

***In vitro*- und *ex vivo*-Modelle
für die intestinale Absorption
von Polyphenolen
am Beispiel
des Apfels (*Malus domestica* Borkh.)**

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

D 386

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 5.10.2010

vorgelegt von Hannah Deußner

Betreuerin der Arbeit: Prof. Dr. Elke Richling

Kaiserslautern 2010

Für Stefan

ACH WIE GUT SCHMECKT APFELSAFT,
STÄRKT DIE NERVEN, GIBT DIR KRAFT.
DOCH APFELSAFT IST GROSSER MIST,
WENN ER AUSGESOFFEN IST.

Helme Heine

*1941 in Berlin

Schriftsteller, Illustrator und Designer

Der experimentelle Teil dieser Arbeit entstand zwischen Dezember 2006 und Februar 2010 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 5. Oktober 2010

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Thiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Richling

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

Ich danke Frau Prof. Dr. Elke Richling für die Überlassung des Themas, sowie für die Anregungen und Unterstützung während der Promotionszeit.

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Zusammenfassung.....	XI
Summary.....	XV
1 Einleitung und Problemstellung	1
2 Kenntnisstand	3
2.1 Polyphenole in Äpfeln und Apfelsaft	3
2.1.1 Klassen, Vorkommen und Funktion	3
2.1.2 Biosynthese.....	4
2.1.3 Gehalte.....	6
2.2 Biologische Wirkungen der Polyphenole.....	8
2.2.1 <i>In vivo</i> -Studien.....	8
2.2.2 <i>In vitro</i> -Studien	8
2.3 Aufbau des Gastrointestinaltraktes	10
2.4 Absorption und Bioverfügbarkeit der Polyphenole.....	12
2.5 Intestinale Aufnahme- und Transportmechanismen	17
2.5.1 Mechanismen	17
2.5.2 Transporter-Familien	18
2.5.3 Vorkommen der Transportproteine im Gastrointestinaltrakt	19
2.5.3.1 P-Glycoprotein (P-gp).....	19
2.5.3.2 Multidrug-Resistance-Proteine (MRP)	19
2.5.3.3 Brustkrebs-Resistenz-Protein (BCRP).....	20
2.5.3.4 Monocarboxylattransporter (MCT).....	20
2.5.4 Interaktionen von Flavonoiden mit Transportern	20
2.5.5 Transportproteine und chronisch entzündliche Darmerkrankungen	21
2.6 Modelle zur intestinalen Absorption und Metabolismus von Polyphenolen.....	21
2.6.1 Absorptionsstudien in der Zellkultur	23
2.6.2 Studien zur Aufnahme in die Zelle	28
2.6.3 Studien zum Metabolismus in der Zellkultur.....	30
2.6.4 <i>Ex vivo</i> -Studien zum intestinalen Transport und Metabolismus	33
2.6.5 Stabilität von Polyphenolen unter Zellkulturbedingungen	35
2.6.6 Wasserstoffperoxid-Generierung im Inkubationsmedium.....	36
2.7 Die intestinale Barriere	38
2.7.1 Aufbau der intestinalen Barriere	38
2.7.2 Status der intestinalen Barriere.....	39

2.7.3	Defekte der intestinalen Barriere	40
2.7.4	Einfluss von Nahrungsmittelinhaltsstoffen auf die intestinale Barriere – <i>in vitro</i> -Studien	42
2.7.4.1	Einzelne Polyphenole – <i>in vitro</i> -Untersuchungen	42
2.7.4.2	Polyphenolhaltige Pflanzenextrakte – <i>in vitro</i> -Untersuchungen	43
2.7.4.3	<i>In vivo</i> -Untersuchungen	43
2.7.5	Herabsetzung der Integrität der intestinalen Barriere	43
2.8	Die Kolonkarzinomzelllinie T84 als Modell für die humane intestinale Mukosa	44
2.9	Schweinedarmmukosa als Modell für die humane intestinale Mukosa	45
3	Ergebnisse	47
3.1	Synthese von einzelnen Polyphenolen	47
3.1.1	1-Kaffeoylchinasäure	48
3.1.2	3- und 4-Kaffeoylchinasäure	49
3.1.3	4- und 5- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	50
3.1.4	Phloretin-2'- <i>O</i> -xyloglucosid	50
3.2	Stabilität von Polyphenolen im Inkubationsmedium	50
3.3	Wasserstoffperoxid-Generierung im Inkubationsmedium	58
3.4	Transepitheliale Absorption der Polyphenole aus Apfel in verschiedenen Modellen	60
3.4.1	Transepitheliale Absorption in T84-Monolayern	61
3.4.2	Bestimmung der cytosolischen und Membran assoziierten Polyphenolkonzentrationen	65
3.4.3	Transepitheliale Absorption in Caprinsäure-vorbehandelten T84-Monolayern	66
3.4.4	Transepitheliale Absorption in Schweinedarmmukosa	67
3.4.5	Transepitheliale Absorption in humanen Biopsien	69
3.5	Charakterisierung des Transports von Polyphenolen in epithelialen Zellen	70
3.5.1	Studien zur Konzentrationsabhängigkeit der Absorption am Beispiel der Ferulasäure	70
3.5.2	Studien zum Einfluss verschiedener Bedingungen auf die Absorption am Beispiel des Phloretins	71
3.5.2.1	Rückabsorption von der basolateralen auf die apikale Seite	72
3.5.2.2	Konzentrationsabhängige Absorptionen	72
3.5.2.3	Absorption in Gegenwart eines pH-Gradienten	73
3.5.2.4	Absorption in Gegenwart des Metabolismushemmers Natriumazid	75
3.6	Metabolismus der Apfelpolyphenole in den verschiedenen Modellen	76
3.6.1	Metabolismus in T84-Monolayern	76
3.6.2	Metabolismus in der Schweinedarmmukosa	78

3.6.3	Metabolismus in humanen Biopsien	79
3.7	Einfluss von Apfelpolyphenolen auf die intestinale Barriere	79
3.7.1	Einfluss auf T84-Monolayer	80
3.7.2	Einfluss auf Caprinsäure-vorbehandelte T84-Monolayer	82
3.7.3	Immunofluoreszenzfärbung des „Tight junction“-Proteins Occludin.....	84
4	Diskussion.....	89
4.1	Synthese kommerziell nicht erhältlicher Polyphenolreferenzen.....	89
4.2	Überprüfung der Stabilität der Polyphenole im Inkubationsmedium	89
4.3	Untersuchung der Generierung von Wasserstoffperoxid in der Ussing-Kammer.....	95
4.4	Transepitheliale Absorption der Polyphenole	96
4.4.1	T84-Monolayer	97
4.4.1.1	Transepitheliale Absorption.....	97
4.4.1.2	Quantifizierung der zellassoziierten Polyphenolgehalte.....	100
4.4.1.3	Aufnahme der Polyphenole ins Cytoplasma	101
4.4.2	Schweinedarmmukosa	105
4.4.3	Humane Biopsien	107
4.4.4	Charakterisierung der transepithelialen Absorption.....	109
4.4.4.1	Untersuchung der Abhängigkeit von den „Tight junctions“	109
4.4.4.2	Studien zur Konzentrationsabhängigkeit der transepithelialen Absorption	110
4.4.4.2.1	Ferulasäure.....	110
4.4.4.2.2	Phloretin.....	112
4.4.4.3	Untersuchungen zur Rückabsorption von Phloretin.....	112
4.4.4.4	Untersuchungen mit Phloretin in Gegenwart eines pH-Gradienten.....	114
4.4.4.5	Untersuchungen mit Phloretin in Gegenwart des Zellmetabolismushemmers Natriumazid	115
4.4.5	Zusammenfassung zur transepithelialen Absorption.....	115
4.5	Metabolismus der Polyphenole in den untersuchten Modellen.....	117
4.6	Einfluss von Polyphenolen auf die intestinale Barriere	121
5	Material und Methoden.....	125
5.1	Materialien	125
5.1.1	Verzeichnis der verwendeten Chemikalien	125
5.1.2	Lösungen für die Zellkultur	126
5.1.3	Verwendete Polyphenole	127
5.1.4	Verzeichnis der verwendeten Einmalartikel	128
5.1.5	Verzeichnis der verwendeten Geräte	128
5.1.6	Verwendete HPLC-Geräte	129

5.2	Methoden	133
5.2.1	Synthese und Isolierungen einzelner Polyphenole.....	133
5.2.1.1	Synthese von 1-Kaffeoylchinasäure	133
5.2.1.1.1	Darstellung von 3,4- <i>O</i> -Isopropyliden-1,5-chinalacton	133
5.2.1.1.2	Synthese von acetyliertem Kaffeesäurechlorid.....	134
5.2.1.1.3	Darstellung von acetylierter 1-Kaffeoylchinasäure.....	134
5.2.1.1.4	Synthese von 1-Kaffeoylchinasäure	135
5.2.1.2	Synthese von 3- und 4-Kaffeoylchinasäure	136
5.2.1.3	Isolierung und Synthese von 4- und 5- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure.....	137
5.2.1.4	Isolierung von Phloretin-2'- <i>O</i> -xyloglucosid.....	137
5.2.2	Stammlösungen der Polyphenole für die Inkubationen	137
5.2.3	Kalibriergeraden, interner Standard, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.....	138
5.2.3.1	Polyphenole	138
5.2.3.2	D-(-)-Chinasäure	140
5.2.4	Bestimmung der Stabilität der Polyphenole im Inkubationspuffer.....	141
5.2.5	Wasserstoffperoxid-Generierung im Inkubationsmedium.....	141
5.2.6	Allgemeine Kultur der Zellen.....	142
5.2.7	Kultivierung und Inkubation der Zellen in 6-Well-Platten zur Ermittlung der cytosolischen und zellassozierten Konzentrationen.....	142
5.2.8	Kultivierung der T84-Monolayer auf Snapwell-Inserts.....	143
5.2.9	Ussing-Kammer-Experimente mit T84-Monolayern	143
5.2.10	Ussing-Kammer-Experimente mit Caprinsäure-Vorinkubation	144
5.2.11	Inkubationen mit Schweinedünndarmmukosa in der Ussing-Kammer.....	144
5.2.12	Inkubationen mit humanen Biopsien in der Ussing-Kammer	145
5.2.13	Bestimmung der Polyphenolkonzentration in den Mediumüberständen	145
5.2.13.1	Bestimmung mittels HPLC-Diodenarraydetektion (HPLC-DAD)	145
5.2.13.2	Bestimmung mittels HPLC-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS)	146
5.2.14	Bestimmung der zellassozierten und intrazellulären Polyphenolkonzentrationen	146
5.2.14.1	Zellassozierte Konzentrationen	146
5.2.14.2	Intrazelluläre Konzentrationen.....	147
5.2.15	Bestimmung der D-(-)-Chinasäurekonzentrationen in den Mediumüberständen.....	147
5.2.16	Inkubation mit Ferulasäure in unterschiedlichen Konzentrationen	147
5.2.17	Inkubationen von Phloretin mit T84-Monolayern unter verschiedenen Bedingungen.....	148

5.2.17.1	Zugabe von Phloretin auf der basolateralen Seite	148
5.2.17.2	Inkubation von Phloretin mit unterschiedlichen Konzentrationen	148
5.2.17.3	Inkubation von Phloretin in Gegenwart eines pH-Gradienten	148
5.2.17.4	Inkubation von Phloretin in Gegenwart des Metabolismushemmers Natriumazid	148
5.2.18	Immunofluoreszenzfärbung zur Detektion des „Tight junction“-Proteins Occludin	149
5.3	Statistik	150
6	Strukturübersicht	151
7	Literatur	155
8	Danksagung	177
9	Anhang	179
	Lebenslauf	201
	Eidesstattliche Erklärung	203

Veröffentlichungen

Originalpublikationen:

Erk, T.; **Bergmann, H.**; Richling, E. (2009) A Novel Method for the Quantification of Quinic Acid in Food Using Stable Isotope Dilution Analysis. *Journal of AOAC International* **92**, 730-733.

Bergmann, H.; Triebel, S.; Erk, T.; Rogoll, D.; Scheppach, W.; Richling, E. (2009) Studien zur Stabilität von Polyphenolen unter Zellkulturbedingungen. *Lebensmittelchemie* **63**, 3.

Bergmann, H.; Rogoll, D.; Scheppach, W.; Melcher, R.; Richling, E. (2009) The Ussing type chamber model to study the intestinal transport and modulation of specific tight-junction genes using a colonic cell line. *Molecular Nutrition and Food Research* **53**, 1211-1225.

Bergmann, H.; Triebel, S.; Kahle, K.; Richling, E. (2010) The metabolic fate of apple polyphenols in humans. *Current Nutrition and Food Science* **6**, 19-35.

Leipold, D., Wünsch, G., Schmidt, M., Bart, H.-J., Bley, T., Neuhaus, H. E., **Bergmann, H.**, Richling, E., Muffler, K., Ulber, R. (2010) Biosynthesis of ursolic acid derivatives by microbial metabolism of ursolic acid with *Nocardia* sp. strains – proposal of new biosynthetic pathways. *Process Biochemistry* **45**, 1043-1051.

Rogoll, D.; **Bergmann, H.**; Hellenschmidt, D.; Scheppach, W.; Melcher, R.; Richling, E. (2010) Influence of apple polyphenols on the intestinal barrier in a colonic cell model. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, im Druck.

Hagl, S., **Bergmann, H.**, Janzowski, C., Soyalan, B., Will, F., Dietrich, H., Richling, E., Colonic availability of polyphenols and D-(-)-quinic acid after apple smoothie consumption. *Molecular Nutrition and Food Research*, im Druck.

Deußner, H., Rogoll, D., Scheppach, W., Volk, A., Backhaus, K., Melcher, R., Richling, E., *Ex vivo* studies on porcine gastrointestinal absorption and metabolism of apple polyphenols, in Vorbereitung.

Rogoll, D., **Deußer, H.**, Scheppach, W., Dorbath, D., Melcher, R., Richling, E., Influence of polyphenols on the intestinal barrier – visualization by immunostaining methods, in Vorbereitung.

Vorträge:

Bergmann, H.; Triebel, S.; Erk, T.; Rogoll, D.; Scheppach, W.; Richling, E., Studien zur Stabilität von Polyphenolen unter Zellkulturbedingungen. Lebensmittelchemische Gesellschaft Regionaltagung Süd-West, 3. März 2008 in Stuttgart-Hohenheim.

Bergmann, H.; Rogoll, D.; Scheppach, W.; Melcher, R.; Richling, E., *In vitro*- und *ex vivo*-Modelle zum intestinalen Transport von Polyphenolen am Beispiel des Apfels (*Malus domestica*). Lebensmittelchemische Gesellschaft Regionaltagung Süd-West und Bayern, 9. März 2010 in Erlangen.

Posterpräsentationen:

Bergmann, H.; Rogoll, D.; Scheppach, W.; Melcher, R.; Triebel, S.; Richling, E., Permeability of apple polyphenols in T84 cell model and their influence on tight junctions. Risk Assessment of Phytochemicals in Food – Novel Approaches, Symposium of the SKLM (Senatskommission für Lebensmittelsicherheit), 30. März bis 1. April 2009 in Kaiserslautern.

Bergmann, H.; Rogoll, D.; Scheppach, W.; Melcher, R.; Richling, E., Transport von Apfelpolyphenolen in intestinalen Epithelzellen und ihr Einfluss auf die „tight junctions“. 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 14. bis 16. September 2009 in Berlin.

Bergmann, H.; Rogoll, D.; Scheppach, W.; Melcher, R.; Richling, E., Schweinedarmmukosa als Modell für den humanen intestinalen Transport von Polyphenolen. 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 14. bis 16. September 2009 in Berlin.

Bergmann, H.; Rogoll, D.; Scheppach, W.; Melcher, R.; Richling, E., Gastrointestinal absorption and metabolism of polyphenols. 4th Int. Conference on polyphenols and health, 7. bis 9. Dezember 2009 in Leeds, England.

Abkürzungsverzeichnis

¹³ C-IS	Interner Standard ¹³ C markierte D-(-)-Chinasäure
¹⁸ O ₂ -AQ2	Abbauprodukt 2 von Quercetin mit ¹⁸ O-markiert
ABC	ATP-bindende Kasette (engl. ATP-binding-cassette)
AE1	Abbauprodukt 1 von (-)-Epicatechin
AE2	Abbauprodukt 2 von (-)-Epicatechin
AGEs	„advanced glycation end products“
ATP	Adenosintriphosphat
AQ1	Abbauprodukt 1 von Quercetin
AQ2	Abbauprodukt 2 von Quercetin
BCRP	Brustkrebs-Resistenz-Protein (engl. breast cancer resistance protein)
BSA	Rinderserumalbumin
Cat	(+)-Catechin
C10	Caprinsäure, Decansäure
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CQA	Kaffeoylchinasäure (engl. caffeoylquinic acid)
DAD	Diodenarraydetektion
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECG	(-)-Epicatechingallat
EGCG	(-)-Epigallocatechin-3-gallat
Epi	(-)-Epicatechin
ES	umgestülpter Sack (engl. everted sac)
ESI	Electrospray-Ionisierung
EtOAc	Ethylacetat
FOX	engl. „ferrous oxidation in xylenol orange“, verwendet zur Quantifizierung von Wasserstoffperoxid
FKS	fötales Kälberserum
FW	Frischgewicht (engl. fresh weight)
GLUT	Glucosetransporter
HBSS	Hanks abgestimmte Salzlösung (engl. Hanks' balanced salt solution)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
IFN-γ	Interferon-γ
IL-13	Interleukin-13
IP	intestinale Permeabilität
IS	interner Standard (hier 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure)

Log P	Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
LDL	Low-density-Lipoproteine
LPH	Lactase-Phloridzin-Hydrolase
MCT	Monocarboxylattransporter
MDR	Multisubstanz-Resistenz (engl. multidrug-resistance)
MLC	Myosin-leichte-Kette (engl. myosin light chain)
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase (engl. myosin light chain kinase)
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MRP	Multisubstanz-Resistenz-Protein (engl. multidrug-resistance-protein)
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie bzw. Tandemmassenspektrometer
<i>m/z</i>	Masse/Ladungsverhältnis
MW	Mittelwert
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
<i>p</i> -CouQA	<i>p</i> -Coumaroylchinasäure (engl. <i>p</i> -coumaroylquinic acid)
P-gp	P-Glycoprotein
PhI	Phloretin
PhI-G	Phloretin-2'-O-glucosid
PhI-XG	Phloretin-2'-O-xyloglucosid
Q	Quadrupol
Que	Quercetin
Que-4'-G	Quercetin-4'-O-glucosid
Que-G	Quercetin-3-O-glucosid
Que-GR	Quercetin-3-O-glucorhamnosid (Rutin)
Que-R	Quercetin-3-O-rhamnosid
S-MCT	Natrium abhängiger Monocarboxylattransporter
SGLT	Natrium abhängiger Glucosetransporter
SLC	Solute Carrier
Stabw	Standardabweichung
TER	Transepithelialer Widerstand (engl. transepithelial resistance)
THF	Tetrahydrofuran
TJ	Tight junction
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UGT	Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase
ZO	Zonula occludens

Zusammenfassung

Polyphenole sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und werden mit unserer täglichen Nahrung aufgenommen. Um die Relevanz der einzelnen Polyphenole für die vielfach beschriebenen positiven Effekte auf die Gesundheit abschätzen zu können, ist es wichtig ihre **intestinale Absorption und ihren Metabolismus** zu kennen. Äpfel (*Malus domestica* Borkh.) enthalten eine Vielzahl an Polyphenolen. Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden Polyphenole aus der Gruppe der Hydroxycimtsäuren, Dihydrochalkone, Flavonole und Flavan-3-ole eingesetzt. Es wurden die intestinale Absorption und der Metabolismus dieser Polyphenole in **intestinalen Konzentrationen** – in denen sie nach Apfelsaftverzehr im Dickdarm vorliegen (10 bis 80 μM) – in der **Ussing-Kammer** anhand verschiedener Modelle (Monolayer der Kolonkarzinomzelllinie T84, Schweinedarmmukosa und humane Biopsien) untersucht. Bei den Inkubationen zur Untersuchung von intestinaler Absorption und Metabolismus in der Ussing-Kammer wurde parallel der transepitheliale Widerstand (TER) des verwendeten Monolayers gemessen. Er spiegelt die Integrität der **intestinalen Barriere** wider. Die intestinale Barriere spielt eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Nährstoffen im Körper und bei der Abwehr von Mikroorganismen und pro-inflammatorischen Faktoren. Bei gesunden Menschen ist die intestinale Barriere intakt, bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa dagegen ist die Integrität der intestinalen Barriere herabgesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Polyphenole des Apfels einen Einfluss auf die intestinale Barriere haben.

Vor dem Beginn der Untersuchungen zu Absorption und Metabolismus sowie zum Einfluss der Polyphenole auf die intestinale Barriere mussten im Rahmen von Vorarbeiten einige nicht käuflich erhältliche Polyphenole synthetisiert bzw. isoliert werden. Außerdem wurde die Stabilität der eingesetzten Polyphenole im Inkubationsmedium sowie die Bildung von Wasserstoffperoxid, die bereits bei Zellkulturinkubationen in der Literatur beschrieben wurde, untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es, 1-, 3- und 4-Kaffeoylchinasäure, 4- und 5-*p*-Coumaroylchinasäure sowie Phloretin-2'-*O*-xyloglucosid zu synthetisieren bzw. aus einem mit Laccase behandelten Apfelsaftextrakt zu isolieren. Diese Polyphenole wurden anschließend für die Versuche verwendet.

Da für einige Polyphenole bekannt war, dass sie in Zellkulturmedien instabil sind, wurde zunächst die **Stabilität** der zu untersuchenden Polyphenole im eingesetzten Medium mittels **HPLC-DAD** untersucht und die Abbauprodukte mittels **HPLC-ESI-MS/MS** identifiziert. Bei der Überprüfung der Stabilität der Polyphenole im verwendeten Medium zeigte sich, dass einige über den gesamten Zeitraum von 24 Stunden stabil waren, andere dagegen wurden

abgebaut und waren z.T. bereits nach vier Stunden nicht mehr nachweisbar. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte durch den Einsatz von isotopenmarkiertem Sauerstoff erstmalig der Nachweis der Bildung des Quercetin-Abbauprodukts 2,5,7,3',4'-Pentahydroxy-3,4-flavandion in Zellkulturmedium.

Die Untersuchungen zur Bildung von **Wasserstoffperoxid** wurden mit einem photometrischen Assay unter den verwendeten Ussing-Kammer-Bedingungen durchgeführt. Es waren nur geringe Konzentrationen nachweisbar. Zudem zeigte sich, dass Wasserstoffperoxid während der Inkubation unter den gewählten Bedingungen entwich.

Im Anschluss an die Voruntersuchungen erfolgten die Untersuchungen von Absorption und Metabolismus in **Monolayern der Kolonkarzinomzelllinie T84, Schweinedarmmukosa und humanen Biopsien**. Die Analytik der Mediumüberstände auf der apikalen (Darmlumen-) und basolateralen (Blut-) Seite sowie der Zellsuspensionen auf ihre Polyphenolgehalte erfolgte mittels HPLC-ESI-MS/MS und HPLC-DAD. Außerdem wurde der Polyphenolgehalt des Cytosols- durch Permeabilisierung der Zellmembran mit **Digitonin** - bestimmt. Die transepitheliale Absorption der Polyphenole in den verschiedenen Modellen war **strukturabhängig** und auch zwischen den Modellen unterschiedlich. Bei den Hydroxymizimsäuren und ihren Derivaten wurden weniger polare Verbindungen in höherem Maße auf der basolateralen Seite ermittelt als polare. Die Ester der Kaffee- und *p*-Coumarsäure mit D-(-)-Chinasäure waren im T84-Modell basolateral nicht nachweisbar, in der Schweinedarmmukosa dagegen wurden zwei Vertreter dieser Gruppe basolateral detektiert. Die untersuchten Flavan-3-ole ((-)-Epicatechin und (+)-Catechin) wurden in beiden Modellen nicht auf die basolaterale Seite absorbiert. Die ausschließlich im Apfel vorkommenden Phloretinglycoside wurden ebenso wie das untersuchte Quercetinglycosid nicht basolateral identifiziert. Das freie Aglykon Phloretin dagegen war auf der basolateralen Seite nachweisbar. Bei den intestinal gebildeten Abbauprodukten war zum Teil eine Absorption zu beobachten. Mit den humanen Biopsien erfolgte die Inkubation nur exemplarisch mit den Hydroxymizimsäuren, auf die basolaterale Seite gelangten nur Mengen unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Weiterhin wurde untersucht, auf welchem Mechanismus die transepitheliale Absorption der Polyphenole beruht. Dazu wurden Inkubationen an T84-Monolayern mit herabgesetztem transepitheliale Widerstand, unterschiedlichen Polyphenolkonzentrationen und einem Metabolismushemmer exemplarisch mit Ferulasäure und Phloretin durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich bei der Aufnahme von Polyphenolen in der Mukosa um eine **passive transzelluläre Diffusion** handelt.

Die Inkubationen von Ferulasäure mit Konzentrationen von bis zu 1000 μM zeigten, dass sowohl Enzyme der T84-Monolayer als auch der Schweinedarmmukosa in der Lage sind, **Glucuronide** und **Sulfate** zu bilden, die aber erst bei Inkubationskonzentrationen ab 100 μM

nachweisbar waren. Bei der Inkubation von Phloretin und Quercetin in T84-Monolayern wurden außerdem Spuren von Glucuroniden in den Zellsuspensionen nachgewiesen, bei der Inkubation von Phloretin-2'-O-glucosid wurde das Aglykon Phloretin detektiert.

Weiterhin wurde der Einfluss der Polyphenole auf die **intestinale Barriere** im T84-Modell untersucht, indem der transepitheliale Widerstand (TER) der Monolayer ermittelt wurde. Die intestinale Barriere wird unter anderem durch die sogenannten „Tight junctions“ (TJs) – Verknüpfungen zwischen den Epithelzellen – ausgebildet. Der TER lässt Rückschlüsse auf den Zustand der TJs zu. Die Messung des TER der T84-Monolayer während der Inkubation mit Polyphenolen zeigte, dass es im Gegensatz zur Kontrolle zu einem Anstieg des TER kam, d.h. es kam zu einer **Verstärkung der intestinalen Barriere**. Als Modell für die intestinale Barriere bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurden mit Caprinsäure (C10) vorbehandelte T84-Monolayer gewählt. Die Verbindung C10 vermindert die ATP-Bildung in den Zellen und führt über eine Kontraktion der perijunktionalen Actomyosinringe zu einer Dilatation der TJs, was bei den Versuchen durch einen verminderten TER deutlich wurde. Auch hier kam es bei den Inkubationen mit Polyphenolen im Vergleich zur Kontrolle zu einer Steigerung des TER. Außerdem wurde der Einfluss der Polyphenole auf das TJ-Protein Occludin mittels Immunofluoreszenzmikroskopie belegt. Für vier ausgewählte Polyphenole (Ferulasäure, 5-Kaffeoylchinasäure, Phloretin und Phloretin-2'-O-glucosid) wurde gezeigt, dass sie einen Einfluss auf die Expression von Occludin haben, das einen integralen Bestandteil der intestinalen Barriere darstellt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neue Erkenntnisse zur intestinalen Absorption und zum Metabolismus von Polyphenolen des Apfels gewonnen. Es wurde gezeigt, dass ein Teil der den Dickdarm erreichenden Apfelpolyphenole dort absorbiert und metabolisiert werden kann. Weiterhin wurden neue Daten zum Einfluss der Polyphenole auf die intestinale Barriere gewonnen. Die *in vitro* erzielten Daten weisen darauf hin, dass die Apfelpolyphenole *in vivo* möglicherweise vor chronisch entzündlichen Darmerkrankungen schützen können. Langfristig wäre eine Nutzung von Lebensmitteln aus Äpfeln oder Apfelpolyphenolen zur Prävention dieser Erkrankungen möglich.

Summary

Polyphenols are secondary plant constituents which are ingested with our daily diet. In order to assess their relevance for human health, it is of great importance to understand the **intestinal absorption and metabolism** of polyphenols. Apples (*Malus domestica* Borkh.) contain polyphenols from various classes. In the presented study, hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones, flavonols and flavan-3-ols were applied. Intestinal absorption and metabolism of these polyphenols were investigated in **intestinal concentrations** (10 to 80 μ M) using the **Ussing chamber** model with several models (monolayers of the colon carcinoma cell line T84, pig intestinal mucosa, and human biopsies). During the incubations the transepithelial resistance (TER) of the monolayers was measured in parallel. The TER reflects the integrity of the **intestinal barrier**. The intestinal barrier plays a major role in the absorption of nutrients and the defence against microorganisms and pro-inflammatory factors. Healthy humans have an intact intestinal barrier, whereas its integrity is decreased in patients with inflammatory bowel diseases like Crohn's disease and ulcerative colitis. Consequently, the second objective within this work was to examine the influence of apple polyphenols on the intestinal barrier.

Prior to the investigations on absorption, metabolism, and influence of the polyphenols on the intestinal barrier, some commercially not available polyphenols had to be synthesized or isolated. In addition, the stability of the applied polyphenols in the incubation media as well as the formation of hydrogen peroxide was investigated.

In the presented study, 1-, 3-, and 4-caffeoylquinic acid, 4- and 5-*p*-coumaroylquinic acid and phloretin 2'-*O*-xyloglucoside were synthesized or isolated from a laccase treated apple juice extract prior to their use in the following experiments.

Due to the known instability of some polyphenols in cell culture media the **stability** of polyphenols in the media used in this study was analyzed by **HPLC-DAD**. The degradation products were identified by **HPLC-ESI-MS/MS**. Some of the investigated polyphenols were stable during the whole incubation time, others were degraded. For the first time the formation of the quercetin degradation product 2,5,7,3',4'-pentahydroxy-3,4-flavandione in cell culture media could be described after incubations with isotopic labeled oxygen.

The formation of **hydrogen peroxide** during the incubation with polyphenols as an artifact of cell culture has been described in literature. Based on these results, in this study the formation of hydrogen peroxide under the conditions in the Ussing chamber was investigated by a photometric assay. In the Ussing chamber only slight concentrations of hydrogen peroxide were detectable after incubation with polyphenols. Moreover, hydrogen peroxide was exhausted under the conditions used.

In order to examine absorption and metabolism of the polyphenols **monolayers of the colon carcinoma cell line T84**, **pig intestinal mucosa**, and **human biopsies** were utilized. The incubation media on the apical (gut lumen) and basolateral (blood) side as well as the cell suspensions were analyzed by HPLC-ESI-MS/MS and HPLC-DAD. In addition a new method for the determination of polyphenol contents of the cytosolic fraction was applied. The cells were permeabilized by **digitonin** followed by the analysis of the cytosolic fraction. The transepithelial absorptions of the polyphenols were **structure dependent** and differed between the models used. In the group of the hydroxycinnamic acids the absorption to the basolateral side of the less polar derivatives was higher than for the polar ones. Esters of caffeic and *p*-coumaric acid with D-(-)-quinic acid were not detectable on the basolateral side in the T84 model. In the pig intestinal mucosa two of them were identified on the basolateral side. For the flavan-3-ols ((-)-epicatechin and (+)-catechin) in both models no absorption to the basolateral side could be found. The apple specific phloretin glycosides as well as the quercetin glycoside were not absorbed to the basolateral side whereas the aglycon phloretin was detected on the basolateral side. The intestinal degradation products were only absorbed partially. With the human biopsies only the hydroxycinnamic acids were investigated; concentrations on the basolateral side were below the limit of quantification.

Anymore, the mechanism of the transepithelial absorption was studied. Hence incubations with T84 monolayers with reduced TER, different polyphenol concentrations, and a metabolic inhibitor were conducted. The results indicated that absorption of the polyphenols was a **passive transcellular diffusion** process.

