Andreas, Natali und Steffi für die gute Zusammenarbeit.

...Tanja Kautenburger für die Hilfe bei der DCF-Assay-Etablierung und die vielen geduldigen Momente vor Berichtsabgaben u.ä..

...Melanie für die gemeinsame Studienzeit und die vielen „apfeligen“ Austauschungen während der Promotionszeit.

...Patrick Schmitt für das fachmännische Flottmachen des Rechners und seinem Bruder für die vielen Literaturbestellungen.

...Rainer, Ari und Eva „von nebenan“, die jeder auf seine Art das Arbeitsklima in 327 am Leben hielten.

...den „56ern“ für die vielen Anregungen rund um die Arbeit.

...Jochen, Yu, Thomas und dem Kaffeezimmer für die überaus kurzweiligen Momente zu jeder Tages- und Nachtzeit.

...dem PC-Kaffeezimmer, v.a. Anita, Graziano und Stoltibär, dass ich trotz meines Lemitanten-Daseins bei Euch Kaffee schlürfen und frühstücken durfte.

...den Fachtoxkollegen für die geselligen Abende/ Wochen außerhalb der eigenen vier Uni-Wänden.

...Rainer und Fine sowie Matthias und Ute für die schönen Stunden am Weiher bzw. im Forsthaus.

...Kirsten für die schönen Stunden an der „Lamina“ und den (leider viel zu seltenen) emails.

...Marco und Susanne, dass sie mich so (verblinst) nehmen, wie ich bin.

...der Familie Kamp für die überaus kulinarischen, aber leider viel zu selten geworden Abende und besonders Hennicke, der sich geduldig meiner Arbeit gewidmet hat und mir mit dem nötigen Pfund Kritik immer wieder weiter geholfen hat.

...der Familie Müller für die vielen schönen (meistens Dienstag-)Abende, die ich bei ihnen zubringen durfte und besonders Christoph, mein Origin-Held, der mir dieses (mittlerweile tolle) Programm schmackhaft gemacht und mich auch ansonsten immer wieder weitergebracht hat.

...Daniel für die immer wieder lustigen und schönen Tage/Abende und die vielen Diskussionen rund um das Leben.

...Tamara für das Teilen und Bewältigen gemeinsamer kleiner und großer Sorgen und für die vielen Hilfen, und da das Leben nicht nur Trauerspiel ist (was man bei der ersten Zeile vermuten könnte) auch für die vielen lustigen und schönen Abende/Tage.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern, dass sie mir das Studium ermöglicht und mich immer unterstützt haben und für vieles mehr.

Am Ende möchte ich mich noch von ganzem Herzen bei Mark bedanken. Er musste mich, gerade in der Endphase, am meisten erdulden und das war weiß Gott nicht immer einfach. Er hat mich immer aufgebaut und mir auch die schwierigen Stunden erträglich gemacht. Schön, dass es Dich gibt und mit mir zusammen in die weite Welt ziehen und alle Berge erklimmen willst.