Incubations of ferulic acid in concentrations up to 1000 μM with T84 monolayers and pig intestinal mucosa showed their ability to form **glucuronides** and **sulfates**. They were detectable at concentrations $\geq 100 \mu\text{M}$. Furthermore, incubations with phloretin and quercetin in T84 monolayers showed traces of glucuronides in the cell suspensions. After incubation of phloretin 2'-O-glucosid the aglycon phloretin was formed.

In addition, the influence of the polyphenols on the **intestinal barrier** was investigated in the T84 model. Therefore measurement of the transepithelial resistance (TER) was utilized. The intestinal barrier is formed by the tight junctions (TJs) – a branching network of sealing strands. The TER reflects the status of the TJs. Results showed that the TER of the T84 monolayers was increased during incubation with polyphenols in comparison to the controls indicating a **fortification of the intestinal barrier**. T84 monolayers pretreated with capric acid (C10) were utilized as a model for patients with inflammatory bowel diseases. C10 decreases the ATP-formation in the cells and induces a contraction of the perijunctional actomyosin rings resulting in the dilatation of the TJs. This dilatation is indicated by a decreased TER of the monolayer. Again, an increase of the TER in comparison to the controls was detected during incubation with polyphenols. Moreover, the influence of four

selected polyphenols on occludin as a tight junction protein was investigated by immunofluorescence microscopy. Influence on the expression of the TJ-protein occludin – an integral part of the intestinal barrier – was shown for all polyphenols under study.

In summary the present study succeeded to achieve new findings on intestinal absorption and metabolism of apple polyphenols. It could be demonstrated that some of the investigated apple polyphenols reaching the colon are absorbed and metabolized in the colon. Furthermore, new data on the influence of polyphenols on the intestinal barrier were achieved. The *in vitro* data indicate that apple polyphenols may prevent inflammatory bowel diseases *in vivo*. In the future, utilization of food derived from apples or apple polyphenols for the prevention from these diseases may be possible.

1 Einleitung und Problemstellung

Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. empfiehlt, dass Obst und Gemüse zusammen etwa 43% der täglich verzehrten Gesamtlebensmittelmenge betragen sollten [Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. 2010]. Damit wird ihnen ein wichtiger Stellenwert in unserer Ernährung beigemessen. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass durch den Konsum von Obst und Gemüse allgemein chronische Krankheiten verzögert oder verhindert werden können [Lampe 1999].

In Deutschland ist der Konsum von Äpfeln – sowohl in Form von Apfelsaft als auch als frisches Obst – sehr beliebt. Im Jahr 2009 wurden in Deutschland von jeder Person im Durchschnitt 37 Liter Fruchtsaft verzehrt. Damit weist die deutsche Bevölkerung den weltweit größten Fruchtsaftkonsum auf. Mit durchschnittlich 9,3 Liter pro Person ist Apfelsaft in Deutschland einer der beliebtesten Fruchtsäfte. Hinzu kommen pro Person 1,6 Liter in Form von Apfelmischgetränken wie Schorle [Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e. V. 2010].

Auch für Äpfel belegen epidemiologische und klinische Studien eine positive Wirkung auf die Gesundheit. So wurde durch den Konsum von Äpfeln das Risiko für Lungen- und kolorektalen Krebs, kardiovaskuläre Erkrankungen und Asthma gesenkt [Boyer und Liu 2004, Jedrychowski und Maugeri 2009]. *In vitro* wurde außerdem gezeigt, dass Apfelextrakte ein chemopräventives Potential aufweisen [Gerhauser 2008]. Unter den Inhaltsstoffen von Obst und Gemüse sind die Polyphenole – eine Gruppe sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe – von großer Bedeutung für die Gesundheit des Menschen [Scalbert *et al.* 2005b]. Im Apfel (und Apfelprodukten wie Apfelsaft) sind Polyphenole aus den Klassen der Hydroxyzimtsäuren, Dihydrochalkone, Flavonole und Flavan-3-ole enthalten [Neveu *et al.* 2010]. Äpfel und Apfelsaft stellen eine wichtige Quelle für Polyphenole in unserer Ernährung dar, die Gehalte in Äpfeln liegen zwischen 5,2 und 27,2 g/kg Trockengewicht [Wojdylo *et al.* 2008] und 110 und 459 mg/L in Apfelsaft [Kahle *et al.* 2005a].

Nach der Aufnahme der Polyphenole mit der Nahrung kommt es im Gastrointestinaltrakt zu Dekonjugationen, Bildung von Phase-II-Metaboliten und Abbauprodukten. Williamson *et al.* wiesen darauf hin, dass die Form in der die Polyphenole am Zielort vorliegen, von Bedeutung sei. Manche Metabolite haben eine niedrigere, andere eine höhere biologische Aktivität im Vergleich zu den aufgenommenen Formen aus den Lebensmitteln [Williamson *et al.* 2005].

Eine wichtige Rolle sowohl bei der Aufnahme der Polyphenole als auch bei der Funktion des Gastrointestinaltrakts spielt die intestinale Barriere. Sie wird zwischen den Epithelzellen durch die „Tight junctions“ (TJs) gebildet und dient dem Schutz vor Pathogenen. Defekte der intestinalen Barriere stehen in engem Zusammenhang mit chronisch entzündlichen

Darmerkrankungen (CED). Bereits 1997 wurde postuliert, dass Nahrungsmittelinhaltsstoffe bzw. ihre intestinalen Metabolite zu einer Verbesserung der intestinalen Barriere beitragen können und damit in die Kontrolle der Barrierefunktion bei gesunden und kranken Menschen involviert sind [Mariadason *et al.* 1997]. Dies wurde bisher jedoch nur in wenigen Studien untersucht [Amasheh *et al.* 2008, Kobayashi *et al.* 2008, McCann *et al.* 2007, Ohno *et al.* 2006, Suzuki und Hara 2009].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Absorption und den Metabolismus von Apfelpolyphenolen in verschiedenen Modellsystemen (Kolonkarzinomzelllinie T84, Schweinedarmmukosa und humane Biopsien) als auch die Effekte von Polyphenolen auf die intestinale Barriere zu untersuchen. Die Studie wurde im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten „Nutrition Net - Rolle von Nahrungsbestandteilen in der Genese von Darmkrankheiten und Möglichkeiten der Prävention durch die Ernährung“ durchgeführt.

2 Kenntnisstand

2.1 Polyphenole in Äpfeln und Apfelsaft

2.1.1 Klassen, Vorkommen und Funktion

Der Begriff „Polyphenol“ ist eine Sammelbezeichnung für phenolische Verbindungen mit meist mehr als zwei Phenol- oder Phenoethergruppen. Die Polyphenole lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: die Phenolcarbonsäuren und ihre Derivate sowie die Flavonoide, deren Grundgerüst das 2-Phenylbenzodihydropyran (Flavan) ist [Eisenbrand und Schreier 2006]. Die Strukturen sind in Abbildung 2-1 dargestellt.

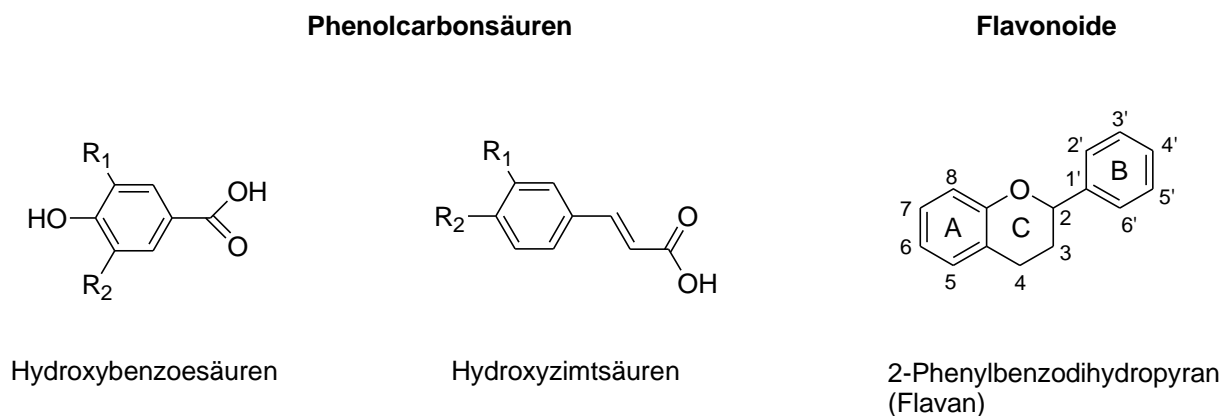


Abbildung 2-1: Grundgerüst der Phenolcarbonsäuren (Hydroxybenzoe- und Hydroxyzimtsäuren) und Flavonoide (mit Bezeichnung der Ringe und Nummerierung der Kohlenstoffatome). R₁ und R₂ = -H, -OH oder -OCH₃.

Die Phenolcarbonsäuren liegen in Pflanzen frei, als Ester mit anderen Säuren, als Ester an Zucker gebunden, als Glycoside decarboxylierter Säuren oder als Ester mit Alkoholen vor. Außerdem treten sie als Acylkomponente in Flavonoiden auf [Eisenbrand und Schreier 2006].

Der Name Flavonoide leitet sich vom lateinischen Begriff für gelb, „flavus“ ab. Flavonoide bestehen aus zwei aromatischen und einem heterocyclischen Kohlenstoff-Ring (A-, B- und C-Ring, siehe Abbildung 2-1). Meist liegen sie als wasserlösliche Glycoside oder Ester mit aliphatischen oder aromatischen Säuren wie Malon- oder Kaffeesäure vor. Nach dem Oxidationsgrad des zentralen Pyranrings (C-Ring) werden sie in weitere Klassen unterteilt: Anthocyanidine, Aurone, Catechine, Chalkone, Flavanole, Flavanone, Flavone, Isoflavone, Flavonole und Leukoanthocyanidine. Innerhalb der Klassen unterscheiden sich die Flavonoide in der Anzahl und Anordnung von Hydroxyl- und Methoxysubstituenten. Außerdem werden in der Literatur noch prenylierte Verbindungen, die einen vom Isopren abgeleiteten Substituenten haben, beschrieben. Bis heute sind durch Variation der Art, Anzahl und Anordnung nicht-acetylierter und acetylierter Zuckerreste über 5000 Strukturen

bekannt [Eisenbrand und Schreier 2006]. Die Grundstrukturen der im Rahmen dieser Arbeit relevanten Klassen werden in Kapitel 2.1.3 vorgestellt.

Polyphenole sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und kommen in allen höheren Pflanzen vor. Gehalte von bis zu 7500 mg/kg Frischgewicht (FW) wurden beispielsweise in Auberginen ermittelt. Früchte, Gemüse, Cerealien, Schokolade und Getränke wie z. B. Tee, Wein, Kaffee und Fruchtsäfte stellen in unserer Ernährung die Hauptquelle für Polyphenole dar. Manche Polyphenole wie Quercetin (Que) sind in allen pflanzlichen Lebensmitteln nachweisbar, andere dagegen sind sehr spezifisch nur in einigen enthalten, wie Flavanone in Citrusfrüchten, Isoflavone in Soja und Phloretin-2'-O-glucosid (Phl-G) in Äpfeln. Die Menge der Polyphenole in den pflanzlichen Lebensmitteln variiert zwischen den verschiedenen Sorten. So ist das Polyphenolprofil in Äpfeln immer nahezu identisch, die Gehalte können jedoch zwischen 0,1 und 10 g/kg FW liegen. Weitere Einflüsse auf die Polyphenolgehalte haben Klima, Anbauart, Lagerung, industrielle Verarbeitung und Zubereitung beim Verbraucher. Da die Aufnahme der Polyphenole bis zu 1 g/Tag betragen kann – abhängig von den Ernährungsgewohnheiten – stellen sie zusammen mit den Vitaminen die am meisten verzehrten Antioxidantien dar (zusammengefasst in [Manach *et al.* 2004, Scalbert *et al.* 2005a]).

In der Pflanze werden Polyphenole zum Schutz vor ultravioletter Strahlung und Pathogenen gebildet. Außerdem tragen sie zur Wundheilung der Pflanze durch Verholzung bei und besitzen antimikrobielle Eigenschaften. Nach einer Infektion der Pflanze wurden erhöhte Polyphenolgehalte nachgewiesen, was darauf schließen lässt, dass sie als Folge der Infektion vermehrt gebildet werden. Manche Polyphenole haben einen adstringierenden bzw. bitteren Geschmack und dienen somit als Fraßschutz. Weiterhin wirken sie wachstumsregulierend, indem sie die Konzentrationsspiegel des Pflanzenhormons Auxin beeinflussen. Einige Polyphenole sind Farbstoffe und locken Insekten an [Aron und Kennedy 2008, Manach *et al.* 2004, Pietta 2000].

2.1.2 Biosynthese

Polyphenole entstehen in Pflanzen über den Phenylpropanoidweg. An diesem Stoffwechselweg sind verschiedene Enzyme beteiligt, von denen ein Teil mit der cytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums assoziiert ist. Außerdem ist ein Komplex aus membran-assoziierten Enzymen an der Polyphenolbiosynthese beteiligt. Die Enzyme zur Polyphenolbiosynthese kommen ubiquitär in allen Pflanzen vor, wobei jeweils bestimmte Polyphenolklassen produziert werden [Winkel-Shirley 2001].

In Abbildung 2-2 ist der Biosyntheseweg der Polyphenole dargestellt. Die im Apfel und Apfelsaft vorkommenden Polyphenole und ihre Klassen sind violett bzw. grün markiert (siehe Abbildung 2-2).

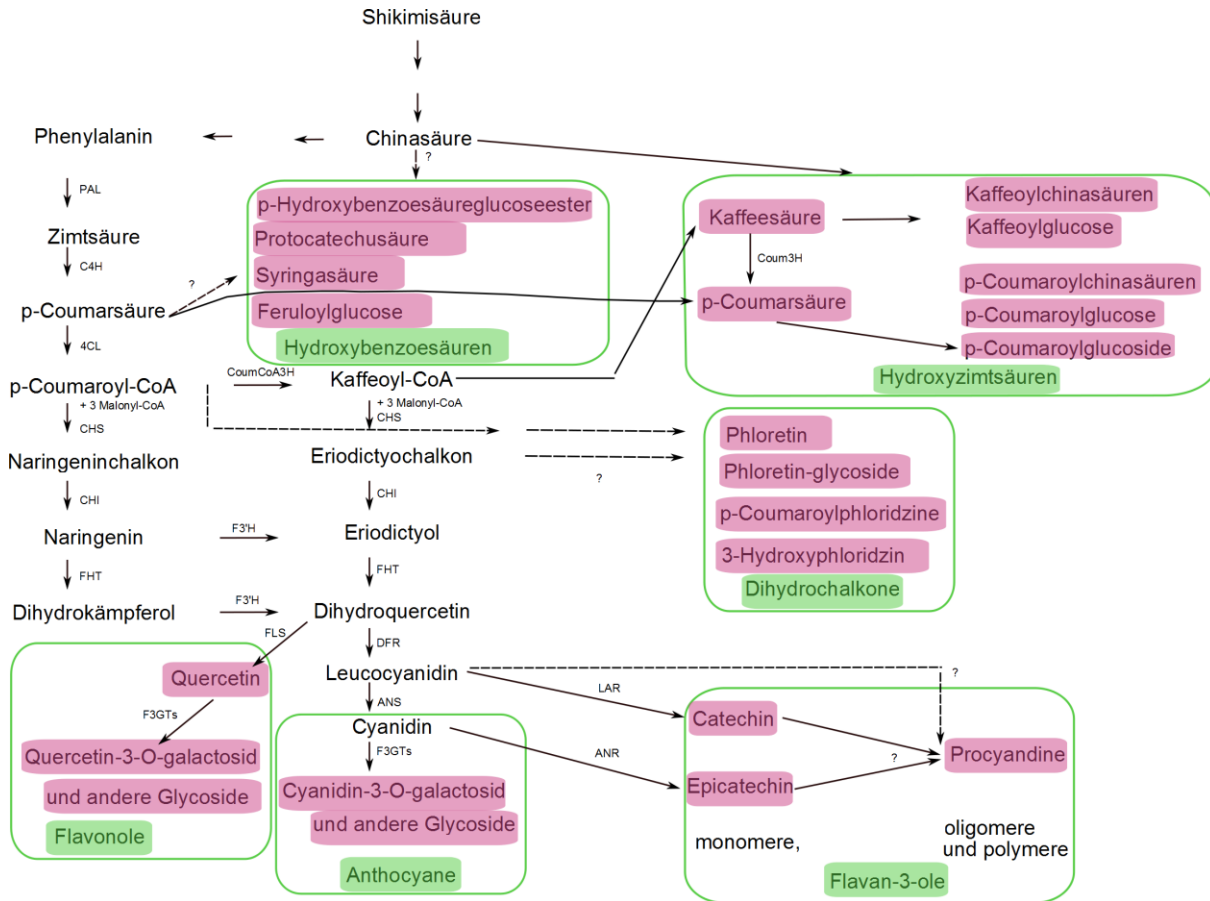


Abbildung 2-2: Biosynthese der im Apfel enthaltenen Polyphenole (nach [Li et al. 2007]). PAL = Phenylalaninammoniaklyase, C4H = Zimtsäure-4-Hydroxylase, 4CL = 4-Coumarat-CoA-Ligase, CHS = Chalkonsynthese, CHI = Chalkonisomerase, FHT = Flavanon-3-β-Hydroxylase, F3'H = Flavonoid-3'-Hydroxylase, DFR = Dihydroflavonol-4-Reduktase, ANS = Anthocyanidinsynthese, FLS = Flavonolsynthese, F3GT = UDP-Glucose-Flavonoid-3-O-Glucosyltransferase, LAR = Leucoanthocyanidinreduktase, ANR = Anthocyanidinreduktase.

Die C₆-C₃-C₆-Flavonoidstruktur (siehe Abbildung 2-1) resultiert dabei aus zwei Biosynthesewegen. Der aromatische B-Ring sowie die C₃-Brücke, die A- und B-Ring miteinander verbindet, bestehen aus einer Phenylpropanoideinheit, die aus p-Coumaroyl-CoA gebildet wird. Der A-Ring entsteht durch Kondensation von drei Acetat-Einheiten über den Malonsäureweg. Die meisten Informationen über diese Synthesewege sowie die involvierten Enzyme und Gene wurden über molekularbiologische Versuche mit der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*), einem einjährigen Kraut aus der Familie der Kreuzblütler, gewonnen [Crozier et al. 2009].

Nach der Biosynthese werden die Polyphenole aus dem Cytoplasma durch eine Glutathion-S-Transferase und eine Glutathionpumpe an die Zielorte in der Vakuole oder Zellwand der Pflanze transportiert [Winkel-Shirley 2001].

2.1.3 Gehalte

In Äpfeln und Apfelsaft sind Polyphenole aus den Klassen der Dihydrochalkone, Flavanole, Flavonole und Hydroxyzimtsäuren nachgewiesen worden. In der Schale wurden außerdem Anthocyane identifiziert (zusammengefasst von [Neveu *et al.* 2010]). Die Grundstrukturen der Polyphenolklassen sind in Abbildung 2-3 jeweils anhand eines repräsentativen Vertreters dargestellt. Untersucht wurden Tafel- und Mostäpfel sowie deren Säfte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2-1 zusammengefasst.

Tabelle 2-1: Gehalte der Polyphenolklassen [in mg/100 g bzw. mg/100 mL] bestimmt in Tafel- und Mostäpfeln sowie deren Säften (zusammengefasst von [Neveu *et al.* 2010]).

	Dihydrochalkone [mg/100 g bzw. mg/100 mL]	Flavanole [mg/100 g bzw. mg/100 mL]	Flavonole [mg/100 g bzw. mg/100 mL]	Hydroxyzimtsäuren [mg/100 g bzw. mg/100 mL]
Tafeläpfel	0,52 - 3,25	3,73 - 84,28	0 - 13,21	4,32 - 47,11
Mostäpfel	1,31 - 36,41	12,09 - 293,01	0 - 1,52	18,97 - 417,11
Saft (aus Tafeläpfeln)	0,5 - 24,05	20,53 - 95,2	0 - 12,65	3,37 - 85,44
Saft (aus Mostäpfeln)	0,57 - 25,26	0,75 - 184,9	0 - 3,06	3,18 - 138,19

Es zeigte sich, dass die Polyphenolgehalte in Mostäpfeln und den daraus hergestellten Säften z.T. bis zu 10-fach höher waren als bei den Tafeläpfeln. Flavanole und Hydroxyzimtsäuren machen den größten Teil der Polyphenole aus, gefolgt von den Dihydrochalkonen. Flavonole wurden bei einem Teil der Untersuchungen nicht in den Äpfeln bzw. Säften nachgewiesen.

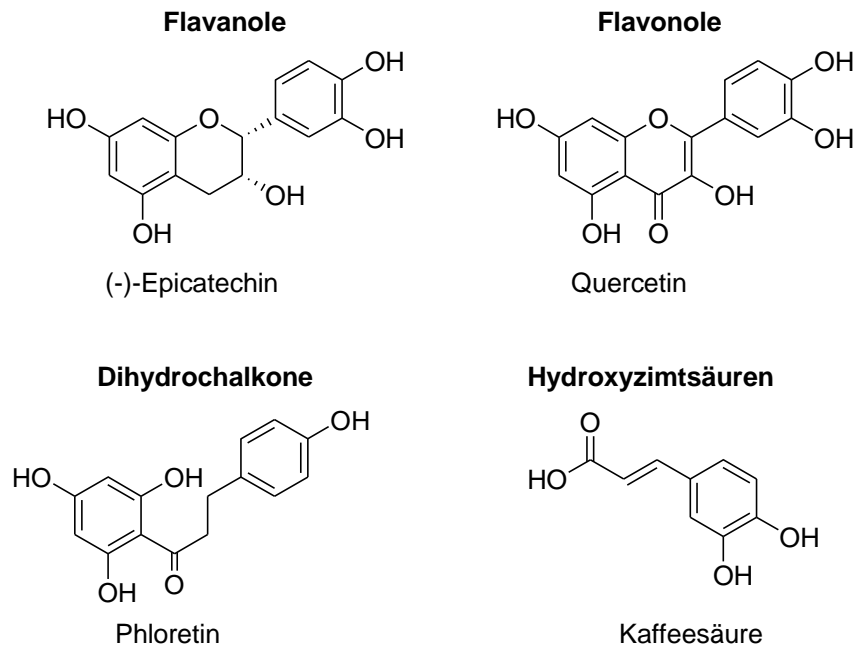


Abbildung 2-3: Strukturen der in Äpfeln und Apfelsaft vorhandenen Polyphenolklassen mit jeweils einem Vertreter.

Aus der Gruppe der Flavan-3-ole kommen die Procyanidine im Apfel und Apfelsaft am häufigsten vor, darunter die Dimere B₁ und B₂ und das Trimer C₁ [Gökmen *et al.* 2001, Kahle *et al.* 2005a]. Es wurden durchschnittliche Polymerisationsgrade zwischen 3 und 13 nachgewiesen [Huemmer *et al.* 2008], die Monomere (-)-Epicatechin und (+)-Catechin sind ebenfalls quantifiziert worden [Kahle *et al.* 2005a]. 5-Kaffeoylchinasäure (5-CQA, englisch 5-caffeoylquinic acid) ist der Hauptvertreter der Hydroxyzimtsäuren in Äpfeln. Außerdem sind 4-CQA, 3-, 4-, 5-*p*-Coumaroylchinasäure (5-*p*-CouQA, englisch 5-*p*-coumaroylquinic acid), Kaffee-, Ferula-, *o*-Coumar-, *p*-Coumarsäure und *p*-Coumaroylglucose identifiziert worden [Gliszczynska-Swiglo und Tyrakowska 2003, Gökmen *et al.* 2001, Kahle *et al.* 2007]. Die Daten für die freien Säuren sind jedoch widersprüchlich. Im Gegensatz zu den Studien von Gliszczynska-Swiglo und Tyrakowska, Gökmen *et al.* und Kahle *et al.* wurden in der Studie von Schieber *et al.* die freien Säuren nicht nachgewiesen [Schieber *et al.* 2001]. Aus der Gruppe der Dihydrochalkone wurden Phl-G und Phloretin-2'-*O*-xyloglucosid (Phl-XG) im Apfelsaft detektiert [Kahle *et al.* 2005a]. Ebenfalls im Apfelsaft nachweisbar waren die Glycoside des Flavonols Que mit den Zuckern Rhamnose, Glucose, Galactose, Xylose und Arabinose [Kahle *et al.* 2007]. Aus der Gruppe der Hydroxybenzoesäuren wurden Gallussäure und Protocatechusäure in Apfelsaft beschrieben, in Äpfeln dagegen wurden Syringasäure und Gentisinsäure identifiziert (zusammengefasst von [Neveu *et al.* 2010]). Eine Strukturübersicht über die für diese Arbeit relevanten Verbindungen ist in Kapitel 6 (Seite 151) gezeigt.

2.2 Biologische Wirkungen der Polyphenole

Polyphenole weisen eine Vielzahl positiver Effekte auf die Gesundheit auf. Im Folgenden sollen *in vivo*- und *in vitro*-Studien vorgestellt werden, die sich mit den Wirkungen von Apfelpolyphenolen befasst haben.

2.2.1 *In vivo*-Studien

Epidemiologische Studien zeigten, dass der Konsum von Äpfeln mit einem erniedrigten Risiko für Lungenkrebs und Diabetes korrelierte. Für kardiovaskuläre Erkrankungen und Asthma wurde ein solcher Zusammenhang ebenfalls festgestellt, auch das Körpergewicht der Probanden wurde durch den Apfelkonsum positiv beeinflusst (zusammengefasst von [Boyer und Liu 2004]). Im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie wurde ermittelt, dass das Risiko für kolorektalen Krebs beim Menschen mit der Anzahl der täglich verzehrten Apfelportionen invers korreliert [Jedrychowski und Maugeri 2009].

Sowohl in Studien mit Ratten als auch in Humanstudien wurde gezeigt, dass die im Apfel enthaltene 5-CQA eine blutdrucksenkende Wirkung hat (zusammengefasst in [Chen *et al.* 2009]).

In Nagermodellen – bei denen verschiedene Darmentzündungen simuliert wurden – wurde der Einfluss von Que und Quercetin-3-O-rhamnosid (Que-R) auf für Darmentzündungen relevante Parameter (darunter Gewicht und Blut im Faeces) untersucht. Obwohl Que-R bei *in vitro*-Studien keine anti-inflammatorische Aktivität aufwies, zeigte sich *in vivo*, dass nach der Aufnahme des Que-R das im Darm freigesetzte Aglykon Que eine positive Wirkung entfaltete. Nach der Aufnahme von Que oder Que-R wurde eine Verminderung der Krankheitssymptome inner- und außerhalb des Darms, der Makro- und Mikropathologie, und der Entzündung und Autoimmunität festgestellt [Shapiro *et al.* 2007].

2.2.2 *In vitro*-Studien

Die bis zum Jahr 2008 veröffentlichten *in vitro*-Ergebnisse zum chemopräventiven Potential von Polyphenolen des Apfels wurden von Gerhäuser zusammengefasst [Gerhäuser 2008]. Die Apfelpolyphenole wiesen in zahlreichen Studien verschiedene präventive Mechanismen auf. Dazu gehörten anti-mutagene Effekte, eine erhöhte Detoxifizierung durch die Modulation des Fremdstoffmetabolismus, anti-oxidative Effekte, anti-inflammatorische Aktivität, die Inhibition von Signalwegen und Zellwachstum sowie die Induktion der Apoptose. Weiterhin wiesen die Fermentationsprodukte der untersuchten Apfelextrakte und von Apfelpektin im Kolon anti-proliferatives Potential auf. Aus im Tiermodell erhaltenen Daten berechnete Gerhäuser die benötigte Dosis an Äpfeln oder Apfelsaft für den Menschen, um Darm- und

Brustkrebs zu senken. Daraus ergab sich, dass eine Menge von 800 mL trübem Apfelsaft bzw. sechs Äpfeln pro Tag nötig sein könnten, um die gewünschten positiven Effekte zu erzielen [Gerhauser 2008].

In vitro sind einzelne Polyphenole des Apfels auf ihre biologische Wirksamkeit getestet worden. Shao *et al.* zeigten, dass die Apfelpolyphenole Phloretin (Phl) und Phl-G in der Lage sind, Dicarbonylspezies – die an der Bildung von „advanced glycation end products“ (AGEs) beteiligt sind – abzufangen. Dadurch kommt es zu einer verringerten Bildung von AGEs, die bei Diabetespatienten zu chronischen Komplikationen, wie Retina-, Nieren- und Nervenleiden sowie macrovaskulären Krankheiten führen können [Shao *et al.* 2008]. In einem Mausmodell für Diabetes wurde gezeigt, dass die Aufnahme von 0,5% Phl-G in der Nahrung nach 14 Tagen zu einer signifikanten Senkung des Blut-Glukose-Levels führte [Masumoto *et al.* 2009]. Für 0,5 und 1% Que in der Nahrung wurde dieser Effekt ebenfalls beobachtet, außerdem wurde die Bildung von Markern des oxidativen Stresses in Leber und Bauchspeicheldrüse erniedrigt sowie der Plasmaspiegel von Insulin erhöht [Kobori *et al.* 2009]. Wu *et al.* zeigten *in vitro*, dass Flavonoide (darunter Que, Epi und Cat), die an Low-density-Lipoproteine (LDL) gebunden sind, deren Oxidation signifikant senkten. Diese Senkung der LDL-Oxidation könnte bei Diabetespatienten zum Schutz vor kardiovaskulären Komplikationen, verursacht durch eine Hyperglykämie, beitragen [Wu *et al.* 2009]. Weiterhin war Que in der Lage, *in vitro* die UV-B- und UV-A-induzierte Lipidoxidation von Liposomen effektiv zu hemmen, wobei die Wirkung gegenüber UV-B-Strahlung zweimal so groß war wie gegenüber UV-A-Strahlung [Fahlman und Krol 2009].

Auch aus lebensmitteltechnologischer Sicht betrachtet weisen Polyphenole eine positive Wirkung auf. So wurde durch die Zugabe von 0,1% Apfelextrakt zu Rinderpasteten vor dem Braten die Bildung von genotoxischen heterocyclischen Aminen um bis zu 70% gesenkt. Eine aktivitätsgeleitete Analyse ergab, dass die Proanthocyanidine, Phl-G und 5-CQA eine zentrale Rolle bei der Senkung der Bildung der heterocyclischen Amine einnehmen [Cheng *et al.* 2007].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für eine Vielzahl von Polyphenolen oder polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten positive Wirkungen auf verschiedenste gesundheitliche Aspekte nachgewiesen wurden. Ein Teil der Ergebnisse wurde bisher nur *in vitro* erzielt, für einige Verbindungen (5-CQA, Que, Que-R) wurden bereits Tierversuche – meist im Nagermodell – durchgeführt. Klinische Studien am Menschen zu den Wirkungen der Polyphenole wurden wenige durchgeführt, für einige Zusammenhänge zwischen der

Aufnahme von Polyphenolen und der Wirkung auf die Gesundheit gibt es aber Hinweise aus epidemiologischen Studien.

2.3 Aufbau des Gastrointestinaltraktes

Der Gastrointestinaltrakt dient der Aufnahme von Nahrungsstoffen, essentiellen Substanzen, Salzen und Wasser sowie der Ausscheidung des nicht resorbierbaren Anteils der Nahrung und eines Teils der Stoffwechselendprodukte. Dabei wird die Nahrung durch die Verdauung in eine resorbierbare Form gebracht. Der menschliche Gastrointestinaltrakt ist in Abbildung 2-4 schematisch dargestellt.

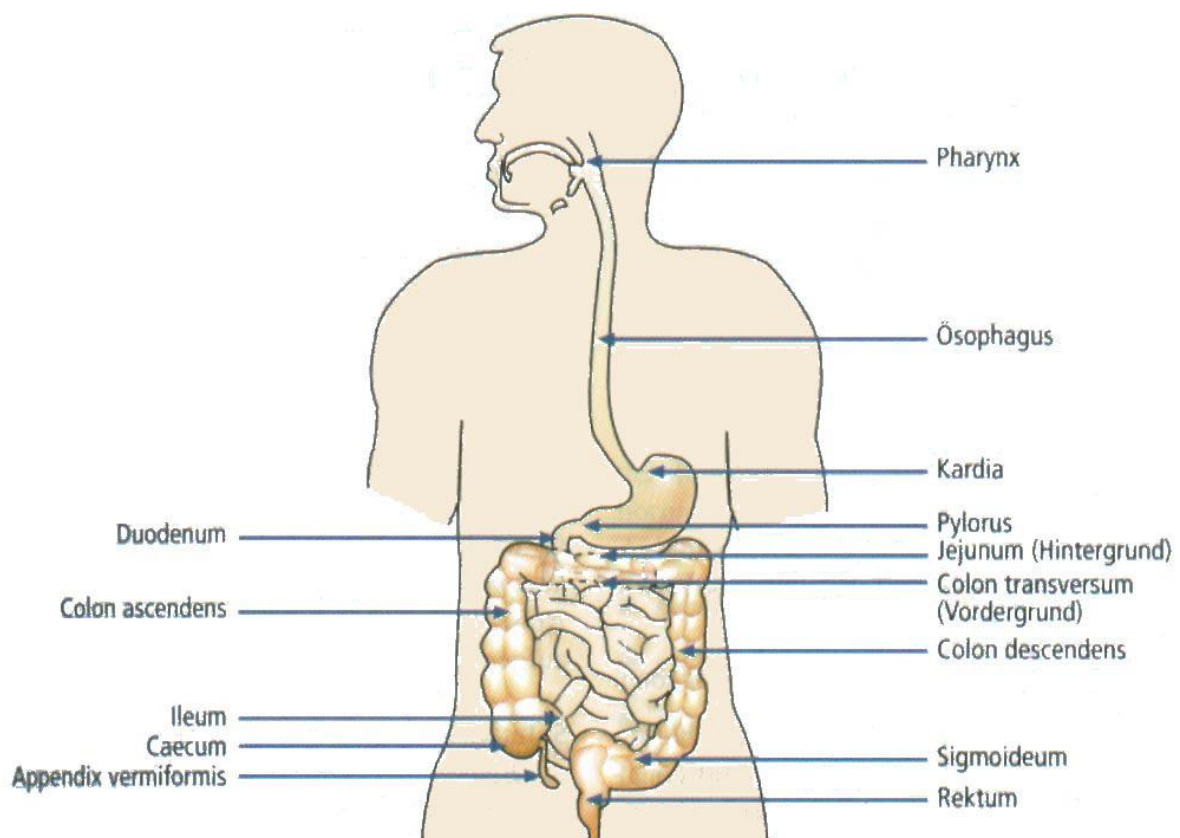


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung des humanen Gastrointestinaltrakts (aus [Mutschler et al. 2008]).

Nach der Aufnahme und dem Zerkleinern der Nahrung im Mund gelangt sie über die Speiseröhre (Ösophagus) in den Magen. Hier kommt es zu einer physikalischen Zerkleinerung und chemischen Veränderung der Nahrung. Außerdem wird sie durch die Magensäure desinfiziert. Durch Pepsin kommt es bereits hier zu einer Spaltung von Proteinen. Der so entstandene Speisebrei wird portionsweise zur weiteren Verdauung in das Duodenum (Zwölffingerdarm) abgegeben. Der sich an den Magen anschließende Dünndarm wird in drei Abschnitte unterteilt: Duodenum (ca. 25 cm), Jejunum (Leerdarm, ca. 1,2 m) und

Ileum (Krummdarm, ca. 1,8 m). Im Dünndarm kommt es neben der Verdauung der Nahrung durch verschiedene Enzyme zur Resorption von Nähr- und Fremdstoffen. Außerdem werden im Duodenum der Pankreassaft aus der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) und der Gallensaft aus der Galle (Vesica fellea) eingeleitet. In der Dünndarmschleimhaut kommt es durch Schleimhautfalten (Kerckringsche Falten), Zotten und Mikrovilli zu einer starken Oberflächenvergrößerung (siehe Abbildung 2-5) [Mutschler *et al.* 2008, Rehner und Daniel 2002].

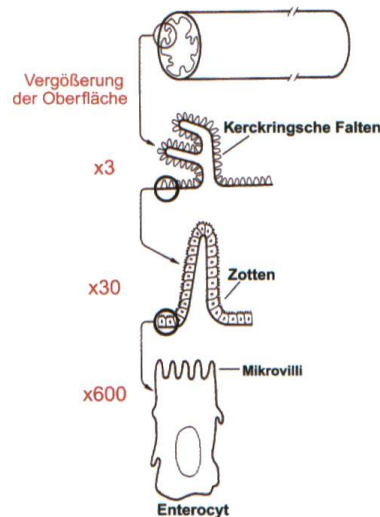


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der Oberflächenvergrößerung im Dünndarm durch Kerckringsche Falten, Zotten und Mikrovilli (aus [Rehner und Daniel 2002]).

Wegen der unterschiedlichen Ausprägung dieser Strukturen nimmt die Oberfläche von proximal nach distal stark ab. Im Duodenum und Jejunum sind die Kerckringschen Falten, entstanden aus Vorwölbungen der Mukosa, am häufigsten und mit bis zu 8 mm am höchsten. Auf ihnen befinden sich die Zotten. Sie sind ca. 1 mm hoch und haben die Form eines Fingers. Ihr Epithel besteht hauptsächlich aus Enterocyten (Saumzellen), an deren apikaler (lumenständiger) Seite sich dicht beieinander stehende protoplasmatische Fortsätze, die Mikrovilli, befinden. Die Oberfläche des Dünndarms wird dadurch ca. 600-fach vergrößert. Die Einbuchtungen zwischen den Zotten werden als Krypten bezeichnet. Die Kryptenregion ist die Proliferationszone des Epithels, dabei kommt es in 3 bis 6 Tagen zu einer vollständigen Erneuerung der Mukosaoberfläche. Aus den Kryptenzellen entstehen durch Teilung neue Zellen, die in Richtung der Zottenspitze wandern. Dabei durchlaufen sie eine Differenzierung mit zunehmender Ausprägung der phänotypischen Eigenschaften der Enterocyten [Mutschler *et al.* 2008, Rehner und Daniel 2002].

Durch die am Ende des Dünndarms gelegene Ileozökalklappe wird der Darminhalt portionsweise in den Dickdarm abgegeben. Er gliedert sich wiederum in mehrere Abschnitte: Caecum (Blinddarm) mit dem Appendix vermiformis (Wurmfortsatz), Kolon (Grimmdarm) und

Rektum (Enddarm). Das Kolon wird nochmals in verschiedene Abschnitte unterteilt: aufsteigender, querverlaufender, absteigender und S-förmiger Abschnitt (Colon ascendens, transversum, descendens, sigmoideum). Im Dickdarm werden Elektrolyte und Wasser resorbiert, es kommt zu einer Konzentrierung der Faeces. Der gesamte Dickdarm hat eine Länge von ca. 1,5 m. Da hier keine Zotten oder Mikrovilli vorhanden sind, ist die Oberfläche des Dickdarms nicht sehr groß. Dafür gibt es besonders tiefe und dicht nebeneinander stehende Krypten. Der Dickdarm ist mit zwischen 10^9 bis 10^{12} Kolonie formenden Einheiten pro mL Darminhalt dicht mit Bakterien besiedelt, der Dünndarm dagegen nur mit 10^3 bis 10^8 Kolonie formenden Einheiten pro mL Darminhalt [Blaut und Clavel 2007]. Die Bakterien machen etwa 40% des Darminhalts aus. Es können zwischen 300 und 400 Spezies identifiziert werden, wobei zwischen einzelnen Individuen beträchtliche Unterschiede bestehen können. Bei 90% der Bakterien handelt es sich um Anaerobier. Sie metabolisieren die Nährstoffe, die Stoffwechselprodukte der Darmflora können von der Kolonmukosa resorbiert werden [Mutschler *et al.* 2008, Rehner und Daniel 2002].

2.4 Absorption und Bioverfügbarkeit der Polyphenole

Um die zum Teil bei *in vitro*-Versuchen ermittelten Ergebnisse zu biologischen Wirkungen von Polyphenolen (z.B. antioxidative Kapazität) richtig beurteilen zu können, ist es wichtig, deren Absorptionsraten im Gastrointestinaltrakt und ihre Bioverfügbarkeit an den Zielorten im Körper (z.B. Blut) zu berücksichtigen. Die Bioverfügbarkeit ist der Anteil der aufgenommenen Nährstoffe, der dem Körper zur Verfügung steht. Im Rahmen der Betrachtung von in Lebensmitteln enthaltenen Nährstoffen gilt dies unabhängig davon, ob es der ursprünglich aufgenommene Nährstoff oder ein Metabolit desselben ist [Bergmann *et al.* 2010]. Das aktuell vorhandene Wissen über die Absorption und Bioverfügbarkeit von Polyphenolen, darunter auch den im Apfel enthaltenen, wurde bereits in mehreren Übersichtsartikeln zusammengefasst [Bergmann *et al.* 2010, Crozier *et al.* 2009, Lafay und Gil-Izquierdo 2008, Manach *et al.* 2004, Manach *et al.* 2005, Prior 2003, Ross und Kasum 2002, Scalbert *et al.* 2002, Scalbert und Williamson 2000, Yang *et al.* 2008, Zhao und Moghadasian 2008]. Hier soll nur eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse erfolgen (in Anlehnung an [Bergmann *et al.* 2010]):

Obwohl die Gruppe der Flavan-3-ole die in Äpfeln am häufigsten vorkommende ist, ist über ihre intestinale Absorption wenig bekannt. Im Mund und Magen sind die Monomere weitestgehend stabil. Auch im Dünndarm kommt es zu keinem nennenswerten Abbau, es kommt jedoch während der Passage des Gastrointestinal-Trakts zu Isomerisierungen der Monomere, die zwei stereogene Zentren aufweisen. (-)-Epicatechin epimerisiert zu (-)-Catechin, (+)-Catechin dagegen zu (+)-Epicatechin. Im Dickdarm dagegen werden die

Flavan-3-ol-Monomere durch die Mikroflora zu Phenylvalerolactonen und Phenylpropionsäurelactonen abgebaut. Außerdem wurden im Urin Phenolcarbonsäuren detektiert, im Plasma dagegen nur Mono- und Dimere (zusammengefasst von [Bergmann *et al.* 2010]). Neben den Monomeren kommen im Apfel Dimere (Procyanidin B₁ und B₂) und weitere Oligomere (darunter Procyanidin C₁) und Polymere vor. Die Verbindung der Monomere miteinander erfolgt meist über C-C-Bindungen [Rasmussen *et al.* 2005]. Der Anteil der oligomeren Flavan-3-ole macht 40 bis 60% des Polyphenolgehalts von Äpfeln aus. Inkubationen des Dimers Procyanidin B₂ mit künstlichem Magensaft zeigten, dass es im Magen zu einem Abbau zu (-)-Epicatechin und Isomerisierung zu Procyanidin B₅ kommt. Die oligomeren Procyanidine waren im Speichel ebenfalls stabil, über die Stabilität im Magen gibt es unterschiedliche Ergebnisse. Manche Gruppen beschreiben einen Abbau bei saurem pH-Wert, andere Gruppen dagegen zeigten, dass 90% der aufgenommenen Oligomere am Ende des Dünndarms wiedergefunden wurden. Bei der Passage des Dünndarms nahm der durchschnittliche Polymerisationsgrad der Procyanidine jedoch ab. *In vitro*-Inkubationen mit humaner Kolonmikroflora zeigten, dass die den Dickdarm erreichenden Procyanidine dort zu niedermolekularen Phenolsäuren abgebaut wurden (zusammengefasst von [Bergmann *et al.* 2010]).

Für Hydroxyzimtsäuren wurde beschrieben, dass sie z. T. durch die Mukosa des Magens diffundieren können. Für 5-CQA wurden Isomerisierungen und Hydrolyse im Duodenum beschrieben, wogegen die freien Säuren dort stabil sind. Die Absorption der Hydroxyzimtsäuren kann über verschiedene aktive Transporter erfolgen. Im Plasma und Urin von Probanden wurden sowohl 5-CQA als auch die freien Säuren und deren Konjugate (Glucuronide und Sulfate) nachgewiesen, die Ergebnisse der einzelnen Forschergruppen widersprechen sich jedoch teilweise. Einige Gruppen wiesen geringe Mengen der unveränderten 5-CQA im Plasma nach, andere dagegen nur freie und konjugierte Kaffeesäure. Im Kolon kommt es zum mikrobiellen Metabolismus der Hydroxyzimtsäuren. Aus 5-CQA entsteht Kaffeesäure, die dann weiter zu Dihydrokaffeesäure und anderen Phenolcarbonsäuren abgebaut werden kann (zusammengefasst von [Bergmann *et al.* 2010]). Nach dem Verzehr von Apfelsaft, der aus der Klasse der Dihydrochalkone PhI-G und PhI-XG enthält, wird PhI-G durch die in der Bürstensaummembran des Dünndarmepithels lokalisierte Lactasephloridzinhydrolase (LPH) gespalten. Außerdem kommt es zur Konjugation des freien Aglykons. Den Dickdarm erreichen PhI, PhI-XG und Phloretinglucuronide. Im Kolon wird PhI durch die Mikroflora zu Phenolcarbonsäuren gespalten. Im Dünndarm kann PhI-G über den Natrium abhängigen Glucose-Transporter (SGLT, engl. sodium dependent glucose transporter, siehe 2.5) als intaktes Molekül aufgenommen werden. Im Plasma und Urin kommen Glucuronide und Sulfate des PhIs vor (zusammengefasst von [Bergmann *et al.* 2010]).

Eine Vielzahl an Daten ist über die Absorption des Flavonols Que und seiner Glycoside vorhanden. Für Glucoside des Ques wurde bereits im Mund durch den Speichel eine Spaltung in Aglykon und Zucker beschrieben, das Rhamnosid dagegen blieb stabil. Im Magen und Duodenum fand kein Abbau der Glycoside statt, das Aglykon Que dagegen wurde abgebaut und die Metaboliten 3,4-Dihydroxybenzoesäure und 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure identifiziert. Bei der weiteren Passage des Dünndarms kommt es zur Spaltung einiger Glycoside durch die intestinale β -Glucosidase. Außerdem wurde beschrieben, dass ein Teil der Glycoside auch ohne Spaltung im Dünndarm absorbiert werden kann. Im Dickdarm kommt es durch bakterielle Enzyme zu einer Spaltung der Glycoside (Que-R, -xylosid und -arabinosid). Das Aglykon Que wird durch die Mikroflora des Dickdarms weiter abgebaut, als Metabolite wurden Phloroglucinol und 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure identifiziert (zusammengefasst von [Bergmann *et al.* 2010]).

Die beim Menschen den Dickdarm erreichende Menge an mit der Nahrung aufgenommenen Substanzen kann in Studien mit Probanden mit einem Stoma des terminalen Ileums (Ileostoma) ermittelt werden. Das Ileostoma ist ein künstlicher Darmausgang, der im Bereich des endständigen Dünndarms vorübergehend oder dauerhaft angelegt wird. Gründe hierfür können der vorübergehende Ausschluss bestimmter Darmabschnitte bei CED, wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, oder die chirurgische Entfernung bestimmter nachgeschalteter Dickdarmabschnitte sein [Schürmann 2001]. Nach der Passage des Dünndarms gelangt die Nahrung bei Probanden mit Ileostoma nicht in den Dickdarm sondern in einen Beutel, der sich außerhalb des Körpers befindet. Verschiedene Gruppen haben Studien mit Probanden mit Ileostoma durchgeführt, um zu ermitteln, welche Mengen der aufgenommenen Substanzen den Dünndarm passieren und bei Menschen ohne Stoma den Dickdarm erreichen würden. Auch lassen sich während der Dünndarmpassage gebildete Metabolite in der Ileostomaflüssigkeit nachweisen. Untersucht wurden bei Probanden mit Ileostoma unter anderem Absorption und Metabolismus von Flavan-3-olen aus Grüntee, Dihydrochalkonen aus Apfelwein, Polyphenolen aus Apfelsaft und 5-CQA [Kahle *et al.* 2007, Marks *et al.* 2009, Olthof *et al.* 2001, Stalmach *et al.* 2009].

Eine von Kahle *et al.* mit Ileostomieprobanden durchgeführte Studie [Kahle *et al.* 2007, Kahle *et al.* 2005b] soll hier näher beschrieben werden, da die in dieser Studie in der Ileostomaflüssigkeit bestimmten Konzentrationen der Apfelsaftpolyphenole für die vorliegende Arbeit als Untersuchungskonzentrationen gewählt wurden. Auch das Spektrum der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanzen wurde in Anlehnung an diese Veröffentlichungen gewählt. An der Studie nahmen elf zu diesem Zeitpunkt nicht akut erkrankte Probanden (drei Männer, acht Frauen) mit einem durchschnittlichen Alter von 41 Jahren (23 bis 50 Jahre) teil. Alle hatten ein Stoma des terminalen Ileums, bei keinem

wurden Teile des Dünndarms entfernt. Zu Grunde liegende Erkrankungen waren in sieben Fällen Morbus Crohn, zweimal Colitis ulcerosa und zweimal familiäre adenomatöse Polyposis (FAP). Am Tag vor der Studie ernährten sich die Probanden polyphenolfrei. Nach Einhaltung einer Fastenzeit von 10 Stunden über Nacht tranken sie innerhalb von 15 Minuten 1 L naturtrüben Apfelsaft. Nach 4 Stunden erhielten die Probanden eine leichte, polyphenolfreie Mahlzeit. Direkt vor der Apfelsaftaufnahme sowie 1, 2, 4, 6 und 8 Stunden danach wurden die Ileostomabeutel abgenommen und tiefgefroren gelagert. Nach Gefriertrocknung wurden die Beutelinhalte extrahiert und die darin enthaltenen Polyphenole mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) und Diodenarraydetektion (HPLC-DAD) identifiziert und quantifiziert. Es zeigte sich, dass das Maximum der Polyphenolausscheidung in die Ileostomabeutel nach zwei Stunden erreicht wurde. Die Ergebnisse der Studie sind in Tabelle 2-2 dargestellt. Die Aufstellung zeigt die Konzentrationen der Polyphenole im konsumierten Apfelsaft in mg/L, die Stoffmenge der Polyphenole in einem Liter Apfelsaft, die Gesamtexkretion an Polyphenolen in die Ileostomabeutel über den Zeitraum von acht Stunden, die Stoffmenge, die im 2-Stunden-Beutel enthalten war sowie die entsprechende Konzentration bei einem mittleren Beutelvolumen von ca. 370 mL. Die Beutelvolumen lagen zwischen 216 und 625 mL.

Tabelle 2-2: Polyphenolgehalte des naturtrüben Apfelsaftes und Exkretion in die Ileostomabeutel über den gesamten Zeitraum von 8 Stunden sowie nach 2 Stunden und Konzentrationen nach 2 Stunden bei einem mittleren Beutelvolumen von 370 mL (aus [Kahle 2008, Kahle *et al.* 2007]). n.d. = nicht detektierbar.

Substanz	Apfelsaft [mg/L]	Apfelsaft [μ mol]	Gesamt- exkretion [μ mol]	Exkretion nach 2 h [μ mol]	Konzentration im Ileostoma- beutel nach 2 h [μ M] ^a
1-Kaffeoylchinasäure	n.d.	n.d.	16,5 \pm 2,4	6,8 \pm 2,1	18,4
3-Kaffeoylchinasäure	n.d.	n.d.	33,7 \pm 8,2	16,3 \pm 3,3	44,0
4-Kaffeoylchinasäure	14,1 \pm 2,0	39,8 \pm 5,6	9,2 \pm 3,0	4,2 \pm 1,8	11,3
5-Kaffeoylchinasäure	112,8 \pm 3,5	318,4 \pm 9,9	32,5 \pm 7,7	16,9 \pm 2,9	45,6
Kaffeensäure	5,3 \pm 1,7	29,4 \pm 9,4	n.d.	n.d.	n.d.
Kaffeensäuremethylester	n.d.	n.d.	11,9 \pm 8,5	7,3 \pm 5,2	19,7
3- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	7,1 \pm 0,4	21,0 \pm 1,2	6,4 \pm 0,5	3,6 \pm 0,7	9,7
4- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	18,4 \pm 0,3	54,4 \pm 0,9	9,9 \pm 1,0	3,6 \pm 0,6	9,7
5- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	4,2 \pm 0,1	12,4 \pm 0,3	1,4 \pm 0,3	0,3 \pm 0,2	0,8
<i>p</i> -Coumarsäuremethylester	n.d.	n.d.	12,3 \pm 8,8	7,0 \pm 4,8	18,9
D-(-)-Chinasäure	n.d.	n.d.	67,6 \pm 8,1	28,2 \pm 7,3	76,1
Phloretin-2'- <i>O</i> -xyloglucosid	36,9 \pm 1,8	64,9 \pm 3,2	12,7 \pm 0,9	6,2 \pm 1,2	16,7
Phloretin-2'- <i>O</i> -glucosid	7,1 \pm 0,7	16,3 \pm 1,6	n.d.	n.d.	n.d.
Phloretin-2'- <i>O</i> - β -glucuronid	n.d.	n.d.	5,6 \pm 1,2	2,5 \pm 0,6	6,7

Substanz	Apfelsaft [mg/L]	Apfelsaft [μmol]	Gesamt- exkretion [μmol]	Exkretion nach 2 h [μmol]	Konzentration im Ileostoma- beutel nach 2 h [μM] ^a
Phloretin	n.d.	n.d.	1,8 ± 0,9	0,7 ± 0,4	1,9
(+)-Catechin	3,0 ± 0,5	10,3 ± 1,7	n.d.	n.d.	n.d.
(-)-Epicatechin	15,0 ± 2,1	51,7 ± 7,2	8,8 ± 1,7	3,8 ± 0,6	10,3
Procyanidin B ₁	5,3 ± 1,6	9,2 ± 2,8	n.d.	n.d.	n.d.
Procyanidin B ₂	9,9 ± 0,3	17,1 ± 0,5	n.d.	n.d.	n.d.
Procyanidin B ₃	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Procyanidin B ₄	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3-O-glucosid	1,8 ± 0,2	3,9 ± 0,4	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3-O-galactosid	1,5 ± 0,3	3,2 ± 0,7	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3-O-xylosid	3,9 ± 0,1	9,0 ± 0,2	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3-O-arabinosid	0,9 ± 0,1	2,1 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2
Quercetin-3-O-rhamnosid	2,7 ± 0,3	6,0 ± 0,7	0,6 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,5
Quercetin	n.d.	n.d.	0,0 ± 0,1	n.d.	n.d.
Anthocyane	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^a Berechnet mit einem mittleren Beutelvolumen von 370 mL.

Kahle und Mitarbeiter konnten zeigen, dass der größte Teil der mit dem naturtrüben Apfelsaft aufgenommenen Polyphenole im Dünndarm absorbiert oder metabolisiert wurde. Zwischen 0 und 33% der aufgenommenen Menge wurden in den Ileostomabeuteln detektiert, das Maximum ihrer Exkretion wurde nach 2 Stunden erreicht. Bei den CQAs kam es zu Umesterungen, außerdem wurden Methylester der Kaffee- und *p*-Coumarsäure gefunden. PhI-XG wurde in den Beuteln detektiert, PhI-G dagegen nicht. Dafür wurden freies PhI und Phloretin-2'-O-glucuronid nachgewiesen. Procyanidin B₁ und B₂ gelangten ebenfalls nicht in die Ileostomabeutel. Von den fünf im Apfelsaft vorkommenden Glycosiden des Ques wurden nur zwei in den Ileostomabeuteln gefunden, freies Que war in Spuren zusätzlich nachweisbar [Kahle *et al.* 2007, Kahle *et al.* 2005b]. Wegen des breiten Spektrums der untersuchten Polyphenole und der Aufnahmemenge von einem Liter Apfelsaft, die realistisch erreicht werden kann, wurden die Ergebnisse dieser Studie als Grundlage für die vorliegende Arbeit verwendet.

2.5 Intestinale Aufnahme- und Transportmechanismen

2.5.1 Mechanismen

Für die intestinale Aufnahme von den Darm erreichenden Stoffen, darunter auch Polyphenole, sind verschiedene Wege möglich. Die Hauptwege sind in Abbildung 2-6 schematisch dargestellt.

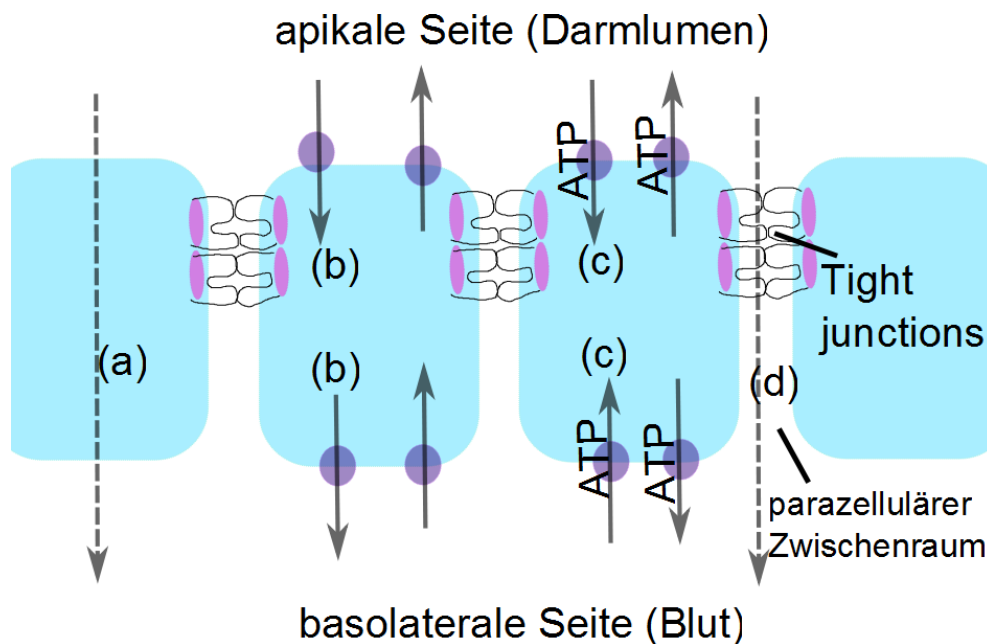


Abbildung 2-6: Verschiedene Wege der intestinalen Absorption: (a) passive transzelluläre Diffusion, (b) erleichterte Diffusion, (c) aktiver Transport, (d) parazelluläre Diffusion (nach [Hunter und Hirst 1997, Mitic *et al.* 2000, Mutschler *et al.* 2008, Shimizu 1999]). Erläuterungen siehe Text. ATP = Adenosintriphosphat.

Wie in Abbildung 2-6 dargestellt, ermöglicht die transzelluläre passive Diffusion (a) die Aufnahme von hydrophoben Substanzen wie fettlöslichen Vitaminen. Die treibende Kraft der einfachen Diffusion ist ein Konzentrationsunterschied der Substanz zwischen den beiden Seiten der Membran. Durch eine Stoffwechselblockade lässt sich die passive Diffusion nicht beeinflussen. Dagegen erfolgt die transzelluläre Diffusion durch verschiedene Bindungsproteine. Man spricht dann von erleichterter Diffusion (b) oder auch Carrier-vermitteltem Transport. Zwischen der meist hydrophilen Substanz und dem Carrier wird ein Komplex gebildet, der den Transport ermöglicht. Auch hier führt eine Stoffwechselblockade nicht zu einer Hemmung des Transports. Die Carriersysteme lassen sich, je nachdem wie der Transport abläuft, in mehrere Typen unterteilen: Uniporter transportieren ein bestimmtes Substrat, Symporter benötigen für den Transport zwei gleichzeitig gebundene Substrate, die zusammen in die gleiche Richtung transportiert werden, Antiporter befördern zwei Substrate in jeweils entgegengesetzte Richtungen. Die Kinetiken der beiden Diffusionen ((a) und (b)) unterscheiden sich voneinander. Im Falle der einfachen Diffusion erhält man bei Auftragung

der Transportgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration eine Gerade, im Falle der erleichterten Diffusion eine Hyperbel. Eine weitere Möglichkeit ist der aktive Transport (c). Hier sind spezielle Transportproteine, die den Durchtritt von Substanzen durch die Membran im Sinne einer Katalyse erleichtern, beteiligt. Beispiele für Transporter vermittelt absorbierte Nahrungsmittelinhaltsstoffe sind Glucose, Aminosäuren, Di- und Tripeptide sowie wasserlösliche Vitamine. Hierbei wird Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) benötigt. Der Transport ist durch Stoffwechselgifte wie Natriumazid hemmbar. Weiterhin ist die parazelluläre Diffusion (d) für wasserlösliche Substanzen zwischen den Zellen hindurch möglich. Sie wird durch die TJs (siehe 2.7) reguliert. Hochmolekulare Substanzen, wie Proteine, werden über Transcytose aufgenommen (nicht in Abbildung 2-6 dargestellt). Dabei werden die Substanzen apikal über Endocytose in die Zelle aufgenommen, in Vesikeln durch die Zelle transportiert und auf der basolateralen Seite über Exocytose wieder abgegeben. Die Transcytose wiederum lässt sich in spezifische Rezeptor vermittelte Systeme und nichtspezifische pinocytotische Systeme unterteilen [Hunter und Hirst 1997, Mutschler *et al.* 2008, Rehner und Daniel 2002, Shimizu 1999].

2.5.2 Transporter-Familien

Im tierischen und humanen Organismus kommt eine Vielzahl von Transportproteinen vor. Nach Literaturangaben kodieren schätzungsweise 7% aller humanen Gene für Transportproteine. Für den gerichteten Transport von Fremdstoffen über polarisierte Zellen, wie sie beispielsweise im Gastrointestinaltrakt vorkommen, sind im Wesentlichen zwei Familien von Proteinen verantwortlich: Transportproteine vom Solute-Carrier-Typ (SLC-Typ) und ATP-Binding-Cassette-Familie-Transporter (ABC-Transporter). Die Transportproteine beider Familien spielen bei der Resorption im Darm, bei der Verteilung in die verschiedenen Gewebe und bei der Ausscheidung eine wichtige Rolle [Mutschler *et al.* 2008, Nishimura und Naito 2005].

Transportproteine vom SLC-Typ transportieren zahlreiche kationische, anionische und ungeladene endogene Substrate sowie Fremdstoffe. In 47 Familien gibt es etwa 350 verschiedene Proteine. Der Transport ist sowohl in die Zelle hinein als auch aus der Zelle heraus möglich [Mutschler *et al.* 2008]. Unter anderem gehören die Familien der Glucosetransporter (GLUT), SGLT und Monocarboxylattransporter (MCT) dazu [Nishimura und Naito 2005].

Transportproteine vom ABC-Typ nutzen Energie aus der Hydrolyse von ATP, um die Substrate entgegen dem Konzentrationsgradienten in die Zelle hinein oder aus der Zelle heraus zu transportieren. Bisher wurden 51 dieser Proteine identifiziert, die in sieben Familien unterteilt werden. Zu ihnen gehören P-Glycoprotein (P-gp), Breast Cancer

Resistance Protein (BCRP) und die Multi Drug Resistance Proteine (MRPs) [Mutschler *et al.* 2008, Nishimura und Naito 2005].

2.5.3 Vorkommen der Transportproteine im Gastrointestinaltrakt

Transporter der SLC- und ABC-Familie kommen im gesamten humanen Gastrointestinaltrakt vor.

2.5.3.1 P-Glycoprotein (P-gp)

Das Protein P-gp ist auf der apikalen Seite der Epithelzellen des Darms lokalisiert und sorgt für die Blockierung der Aufnahme und Erleichterung des Effluxes von amphiphilen Substanzen. Seine Hauptrolle ist die Detoxifizierung, weshalb große Mengen des Proteins auch in der Niere vorliegen [Bremer *et al.* 1992, Comerford *et al.* 2002]. Nachweisbar ist die mRNA von P-gp sowohl im humanen Dünndarm als auch im Kolon [Nishimura und Naito 2005], wobei die Transkriptmenge vom Dünndarm zum Dickdarm hin stufenweise zunimmt [Ayrton und Morgan 2001]. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Englund und Mitarbeitern. Sie fanden im Duodenum und Kolon signifikant gegenüber dem Ileum – das zwischen den anderen beiden Darmabschnitten liegt – erniedrigte mRNA-Mengen [Englund *et al.* 2006]. Auch Seithel *et al.* bestätigten die These, dass die mRNA-Menge von P-gp in Richtung des Kolons zunimmt, nicht. Sie fanden für P-gp im Jejunum höhere Transkriptlevel als im Kolon [Seithel *et al.* 2006]. Die Expression des Transporters variiert in den Zellen des Darms. So ist P-gp in großen Mengen in den Epithelzellen der Zotten zu finden, jedoch nicht in den Kryptenzellen [Ayrton und Morgan 2001]. In der Vergangenheit war P-gp der am meisten untersuchte ABC-Transporter und ihm wurde auch die größte Rolle beim apikalen Efflux von Fremdstoffen zugeschrieben [Ayrton und Morgan 2001, Hunter und Hirst 1997]. Taipalensuu *et al.* zeigten jedoch, dass im humanen Jejunum die Transkriptlevel der apikal lokalisierten Effluxtransporter BCRP und MRP2 höher sind als für P-gp und ihre Rolle eventuell bisher unterschätzt wurde [Taipalensuu *et al.* 2001].

2.5.3.2 Multidrug-Resistance-Proteine (MRP)

Im humanen Dünndarm und Dickdarm sind weiterhin MRP1 bis MRP6 auf Genebene nachweisbar [Maubon *et al.* 2007, Nishimura und Naito 2005]. MRP2 ist auf der apikalen Seite der Epithelzellen lokalisiert, auf der basolateralen Seite findet man MRP1, MRP3, MRP5 und MRP6 [Taipalensuu *et al.* 2001]. Die mRNA von MRP2 war im Duodenum und Ileum nachweisbar, aber nicht im Kolon. Dagegen wurden im Kolon signifikant höhere Mengen an MRP3-mRNA bestimmt [Englund *et al.* 2006]. Diese Ergebnisse wurden von

einer weiteren Arbeitsgruppe bestätigt [Seithel *et al.* 2006]. Hilgendorf *et al.* zeigten, dass die mRNA von MRP2 nicht im Kolon detektierbar ist, für MRP1 und MRP3 bis MRP6 wurden im Jejunum und Kolon etwa gleich große Mengen nachgewiesen [Hilgendorf *et al.* 2007].

2.5.3.3 Brustkrebs-Resistenz-Protein (BCRP)

Das Protein BCRP bzw. seine mRNA wurden im humanen Dünndarm und Dickdarm nachgewiesen [Maubon *et al.* 2007, Nishimura und Naito 2005]. Das Protein ist auf der apikalen Seite der Epithelzellen lokalisiert [Taipalensuu *et al.* 2001]. Die Transkriptlevel der mRNA sind im Jejunum höher als im Kolon [Hilgendorf *et al.* 2007, Seithel *et al.* 2006].

2.5.3.4 Monocarboxylattransporter (MCT)

Aus der Gruppe der SLC-Transporter ist beispielsweise MCT1 im Darm lokalisiert [Maubon *et al.* 2007]. Die mRNA von MCT1 war im Kolon ebenfalls signifikant stärker exprimiert als im Ileum [Englund *et al.* 2006], im Jejunum dagegen aber weniger stark als im Kolon [Seithel *et al.* 2006]. Im Gegensatz dazu fand die Arbeitsgruppe um Hilgendorf etwa gleiche mRNA-Level in Jejunum und Kolon [Hilgendorf *et al.* 2007]. MCT-Transporter wurden auf beiden Seiten der polarisierten Epithelzellen nachgewiesen [Watanabe *et al.* 2006].

Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen den humanen Darmabschnitten wurden in drei verschiedenen Studien untersucht [Englund *et al.* 2006, Hilgendorf *et al.* 2007, Seithel *et al.* 2006]. Ein Vergleich zwischen den Studien der drei Gruppen ist jedoch schwierig, da die Gruppen um Hilgendorf und Seithel die Transkriptlevel in Jejunum und Kolon untersuchten, die Gruppe um Englund dagegen Duodenum, Ileum und Kolon. Dennoch kann zusammenfassend gesagt werden, dass die Transkriptlevel der verschiedenen Transporter sich zwischen den Darmabschnitten unterscheiden.

2.5.4 Interaktionen von Flavonoiden mit Transportern

Die Effekte von Flavonoiden auf ABC-Transporter wurden von Morris und Zhang zusammengefasst. *In vitro* zeigten zahlreiche Flavonoide einen Einfluss auf die Absorption von Arzneistoffen über P-gp und BCRP. In Tier- und Humanstudien wurden Interaktionen der Flavonoide auf die Transporter festgestellt, die an der Aufnahme von konventionell eingesetzten Arzneistoffen beteiligt sind. Dadurch können Aufnahme, Verteilung, Metabolismus und Eliminierung der Arzneistoffe beeinflusst werden, was für den Patienten von Nachteil sein kann [Morris und Zhang 2006].

2.5.5 Transportproteine und chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Es wird vermutet, dass P-gp vor der Entstehung von CED schützt. So wurde berichtet, dass Knockout-Mäuse, welche die Gene für P-gp und MRP1 nicht besitzen, häufiger CED entwickelten. Weiterhin hatten P-gp-Knockout-Mäuse eine höhere Inzidenz, Darmentzündungen zu entwickeln, vor denen die Mäuse aber durch die Gabe von Antibiotika geschützt werden konnten. Die Ergebnisse zeigten, dass P-gp vor einer Akkumulation von bakteriellen Stoffwechselprodukten schützt. Ferner waren MRP1-Knockout-Mäuse anfälliger für die Induzierung einer Darmentzündung als die Wildtyp-Mäuse. Da bei dem verwendeten Modell die Entzündung wahrscheinlich durch oxidativen Stress verursacht wird, zeigten die Ergebnisse dieses Versuchs, dass MRP1 eine wichtige Rolle entweder bei der Detoxifizierung des verwendeten induzierenden Agens oder der oxidativen Metabolite spielt (zusammengefasst von [Leslie *et al.* 2005]).

2.6 Modelle zur intestinalen Absorption und Metabolismus von Polyphenolen

Um intestinale Absorption und Metabolismus von Fremdstoffen *in vitro* zu untersuchen, sind verschiedene humane intestinale Zelllinien eingesetzt worden, welche die funktionale und morphologische Organisation des intestinalen Epitheliums z. T. simulieren. Die am häufigsten verwendete Zelllinie ist die Caco-2-Kolonkarzinomzelllinie. Eine weitere Kolonkarzinomzelllinie ist T84. Sie wurde hauptsächlich in Studien verwendet, in denen funktionale und molekulare Eigenschaften von intestinalen Epithelien untersucht wurden [Sambruy *et al.* 2001].

Um *in vitro*-Untersuchungen durchzuführen, gibt es zwei geeignete Versuchsaufbauten. Meist wird ein statisches System verwendet, bei dem die permeablen Filter, auf denen die Zellmonolayer angewachsen sind, in einer Well-Platte angebracht sind (siehe Abbildung 2-7). Dadurch kommt es zur Ausbildung eines apikalen (oben) und eines basolateralen Bereichs (unten). Zur Inkubation werden die Well-Platten in einen Brutschrank bei 37 °C gestellt.

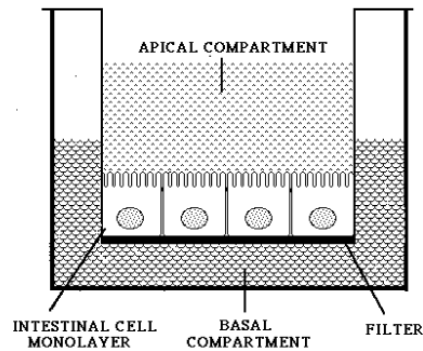


Abbildung 2-7: Schematische Darstellung des statischen Systems zur Untersuchung der transepithelialen Absorption mit Zellmonolayern. Die Zellmonolayer sind auf Filtern angewachsen, oben befindet sich der apikale Bereich, unten der basolaterale (aus [Sambruy et al. 2001]).

Ein weiteres System ist die Ussing-Kammer, die nach ihrem Entwickler Hans Ussing benannt wurde. Sie erlaubt Versuche zu Barrierefunktion und Transport von Ionen und anderen Molekülen mit biologischen Membranen oder Zellschichten in einem dynamischen System [Ussing und Zerahn 1951]. Der schematische Aufbau der Ussing-Kammer ist in Abbildung 2-8 dargestellt. Durch das Aufspannen eines Zellmonolayers, gewachsen auf permeablen Snapwell-Inserts, oder eines Gewebestücks (D) entsteht die Teilung der Kammer in eine apikale (A) und eine basolaterale Seite (B). Die beiden Kammern werden mit dem Inkubationsmedium befüllt, das während der Inkubation durch ein Thermostat auf 37 °C temperiert wird. Außerdem werden beide Kammerhälften mit sogenanntem Carbogengas (95% O₂, 5% CO₂) begast (C), was zu einer kontinuierlichen Bewegung des Inkubationsmediums führt. Über die gewebefernen Elektroden (E) werden in regelmäßigen Zeitabständen definierte Strompulse ΔI ausgelöst. Daraus resultieren kurzzeitige Änderungen der Potentialdifferenz ΔPD , die von den gewebe nahen Elektroden (F) erfasst werden. Nach dem Ohmschen Gesetz wird aus diesen Daten der Widerstand des Gewebes (transepithelialer Widerstand, TER) ermittelt: $TER = \Delta PD / \Delta I$.

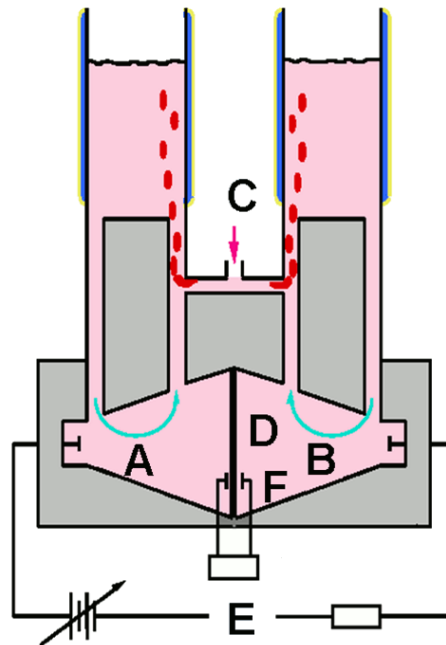


Abbildung 2-8: Schematischer Aufbau der in den Transportexperimenten verwendeten Ussing-Kammer. A: apikale Seite, B: basolaterale Seite, C: Begasung (95% O₂, 5% CO₂), D: Zellmonolayer/ Gewebe, E: gewebeferne Elektroden, F: gewebeernahe Elektroden.

Für Polyphenole sind in der Vergangenheit eine Reihe von Untersuchungen zu Transport, Aufnahme in die Zelle und Metabolismus durchgeführt worden. Die Ergebnisse der einzelnen Studien sind in den folgenden Kapiteln (2.6.1 bis 2.6.3) in Tabellen zusammengefasst. Dargestellt sind nur die Studien, bei denen die Zugabe der Polyphenole auf der apikalen Seite erfolgte.

2.6.1 Absorptionsstudien in der Zellkultur

In Tabelle 2-3 sind Untersuchungen zur intestinalen Absorption im Zellkulturmodell zusammengefasst.

Von zahlreichen Gruppen wurde in einem statischen Caco-2-Modell der Transport der Hydroxycimtsäuren Ferula-, *p*-Coumar-, *m*-Coumar-, Kaffee-, 3,4-Dihydroxyphenylpropion-, Dihydrokaffeesäure und 5-CQA von der apikalen auf die basolaterale Seite untersucht. Bei allen Substanzen fand eine Absorption statt. In Gegenwart eines Protonengradienten, d.h. eines pH-Werts von 6,0 auf der apikalen Seite und 7,4 auf der basolateralen Seite wurde eine erhöhte Transportrate beobachtet [Dupas *et al.* 2006, Konishi 2005, Konishi und Kobayashi 2004a, Konishi und Kobayashi 2004b, Konishi *et al.* 2003, Konishi und Shimizu 2003]. Bestätigt wurden die Ergebnisse in einem Monolayer bestehend aus kokultivierten Caco-2- und HT29-MTX-Zellen für Ferulasäure [Poquet *et al.* 2008b].

Für das Flavonol Que wurde ein Transport von apikal nach basolateral sowie in umgekehrter Richtung über Caco-2-Monolayer ermittelt [Cai und Bennick 2006, Tian *et al.* 2009, Walgren *et al.* 1998]. Widersprüchlich dazu sind Ergebnisse von Tammela *et al.*, die Que jedoch nicht auf der basolateralen Seite nachweisen konnten [Tammela *et al.* 2004]. Für Quercetin-4'-glucosid (Que-4'-G) wurde keine Absorption auf die basolaterale Seite nachgewiesen, bei Inkubation mit Quercetin-3,4'-diglucosid dagegen wurden geringe Mengen der inkubierten Verbindung auf der basolateralen Seite ermittelt [Walgren *et al.* 1998]. Que-R wurde nach apikaler Applikation ebenfalls basolateral nachgewiesen, die Absorption war aber geringer als die des Aglykons Que [Tian *et al.* 2009].

Für (-)-Epicatechin (Epi) und (+)-Catechin (Cat) wurde nach apikaler Zugabe im Caco-2-Modell keine Absorption beobachtet. Nach Zugabe auf der basolateralen Seite war jedoch ein Transport auf die apikale Seite detektierbar [Tammela *et al.* 2004, Vaidyanathan und Walle 2001, Zhang *et al.* 2004].

Hesperetin, ein in Citrusfrüchten vorkommendes Flavonoid, wurde nach Applikation auf der apikalen Seite auf der basolateralen Seite von Caco-2-Monolayern detektiert, in Gegenwart eines Protonengradienten war die Transportrate stark erhöht [Brand *et al.* 2008, Kobayashi *et al.* 2008]. Das korrespondierende Rutinosid wurde in geringem Maße ebenfalls absorbiert, hier war die Rate in Gegenwart des Protonengradienten geringer [Kobayashi *et al.* 2008]. Kim *et al.* untersuchten den Transport einer Mischung aus Hesperidinglucosiden (Mono- bis Pentaglucosid) im Caco-2-Monolayermodell. Die Glucoside wurden basolateral identifiziert, wobei sie im selben Verhältnis basolateral nachweisbar waren, wie sie apikal inkubiert wurden [Kim *et al.* 1999].

Steinert *et al.* untersuchten den Transport einer Mischung aus Anthocyanen aus der schwarzen Johannisbeere (*Ribes nigrum* L.) in Caco-2-Monolayern. Es wurden keine Anthocyane auf der basolateralen Seite detektiert, es wurde jedoch eine Abnahme auf der apikalen Seite beobachtet. Dies ließ auf eine teilweise Absorption in die Zellen schließen. Zum größten Teil war der Verlust der Anthocyane aber auf ihre Instabilität im Inkubationsmedium zurückzuführen (siehe 2.6.5) [Steinert *et al.* 2008]. Nach Inkubation eines Anthocyanidinmonoglucosid haltigen Extrakts aus Schalen der roten Traube (*Vitis vinifera*) wurden Anthocyane auf der basolateralen Seite detektiert [Faria *et al.* 2009].

Tabelle 2-3: *In vitro*-Zellkulturstudien zum Transport von Polyphenolen. Der absorbierte Anteil [%] der Polyphenole (ohne Protonengradient) ist von der apikalen auf die basolaterale Seite angegeben. t = Inkubationszeit, c = Inkubationskonzentration, n.d. = nicht detektierbar, n.a. = nicht angegeben, 5-CQA = 5-Kaffeoylchinasäure, EGCG = (-)-Epigallocatechin-3-gallat.

Substanz	absorbierter Anteil	t	c	Zelllinie	Referenz
Hydroxyzimtsäuren					
Kaffeensäure	0,20 ± 0,01%	40 min	5 mM	Caco-2	[Konishi und Kobayashi 2004b]
5-CQA	0,12 ± 0,02%	40 min	5 mM	Caco-2	[Konishi und Kobayashi 2004b]
5-CQA	0,14 ± 0,04%	60 min	5 mM	Caco-2	[Dupas <i>et al.</i> 2006]
<i>p</i> -Coumarsäure	1,55 ± 0,19%	40 min	1 mM	Caco-2	[Konishi <i>et al.</i> 2003]
<i>m</i> -Coumarsäure	1,34 ± 0,04%	40 min	1 mM	Caco-2	[Konishi und Kobayashi 2004a]
3,4-Dihydroxyphenylpropion-säure	0,40 ± 0,10%	40 min	5 mM	Caco-2	[Konishi und Kobayashi 2004a]
Dihydrokaffeensäure	0,22 ± 0,06%	40 min	5 mM	Caco-2	[Konishi 2005]
Ferulasäure	3,42 ± 0,18%	40 min	5 mM	Caco-2	[Konishi und Shimizu 2003]
Ferulasäure	9,4%*	60 min	30 µM	Caco-2/HT29 -MTX Cokultur	[Poquet <i>et al.</i> 2008b]
Dihydroferulasäure	0,83 ± 0,13%	40 min	1 mM	Caco-2	[Konishi 2005]
Flavonole					
Quercetin	1,8%*	60 min	50 µM	Caco-2	[Walgren <i>et al.</i> 1998]
Quercetin	n.d.	90 min	n.a.	Caco-2	[Tammela <i>et al.</i> 2004]
Quercetin	0,4%*	60 min	10 µM	Caco-2	[Cai und Bennick 2006]
Quercetin	4,3%*	60 min	50 µM	Caco-2	[Tian <i>et al.</i> 2009]
Quercetin-4'-glucosid	n.d.	180 min	50 µM	Caco-2	[Walgren <i>et al.</i> 1998]
Quercetin-3,4'-diglucosid	0,02%*	60 min	50 µM	Caco-2	[Walgren <i>et al.</i> 1998]
Que-rha	0,9%*	60 min	50 µM	Caco-2	[Tian <i>et al.</i> 2009]

Substanz	absorbierter Anteil	t	c	Zelllinie	Referenz
Flavan-3-ole					
(-)-Epicatechin	n.d.	180 min	10 - 50 µM	Caco-2	[Vaidyanathan und Walle 2001]
(-)-Epicatechin	0,3%*	180 min	50 µM	Caco-2	[Zhang <i>et al.</i> 2004]
(-)-Epicatechin	n.d.	90 min	n.a.	Caco-2	[Tammela <i>et al.</i> 2004]
(+)-Catechin	n.d.	90 min	n.a.	Caco-2	[Tammela <i>et al.</i> 2004]
weitere Flavonoide					
Hesperitin	ca. 10%	120 min	10 µM	Caco-2	[Brand <i>et al.</i> 2008]
Hesperetin	23,1 ± 2,84%	40 min	500 µM	Caco-2	[Kobayashi <i>et al.</i> 2008]
Hesperidin	0,58 ± 0,08%	40 min	500 µM	Caco-2	[Kobayashi <i>et al.</i> 2008]
Mischung aus Hesperidin-glucosiden	2%	120 min	16,38 mM	Caco-2	[Kim <i>et al.</i> 1999]
Anthocyane der schwarzen Johannisbeere	n.d.	80 min	180 µM	Caco-2	[Steinert <i>et al.</i> 2008]
Anthocyanidin-monoglucosid-extrakt aus roten Trauben	1,77 ± 0,36%	120 min	378 µM	Caco-2	[Faria <i>et al.</i> 2009]

* Errechnet aus den Permeabilitätsraten, die in den Quellen angegeben waren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwischen 0 und 23% der inkubierten Menge der Polyphenole die basolaterale Seite der Monolayer erreichten. Bei der Durchführung der Versuche gab es aber Unterschiede zwischen den Arbeitsgruppen hinsichtlich der Inkubationsdauer und -konzentration. Die Absorption von Que und Epi wurde von mehreren Arbeitsgruppen untersucht, die Absorption von Que auf die basolaterale Seite lag zwischen 0 und 4,3%. Bei Epi fanden zwei Arbeitsgruppen keinen Transport, eine dagegen detektierte 0,3% auf der basolateralen Seite.

Bei einem Teil der vorgestellten Studien wurde zusätzlich untersucht, ob es während der Inkubation zur Bildung von Metaboliten kam. Diese Ergebnisse sind in Kapitel 2.6.3 zusammengefasst.

Um Aussagen darüber treffen zu können, ob es sich bei der Absorption der Polyphenole um aktiven Transport oder passive Diffusion handelt, wurden metabolische Inhibitoren oder für einzelne Transportproteine selektive Hemmstoffe bei der Inkubation eingesetzt. Abbildung 2-9 gibt eine Übersicht, auf welcher Seite der Epithelzellen die Transportproteine lokalisiert sind.

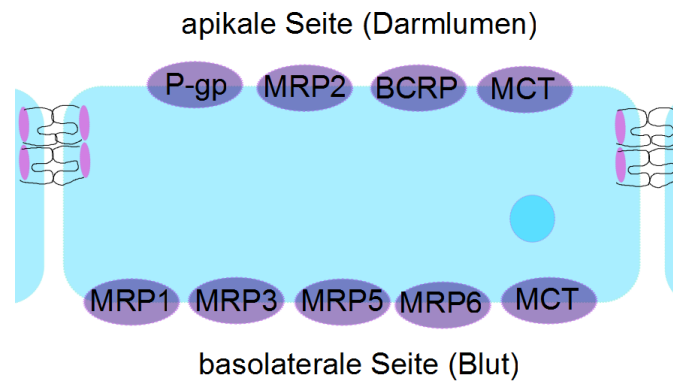


Abbildung 2-9: Übersicht über die Lokalisierung der in humanen intestinalen Epithelzellen nachgewiesenen Transporter. P-gp = P-Glycoprotein, MRP = Multisubstanz-Resistenz-Protein, BCRP = Brustkrebs-Resistenz-Protein, MCT = Monocarboxylattransporter (nach [Bremer *et al.* 1992, Taipalensuu *et al.* 2001, Watanabe *et al.* 2006]).

Für Ferulasäure wurde durch den Einsatz von selektiven Inhibitoren gezeigt, dass die Absorption durch passive transzelluläre Diffusion und erleichterten Transport über MCT und den Natrium-abhängigen Monocarboxylattransporter (S-MCT) erfolgen kann. Die Inkubation der Metabolite Ferulasäureglucuronid und Dihydroferulasäure mit verschiedenen selektiven Inhibitoren wies darauf hin, dass ein MRP-Transporter für den Efflux dieser Metabolite verantwortlich ist. Inkubationen mit einem P-gp-Inhibitor legten außerdem nahe, dass P-gp für einen apikalen Efflux dieser Metabolite sorgt [Poquet *et al.* 2008b].

Im Fall von Epi wurde P-gp als Effluxtransporter auf der apikalen Seite ausgeschlossen, MRP2 dagegen scheint in den Rücktransport von Epi auf die apikale Seite involviert zu sein [Vaidyanathan und Walle 2001].

Für in Caco-2-Zellen gebildete Metaboliten von Grüntee catechinen wurde beschrieben, dass Proteine aus der Gruppe der MRP am Efflux auf die basolaterale Seite beteiligt sind [Zhang *et al.* 2004].

Die Arbeitsgruppe um Konishi sammelte Belege für einen aktiven Transport verschiedener Hydroxymitsäuren über MCT, von dem auf beiden Seiten der polarisierten Epithelzellen bisher 14 Isoformen identifiziert wurden. Gleichzeitig findet eine parazelluläre Diffusion statt [Konishi 2005, Konishi und Kobayashi 2004a, Konishi und Kobayashi 2004b, Konishi *et al.* 2003, Konishi und Shimizu 2003, Watanabe *et al.* 2006]. Exemplarisch belegte die Arbeitsgruppe anhand von *p*-Coumarsäure, dass MCT1 jedoch nicht in den Transport der Phenolsäuren involviert ist [Watanabe *et al.* 2006]. Für das Citrusflavonoid Hesperidin fand

die Gruppe eine parazelluläre Diffusion, das Aglykon Hesperetin dagegen gelangte durch transzelluläre Diffusion und einen Protonen gekuppelten, Energie abhängigen polarisierten Transport auf die basolaterale Seite. Ein in Frage kommender Transporter ist MCT, auch wenn es sich bei Hesperetin nicht um eine Carboxylsäure handelt [Kobayashi *et al.* 2008].

Für Que wurde eine passive Diffusion durch die Zelle (transzellulär) auf die basolaterale Seite vorgeschlagen [Walgren *et al.* 1998]. Bei der Inkubation von Hesperidinglycosiden wurde dagegen eine parazelluläre Diffusion postuliert [Kim *et al.* 1999].

Für Anthocyane wurde kürzlich beschrieben, dass ihre Absorption mit Hilfe des GLUT2, der sowohl in der apikalen als auch der basolateralen Membran exprimiert wird, erfolgen könnte [Faria *et al.* 2009].

Diese Studien zusammenfassend lässt sich sagen, dass verschiedene Transportmechanismen für die transepitheliale Absorption der Polyphenole vorgeschlagen wurden. Zum Teil wurden Hinweise auf eine passive Diffusion beschrieben. Einige Arbeitsgruppen belegten, dass es sich um parazelluläre Diffusion handelt, andere, dass es sich um transzelluläre Diffusion handelt. Als aktive Transporter, die in die Absorption der Polyphenole und ihrer Metabolite involviert sind, wurden P-gp, MRPs und MCTs beschrieben.

2.6.2 Studien zur Aufnahme in die Zelle

Die Aufnahme der inkubierten Polyphenole in die Zelle wurde in einer Reihe von Untersuchungen (siehe Tabelle 2-4) bestimmt. Dabei wurden verschiedene Methoden verwendet, um die intrazellulären Konzentrationen der Polyphenole zu bestimmen.

Im Folgenden werden die verwendeten Methoden zur Aufarbeitung kurz vorgestellt, die Ergebnisse sind Tabelle 2-4 zu entnehmen.

Die Arbeitsgruppe um Konishi wusch den Monolayer nach Beendigung der Inkubation mit dem polyphenolfreien Inkubationsmedium, gefolgt von einer 30-minütigen Extraktion mit einem Puffer aus Methanol und Natriumacetat. Auf diese Weise wurde die Aufnahme von Kaffeesäure, 5-CQA, *p*-Coumarsäure, *m*-Coumarsäure, 3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure, Dihydrokaffeesäure, Ferulasäure, Dihydroferulasäure, Hesperetin und Hesperidin in Caco-2-Zellen gemessen [Kobayashi *et al.* 2008, Konishi 2005, Konishi und Kobayashi 2004a, Konishi und Kobayashi 2004b].

Alternativ wurde die Que-Konzentration in Caco-2-Zellen nach mehreren Denaturierungs-, Ultraschall- und Zentrifugationsschritten bestimmt [Ikeno *et al.* 1999].

Die Verteilung des inkubierten Polyphenols (in diesem Fall radioaktiv markiertes EGCG) zwischen Cytoplasma und Membranfraktion wurde von Hong *et al.* untersucht. Nach mehrmaligem Waschen, Einfrieren und Auftauen in saurer Ascorbinsäurelösung wurde die

Zellsuspension bei 10.000 g für 20 Minuten zentrifugiert. Im Überstand befand sich die Cytoplasma-Fraktion, während in Niederschlag die Membranfraktionen gelangten. Die Ermittlung des Gehalts an Polyphenol erfolgte mittels Szintillationszähler [Hong *et al.* 2002]. Von einer weiteren Arbeitsgruppe wurde die Extraktion mit purem Methanol gewählt, um die Gehalte von Epi und Cat in Caco-2-Zellen zu bestimmen [Vaidyanathan und Walle 2003].

Tabelle 2-4: *In vitro*-Zellkulturstudien zur Aufnahme [%] von Polyphenolen in die Zelle. Die Inkubation erfolgte auf der apikalen Seite. t = Inkubationsdauer, c = Inkubationskonzentration, Ex = Art der Extraktion, n.d. = nicht detektierbar, n.a. = nicht angegeben, 5-CQA = 5-Kaffeoylchinasäure, EGCG = (-)-Epigallocatechin-3-gallat.

Substanz	Aufnahme in die Zellen	t	c	Zelllinie	Ex	Referenz
Hydroxyzimtsäuren						
Kaffeesäure	0,25 ± 0,02%	40 min	5 mM	Caco-2	^a	[Konishi und Kobayashi 2004b]
5-CQA	0,12 ± 0,17%	40 min	5 mM	Caco-2	^a	[Konishi und Kobayashi 2004b]
<i>p</i> -Coumarsäure	0,12 ± 0,01%	40 min	1 mM	Caco-2	^a	[Konishi <i>et al.</i> 2003]
<i>m</i> -Coumarsäure	0,12 ± 0,09%	40 min	1 mM	Caco-2	^a	[Konishi und Kobayashi 2004a]
3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure	0,20 ± 0,04%	40 min	5 mM	Caco-2	^a	[Konishi und Kobayashi 2004a]
Dihydrokaffeesäure	0,13 ± 0,05%	40 min	5 mM	Caco-2	^a	[Konishi 2005]
Ferulasäure	0,06 ± 0,01%	40 min	5 mM	Caco-2	^a	[Konishi und Shimizu 2003]
Dihydroferulasäure	0,13 ± 0,03%	40 min	1 mM	Caco-2	^a	[Konishi 2005]
Flavanole						
Quercetin	1056 ± 210 pmol/mg Protein	60 min	10 mM	Caco-2	^b	[Ikeno <i>et al.</i> 1999]
Flavan-3-ole						
(-)-Epicatechin	n.d.	60 min	50 µM	Caco-2	^c	[Vaidyanathan und Walle 2003]
(+)-Catechin	100 pmol/mg Protein	60 min	50 µM	Caco-2	^c	[Vaidyanathan und Walle 2003]
EGCG	ca. 260 pmol/mg Protein	180 min	5 µM	HT-29	^d	[Hong <i>et al.</i> 2002]
weitere Flavonoide						
Hesperetin	1,62 ± 0,27%	40 min	500 µM	Caco-2	^a	[Kobayashi <i>et al.</i>

Substanz	Aufnahme in die Zellen	t	c	Zelllinie	Ex	Referenz
Hesperidin	0,85 ± 0,37%	40 min	500 µM	Caco-2	^a	[Kobayashi <i>et al.</i> 2008] [Kobayashi <i>et al.</i> 2008]

^a Monolayer wurden 30 Minuten mit Methanol/5% Methanol in 50 mM Natriumacetat (pH 3,0 mit Phosphorsäure) (10/1) extrahiert und mittels HPLC-elektrochemischem Detektor vermessen.

^b Monolayer wurden in 200 mM Acetatpuffer (pH 5,0) suspendiert, 30 Minuten bei 0 °C ins Ultraschallbad gestellt, mit Triton X-100 verdünnt, erneut für 60 Minuten bei 0 °C ins Ultraschallbad gestellt, mit Methanol/Essigsäure (100/5) verdünnt, nach Vermischen bei 5.000 g zentrifugiert und der Überstand nach Verdünnung mittels HPLC-elektrochemischem Detektor vermessen.

^c Monolayer wurden zweimal mit Methanol extrahiert, nach Zentrifugation bei 14.000 g für 2 Minuten wurden die vereinigten Überstände abgedampft und der Rückstand in HPLC-Lösemittel aufgenommen und mittels HPLC-DAD vermessen.

^d Die Inkubation erfolgte mit radioaktiv markiertem Polyphenol. Die Monolayer wurden mit 0,2 N Natronlauge lysiert, mit 0,1% Ascorbinsäurelösung (pH 4) versetzt und dreimal eingefroren und wieder aufgetaut. Nach dreimaliger Behandlung für 3 Minuten im Ultraschallbad wurden die Zellen bei 10.000 g zentrifugiert. Im Überstand befand sich die Cytoplasmafraktion, im Niederschlag die Membranfraktion. Der Niederschlag wurde in 0,2 N Natronlauge lysiert. Beide Suspensionen wurden mittels Szintillationszähler vermessen.

Bei allen in Tabelle 2-4 dargestellten Studien mit Polyphenolen wurde eine Aufnahme in die Zellen beobachtet. Eine Ausnahme bildete Epi, das nicht in den Zellen detektiert wurde. Der Gehalt lag in allen Fällen (außer für Hesperetin) unter 1% der inkubierten Menge.

Es ist anzumerken, dass die Methode der Extraktion der Zellmonolayer nur bedingt Rückschlüsse auf den intrazellulären Polyphenolgehalt zulässt, da nicht nachweisbar ist, ob tatsächlich der gesamte Polyphenolgehalt der Zellen erfasst wurde. Bei der Homogenisierung der kompletten Zellmonolayer wird zudem auch der Anteil der Polyphenole erfasst, der nur an die Zellen assoziiert vorliegt.

2.6.3 Studien zum Metabolismus in der Zellkultur

Eine Metabolisierung der mit der Nahrung aufgenommenen Polyphenole kann in den intestinalen Epithelzellen stattfinden. Dies wurde in einigen Studien *in vitro* an humanen Kolonkarzinomzelllinien untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2-5 zusammengefasst. Über die Fähigkeit der meist verwendeten Caco-2-Zelllinie, Glucuronide zu bilden, herrscht Unstimmigkeit. Mehrere Arbeitsgruppen beschrieben die Konjugation von Polyphenolen mit Glucuronsäure [Brand *et al.* 2008, Ikeno *et al.* 1999, Kern *et al.* 2003], wohingegen andere Arbeitsgruppen lediglich die Konjugation mit Sulfat beobachteten [Poquet *et al.* 2008a, Poquet *et al.* 2008b, Zhang *et al.* 2004]. Ferner wurden methoxylierte sowie dehydrierte Verbindungen nachgewiesen.

Kern *et al.* detektierten nach der Inkubation (24 Stunden) von *p*-Coumar-, Kaffee- und Ferulasäuremethylester mit Caco-2-Zellen die freien Säuren sowie ihre Glucuronide und Sulfate. Bei Inkubation mit den korrespondierenden freien Säuren war jedoch nur bei Kaffee-

und Ferulasäure eine Konjugation mit Sulfat nachweisbar, bei *p*-Coumarsäure wurden keine Metabolite detektiert [Kern *et al.* 2003]. Nach Inkubation einer Kokultur aus Caco-2- und HT29-MTX-Zellen mit Dihydrokaffeesäure wurde die Bildung von zwei Dihydrokaffeesäureglucuroniden (*meta*- und *para*-), Dihydroferulasäureglucuronid, Dihydrokaffeesäuresulfat und Dihydroferulasäure im Mediumüberstand beobachtet. Bei Inkubation von Ferulasäure in dieser Kokultur wurden ebenfalls ein Sulfat, ein Glucuronid und Dihydroferulasäure nachgewiesen. Bei alleiniger Inkubation von Caco-2-Zellen mit Ferulasäure dagegen waren die entsprechenden Glucuronide nicht nachweisbar [Poquet *et al.* 2008a, Poquet *et al.* 2008b].

Ikeno *et al.* wiesen nach Inkubation von Que (10 mM) in Caco-2-Monolayern methyliertes Que (Isorhamnetin) in den Zellhomogenaten nach. Nach Behandlung der Homogenate mit Sulfatase, die auch eine β -Glucuronidase-Aktivität aufwies, wurde ein Ansteigen des Que-Peaks beobachtet, obwohl die Peaks der Konjugate im ursprünglichen Chromatogramm nicht identifizierbar waren. Aus vorhergehenden Versuchen mit Sulfatase in Gegenwart eines β -Glucuronidaseinhibitors wurde angenommen, dass der größte Teil der gebildeten Konjugate Glucuronide waren [Ikeno *et al.* 1999]. Tammela *et al.* bestätigten die Bildung dieser Metabolite bei der Inkubation von Que in Caco-2-Monolayern jedoch nicht [Tammela *et al.* 2004].

Nach apikaler Zugabe von Epi zu Caco-2-Monolayern wurde keine Metabolisierung beobachtet. Im Gegensatz dazu wurden nach basolateraler Zugabe Metabolite detektiert, bei denen es sich wahrscheinlich um Sulfate handelte [Vaidyanathan und Walle 2001]. Die Arbeitsgruppe um Zhang bestätigte diese Annahme, indem sie (-)-Epicatechinsulfat, Methyl(-)-epicatechin und Methyl(-)-epicatechinsulfat auf der apikalen Seite detektierte [Zhang *et al.* 2004]. Hong *et al.* wiesen nach 2-stündiger Inkubation mit der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 ein Glucuronid und ein methyliertes Derivat des Grüntee-catechins EGCG nach [Hong *et al.* 2002].

Bei der Inkubation des Citrusflavonons Hesperetin in der Caco-2-Zelllinie wurde ein Glucuronid und ein Sulfat identifiziert [Brand *et al.* 2008]. Weiterhin wurden durch eine andere Gruppe Hesperidinglucoside (Mono- bis Pentaglusid) im Caco-2-Monolayermodell inkubiert. Die Behandlung mit dekonjugierenden Enzymen (Sulfatase und Glucuronidase) zeigte, dass während der Inkubation keine Konjugate der Hesperidinglucoside entstanden [Kim *et al.* 1999].

Tabelle 2-5: *In vitro*-Zellkulturstudien zum Metabolismus von Polyphenolen. t = Inkubationsdauer, c = Inkubationskonzentration, n.d. = nicht detektierbar, n.a. = nicht angegeben, 5-CQA = 5-Kaffeoylchinasäure, EGCG = (-)-Epigallocatechin-3-gallat.

Substanz	nachgewiesene Metabolite	t	c	Zelllinie	Referenz
Hydroxyzimtsäuren					
<i>p</i> -Coumarsäure	n.d.	24 h	50 µM	Caco-2	[Kern <i>et al.</i> 2003]
<i>p</i> -Coumarsäure-methylester	<i>p</i> -Coumarsäure, <i>p</i> -Coumarsäure-methylesterglucuronid, <i>p</i> -Coumarsäuremethylestersulfat	24 h	50 µM	Caco-2	[Kern <i>et al.</i> 2003]
Kaffeesäure	Ferulasäure, Isoferulasäure	24 h	50 µM	Caco-2	[Kern <i>et al.</i> 2003]
Kaffeesäure-methylester	Kaffeesäure, Ferulasäure, Isoferulasäure, Kaffeesäuremethylestersulfat, Kaffeesäuremethylesterglucuronid	24 h	50 µM	Caco-2	[Kern <i>et al.</i> 2003]
Dihydrokaffeesäure	Dihydrokaffeesäureglucuronide, Dihydroferulasäureglucuronid, Dihydrokaffeesäuresulfat, Dihydroferulasäure	180 min	100 µM	Caco-2/ HT29- MTX Cokultur	[Poquet <i>et al.</i> 2008a]
Dihydrokaffeesäure	Dihydrokaffeesäuresulfat, Dihydroferulasäure	180 min	100 µM	Caco-2	[Poquet <i>et al.</i> 2008a]
Ferulasäure	Ferulasäuresulfat	24 h	50 µM	Caco-2	[Kern <i>et al.</i> 2003]
Ferulasäure-methylester	Ferulasäure, Ferulasäuresulfat, Ferulasäuremethylestersulfat, Ferulasäuremethylesterglucuronid	24 h	50 µM	Caco-2	[Kern <i>et al.</i> 2003]
Ferulasäure	Ferulasäureglucuronid, Ferulasäuresulfat, Dihydroferulasäure	60 min	30 µM	Caco-2/ HT29- MTX Cokultur	[Poquet <i>et al.</i> 2008b]
Ferulasäure	Ferulasäuresulfat, Dihydroferulasäure	60 min	30 µM	Caco-2	[Poquet <i>et al.</i> 2008b]
Flavonole					
Quercetin	3'-O-Methylquercetin, Quercetinsulfat, Quercetinglucuronid	60 min	10 mM	Caco-2	[Ikeno <i>et al.</i> 1999]
Quercetin	n.d.	90 min	n.a.	Caco-2	[Tammela <i>et al.</i> 2004]
Flavan-3-ole					
(-)-Epicatechin	n.d.	180 min	10 - 50 µM	Caco-2	[Vaidyanathan

Substanz	nachgewiesene Metabolite	t	c	Zelllinie	Referenz
		min	µM		und Walle 2001]
(-)-Epicatechin	(-)-Epicatechinsulfat, Methyl(-)- epicatechinsulfat, Methyl(-)- epicatechin	180 min	50 µM	Caco-2	[Zhang <i>et al.</i> 2004]
EGCG	4''-Methyl-EGCG, EGCG-4''- glucuronid	120 min	10 µM	HT-29	[Hong <i>et al.</i> 2002]
weitere Flavonoide					
Hesperitin	Hesperitin-7-O-glucuronid, Hesperitin-7-O-sulfat	120 min	10 µM	Caco-2	[Brand <i>et al.</i> 2008]
Mischung aus Hesperidin- glucosiden	n.d.	120 min	16,38 mM	Caco-2	[Kim <i>et al.</i> 1999]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den *in vitro*-Studien zum intestinalen Metabolismus von Polyphenolen mit unterschiedlichen Zellkulturen verschiedene Konjugate detektiert wurden. Nur in einzelnen Fällen war keine Metabolisierung nachweisbar. Identifiziert wurden Glucuronide, Sulfate und methoxylierte und dehydrierte Verbindungen.

2.6.4 *Ex vivo*-Studien zum intestinalen Transport und Metabolismus

Ergänzend zu den beschriebenen *in vitro*-Studien mit humanen intestinalen Karzinomzelllinien wurden *ex vivo*-Versuche mit Darmsegmenten von Ratten durchgeführt. Bei ihnen handelt es sich nicht um Zelllinien, die nur aus einer Art von Zellen bestehen. Gegenüber Tierversuchen mit lebenden Tieren besteht der Vorteil von *ex vivo*-Studien darin, dass direkt das betreffende Segment untersucht und Aufschluss darüber gewonnen werden kann, welche Reaktionen dort erfolgen.

Transport und Metabolismus von Quercetin-3-O-glucosid (Que-G) und Quercetin-3-O-glucorhamnosid (Que-GR) wurden in Rattendarmsegmenten, die in eine Ussing-Kammer (siehe 2.6) eingespannt waren, untersucht [Wolffram *et al.* 2002]. Dabei wurden Segmente des Jejunums und proximalen Kolons verwendet. Nach einer dreistündigen Inkubation mit Jejunumgewebe wurde auf der apikalen Seite eine Abnahme des Que-G beobachtet. Gleichzeitig wurde die Bildung des Aglykons Que apikal detektiert, weitere Metabolite bildeten sich jedoch nicht. Auf der basolateralen Seite wurden weder Que-G noch Que oder andere Metabolite nachgewiesen. Bei Inkubationen mit Segmenten des proximalen Kolons wurden weder eine Freisetzung von Que noch die Bildung anderer Metabolite oder ein Transport auf die basolaterale Seite festgestellt. Aus den Ergebnissen wurde

geschlussfolgert, dass SGLT-1 für die Aufnahme des Que-G in die Zellen verantwortlich ist. In den Zellen kann es dann zu einer Abspaltung des Zuckerrests kommen. SGLT-1, ist im Jejunum, aber nicht im proximalen Kolon, vorhanden. Alternativ könnte die Abspaltung auch durch die extrazellulär in der Bürstensaummembran vorhandene LPH katalysiert werden. Bei der Inkubation von Que-GR kam es in Jejunum und proximalem Kolon weder zu einer Abspaltung des Zuckers oder Metabolitbildung noch zu einem Transport auf die basolaterale Seite [Wolffram *et al.* 2002].

Matsumoto *et al.* untersuchten den transepithelialen Transport eines wasserlöslichen Que-Derivats, bestehend aus D-Glucose verknüpft mit Rutin (Quercetin-3-O-glucorhamnosid), in intestinaler Mukosa von Ratten, die in Ussing-Kammern montiert war. Bis zu 0,03% der inkubierten Konzentration des Que-Derivats erreichten die basolaterale Seite. Freigesetztes Que oder Que-Konjugate wurden nicht detektiert [Matsumoto *et al.* 2004].

Eine weitere Methode zur Bestimmung des intestinalen Transports und Metabolismus ist die Verwendung von sogenannten „everted sacs“ (ESs, umgestülpte Säcke) aus dem Darm von Ratten. Die Herstellung erfolgt durch das Schneiden von etwa 5 cm langen Stücken. Diese werden mit Puffer gereinigt, umgestülpt, so dass die Innenseite nach außen zeigt, und an einem Ende zusammen gebunden. Anschließend werden sie mit dem basolateralen Puffer befüllt und verschlossen. Für die Inkubation gibt man die ESs in Kolben, die den apikalen Inkubationspuffer mit der zu inkubierenden Substanz enthalten und bei 37 °C leicht geschüttelt werden. Dabei wird der Puffer kontinuierlich mit sogenanntem Carbogengas (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid) begast [Day *et al.* 2003, Poquet *et al.* 2008a, Poquet *et al.* 2008b]. Day *et al.* zeigten mit Hilfe von ESs des Jejunums, dass Que-G und Que-4'-G nicht auf die basolaterale Seite des ESs gelangen. Auf der apikalen Seite wurde das Aglykon Que detektiert. Auf beiden Seiten wurden Glucuronide und Sulfate des Ques nachgewiesen. Das Gewebe wurde am Ende der Inkubation auf Polyphenole hin untersucht, wobei Que und Konjugate, aber nicht die Ausgangsverbindungen (Glycoside) identifiziert wurden [Day *et al.* 2003].

Transport und Metabolismus von Ferulasäure wurden in ESs des aufsteigenden und absteigenden Kolons (*Colon ascendens* und *Colon descendens*) der Ratte untersucht [Poquet *et al.* 2008b]. Bei Inkubation mit beiden Abschnitten wurden in den ESs die Metabolite *trans*-Ferulasäure-4-O- β -D-glucuronid, *cis*-Ferulasäure-4-O- β -D-glucuronid, Ferulasäuresulfat und Dihydroferulasäure in vergleichbaren Konzentrationen bestimmt. Die Ergebnisse stimmten mit den in der Zellkultur (Caco-2/HT29-MTX) erzielten Erkenntnissen überein [Poquet *et al.* 2008b].

Eine weitere Studie widmete sich der Untersuchung von Transport und Metabolismus von Dihydrokaffeesäure in ESs des *Colon ascendens*, *Colon descendens* und Jejunums. Auf der basolateralen Seite war freie Dihydrokaffeesäure die Hauptkomponente, daneben wurden

jedoch auch die Metabolite Dihydrokaffeesäure-4-O- β -D-glucuronid, Dihydrokaffeesäure-3-O- β -D-glucuronid, Dihydrokaffeesäuresulfat, Dihydroferulasäure, Dihydroferulasäuresulfat und Dihydroferulasäureglucuronid identifiziert. Für die Permeation der freien Dihydrokaffeesäure wurde kein Unterschied zwischen den verschiedenen Darmabschnitten festgestellt, Dihydroferulasäure wurde in den ESs des Kolons dagegen in größerer Konzentration bestimmt als in ESs des Jejunums. Auch die Glucuronidierung fand in den Dickdarmabschnitten in stärkerem Maße statt als im Jejunum [Poquet *et al.* 2008a].

Grundsätzlich haben alle Studien gezeigt, dass es bei der Inkubation von Rattendarmmukosa mit Polyphenolen zur Bildung verschiedener Metabolite kam. Nachgewiesen wurden die Freisetzung von Aglyka aus ihren Glycosiden sowie die Bildung von Sulfaten, Glucuroniden und methoxylierten und dehydrierten Verbindungen auf beiden Seiten der Mukosa. Bei einigen der untersuchten Polyphenole und ihren Metabolite wurde eine Absorption auf die basolaterale Seite beobachtet. Die Inkubationen eines einzelnen Polyphenols mit unterschiedlichen Segmenten des Darms zeigten, dass Unterschiede in Absorption und Metabolismus zwischen den Segmenten bestehen. In den Abschnitten des Dickdarms waren sowohl Absorption als auch die Bildung von Glucuroniden höher als im Jejunum.

2.6.5 Stabilität von Polyphenolen unter Zellkulturbedingungen

Verschiedene Autoren haben beschrieben, dass einige Polyphenole in Zellkulturmedium und anderen Puffern instabil sein können. Dies ist ein wichtiger Aspekt bei der Durchführung und Interpretation von *in vitro*-Studien mit Polyphenolen.

Zhu *et al.* untersuchten die Stabilität von Grüntee catechinen (darunter Epi) in Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer. Innerhalb der ersten halben Stunde wurden mehr als 75% der Grüntee catechine abgebaut [Zhu *et al.* 1997]. Die Stabilität des Grüntee catechins EGCG wurde in den Zellkulturmedien „Hanks‘ balanced salt solution“ (HBSS), McCoy’s 5A-Medium und Ham’s F12 untersucht. Es kam in allen Medien zu einer Autoxidation von EGCG, die ersten Reaktionsprodukte waren bereits nach 10 Minuten detektierbar und wurden mittels HPLC-MS/MS als Dimere des EGCG identifiziert. Nach einer Stunde waren weniger als 10% der ursprünglichen Konzentration an EGCG vorhanden [Hong *et al.* 2002]. Weiterhin zeigten Sang *et al.*, dass von EGCG in einer Mischung der Zellkulturinkubationsmedien Ham’s und RPMI-1640 nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C noch etwa 10% der Ausgangskonzentration nachweisbar waren. Nach 6 Stunden war kein EGCG im Medium detektierbar [Sang *et al.* 2005].

Die Stabilität von Que wurde im Zellkulturmedium „Williams‘ Medium E“ untersucht. Nach 8 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden noch ca. 12% der Ausgangskonzentration ermittelt.

Außerdem wurden drei Abbauprodukte detektiert, von denen eins als 3,4-Dihydroxybenzoesäure identifiziert wurde. In „Minimum Essential Eagle Medium“ wurden vergleichbare Ergebnisse für Que erzielt [Boulton *et al.* 1999]. Wolfram *et al.* untersuchten die Stabilität von Que, Que-G und Que-GR in Krebs-Henseleit-Phosphatpuffer, einem Puffer mit einem pH-Wert von 6,8. Die beiden Glycoside waren über den Inkubationszeitraum von 3 Stunden stabil, vom Aglykon Que dagegen waren bereits nach 2 Stunden nur noch etwa 10% der Ausgangskonzentration nachweisbar. Die gebildeten Abbauprodukte des Ques wurden jedoch nicht charakterisiert [Wolfram *et al.* 2002].

Für das Citrusflavanon Hesperetin wurde die Stabilität in DMEM untersucht. Nach zwei Stunden Inkubation waren noch 88% der Ausgangskonzentration vorhanden, nach 24 Stunden sank die Konzentration auf 67%. Parallel dazu wurden Hesperitin-7-O-glucuronid und Hesperitin-7-O-sulfat inkubiert, hier waren nach 24 Stunden Inkubation noch über 95% der Ausgangskonzentration vorhanden [Brand *et al.* 2008].

Die Stabilität von Anthocyanen wurde ebenfalls untersucht. Steinert *et al.* inkubierten Delphinidin-3-O-glucosid, Delphinidin-3-O-rutinosid, Cyanidin-3-O-glucosid und Cyanidin-3-O-rutinosid zellfrei in HBSS. Nach 80 Minuten Inkubation bei 37 °C waren noch zwischen 2,8 und 28,8% der Ausgangskonzentration nachweisbar. Die Stabilität war von der Struktur des Aglykons abhängig, die Cyanidine wurden schneller abgebaut als die Delphinidine. Der Zuckerrest hatte keinen Einfluss auf die Stabilität der Anthocyane [Steinert *et al.* 2008].

Es lässt sich sagen, dass in zahlreichen Zellkulturmedien Polyphenole wie Epi und Que bei 37 °C nicht stabil sind. Ein rascher Abbau innerhalb von 30 Minuten wurde beschrieben. Andere Polyphenole, darunter Que-R waren über die gesamte Inkubationsdauer stabil.

Um die Ergebnisse aus Zellkulturversuchen zum Metabolismus von Polyphenolen richtig interpretieren zu können, ist es wichtig zu wissen, ob im verwendeten Inkubationsmedium Abbauprodukte der Polyphenole entstehen.

2.6.6 Wasserstoffperoxid-Generierung im Inkubationsmedium

Einige Polyphenole sind in der Lage, durch Interaktion mit Substanzen im Zellkulturmedium Wasserstoffperoxid zu bilden. Dies wurde bereits für 5-CQA, Cat, Que und weitere Polyphenole gezeigt [Akagawa *et al.* 2003, Bellion *et al.* 2009, Long *et al.* 2000]. Bellion *et al.* stellten fest, dass die Bildung des Wasserstoffperoxids vom Typ des verwendeten Mediums abhängt. Als maßgeblicher Bestandteil des Mediums wurde Natriumbicarbonat identifiziert [Bellion *et al.* 2009].

Über die Wirkung des gebildeten Wasserstoffperoxids wird kontrovers diskutiert. Lapidot *et al.* vermuten, dass die Inhibition der Proliferation von Tumorzellen durch Polyphenole indirekt durch die Wasserstoffperoxidbildung verursacht wird [Lapidot *et al.* 2002]. Liu und Sun

widersprechen dem und belegten durch Inkubation mit Katalase, dass die Anwesenheit von Wasserstoffperoxid keinen Einfluss auf die Proliferation hat [Liu und Sun 2003]. Fridrich *et al.* zeigten, dass die Inhibition des Zellwachstums von Tumorzellen (HT29) hauptsächlich durch das bei der Inkubation mit Apfelsaftextrakt in Konzentrationen größer 150 µg/mL gebildete Wasserstoffperoxid verursacht wird [Fridrich *et al.* 2007]. Lee *et al.* zeigten, dass die Zytotoxizität von Quercetin in Caco-2-Zellen und WB-F344 Rattenleberepithelzellen zu einem großen Teil auf die Bildung des Wasserstoffperoxids zurückzuführen ist [Lee *et al.* 2005].

Es wird daher empfohlen, während der Inkubation mit Polyphenolen und polyphenolhaltigen Extrakten Katalase zu verwenden, um gebildetes Wasserstoffperoxid abzubauen [Lapidot *et al.* 2002] bzw. die Bildung des Wasserstoffperoxids bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen [Fridrich *et al.* 2007, Long *et al.* 2000, Wee *et al.* 2003].

Bellion *et al.* zeigten, dass Polyphenole mit einer *o*-Chinonstruktur, wie sie bei Que und 5-CQA beispielsweise vorliegt, das größte Potential zur Wasserstoffperoxidbildung aufwiesen [Bellion *et al.* 2009].

Die Bildung von Wasserstoffperoxid im Kulturmedium beruht möglicherweise auf dem Mechanismus der sogenannten Autoxidation und ist in Abbildung 2-10 dargestellt. Unter Abspaltung eines H⁺-Ions und Elektronenübertragung auf im Medium vorhandenen molekularen Sauerstoff entsteht aus dem *o*-Hydrochinon, das ein Strukturbestandteil vieler Polyphenole (Kaffeensäure, Que, Epi) ist, ein Semichinonradikalanion sowie Wasserstoffperoxid. Durch eine weitere Elektronenübertragung entsteht dann ein *o*-Chinon sowie ein weiteres Molekül Wasserstoffperoxid [Bellion *et al.* 2009].

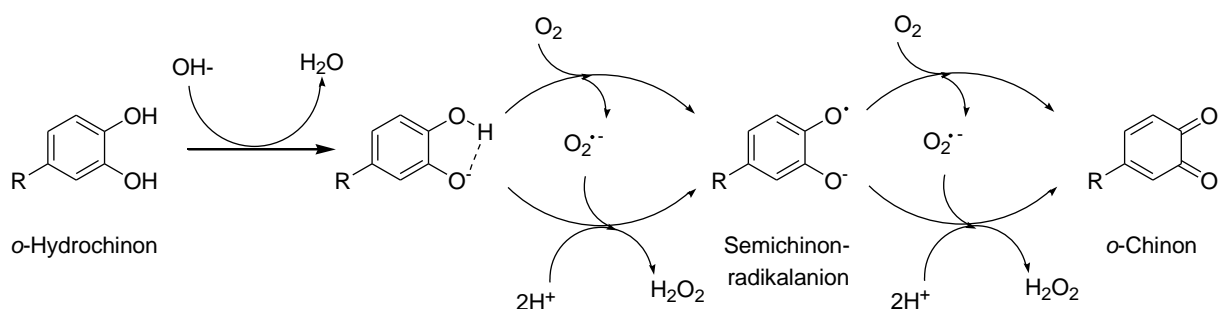


Abbildung 2-10: Möglicher Mechanismus der Bildung von Wasserstoffperoxid aus Polyphenolen (nach [Bellion *et al.* 2009]).

Eine Möglichkeit der Detektion von Wasserstoffperoxid im Inkubationsmedium ist der FOX1-Assay (engl. ferrous oxidation in xylenol orange). Dieser Test beruht auf der peroxidvermittelten Oxidation von zugefügten Fe²⁺-Ionen in Form von Ammoniumeisen(II)sulfat zu Fe³⁺-Ionen, bei der Hydroxylradikale gebildet werden: Fe²⁺ + ROOH → Fe³⁺ + RO[•] + OH⁻. Diese Reaktion findet unter sauren Bedingungen statt und

wird durch Sorbitol katalysiert. Der Farbstoff Xylenol-Orange bindet die gebildeten Fe^{3+} -Ionen unter Ausbildung eines Komplexes, der bei 560 nm maximale Absorption zeigt [Jiang *et al.* 1990]. Aufgrund der Überschneidung mit dem Absorptionsspektrum des im Medium enthaltenen Phenolrots wird die Absorption jedoch nicht bei 560 nm gemessen, sondern bei 595 nm. Durch die Erfassung der gebildeten Fe^{3+} -Ionen erhält man die Konzentration an Wasserstoffperoxid, die im Medium vorliegt.

2.7 Die intestinale Barriere

2.7.1 Aufbau der intestinalen Barriere

Die intestinale Barriere besteht aus einer dichten Mukusschicht, einer Schicht epithelialer Zellen sowie aus den nicht-epithelialen mukosalen Zellen [McGuckin *et al.* 2009]. Um den parazellulären Raum zwischen den Epithelzellen zu schließen, werden von den Zellen unter anderem TJs gebildet. Weitere Verknüpfungen zwischen den Epithelzellen umfassen die „gap junctions“, „adherens junctions“ und Desmosomen; die TJs spielen jedoch die wichtigste Rolle bei der Schließung des parazellulären Raums in allen Epithelien [Denker und Nigam 1998, Powell 1981].

Die TJs regulieren die Passage von Ionen, Wasser und Molekülen. Unterteilen lassen sich die TJ-Proteine in zwei Gruppen, die Transmembran- sowie intrazelluläre Proteine [Gonzalez-Mariscal *et al.* 2003]. Zu den Transmembranproteinen zählen Occludin, Tricellulin und die Gruppe der Claudine (siehe Abbildung 2-11). Die Claudine stellen die Schlüsselkomponenten für Struktur und Funktion der TJs dar, indem sie miteinander interagieren und zwischen den Epithelzellen polymerisieren – wahrscheinlich innerhalb der Plasmamembran – um die TJ-Stränge zu bilden. Occludin und Tricellulin werden in diese Stränge eingegliedert oder sind sehr nah bei den Claudinen lokalisiert. Zu den intrazellulären TJ-Proteinen gehört die Familie der Zonula occludens-Proteine (ZO-Proteine). Sie binden an das C-terminale Ende der Domänen der Transmembranproteine [Furuse 2009].

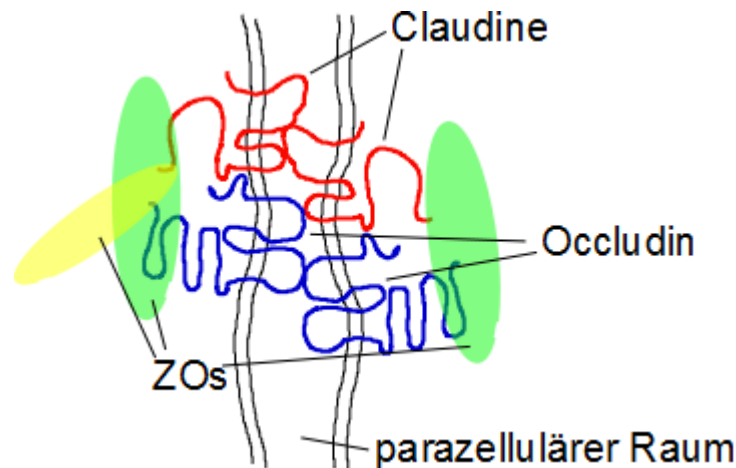


Abbildung 2-11: Schematische Darstellung der Anordnung der TJ-Proteine. ZO = *Zonula occludens* (nach [Mitic *et al.* 2000]).

In der Familie der Claudine sind bis heute 24 Proteinen beschrieben, die eine Größe von 21 bis 28 kD haben und aus vier Transmembrandomänen bestehen. Sie bilden zwei extrazelluläre Schleifen, sowohl das amino- als auch das carboxyterminale Ende befinden sich im Cytoplasma. Am C-terminalen Ende der meisten Claudine befindet sich die sogenannte PDZ-Domäne, an welche die intrazellulären ZO-Proteine binden. Die Anordnung einiger Aminosäuren in einer der extrazellulären Schleifen findet man ebenfalls in den meisten Claudinen [Furuse 2009, Gonzalez-Mariscal *et al.* 2003, Mitic *et al.* 2000].

Occludin war das erste beschriebene Transmembranprotein der TJs. Es hat eine Größe von ca. 65 kD und weist wie die Claudine ebenfalls vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre Schleifen, sowie das amino- und carboxyterminale Ende im Cytoplasma auf. Das carboxyterminale Ende des Occludins bindet ebenfalls an die ZO-Proteine, jedoch besteht bezüglich der Aminosäuresequenz keine Ähnlichkeit mit den Claudinen [Furuse 2009, Gonzalez-Mariscal *et al.* 2003].

Die transmembranen TJ-Proteine interagieren direkt mit den interzellulären TJ-Proteinen, zu denen unter anderem die strukturell verwandten Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3 gehören. Sie bilden das Grundgerüst der TJs und verbinden sie mit anderen strukturellen Proteinen, Signalproteinen und dem Actin-Cytoskelett [Furuse 2009, Mitic *et al.* 2000].

2.7.2 Status der intestinalen Barriere

Der Status der intestinalen Barriere kann durch den TER beschrieben werden. Da der TER hauptsächlich durch den Widerstand der TJs gebildet wird, reflektiert der TER den Zustand der TJs [Anderson und Van Itallie 2009, Klingberg *et al.* 2005, Shimizu 1999].

2.7.3 Defekte der intestinalen Barriere

Defekte der intestinalen Barriere stehen mit CED wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa in engem Zusammenhang [Laukoetter *et al.* 2008]. Es ist bis heute unklar, ob die Defekte der intestinalen Barriere die Voraussetzung oder eine Folge der CED sind [McGuckin *et al.* 2009]. Als Schlüsselkomponenten in der Entwicklung der CED gelten drei Komponenten, die einen Kreislauf bilden:

- Störung der intestinalen Barriere
- Eintritt luminaler Substanzen in die *Lamina propria*
- eine anormale Immunantwort, die dann wiederum zu einer Störung der intestinalen Barriere führt

In Mausmodellen wurde gezeigt, dass jeder dieser drei Schritte der Auslöser dieses Kreislaufs sein kann [Clayburgh *et al.* 2004]. Neueste Untersuchungen zeigten, dass die Dysregulation der intestinalen TJs zu einer Aktivierung des mukosalen Immunsystems führt [Su *et al.* 2009]. Clayburgh *et al.* weisen darauf hin, dass die effektive Bekämpfung von CED möglich wäre, wenn eine oder mehrere Stellen des genannten Kreislaufs blockiert werden [Clayburgh *et al.* 2004].

Die intestinale Permeabilität (IP) und damit die Funktion der intestinalen Barriere wurde in mehreren Studien bei gesunden Personen sowie Probanden mit CED untersucht. Es wurde gezeigt, dass die IP bei Patienten mit CED gegenüber der IP der Gesunden erhöht ist. Weiterhin wurde die IP bei Morbus Crohn-Patienten, die aktuell keine Symptome zeigten, gemessen und danach ein Jahr beobachtet. Eine erhöhte IP ging einem Wiederauftreten der Krankheit innerhalb eines Jahres voraus, wohingegen bei Patienten mit einer normalen IP (im Vergleich zu gesunden Personen) meist kein Rückfall innerhalb eines Jahres erfolgte [Arnott *et al.* 2000, Wyatt *et al.* 1993]. Von Irvine und Marshall wurde ein bisher einmalig beobachteter Fall beschrieben, in dem eine Patientin im Alter von 13 Jahren als Verwandte erster Ordnung eines Morbus Crohn-Patienten auf verschiedene molekulare Marker hin untersucht wurde. Sie zeigte eine erhöhte IP, jedoch wurden auch nach eingehender Untersuchung keine makro- oder mikroskopischen Hinweise auf Morbus Crohn gefunden. Acht Jahre später wurde die Krankheit bei ihr diagnostiziert [Irvine und Marshall 2000]. Diese Studien zeigen, dass eine Störung der intestinalen Barriere der Erkrankung an Morbus Crohn vorausgehen kann.

Histologisch und molekularbiologisch wurde die intestinale Mukosa von Morbus Crohn-Patienten ebenfalls untersucht. Marin *et al.* zeigten bereits 1983 mittels Gefrierbruchtechniken eine starke TJ-Desorganisation im Vergleich zur Mukosa gesunder

Probanden. Die TJs wiesen bizarre Strukturen auf, waren fragmentiert und fehlerhaft ausgerichtet [Marin *et al.* 1983].

Gassler *et al.* zeigten, dass in der entzündeten Mukosa von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa die Proteinexpression von Occludin und ZO-1 gegenüber normalen Kontrollen signifikant herabgesetzt war. Bei der nicht entzündeten Mukosa dieser Patienten wurde kein Unterschied zu den Kontrollen gesunder Probanden festgestellt. Für Occludin wurden diese Ergebnisse auf mRNA-Ebene bestätigt. Die morphologische Integrität der Zellen war im entzündeten Gewebe jedoch vollständig erhalten geblieben. Die Epithelzellen scheinen Änderungen in der Organisation der Verknüpfungen zwischen den Zellen ohne das Auftreten von Apoptose oder Nekrose zu tolerieren [Gassler *et al.* 2001].

Piche *et al.* zeigten eine verminderte ZO-1 mRNA-Expression in Biopsien von Patienten mit CED. Damit einhergehend war die Permeabilität der Gewebe im Vergleich zum Gewebe gesunder Probanden erhöht. Weiterhin inkubierten sie Monolayer der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mit sterilfiltrierten Überständen der Biopsien und stellten fest, dass nach Inkubation mit den Überständen der CED-Patienten die Permeabilität der Monolayer erhöht und der TER erniedrigt waren. Die ZO-1 mRNA-Expression war gegenüber den gesunden Kontrollen ebenfalls erniedrigt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich in den Überständen lösliche Mediatoren befinden, die in Bezug auf die intestinale Barriere zu Veränderungen führten. Bisher konnte nicht eindeutig gezeigt werden, um welche Substanzen es sich bei den Mediatoren handelt, als mögliche Kandidaten kommen Proteasen oder Histamin in Betracht. Hier besteht aber noch Forschungsbedarf [Piche *et al.* 2009].

Die Erhöhung des Ionenflusses und vermehrte Diarrhöen bei Patienten mit CED können durch Veränderungen in der Expression der TJ-Proteine Claudin 2, 3 und 4 gegenüber gesunden Personen erklärt werden [Prasad *et al.* 2005]. Prasad *et al.* beschreiben, dass die Expression der TJ-Proteine Claudin 2, 3 und 4 in Biopsien des sigmoiden Kolons von gesunden Personen vergleichbar mit der Expression in konfluenten, innerhalb von acht Tagen angewachsenen T84-Monolayern ist. Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten können T84-Monolayer als *in vitro*-Modell für den menschlichen Kolon dienen. Es wurden Untersuchungen zu funktionalen Veränderungen nach der Behandlung mit inflammatorischen Cytokinen (Interleukin-13 (IL-13), Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)), die in Patienten mit CED gefunden wurden, durchgeführt. Der TER sowie die Expression verschiedener TJ-Proteine wurde verändert [Prasad *et al.* 2005]. Weitere *in vitro*-Modellsysteme haben bestätigt, dass proinflammatorische Cytokine die intestinale Barriere beeinflussen, indem sie zu einer Umstrukturierung der TJs führen (zusammengefasst in [Laukoetter *et al.* 2008]).

Eine erhöhte TJ-Permeabilität wird außerdem mit dem Auftreten von Kolonkrebs in Verbindung gebracht. Soler *et al.* zeigten, dass humane Darmpolypen, darunter „Villous adenoma“ und adenomartige Polypen – die eine erhöhte TJ-Permeabilität aufweisen – häufig mit Kolonkrebs assoziiert sind. Hyperplastische Polypen dagegen, die ein verringertes Kolonkrebsrisiko haben, weisen die gleiche TJ-Permeabilität auf wie gesundes Gewebe. Die molekularen Mechanismen, die diesem Zusammenhang zugrunde liegen, sind aber ebenfalls noch unklar. Die erhöhte TJ-Permeabilität könnte jedoch ein Grund für das häufige Auftreten von Kolonkrebs bei Personen mit CED sein [Soler *et al.* 1999].

Auch bei der Entwicklung weiterer Krankheiten, wie Herzinsuffizienz [Sandek *et al.* 2008], Autismus [White 2003] und Krankheiten im Kindesalter (Typ 1 Diabetes, Allergien, Asthma) [Liu *et al.* 2005], scheint die intestinale Barriere eine wichtige Rolle zu spielen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die TJs im Darm eine wichtige Rolle bei Erkrankungen des Darms wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa aber auch bei anderen Krankheiten, die nicht direkt mit dem Darm in einem engem Zusammenhang stehen, spielen.

2.7.4 Einfluss von Nahrungsmittelinhaltstoffen auf die intestinale Barriere – *in vitro*-Studien

Anhand von Zellmonolayern wurde der Einfluss verschiedener Polyphenole und Pflanzenextrakte auf die TJs untersucht.

2.7.4.1 Einzelne Polyphenole – *in vitro*-Untersuchungen

Eine Erhöhung des TER und eine damit verbundene Verbesserung des Status der intestinalen Barriere während der *in vitro*-Inkubation mit Polyphenolen wurde von verschiedenen Gruppen beschrieben. Amasheh *et al.* untersuchten den Einfluss von Que (50 bis 200 μM) auf den TER von Caco-2-Monolayern über einen Zeitraum von 72 Stunden. Maximale Effekte einer Steigerung des TER auf ca. 160% des Initial-TERs wurden nach 48 Stunden bei einer Konzentration von 200 μM Que erzielt. Bei einer Konzentration von 50 μM war kein Effekt nachweisbar [Amasheh *et al.* 2008]. Suzuki und Hara verwendeten im gleichen Zellmodell Konzentrationen von 10, 30 und 100 μM Que über einen Zeitraum von 48 Stunden. Hier wurde nach 6 Stunden ein maximaler Anstieg des TER auf ca. 140% des Ausgangswertes beobachtet. Bei Inkubationen mit dem strukturverwandten Myrecetin, das eine Hydroxylgruppe mehr aufweist als Que, wurde im Vergleich zur Kontrolle kein Einfluss auf den TER festgestellt [Suzuki und Hara 2009]. Que-Glycoside [Ohno *et al.* 2006] und eine Procyanidin-Mischung erhöhten ebenfalls den TER von Caco-2-Monolayern [Erleijman *et al.*

2006]. Im Gegensatz dazu wurde nach Inkubation mit Hesperetin und Hesperidin kein Einfluss auf den TER von Caco-2-Monolayern festgestellt [Kobayashi *et al.* 2008].

Auf Proteinebene konnte eine erhöhte Expression des TJ-assoziierten Proteins Claudin-4 in Caco-2-Zellen nach Inkubation mit dem Flavonoid Que detektiert werden [Amasheh *et al.* 2008, Suzuki und Hara 2009].

2.7.4.2 Polyphenolhaltige Pflanzenextrakte – *in vitro*-Untersuchungen

Polyphenolhaltige Pflanzenextrakte wurden ebenfalls auf ihre Effekte auf den TER von Caco-2-Monolayern hin untersucht. Bei der Inkubation mit Extrakten aus Apfeltrestern [McCann *et al.* 2007] und schwarzem Tee (*Camellia sinensis*) wurde eine signifikante Erhöhung des TER festgestellt [Konishi 2003].

2.7.4.3 *In vivo*-Untersuchungen

Bisher existieren keine humanen *in vivo*-Studien zum Effekt von Polyphenolen oder polyphenolhaltigen Lebensmitteln bzw. Extrakten auf die intestinale Barriere. In einigen Studien an Nagern wurde gezeigt, dass verschiedene Polyphenole und Polyphenolextrakte sich zur Prävention und Behandlung von CED eignen (zusammengefasst in [Romier *et al.* 2009, Shapiro *et al.* 2007]). Diese positiven Effekte könnten auch z. T. durch die Polyphenole hervorgerufen worden sein und auf der Stärkung der intestinalen Barriere beruhen. Auf diesem Gebiet besteht noch weiterer Forschungsbedarf.

2.7.5 Herabsetzung der Integrität der intestinalen Barriere

Die Integrität der intestinalen Barriere und damit auch der TER von Zellmonolayern und Gewebe kann durch die Inkubation mit verschiedenen Reagenzien, wie z. B. Caprinsäure (C10) [Anderberg *et al.* 1993, Shimazaki *et al.* 1998], Deoxycholat [Argenzio *et al.* 1988], Alkohol [Loucks und Buell 1994], Formaldehyd [Cohen *et al.* 1986], Essigsäure [Argenzio und Meuten 1991] und Salzsäure [Feil *et al.* 1989], reduziert werden. So wird z. B. bei der Inkubation mit C10 die ATP-Bildung verringert, was zu einer Kontraktion der perijunktionalen Actomyosinringe gefolgt von Dilatationen und strukturellen Deformationen der TJs führt [Anderberg *et al.* 1993, Wallon *et al.* 2005].

Eine Vorinkubation der Zellmonolayer mit einem TER-vermindernden Reagenz wie C10 kann bei *in vitro*-Versuchen dazu dienen, eine verminderte intestinale Barrierefunktion – wie sie bei CED vorliegt – zu simulieren.

2.8 Die Kolonkarzinomzelllinie T84 als Modell für die humane intestinale Mukosa

Eine vielfach verwendete Zelllinie ist die Kolonkarzinomzelllinie T84. Sie wurde in der Vergangenheit eingesetzt, um Ionentransport und -sekretion im Darm zu untersuchen [Beltran *et al.* 2008, Pariwat *et al.* 2008]. Außerdem wurde sie nach Stimulation mit einem Cytokin als ein Modell für Entzündungen der intestinalen Mukosa verwendet [Porath *et al.* 2005].

Die Karzinomzelllinie T84 wurde aus der Lungenmetastase des Kolonkarzinoms eines 72 Jahre alten Mannes gewonnen. Um die Zellen zu vermehren, wurden diese einer Maus transplantiert. Bei diesem Prozess blieben die histologischen Charakteristika einer Kolonkarzinomzelle erhalten. Die Zellen wachsen als Monolayer und bilden zwischen benachbarten Zellen TJs und Desmosomen. Die Morphologie entspricht Epithelzellen, sie wachsen in der Zellkultur adhärent [Health Protection Agency Culture Collections 2010]. Die Zelllinie besitzt typische Eigenschaften von Intestinal- und Kolonepithelien wie die Sekretion von Flüssigkeit und Schleim sowie viele regulatorische Mechanismen des Darmgewebes [McCool *et al.* 1990]. Die Zellen haben eine spindelförmige oder polygonale Form [Alessandro *et al.* 2006] und weisen viele strukturelle Merkmale undifferenzierter Kryptenzellen auf. Etwa fünf Tage nach dem Aussäen der Zellen kommt es zu einer Polarisierung, die apikale und basolaterale Membran werden gebildet. Elemente des Cytoplasmas liegen ebenfalls polarisiert vor [Madara *et al.* 1987]. Im Cytoplasma sind Elemente des rauen endoplasmatischen Retikulums, Mitochondrien, freie Ribosomen sowie kleine Mengen Fetttröpfchen und Glycogen-Granula zu finden. Außerdem besitzen die Zellen Mikrovilli [Alessandro *et al.* 2006]. Die polarisierten Monolayer haben einen hohen TER, was darauf hinweist, dass die TJs sehr gut ausdifferenziert sind. In ihren Eigenschaften der Chloridsekretion entsprechen sie den Kryptenzellen des Kolons und stellen derzeit das beste verfügbare Modell humaner Kolonzellen dar (zusammengefasst in [Sambruy *et al.* 2001]).

Die Ausstattung der T84-Zelllinie mit Transportproteinen, die für die intestinale Absorption von Polyphenolen relevant sein könnten, wurde z.T. ebenfalls untersucht. Die mRNA-Expression von P-gp in der Kolonkarzinomzelllinie T84 wurde von mehreren Gruppen beschrieben [Bremer *et al.* 1992, Haslam *et al.* 2008a, Haslam *et al.* 2008b]. Ebenso wurde P-gp auf Proteinebene nachgewiesen [Comerford *et al.* 2002, Haslam *et al.* 2008b, Hunter *et al.* 1991, Lowes und Simmons 2002].

In Zellen der T84-Zelllinie wurde die mRNA von MRP2 detektiert [Haslam *et al.* 2008a]. Das Protein dagegen war nicht nachweisbar [Lowes und Simmons 2001, Lowes und Simmons 2002, Prime-Chapman *et al.* 2004].

2.9 Schweinedarmmukosa als Modell für die humane intestinale Mukosa

In der Vergangenheit wurden verschiedene Tiermodelle genutzt, um Aspekte des humanen Stoffwechsels zu untersuchen. Vielfach wurden Nager verwendet, die aber in vielerlei Hinsicht geringe Gemeinsamkeiten mit dem Menschen aufweisen. Bereits 1972 wurde erkannt, dass Mensch und Schwein viele Gemeinsamkeiten haben und in der Forschung verwendet werden können [Douglas 1972]. Hinsichtlich Morphologie und Physiologie bestehen große Gemeinsamkeiten im Gastrointestinaltrakt, weswegen Schweine verwendet wurden, um Ernährungseffekte zu untersuchen. Es wurden Studien zum Metabolismus verschiedener Ionen durchgeführt [Douglas 1972]. Weiterhin sind die Transitzeiten der Nahrung sowie die Verdauungseffektivität bei Schwein und Mensch sehr ähnlich. Der Metabolismus der aufgenommenen Nährstoffe ist ebenfalls vergleichbar, wenngleich es auch Ausnahmen gibt wie beispielsweise die Aufnahme von Carotinoiden ins Plasma, welche beim Menschen beobachtet wurde, aber nicht beim Schwein [Miller und Ullrey 1987]. Auch weitere, aktuellere Übersichtsartikel bekräftigen die Gemeinsamkeiten der beiden Spezies und die Verwendung des Schweins als Modell für den Menschen in der Forschung [Almond 1996, Vodicka *et al.* 2005].

Der Darm des Schweins besteht, wie beim Menschen, aus Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und Kolon [Wu *et al.* 2006].

Schweine werden verwendet, um Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Polyphenolen zu untersuchen. Wu *et al.* untersuchten den Metabolismus von Anthocyanen in frisch entwöhnten Schweinen nach dem Verzehr von schwarzen Himbeeren. Der größte Anteil der aufgenommenen Anthocyane wurde in Ileum, Caecum und Kolon gefunden, sehr geringe Mengen auch im Jejunum. Im Duodenum wurden keine Anthocyane detektiert. Im Urin der Schweine wurden methylierte und glucuronidierte Konjugate sowie Kombinationen identifiziert. Die beobachtete Biotransformation von Cyanidin-di- und triglycosiden in Caecum und Kolon stimmte mit Ergebnissen von *in vitro*-Inkubationen mit humaner Darmmikroflora überein. Auch die Metabolite im Urin entsprachen den in Menschen nachgewiesenen Metaboliten nach Anthocyanverzehr [Wu *et al.* 2006]. Espín *et al.* verwendeten das Schwein als Modell für Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Ellagtanninen im Menschen. Sie detektierten verschiedene glucuronidierte, sulfatierte und methylierte Konjugate, wie sie im Menschen ebenfalls nachgewiesen wurden [Espín *et al.* 2007]. Labib *et al.* nutzen den Inhalt von Schweinecaecum, um den intestinalen Metabolismus einiger Flavonoide zu untersuchen [Labib *et al.* 2004, Labib *et al.* 2006].

Ex vivo wurde Mukosa aus dem Jejunum und Ileum von Ferkeln ebenfalls benutzt. In der Ussing-Kammer wurde die Mukosa zur Untersuchung der Glucose- und Chloridtransportkapazität verwendet [Boudry *et al.* 2003].

Die vorgestellten Studien zeigen, dass das Schwein sich als Modell für Absorption und Metabolismus im Menschen eignet.

3 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Apfelpolyphenole und ihre intestinalen Metabolite untersucht. Dabei wurden Konzentrationen verwendet, die in einer Studie von Kahle *et al.* mit Probanden mit einem Stoma des terminalen Ileums ermittelt wurden. Die Probanden nahmen einen Liter naturtrüben Apfelsaft zu sich und anschließend wurden in den Ileostomabeuteln die Polyphenolkonzentrationen bestimmt. Das Maximum der Polyphenolausscheidung war nach 2 Stunden. Aus den bei allen Probanden ermittelten Werten des 2-Stunden-Beutels wurden Mittelwerte gebildet. Diese Konzentrationen wurden als Grundlage für die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen genommen. Die den Beutel erreichenden Polyphenole (und Metabolite) würden bei einem Menschen mit intaktem Gastrointestinaltrakt den Dickdarm erreichen [Kahle *et al.* 2007, Kahle *et al.* 2005b]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden weiterhin einige Hydroxyzimtsäuren untersucht, die eine ähnliche Struktur wie die im Apfel vorkommende Kaffee- und *p*-Coumarsäure aufweisen. Dadurch sollten Hinweise auf strukturabhängige Mechanismen gewonnen werden. Weiterhin wurden mikrobielle Metabolite einiger Polyphenole untersucht, die im Kolon durch Bakterien gebildet werden. Im Einzelnen wurden die Hydroxyzimtsäuren Zimt-, Dihydrozimt-, *p*-Coumar-, Kaffee-, Dihydrokaffee-, Ferula-, Isoferula- und Dihydroferulasäure (jeweils 20 μM) untersucht. *p*-Coumar- und Kaffeesäuremethylester wurden ebenfalls in einer Konzentration von 20 μM verwendet. 4-*p*-CouQA, 5-*p*-CouQA, 1-CQA und 4-CQA wurden in einer Konzentration von 10 μM inkubiert, 3-CQA und 5-CQA dagegen lagen in den Ileostomabeuteln in höherer Konzentration vor, sie wurden daher 50 μM eingesetzt. Die Dihydrochalkone PhI, PhI-G und PhI-XG wurden in einer Konzentration von 20 μM inkubiert, die Flavonole Que und Que-R sowie die Flavan-3-ole Epi und Cat dagegen nur 10 μM . Weiterhin wurden die mikrobiellen Metabolite 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (10 μM), 3,4-Dihydroxytoluol (20 μM), Phloroglucin (20 μM) und D-(-)-Chinasäure (80 μM) verwendet.

3.1 Synthese von einzelnen Polyphenolen

Um den transepithelialen Transport und den Einfluss auf die intestinale Barriere der nach Apfelsaftverzehr im Darm vorliegenden Polyphenole und ihrer Metabolite *in vitro* einzeln untersuchen zu können, mussten die Substanzen als Reinsubstanzen vorliegen. Einige von ihnen sind jedoch käuflich nicht erhältlich. Diese Polyphenole wurden entweder mittels präparativer HPLC aus Apfelsaftextrakten isoliert oder synthetisiert.

3.1.1 1-Kaffeoylchinasäure

Wie in Abbildung 3-1 gezeigt, wurde 1-CQA aus D-(-)-Chinasäure und Kaffeesäure synthetisiert [Rohloff *et al.* 1998, Sefkow 2001, Sefkow *et al.* 2001]. Um eine selektive Veresterung der Kaffeesäure mit der D-(-)-Chinasäure an der Hydroxylgruppe an Position C1 zu erreichen, wurden Schutzgruppen an den nicht zu veresternden Hydroxylgruppen eingeführt. Hierfür wurde aus D-(-)-Chinasäure ein 3,4-O-Isopropyliden-1,5-chinalacton gebildet. Die Hydroxylgruppen der Kaffeesäure wurden durch Acetylierung geschützt. Anschließend erfolgte die Aktivierung der Kaffeesäure als Säurechlorid. Die beiden geschützten Vorstufen wurden im Anschluss miteinander verestert. Nach Abtrennung der Schutzgruppen und Aufreinigung mittels Säulenchromatographie erhielt man 1-CQA mit 70%iger Reinheit.

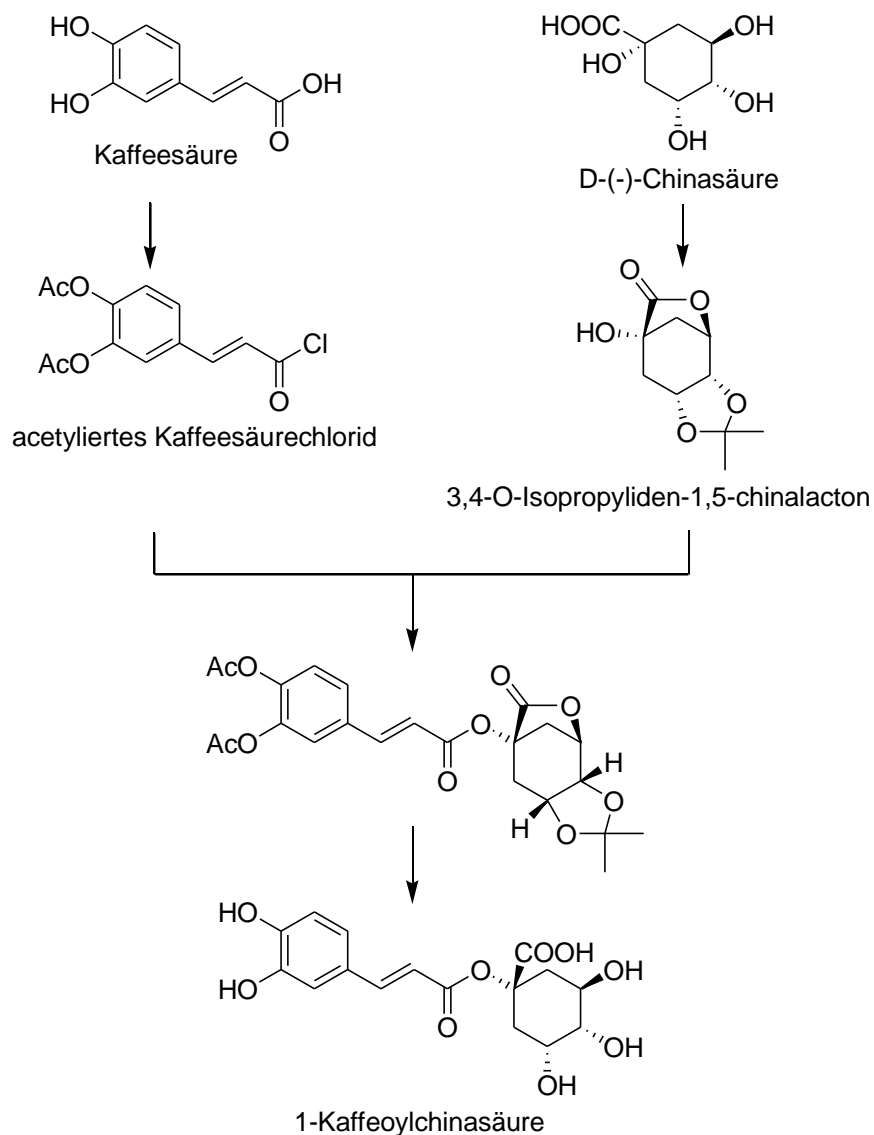


Abbildung 3-1: Syntheseweg von 1-Kaffeoylchinasäure ausgehend von D-(-)-Chinasäure und Kaffeesäure. Erläuterungen siehe Text.

Die Ausbeute der 1-CQA betrug 22,7 mg und entsprach 6%. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist in Abbildung 5-1 gezeigt. Jedoch enthielt das Produkt ca. 30% Verunreinigungen, unter anderem wurde 5-CQA anhand ihrer Retentionszeit durch HPLC-DAD-Analytik identifiziert (siehe Abbildung 3-2). Anschließend wurde 1-CQA mittels semi-präparativer HPLC von den Verunreinigungen getrennt, die Eluate mehrerer Läufe aufgefangen, vereinigt und das Lösungsmittel entfernt. Abschließend wurde die Reinheit nochmals mittels HPLC-DAD überprüft und die erhaltene 1-CQA für weitere Versuche eingesetzt (Reinheit $\geq 95\%$).

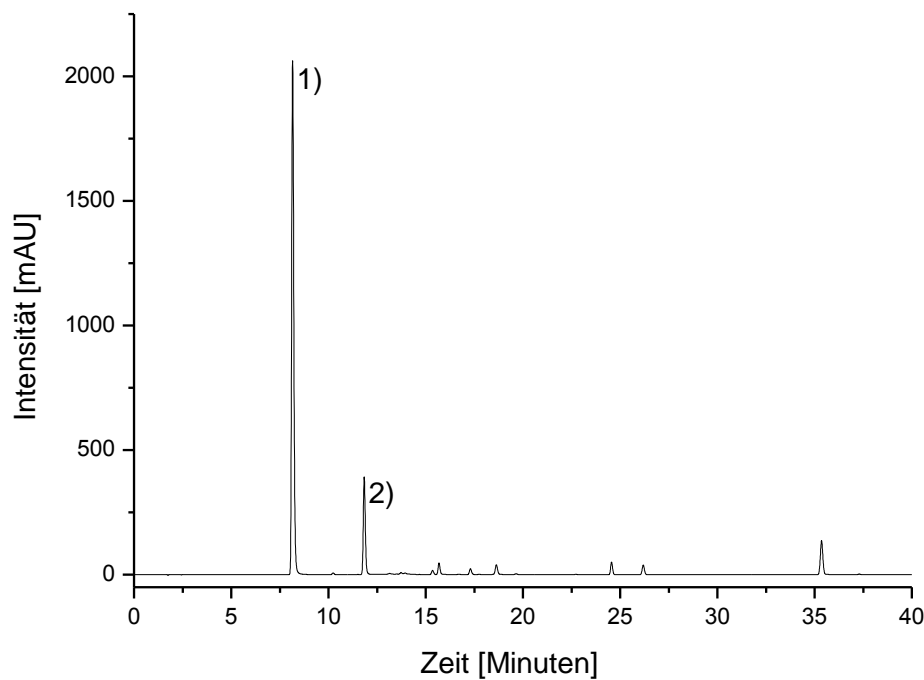


Abbildung 3-2: HPLC-DAD-Chromatogramm bei 320 nm der aus der Synthese erhaltenen 1-Kaffeoylchinasäure vor der Aufreinigung mittels semi-präparativer HPLC. 1) 1-Kaffeoylchinasäure, 2) 5-Kaffeoylchinasäure, bei den anderen Peaks handelt es sich um nicht näher identifizierte Nebenprodukte.

3.1.2 3- und 4-Kaffeoylchinasäure

3- und 4-CQA wurden aus 5-CQA durch alkalische Umesterung nach Trugo und Macrae bei 80 °C erhalten [Trugo und Macrae 1984]. Die drei Isomerisierungsprodukte 3-, 4- und 5-CQA wurden etwa zu gleichen Teilen erhalten. Die Trennung war mittels semi-präparativer oder präparativer HPLC nicht möglich, sie erfolgte deshalb mittels analytischer Säule. Die Elutionsreihenfolge auf C18-Material wurde mittels Referenzsubstanzen bestimmt. Die Retentionszeiten waren 9,8 Minuten bei 3-CQA, 12,2 Minuten bei 5-CQA und 12,8 Minuten bei 4-CQA. Die Eluate mehrerer Läufe wurden vereinigt, das Lösungsmittel entfernt und gefriergetrocknet. Die Reinheit der so erhaltenen Substanzen wurden mittels HPLC-DAD überprüft ($\geq 95\%$) und die Substanzen für weitere Versuche eingesetzt.

3.1.3 4- und 5-*p*-Coumaroylchinasäure

Zur Isolierung der 4- und 5-*p*-CouQA wurde ein mit Laccase behandelter Apfelsaftextrakt verwendet. Die Behandlung mit Laccase (Polyphenoloxidase, EC 1.10.3.2) führt zu einer Oxidation aller enthaltenen Substanzen mit *o*-Dihydroxyphenolstruktur [Will *et al.* 2007]. Dadurch sind bei der späteren Isolierung von 4- und 5-*p*-CouQA Polyphenole wie beispielsweise die CQAs nicht mehr enthalten. Der mit Laccase behandelte Apfelsaftextrakt wurde wie in 3.1.2 beschrieben umgeestert, um aus der in höheren Mengen vorhandenen 4-*p*-CouQA 5- und 3-*p*-CouQA zu gewinnen. Die Elutionsreihenfolge bei Verwendung von C18-Material ist in der Literatur als 3-, 4- und dann 5-*p*-CouQA beschrieben [Rechner 2000]. Es erfolgte die analytische Auftrennung. Die Eluate mehrerer Läufe wurden gesammelt, vereinigt und mittels HPLC-DAD auf Reinheit ($\geq 95\%$) überprüft. Die erhaltenen Substanzen wurden für die *in vitro*-Versuche eingesetzt.

3.1.4 Phloretin-2'-*O*-xyloglucosid

Phl-XG wurde mittels semipräparativer HPLC aus dem Laccase behandelten Apfelsaftextrakt isoliert. Die Eluate mehrerer Läufe wurden gesammelt, vereinigt, vom Lösemittel befreit und gefriergetrocknet. Anschließend erfolgte die Überprüfung auf Reinheit mittels HPLC-DAD. Das erhaltene Phl-XG (Reinheit $\geq 95\%$) wurde für die *in vitro*-Versuche eingesetzt.

3.2 Stabilität von Polyphenolen im Inkubationsmedium

Der mukosale Transport von Polyphenolen und deren Metaboliten sollte in mehreren Modellsystemen untersucht werden. Aus der Literatur war bekannt (siehe Kapitel 2.6.5), dass einige Verbindungen in verschiedenen Inkubationsmedien nicht stabil sind. Aus diesem Grund wurden Stabilitätsstudien im für die weiteren Versuche verwendeten Inkubationsmedium HBSS mit ausgewählten, exemplarischen Polyphenolen, durchgeführt. Die Inkubation der Polyphenole in intestinalen Konzentrationen (10 bis 50 μM) im Medium erfolgte über 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank. Die Überstände wurden mittels HPLC-DAD und HPLC-MS/MS zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht.

Es zeigte sich, dass die Verbindungen strukturabhängig instabil waren. Der Anteil der Polyphenole, der nach 4 bzw. 24 Stunden noch zu detektieren war, ist in Tabelle 3-1 dargestellt.

Tabelle 3-1: Stabilität der Polyphenole in Hank's balanced salt solution (HBSS) bei 37 °C. Angegeben ist der Anteil in der Ausgangskonzentration [%] nach 4 und 24 Stunden. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

Substanz	Anteil der Ausgangskonzentration [%]	
	4 h	24 h
Hydroxyzimtsäuren		
<i>p</i> -Coumarsäure	103,3 \pm 2,7	107,1 \pm 3,5
Kaffeesäure	29,3 \pm 6,0	3,0 \pm 0,5
Dihydrokaffeesäure	33,5 \pm 3,4	4,6 \pm 0,7
Ferulasäure	99,1 \pm 0,9	88,0 \pm 2,1
Dihydroferulasäure	112,5 \pm 4,9	110,7 \pm 0,1
Hydroxyzimtsäuremethylester		
<i>p</i> -Coumarsäuremethylester	101,0 \pm 1,7	98,9 \pm 1,8
Kaffeesäuremethylester	76,9 \pm 1,1	37,4 \pm 1,8
Ester der D-(-)-Chinasäure		
5-Kaffeoylchinasäure	61,2 \pm 6,3	20,6 \pm 1,3
Flavonoide		
Phloretin	85,7 \pm 4,2	44,0 \pm 8,4
Phloretin-2'-O-glucosid	100,9 \pm 0,7	96,5 \pm 0,4
Quercetin	n.d.	n.d.
Quercetin-3-O-rhamnosid	93,3 \pm 2,6	55,6 \pm 5,5
(-)-Epicatechin	49,1 \pm 0,8	20,1 \pm 1,7
(+)-Catechin	89,2 \pm 4,5	47,3 \pm 0,3
Intestinale Metabolite		
3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure	102,8 \pm 1,4	90,2 \pm 1,2
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure	2,2 \pm 4,4	n.d.

Der zeitliche Verlauf der Inkubationen über 24 Stunden ist beispielhaft für Que, Que-R, 5-CQA und *p*-Coumarsäuremethylester in Abbildung 3-3 dargestellt.

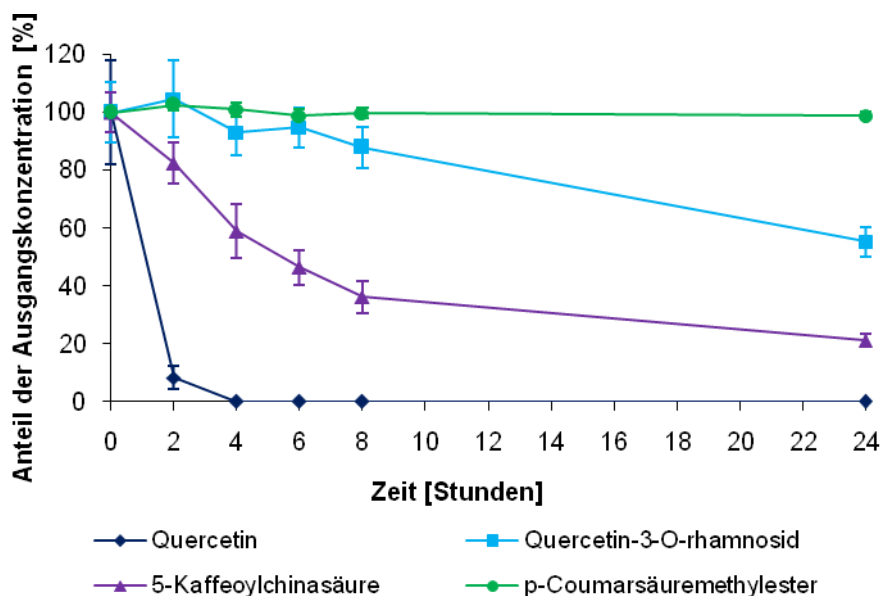


Abbildung 3-3: Zeitlicher Verlauf der Inkubation (Anteil der Ausgangskonzentration [%]) von Quercetin, Quercetin-3-O-rhamnosid, 5-Kaffeoylchinasäure und *p*-Coumarsäuremethylester in HBSS bei 37 °C über 24 Stunden. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

Die Verbindungen *p*-Coumarsäuremethylester, *p*-Coumarsäure, Ferulasäure, Dihydroferulasäure, PhI-G und 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure erwiesen sich über den gesamten Zeitraum von 24 Stunden in HBSS bei 37 °C als stabil. Que-R war über einen Zeitraum von 8 Stunden stabil. Bei dem Dihydrochalcon PhI war eine Abnahme zu beobachten. 5-CQA, Kaffeesäure, Dihydrokaffeesäure, Kaffeesäuremethylester, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, Epi und Cat wurden bei 37 °C in HBSS über einen Zeitraum von 24 Stunden abgebaut. Nach 8 Stunden waren nur noch 20 bis 55% der Ausgangsverbindungen nachweisbar. Que war bereits nach vierstündiger Inkubation nicht mehr nachweisbar. Abbauprodukte wurden bei 5-CQA, Epi, Cat und Que detektiert, bei den anderen Verbindungen wurden keine Abbauprodukte nachgewiesen.

5-CQA isomerisierte zu 3- und 4-CQA. Der zeitliche Verlauf der Isomerisierung von 5-CQA ist in Abbildung 3-4 dargestellt.

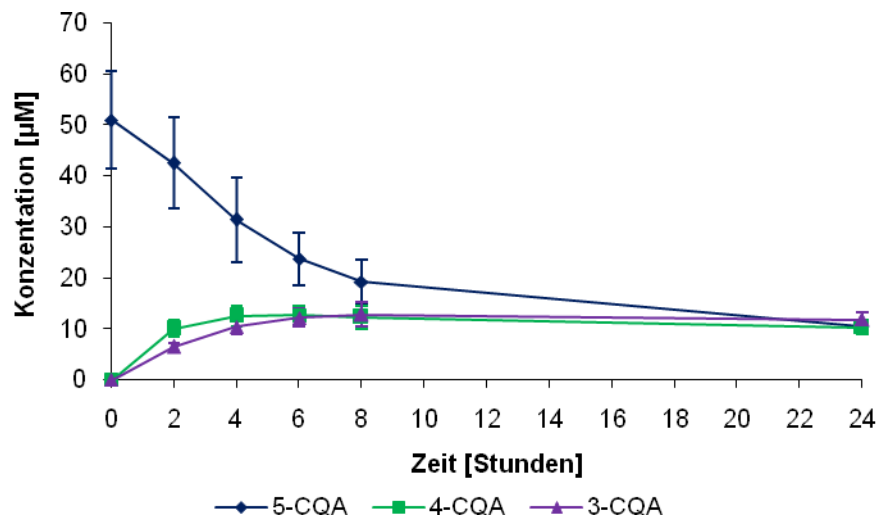


Abbildung 3-4: Zeitlicher Verlauf über 24 Stunden der Isomerisierung [µM] von 5-Kaffeoylchinasäure (5-CQA) zu 3- und 4-Kaffeoylchinasäure (3- und 4-CQA) in HBSS bei 37 °C. Die Daten sind Mittelwerte ± Stabw aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

Bei der Inkubation von Epi wurden zwei Abbauprodukte detektiert, deren Retentionszeiten bei 9,1 und 11,3 Minuten lagen. Die HPLC-DAD-Chromatogramme des Mediums nach 24-stündiger Inkubation sind in Abbildung 3-5 gezeigt. Epi wies ein Absorptionsmaximum bei 280 nm auf (siehe Abbildung 3-6), die beiden Abbauprodukte AE1 und AE2 wiesen identische Absorptionsspektren mit zwei Maxima bei 253 und 280 nm (siehe Abbildung 3-7).

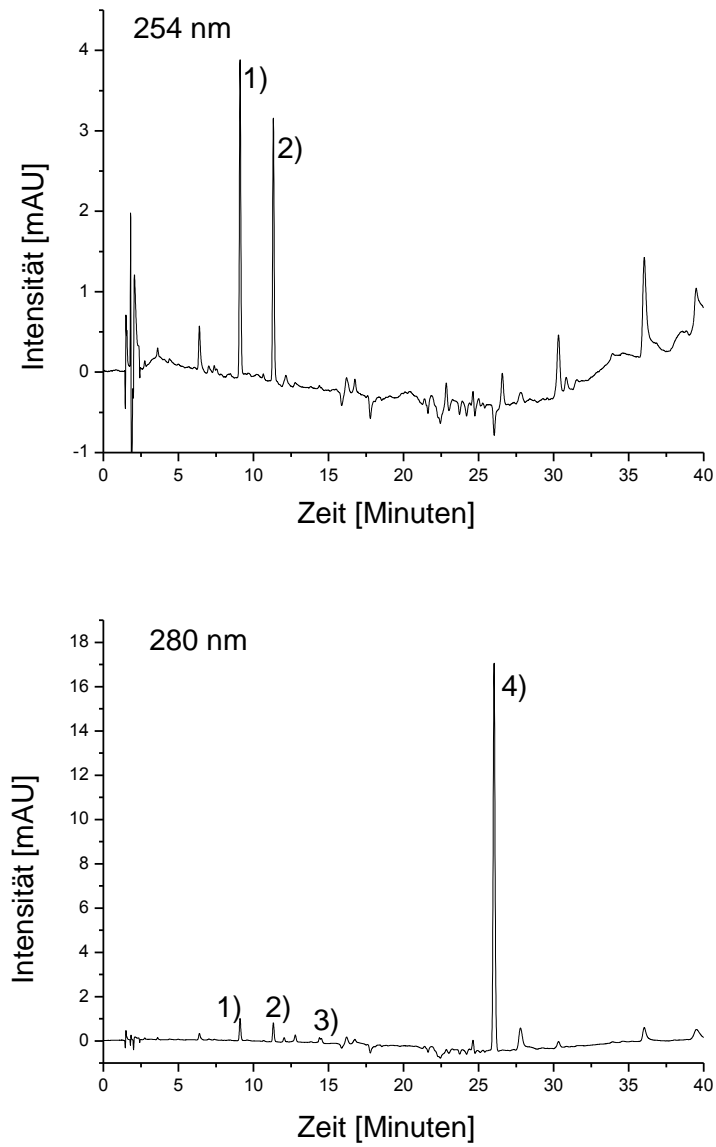


Abbildung 3-5: HPLC-DAD-Chromatogramme des HBSS-Mediums nach 24 Stunden Inkubation mit (-)-Epicatechin. Oben: 254 nm, unten: 280 nm; 1) Abbauprodukt AE1, 2) Abbauprodukt AE2, 3) (-)-Epicatechin, 4) Interner Standard.

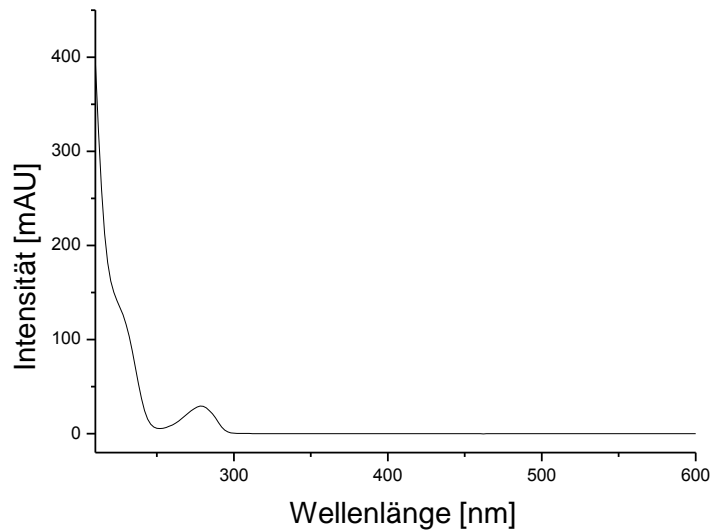


Abbildung 3-6: UV/VIS-Absorptionsspektrum von (-)-Epicatechin.

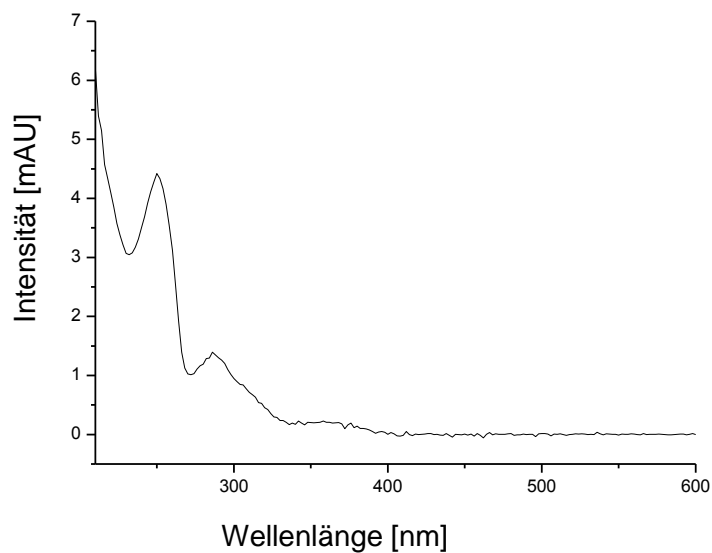


Abbildung 3-7: Exemplarisches UV/VIS-Absorptionsspektrum des Abbauproduktes AE1 von (-)-Epicatechin.

Zur weiteren Identifizierung von AE1 und AE2 wurden mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS die Masse/Ladungsverhältnisse (m/z) sowie die Produktionenspektren von Epi und den Abbauprodukten ermittelt. Epi wies ein Quasimolekülion mit m/z von 289,1 auf, AE1 und AE2 dagegen nur mit m/z 287,1. Die Produktionen sowie Retentionszeit und Absorptionsmaximum sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst. Die MS/MS-Produktionenspektren von Epi sowie der Abbauprodukte sind im Anhang abgebildet (Abbildung 9-1 und Abbildung 9-2).

Tabelle 3-2: Retentionszeiten, Absorptionsmaxima und Produktionen von (-)-Epicatechin und den beiden Abbauprodukten AE1 und AE2 in HBSS bei 37 °C.

Name	Retentionszeit [min]	λ max [nm]	Molekülion [m/z]	Produktionen [m/z]
(-)-Epicatechin	14,4	280	289,1	245,1; 205,0; 203,0; 124,9; 108,9
AE1	9,1	253, 280	287,1	200,8; 125,0
AE2	11,3	253, 280	287,1	200,8; 125,0

Das zusätzliche Absorptionsmaximum der Abbauprodukte bei 253 nm wies darauf hin, dass es sich um Chinone handeln könnte. Das m/z der Abbauprodukte war um zwei reduziert als das der Ausgangsverbindung. Die Produktionenspektren von AE1 und AE2 waren identisch und wiesen genauso wie Epi ein Fragment mit m/z 125 auf, was darauf hinwies, dass der A-Ring bei den Abbauprodukten unverändert vorlag. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass es sich bei AE1 und AE2 um zwei diastereomere Epi-Chinone handeln könnte, eine mögliche Struktur zeigt Abbildung 3-8.

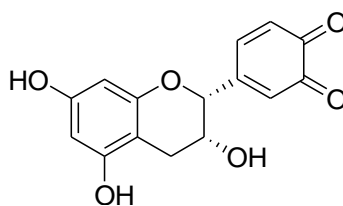


Abbildung 3-8: Struktur von (-)-Epicatechinchinon, möglicherweise gebildet beim Abbau von (-)-Epicatechin in HBSS bei 37 °C.

Die Quantifizierung von AE1 und AE2 erfolgte als Epi. Der zeitliche Verlauf des Epi-Abbaus sowie der Bildung von AE1 und AE2 sind in Abbildung 3-9 dargestellt.

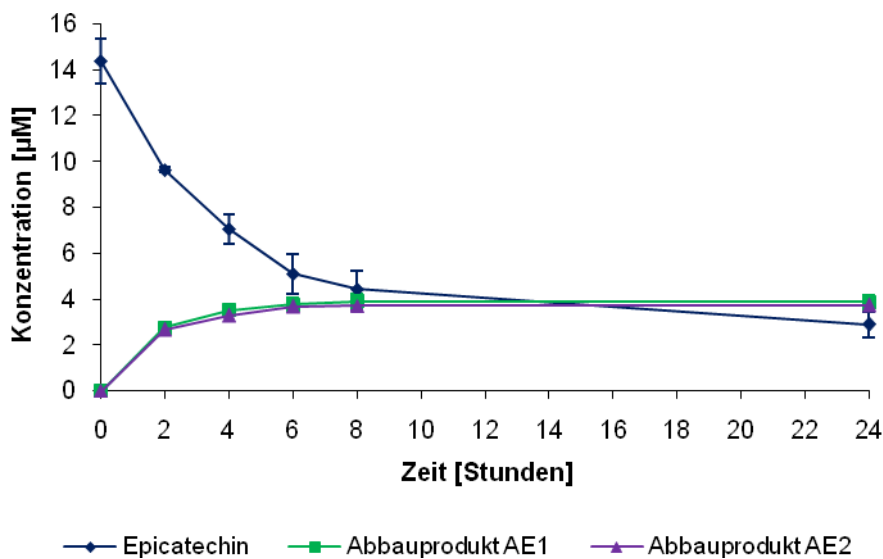


Abbildung 3-9: Zeitlicher Verlauf über 24 Stunden der Bildung der Abbauprodukte [µM] AE1 und AE2 aus (-)-Epicatechin in HBSS bei 37 °C. Die Daten sind Mittelwerte ± Stabw aus n = 3 unabhängigen Experimenten. Bei AE1 und AE2 könnte es sich um (-)-Epicatechinone handeln.

Que war bereits nach zwei Stunden fast vollständig abgebaut. Auch hier wurden zwei Abbauprodukte identifiziert. Die Retentionszeiten, Absorptionsmaxima und Produktionen der Abbauprodukte AQ1 und AQ2 sind in Tabelle 3-3 dargestellt. Die MS/MS-Produktions- und UV/VIS-Spektren sind im Anhang (Abbildung 9-3 bis Abbildung 9-7) gezeigt.

Tabelle 3-3: Retentionszeiten, Absorptionsmaxima und Produktionen von Quercetin und den beiden Abbauprodukten AQ1 und AQ2 in HBSS bei 37 °C.

Name	Retentionszeit [min]	λ max [nm]	Molekülion [m/z]	Produktionen [m/z]
Quercetin	26,9	372	301,0	178,9; 150,8
AQ1	8,6	260	153,1	109,1
AQ2	15,6	295	317,0	255,1; 227,1; 150,9;

Retentionszeit, λ max und Produktionenspektrum von AQ1 stimmten mit denen von käuflich erworbener 3,4-Dihydroxybenzoesäure (Struktur siehe Abbildung 3-10) überein.

Das Produktionenspektrum von AQ2 gab Hinweise darauf, dass im Vergleich zur Ausgangsverbindung Que ein zusätzliches Sauerstoffatom im Molekül vorhanden war. Das Fragment mit m/z 151, das dem A-Ring zugeordnet werden konnte, war sowohl bei Que als auch bei AQ2 identisch. Es war anzunehmen, dass die Oxidation im B- oder C-Ring stattgefunden hatte.

Zur weiteren Strukturaufklärung von AQ2 wurde Que in mit $^{18}\text{O}_2$ -gesättigtem HBSS inkubiert. Mittels ESI_{neg} -MS/MS wurden zwei Quasi-Molekülen mit m/z 317,0 (AQ2) und 319,0 ($^{18}\text{O}_2$ -

AQ2) detektiert. Als Produktionen wurden m/z 257,1; 229,1 und 150,9 detektiert. Das Produktionenspektrum ist im Anhang (Abbildung 9-8) abgebildet. Die Ergebnisse dieser Inkubation bestätigten, dass es zum Einbau eines Sauerstoffatoms in das Molekül kam, die nicht am A-Ring stattfand. Anhand von Literaturdaten [Jungbluth *et al.* 2000, Krishnamachari *et al.* 2004] wurde geschlussfolgert, dass es sich bei AQ2 um 2,5,7,3',4'-Pentahydroxy-3,4-flavandion handelt. Die Strukturen der beiden Abbauprodukte zeigt Abbildung 3-10.

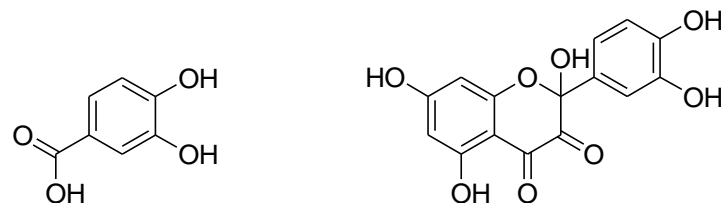


Abbildung 3-10: Strukturen der postulierten Abbauprodukte von Quercetin in HBSS bei 37 °C: 3,4-Dihydroxybenzoesäure (links) und 2,5,7,3',4'-Pentahydroxy-3,4-flavandion (rechts).

Der zeitliche Verlauf des Que-Abbaus ist in Abbildung 3-11 gezeigt, AQ1 wurde als 3,4-Dihydroxybenzoesäure und AQ2 als Que quantifiziert.

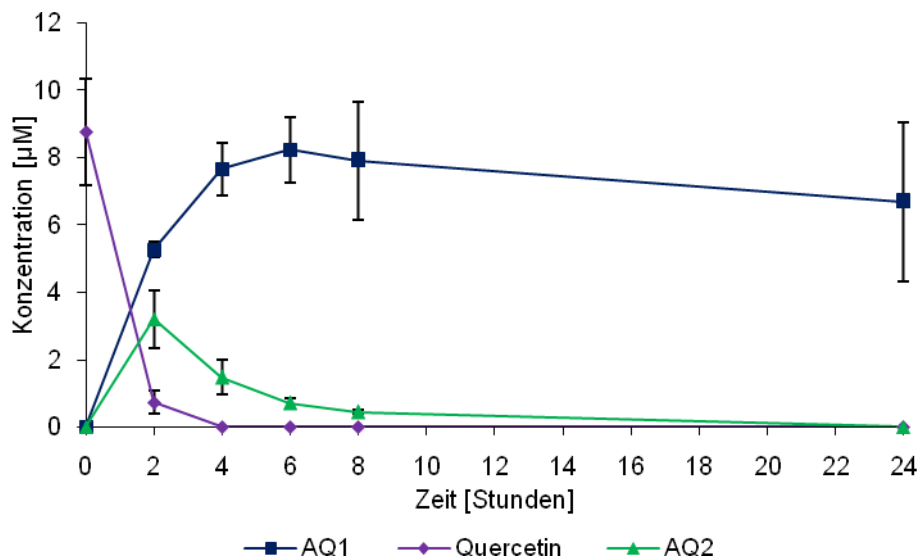


Abbildung 3-11: Zeitlicher Verlauf des Abbaus über 24 Stunden von Quercetin, Bildung der Abbauprodukte [μM] AQ1 und AQ2, quantifiziert als 3,4-Dihydroxybenzoesäure und Quercetin. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

3.3 Wasserstoffperoxid-Generierung im Inkubationsmedium

Bei der Inkubation von Polyphenolen wurde in verschiedenen Zellkulturmedien die Bildung von Wasserstoffperoxid beobachtet (siehe Kapitel 2.6.6). Deshalb wurde die Bildung von Wasserstoffperoxid unter den weiter verwendeten Inkubationsbedingungen in der Ussing-

Kammer mittels photometrischem FOX1-Assay untersucht. Die verwendeten Konzentrationen einiger ausgewählter Polyphenole sowie die erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 3-4 dargestellt.

Tabelle 3-4: Wasserstoffperoxid-Generierung (H₂O₂) [µM] im Inkubationsmedium HBSS in der Ussing-Kammer bei Inkubation mit Polyphenolen. Inkubationskonzentrationen und Ergebnisse. Die Daten sind Mittelwerte ± Stabw aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

Polyphenol	Inkubationskonzentration	H ₂ O ₂ [µM]
Hydroxyzimtsäuren		
Dihydrozimtsäure	20 µM	<1
<i>p</i> -Coumarsäure	20 µM	<1
Kaffeesäure	20 µM	<1
Dihydrokaffesäure	20 µM	<1
Ferulasäure	20 µM	<1
Isoferulasäure	20 µM	1,8 ± 0,4
Dihydroferulasäure	20 µM	<1
Hydroxyzimtsäuremethylester		
<i>p</i> -Coumarsäuremethylester	20 µM	1,2 ± 0,2
Kaffeesäuremethylester	20 µM	<1
Flavonoide		
Phloretin	20 µM	2,8 ± 0,1
Phloretin-2'-O-glucosid	20 µM	1,8 ± 0,8
Quercetin	10 µM	<1
Quercetin-3-O-rhamnosid	10 µM	<1
(-)-Epicatechin	10 µM	2,3 ± 0,2
(+)-Catechin	10 µM	1,2 ± 0,0
Intestinale Metabolite		
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure	20 µM	<1
3,4-Hydroxypropionsäure	20 µM	2,6 ± 0,7
Phloroglucin	20 µM	<1

Die Nachweisgrenze des verwendeten FOX1-Assays lag bei 1 µM. Bei mehr als der Hälfte der untersuchten Polyphenole lag die gebildete Wasserstoffperoxid-Konzentration unter 1 µM. Die höchsten Konzentrationen mit 2,3 bis 2,8 µM wurden bei Phl, Epi und 3,4-Hydroxypropionsäure gemessen.

Zusätzlich wurde untersucht, ob während der vierstündigen Inkubation in der Ussing-Kammer vorhandenes Wasserstoffperoxid entweicht. Dazu wurde mit Wasserstoffperoxidkonzentrationen von 5 bis 50 µM inkubiert und nach vier Stunden die noch vorhandene Menge Wasserstoffperoxid bestimmt. Der gemessene Wert lag wie in

Abbildung 3-12 dargestellt bei allen Konzentrationen unterhalb der inkubierten Konzentration.

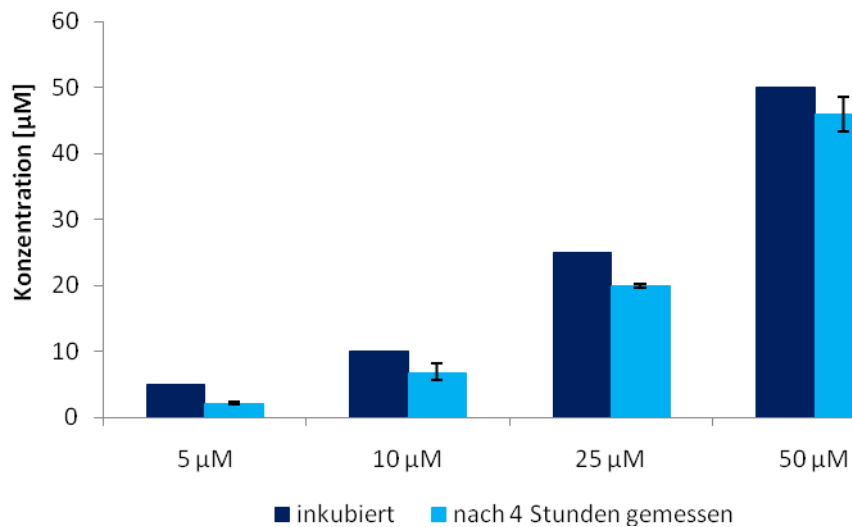


Abbildung 3-12: Wasserstoffperoxid-Konzentration (H₂O₂) [µM] in der Ussing-Kammer während einer vierstündigen Inkubation. Inkubierte (5, 10, 25 und 50 µM) und nach 4 Stunden bestimmte Wasserstoffperoxid-Konzentration. Die Daten sind Mittelwerte ± Stabw aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

3.4 Transepitheliale Absorption der Polyphenole aus Apfel in verschiedenen Modellen

Die transepitheliale Absorption der Apfelpolyphenole, ihrer intestinalen Metabolite sowie einiger strukturverwandter Polyphenole wurde in verschiedenen Modellen untersucht. Eingesetzt wurden Monolayer der Kolonkarzinomzelllinie T84. In weiteren Versuchen wurden die T84-Monolayer mit C10 vorbehandelt, um den TER, d.h. die Integrität der intestinalen Barriere zu reduzieren. Weiterhin wurden *ex vivo*-Inkubationen mit humanen Biopsien, die im Rahmen von Routineuntersuchungen mit dem Einverständnis der Patienten entnommen wurden, durchgeführt. Da diese humanen Biopsien jedoch nicht routinemäßig zur Verfügung stehen, wurde zunächst die Inkubation intestinaler Schweinedarmmukosa etabliert. Die Schweinedarmmukosa ist gut verfügbar, so dass Inkubationen mit allen verwendeten Polyphenolen durchgeführt werden konnten. Die Inkubation der humanen Biopsien erfolgte im Anschluss mit einigen ausgewählten Polyphenolen.

Der größte Teil der Inkubationen wurden vom Kooperationspartner AG Melcher/Scheppach (Gastroenterologisches Labor des Universitätsklinikums Würzburg) durchgeführt, im Anschluss erfolgte der Versand der gefrorenen Überstände und Zellsuspensionen zur weiteren Untersuchung nach Kaiserslautern. Zusätzlich wurden in Kaiserslautern die

Inkubationen zur Ermittlung des cytosolischen Polyphenolgehalts (siehe 3.4.2) und zur Charakterisierung der Absorption von PhI (siehe 3.5.2) durchgeführt.

Generell wurden die T84-Monolayer bzw. Mukosa in die Ussing-Kammer eingespannt und die beiden Kammerhälften mit dem Inkubationsmedium HBSS (jeweils 5 mL, pH-Wert 7,4) befüllt. Nach einer 30-minütigen Equilibrierungsphase wurde die Stammlösung der Polyphenole (in DMSO) in HBSS verdünnt, auf der apikalen Seite der Ussing-Kammer entsprechend Medium entnommen und die Polyphenollösung zugegeben. Kurz nach dem Start der Inkubation sowie nach 1, 2, 3 und 4 Stunden wurden sowohl auf der apikalen als auch auf der basolateralen Seite Aliquote (0,5 mL) des Mediums entnommen und sofort bei -80 °C tiefgefroren und gelagert. Nach vier Stunden wurde die Inkubation beendet und der Monolayer bzw. die Mukosa bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C tiefgefroren und gelagert. Die Zellen wurden lysiert und nach Extraktion und Größenausschlusszentrifugation ebenfalls auf ihren Polyphenolgehalt hin untersucht. Somit war es möglich, den zellassozierten Anteil der Polyphenole zu ermitteln. Die Quantifizierung der Polyphenole in den Überständen und Zellsuspensionen erfolgte mittels HPLC-DAD und HPLC-MS/MS. Wegen einer besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden die Werte zu den unterschiedlichen Zeitpunkten in % angegeben, d.h. die Inkubationsmenge wurde 100% gesetzt und darauf basierend die Werte am Ende der Inkubationszeit berechnet.

3.4.1 Transepitheliale Absorption in T84-Monolayern

Alle Polyphenole (außer Que) wurden nach vier Stunden auf der apikalen Seite der T84-Monolayer nachgewiesen, ein Teil der Polyphenole war nach der Inkubation auch auf der basolateralen Seite detektierbar.

Die Absorption erfolgte bei allen untersuchten Polyphenolen über den Zeitraum von vier Stunden linear, als Beispiel ist die transepitheliale Absorption von Zimtsäure und PhI in Abbildung 3-13 und Abbildung 3-14 dargestellt. Die Verteilung der Polyphenole auf die apikale und basolaterale Seite sowie der Anteil, der zellassoziert vorlag, ist in Tabelle 3-5 zusammengefasst.

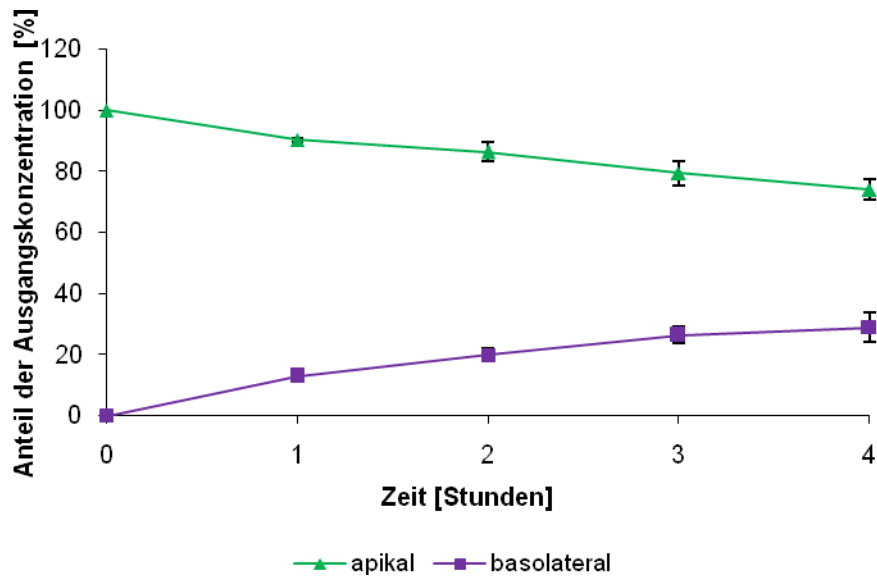


Abbildung 3-13: Zeitlicher Verlauf über 4 Stunden der transepithelialen Absorption (Anteil der Ausgangskonzentration [%]) von Zimtsäure in T84-Monolayern in der Ussing-Kammer. Inkubiert wurden $20 \mu\text{M}$ auf der apikalen Seite. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

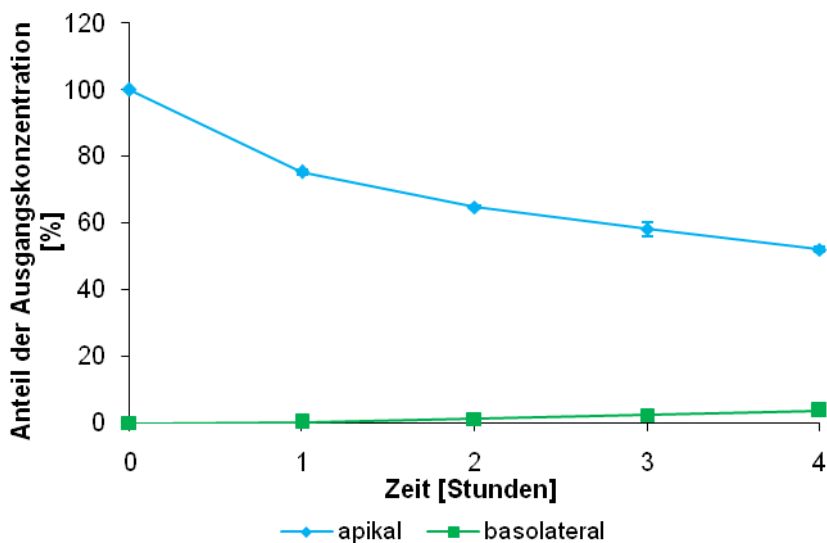


Abbildung 3-14: Zeitlicher Verlauf über 4 Stunden der transepithelialen Absorption (Anteil der Ausgangskonzentration [%]) von Phloretin in T84-Monolayern in der Ussing-Kammer. Inkubiert wurden $20 \mu\text{M}$ auf der apikalen Seite. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

Tabelle 3-5: Absorptionsstudien mit T84-Monolayern. Inkubationskonzentrationen und Verteilung (Anteil der Ausgangskonzentration [%]) der Hydroxyzimtsäuren, Flavonoide und D-(-)-Chinasäure in den Zellsuspensionen und auf der apikalen und basolateralen Seite der Ussing-Kammer nach 4 h Inkubation. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. n.d.= nicht detektierbar, <LOQ = unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Substanz	Inkubations- konzentration [μ M]	Anteil der Ausgangskonzentration [%]		
		apikal	basolateral	zellosoziiert
Hydroxyzimtsäuren				
Zimtsäure	20	74,1 \pm 3,4	29,0 \pm 4,9	1,1 \pm 0,1
Dihydrozimtsäure	20	67,2 \pm 5,8	24,8 \pm 0,6	<LOQ
<i>p</i> -Coumarsäure	20	109,7 \pm 1,7	n.d.	<LOQ
Kaffeesäure	20	82,9 \pm 6,6	n.d.	<LOQ
Dihydrokaffeesäure	20	23,2 \pm 6,3	n.d.	<LOQ
Ferulasäure	20	102,7 \pm 4,4	2,3 \pm 0,2	0,9 \pm 0,1
Isoferulasäure	20	102,4 \pm 12,8	3,2 \pm 2,5	0,3 \pm 0,1
Dihydroferulasäure	20	115,0 \pm 10,1	n.d.	<LOQ
Hydroxyzimtsäuremethylester				
<i>p</i> -Coumarsäuremethylester	20	52,8 \pm 4,0	37,9 \pm 2,2	0,9 \pm 0,1
Kaffeesäuremethylester	20	62,8 \pm 0,7	45,8 \pm 3,1	1,1 \pm 0,1
Ester der D-(-)-Chinasäure				
4- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	10	88,2 \pm 5,3	n.d.	<LOQ
5- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	10	93,9 \pm 10,5	n.d.	<LOQ
1-Kaffeoylchinasäure	10	94,9 \pm 3,6	n.d.	<LOQ
3-Kaffeoylchinasäure	50	75,8 \pm 1,0	n.d.	<LOQ
4-Kaffeoylchinasäure	10	47,9 \pm 1,3	n.d.	<LOQ
5-Kaffeoylchinasäure	50	104,9 \pm 9,1	n.d.	0,2 \pm 0,1
Flavonoide				
Phloretin	20	52,1 \pm 0,6	3,8 \pm 0,6	8,4 \pm 0,1
Phloretin-2'- <i>O</i> -glucosid	20	110,5 \pm 6,4	n.d.	2,9 \pm 0,2
Phloretin-2'- <i>O</i> -xyloglucosid	20	103,4 \pm 1,5	n.d.	1,1 \pm 0,1
Quercetin	10	n.d.	n.d.	1,8 \pm 0,2
Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnosid	10	99,9 \pm 6,2	n.d.	n.d.
(-)-Epicatechin	10	88,8 \pm 0,9	n.d.	n.d.
(+)-Catechin	10	44,8 \pm 4,8	n.d.	n.d.
Intestinale Metabolite				
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure	10	n.d.	n.d.	n.d.
3,4-Dihydroxytoluol	20	n.d.	n.d.	n.d.
Phloroglucin	20	86,8 \pm 2,7	n.d.	n.d.
D-(-)-Chinasäure	80	136,4 \pm 16,5	0,5 \pm 0,1	n.d.

Von den untersuchten Hydroxyzimtsäuren wurden nach vier Stunden lediglich Zimt-, Dihydrozimt-, Ferula- und Isoferulasäure auf der basolateralen Seite nachgewiesen. Dabei war für Zimt- und Dihydrozimtsäure die transepitheliale Absorption mit 29 bzw. 25% wesentlich höher als bei Ferula- und Isoferulasäure (2 bzw. 3%). *p*-Coumar-, Kaffee-, Dihydrokaffee- und Dihydroferulasäure wurden basolateral nicht identifiziert. Zellassoziiert wurden mittels HPLC-MS/MS für alle untersuchten Hydroxyzimtsäuren Spuren detektiert, sie lagen jedoch – außer bei Zimt-, Ferula- und Isoferulasäure – unterhalb der Nachweisgrenze. Bei Kaffee- und Dihydrokaffeesäure wurden nach der Inkubation weniger als 100% der Ausgangskonzentration nachgewiesen.

Im Vergleich dazu konnten die untersuchten Hydroxyzimtsäuremethylester der Kaffee- und *p*-Coumarsäure nach 4 Stunden mit 46 und 37% der inkubierten Konzentration auf der basolateralen Seite bestimmt werden (1% zellassoziiert).

Die Ester der D-(-)-Chinasäure mit Kaffee- und *p*-Coumarsäure gelangten im T84-Modell nicht auf die basolaterale Seite der Ussing-Kammer, zellassoziiert wurden aber geringe Mengen bestimmt. Für 5-CQA wurde bei der zellfreien Inkubation ein Abbau innerhalb von 4 Stunden beobachtet, in Gegenwart der T84-Zellen erfolgte dieser jedoch nicht.

Die inkubierten Dihydrochalkone PhI-G und PhI-XG wurden basolateral nicht detektiert, das Aglykon PhI wurde dagegen basolateral nachgewiesen. Zellassoziiert wurden alle drei Verbindungen identifiziert, bei PhI 8,4% der Ausgangskonzentration. Bei der Inkubation von PhI-G wurden außerdem geringe Mengen des Aglykons PhI zellassoziiert ermittelt ($0,3 \pm 0,2\%$ der PhI-G-Ausgangsmenge).

Das Flavonol Que wurde nach der vierstündigen Inkubation weder apikal noch basolateral nachgewiesen, wobei geringe Mengen zellassoziiert vorlagen. Dafür wurden auf der apikalen Seite die oxidativen Abbauprodukte 3,4-Dihydroxybenzoesäure und 2,5,7,3',4'-Pentahydroxy-3,4-flavandion identifiziert (siehe 3.2). Das Glycosid Que-R lag nur apikal vor.

Die beiden Flavan-3-ole Epi und Cat wurden zellassoziiert und basolateral nicht detektiert.

Weiterhin wurde die transepitheliale Absorption einiger intestinaler Metabolite der Apfelpolyphenole untersucht. 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und 3,4-Dihydroxytoluol konnten nach der vierstündigen Inkubation in keinem der drei Kompartimente detektiert werden. Phloroglucin wurde nur auf der apikalen Seite des T84-Monolayers nachgewiesen. D-(-)-Chinasäure wurde in einer Konzentration von 0,4% auf der basolateralen Seite gemessen, der Rest verblieb auf der apikalen Seite.

Bei einigen der inkubierten Polyphenole (*p*-Coumarsäure, Ferulasäure, Isoferulasäure, Dihydroferulasäure, 5-CQA, PhI-G, PhI-XG und D-(-)-Chinasäure) wurden nach der vierstündigen Inkubation insgesamt in den drei Kompartimenten (apikal, zellassoziiert und basolateral) mehr als 100% der Ausgangskonzentrationen detektiert.

3.4.2 Bestimmung der cytosolischen und Membran assoziierten Polyphenolkonzentrationen

Nach der Inkubation der Polyphenole konnte durch die Analytik der Zellsuspensionen lediglich die Menge der Polyphenole bestimmt werden, die zellassoziiert vorlag. Um den cytosolischen Gehalt der Polyphenole zu bestimmen, wurden die Monolayer nach der Inkubation mit Digitonin, einem Saponinglycosid, das hämolytische und Zellmembran auflösende Eigenschaften hat, inkubiert. Nach dem Waschen der Monolayer wurden die Zellen bei Raumtemperatur durch das Digitonin permeabilisiert, bei der anschließenden 30-minütigen Inkubation auf Eis konnte das Cytosol aus den Zellen herausfließen. Im Überstand wurde dann mittels HPLC-DAD die Polyphenolkonzentrationen, welche vorher im Cytosol vorlagen, bestimmt.

Die Versuche wurden in 6-Well-Platten durchgeführt. Es wurden jeweils zwei Wells mit einem der sechs exemplarisch gewählten Polyphenole des Apfels (Kaffeensäure, 5-CQA, PhI, PhI-G, Que und Que-R) in einer Konzentration von 50 μM inkubiert. Aus einem Well wurde analog zu 3.4.1 die Zellsuspension gewonnen und so der gesamte zellassoziierte Anteil des Polyphenols ermittelt. Das zweite Well wurde zunächst mit Digitonin behandelt und der cytosolische Gehalt bestimmt. Anschließend wurde daraus ebenfalls die Zellsuspension gewonnen und der Membran gebundene Gehalt ohne den cytosolischen ermittelt. Diese beiden Werte wurden addiert. Die Summe sollte dem Gehalt entsprechen, der in den Wells ermittelt wurde, die nach der Inkubation direkt lysiert wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-15 dargestellt, eine Tabelle mit den Daten ist außerdem im Anhang (Tabelle 9-4) gezeigt.

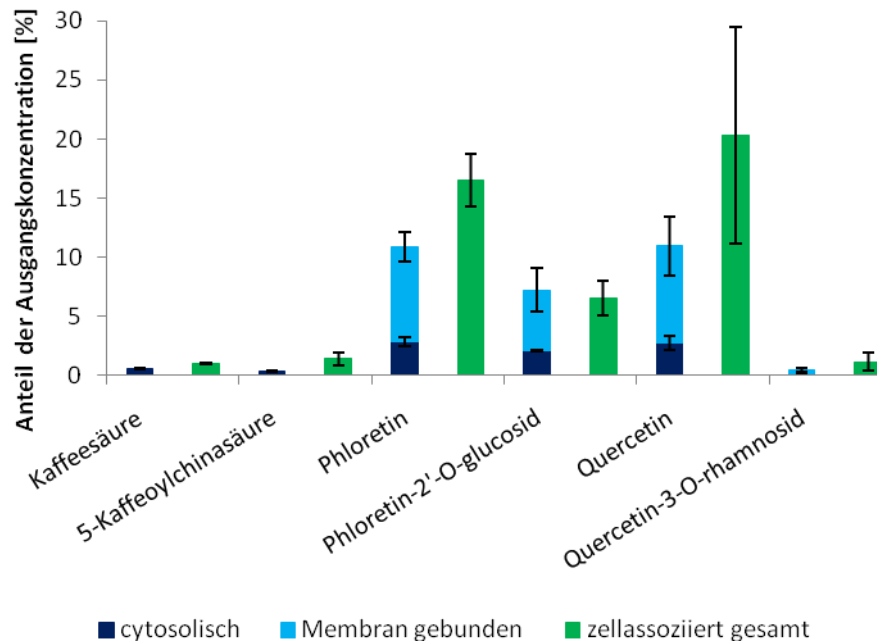


Abbildung 3-15: Anteil der Ausgangskonzentrationen [%] ausgewählter Polyphenole im Cytosol, Membran gebunden und gesamt zellosoziiert in T84-Zellen nach vierstündiger Inkubation (50 μ M). Die cytosolische Konzentration wurde nach Permeabilisierung der Zellen mit Digitonin ermittelt, anschließend wurde durch Lyse der Membran gebundene Anteil bestimmt. In einem weiteren Versuch wurde zur Kontrolle die gesamte zellosoziierte Konzentration durch Lyse ohne vorherige Digitonin-Behandlung bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus n = 5 unabhängigen Experimenten.

Nach der Inkubation der Hydroxyzimtsäuren Kaffeesäure und 5-CQA wurden 0,6 bzw. 0,4% der eingesetzten Menge im Cytosol bestimmt, nach der anschließend durchgeführten Lyse wurden diese Hydroxyzimtsäuren nicht in der Zellsuspension detektiert. Bei der direkten Lyse der Zellen ohne die vorherige Permeabilisierung mit Digitonin wurden 1,0 bzw. 1,4% ermittelt.

Nach der Inkubation der Flavonoide Phl und Que und ihrer Glycoside wurden im Cytosol zwischen 0,2 und 2,9% der eingesetzten Menge bestimmt, der größere Teil mit zwischen 0,3 und 8,2% war Membran gebunden quantifizierbar. Bei direkter Lyse wurden zwischen 1,2 und 20,3% ermittelt.

3.4.3 Transepitheliale Absorption in Caprinsäure-vorbehandelten T84-Monolayern

Die transepitheliale Absorption der Polyphenole in Caprinsäure (C10) vorbehandelten T84-Monolayern wurde ebenfalls mittels HPLC-DAD untersucht. Dadurch wurde der Einfluss der TJs auf die Absorption von der apikalen Seite auf die basolaterale Seite überprüft. Die Absorptionsraten unterschieden sich (außer bei Phl) nicht signifikant von denen ohne C10-Behandlung. Die Ergebnisse sind im Anhang zusammengefasst (siehe Tabelle 9-2). Bei Phl

wurde mit $6,6 \pm 0,7\%$ ein signifikant höherer Wert absorbiert als im Vergleich zu den Monolayern ohne C10-Behandlung ($3,8 \pm 0,6\%$).

3.4.4 Transepitheliale Absorption in Schweinedarmmukosa

Aufgrund der funktionellen Gemeinsamkeiten des Gastrointestinaltraktes von Mensch und Schwein [Almond 1996, Miller und Ullrey 1987, Vodicka *et al.* 2005] wurde die transepitheliale Absorption von Polyphenolen im Schweinedarmmukosamodell untersucht. Dabei wurden vom Schweinedarm (terminales Ileum) die *Lamina epithelialis* und *Lamina propria mucosae* von den übrigen Schichten der Darmwand separiert und in die Ussing-Kammer eingespannt. Die Fläche, die dem Medium exponiert war, betrug $0,71 \text{ cm}^2$. Inkubation und Analytik erfolgten analog zu den Versuchen mit T84-Monolayern. In Abbildung 3-16 ist beispielhaft die transepitheliale Absorption von 5-CQA dargestellt. Die Ergebnisse aller Inkubationen sind in Tabelle 3-6 zusammengefasst.

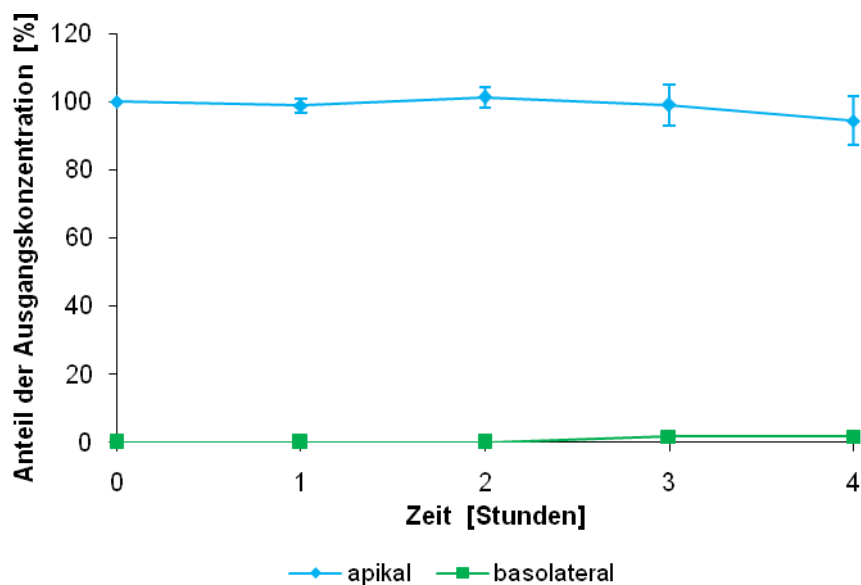


Abbildung 3-16: Zeitlicher Verlauf über 4 Stunden der transepithelialen Absorption (Anteil der Ausgangskonzentration [%]) von 5-Kaffeoylchinasäure in Schweinedarmmukosa in der Ussing-Kammer. Inkubiert wurden $50 \mu\text{M}$ auf der apikalen Seite. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

Tabelle 3-6: Absorptionsstudien mit Schweinedarmmukosa. Inkubationskonzentrationen und Verteilung (Anteil der Ausgangskonzentration [%]) der Hydroxyzimtsäuren, Flavonoide und D-(-)-Chinasäure auf der apikalen und basolateralen Seite der Ussing-Kammer nach 4 h Inkubation. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. n.d.= nicht detektierbar.

Substanz	Inkubations- konzentration [μ M]	Anteil der Ausgangskonzentration [%]	
		apikal	basolateral
Hydroxyzimtsäuren			
Zimtsäure	20	93,9 \pm 1,5	n.d.
Dihydrozimtsäure	20	92,0 \pm 1,7	n.d.
<i>p</i> -Coumarsäure	20	100,5 \pm 2,0	3,3 \pm 1,8
Kaffeesäure	20	105,4 \pm 9,7	3,7 \pm 0,1
Dihydrokaffeesäure	20	91,1 \pm 2,8	n.d.
Ferulasäure	20	89,9 \pm 2,0	1,2 \pm 1,1
Isoferulasäure	20	91,6 \pm 16,0	2,6 \pm 3,0
Dihydroferulasäure	20	108,2 \pm 5,1	n.d.
Hydroxyzimtsäuremethylester			
<i>p</i> -Coumarsäuremethylester	20	19,4 \pm 10,6	n.d.
Kaffeesäuremethylester	20	45,8 \pm 13,7	n.d.
Ester der D-(-)-Chinasäure			
4- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	10	90,9 \pm 3,3	n.d.
5- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	10	57,4 \pm 21,8	n.d.
1-Kaffeoylchinasäure	10	79,5 \pm 5,8	n.d.
3-Kaffeoylchinasäure	50	105,9 \pm 3,5	1,5 \pm 0,2
4-Kaffeoylchinasäure	10	81,6 \pm 14,1	n.d.
5-Kaffeoylchinasäure	50	94,4 \pm 7,2	1,9 \pm 1,0
Flavonoide			
Phloretin	20	n.d.	n.d.
Phloretin-2'- <i>O</i> -glucosid	20	75,7 \pm 6,7	n.d.
Phloretin-2'- <i>O</i> -xyloglucosid	20	103,9 \pm 0,9	n.d.
Quercetin	10	n.d.	n.d.
Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnosid	10	95,5 \pm 5,5	n.d.
(-)-Epicatechin	10	96,5 \pm 6,0	n.d.
(+)-Catechin	10	91,0 \pm 7,7	n.d.
Intestinale Metabolite			
3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure	10	63,9 \pm 4,8	n.d.
3,4-Dihydroxytoluol	20	52,7 \pm 3,4	1,8 \pm 0,9
Phloroglucin	20	n.d.	n.d.
D-(-)-Chinasäure	80	110,4 \pm 10,2	0,6 \pm 0,3

Bei den Hydroxyzimtsäuren waren für *p*-Coumar-, Kaffee-, Ferula- und Isoferulasäure Absorptionen von apikal nach basolateral messbar. Zimtsäure sowie die dehydrierten Strukturanaloga Dihydrokaffee-, Dihydrozimt- und Dihydroferulasäure waren nur apikal quantifizierbar.

Die Methylester von *p*-Coumarsäure und Kaffeesäure wurden nur auf der basolateralen Seite ermittelt, jedoch war die korrespondierende freie Säure in beiden Kammerhälften nachweisbar. Näher wird darauf in Kapitel 3.6.2 eingegangen. Die Ester 4-*p*-CouQA, 5-*p*-CouQA, 1-CQA und 4-CQA waren nur apikal bestimmbar, 3-CQA und 5-CQA dagegen wurden auch basolateral ermittelt.

Die Aglyka PhI und Que wurden in keinem der beiden Kompartimente nachgewiesen. Für ihre Glykoside PhI-G, PhI-XG und Que-R wurde keine Absorption auf der basolateralen Seite gezeigt. Cat und Epi waren ebenfalls basolateral nicht identifizierbar.

Die intestinal gebildeten Metabolite 3,4-Dihydroxytoluol und D-(-)-Chinasäure sind im Gegensatz zu 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und Phloroglucin auf die basolaterale Seite gelangt.

Die zellassoziierten Gehalte der Polyphenole in der Schweinedarmmukosa wurden nicht bestimmt, da die Mukosa zur Bestimmung der Transkriptlevel von TJ-Proteinen vom Kooperationspartner verwendet wurden. Die Ergebnisse werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt [Deußler *et al.* 2010].

3.4.5 Transepitheliale Absorption in humanen Biopsien

Ergänzend zu den Untersuchungen mit Schweinedarmmukosa wurden auch Inkubationen mit humanen Biopsien durchgeführt. Da die Biopsien kleiner sind als die Schweinedarmmukosa, wurde ein spezieller Einsatz für das Aufspannen in der Ussing-Kammer verwendet. Die dem Medium exponierte Fläche war hier nur 0,031 cm² im Gegensatz zu 0,71 cm² bei der Schweinedarmmukosa. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-7 zusammengefasst.

Tabelle 3-7: Absorptionsstudien mit humanen Biopsien. Inkubationskonzentrationen und Verteilung (Anteil der Ausgangskonzentration [%]) der Hydroxyzimtsäuren auf der apikalen und basolateralen Seite der Ussing-Kammer nach 4 h Inkubation. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus n = 3 unabhängigen Experimenten. n.d.= nicht detektierbar, <LOQ = unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Substanz	Inkubationskonzentration	Anteil der Ausgangskonzentration [%]	
		apikal	basolateral
Hydroxyzimtsäuren			
<i>p</i> -Coumarsäure	20	92,8 \pm 15,4	<LOQ
Kaffeesäure	20	37,3 \pm 15,2	n.d.
Ferulasäure	20	83,7 \pm 3,5	<LOQ
Isoferulasäure	20	94,0 \pm 3,3	<LOQ
Dihydroferulasäure	20	93,3 \pm 7,0	<LOQ

Kaffeesäure wurde auf der basolateralen Seite nicht nachgewiesen, bei allen weiteren untersuchten Verbindungen lagen die Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze von 0,02 bis 0,4 mg/L. Von Kaffeesäure waren nach 4 Stunden nur ca. 37% der eingesetzten Menge im Medium quantifizierbar, ein Grund hierfür könnte in der Instabilität der Kaffeesäure im Inkubationsmedium liegen (siehe 3.2). Diese Daten stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen bei den Inkubationen mit T84-Monolayern (Kapitel 3.4.1) und Schweinedarmmukosa (Kapitel 3.4.4).

3.5 Charakterisierung des Transports von Polyphenolen in epithelialen Zellen

Um die Art des Transports der Polyphenole in den vorgestellten Modellen näher zu charakterisieren, wurden weitere Inkubationen für zwei repräsentative Polyphenole (Ferulasäure und PhI) durchgeführt. Die Ergebnisse sind im Folgenden beschrieben.

3.5.1 Studien zur Konzentrationsabhängigkeit der Absorption am Beispiel der Ferulasäure

Um Hinweise auf eine Konzentrationsabhängigkeit der transepithelialen Absorption zu erhalten, wurde Ferulasäure als Modellsubstanz mit T84-Monolayern und Schweinedarmmukosa in einem Konzentrationsbereich von 20 bis 1000 μ M inkubiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-8 gezeigt.

Tabelle 3-8: Absorptionsstudie in T84-Monolayern und Schweinedarmmukosa am Beispiel der Ferulasäure mit unterschiedlichen Konzentrationen (20 bis 1000 μM , Anteil der Ausgangskonzentration [%]). Inkubationskonzentrationen und Verteilung auf der apikalen und basolateralen Seite der Ussing-Kammer nach 4 h Inkubation. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. n.d.= nicht detektierbar, <LOQ = unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Konzentration Ferulasäure [μM]	Anteil der Ausgangs- konzentration [%]	
	apikal	basolateral
T84-Monolayer		
20	102,7 \pm 4,4	2,3 \pm 0,2
50	86,8 \pm 3,8	2,1 \pm 0,0
100	96,6 \pm 2,1	2,1 \pm 0,0
500	100,9 \pm 5,5	1,8 \pm 0,8
1000	94,7 \pm 6,3	2,7 \pm 0,8
Schweinedarmmukosa		
20	89,9 \pm 2,0	1,2 \pm 1,1
50	99,6 \pm 3,1	0,3 \pm 0,2
100	65,7 \pm 10,5	0,5 \pm 0,3
500	69,0 \pm 3,1	0,2 \pm 0,0
1000	68,1 \pm 21,9	1,2 \pm 1,2

Bei den Inkubationen von Ferulasäure mit T84-Monolayern gelangten über den Konzentrationsbereich von 20 bis 1000 μM 1,8 bis 2,7% der inkubierten Menge auf die basolaterale Seite. Bei den Inkubationen mit Schweinedarmmukosa waren 0,2 bis 1,2% der eingesetzten Menge auf der basolateralen Seite quantifizierbar.

3.5.2 Studien zum Einfluss verschiedener Bedingungen auf die Absorption am Beispiel des Phloretins

Zur näheren Charakterisierung der transepithelialen Absorption von Phl wurden verschiedene Inkubationen mit T84-Monolayern in der Ussing-Kammer durchgeführt. Dabei wurden die folgenden Parameter verändert:

- Applikationsseite,
- Inkubationskonzentration,
- pH-Wert auf der apikalen Seite und
- Zugabe des Metabolismushemmers Natriumazid.

3.5.2.1 Rückabsorption von der basolateralen auf die apikale Seite

Zunächst wurde die Rückabsorption von PhI von der basolateralen auf die apikale Seite untersucht. Da die Inkubationen in einer anderen, baulich etwas unterschiedlichen Ussing-Kammer (ansonsten aber unter den gleichen Bedingungen) wie die Inkubationen in Kapitel 3.4.1 stattfanden, wurde zusätzlich als Kontrolle die Absorption von der apikalen auf die basolaterale Seite untersucht. Als Inkubationskonzentration wurde 50 μM gewählt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-17 und im Anhang (Tabelle 9-7) gezeigt.

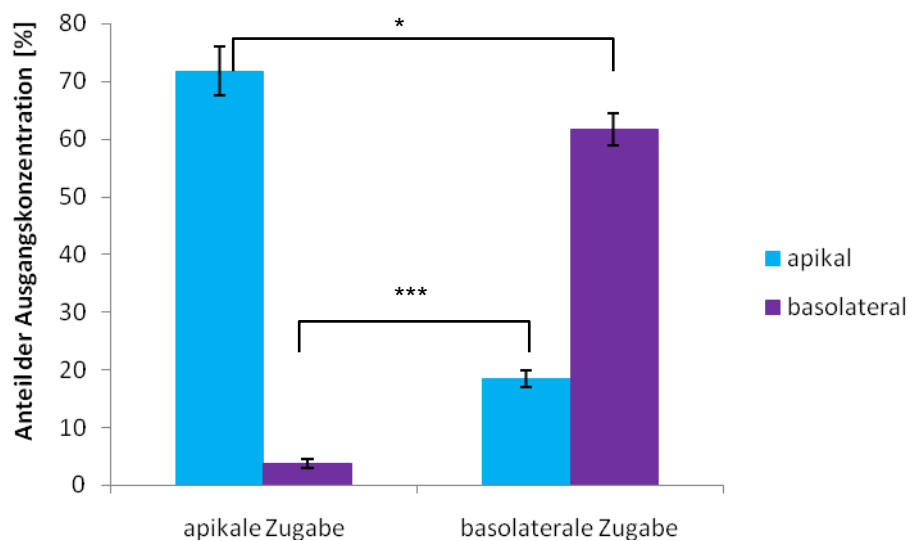


Abbildung 3-17: Transportstudien mit T84-Monolayern am Beispiel des Phloretins, Zugabe auf der apikalen bzw. basolateralen Seite. Verteilung (Anteil der Ausgangskonzentration [%]) von Phloretin nach vierstündiger Inkubation. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$; * = $p < 0,001$.**

Es zeigte sich, dass nach der Zugabe des PhI auf der apikalen Seite 3,8% auf die Aufnahmeseite (basolateral) gelangten, nach Zugabe auf der basolateralen Seite waren 18,5% auf der Aufnahmeseite (apikal) detektierbar.

3.5.2.2 Konzentrationsabhängige Absorptionen

Weiterhin wurde untersucht, ob die Absorption von PhI von der inkubierten Konzentration abhängig ist. Es wurden die Konzentrationen 10, 20 und 50 μM gewählt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-9 zusammengefasst.

Tabelle 3-9: Absorptionsstudien mit T84-Monolayern am Beispiel des Phloretins, Inkubation auf der apikalen bzw. auf der basolateralen Seite. Inkubationskonzentrationen und Verteilung (Anteil der Ausgangskonzentration [%]) von Phloretin auf der apikalen und basolateralen Seite der Ussing-Kammer nach 4 h Inkubation. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus n = 2 unabhängigen Experimenten.

Konzentration Phloretin [μ M]	Anteil der Ausgangskonzentration [%]	
	apikal	basolateral
apikale Inkubation		
10	39,2 \pm 2,3	6,3 \pm 0,9
20	49,1 \pm 8,2	8,5 \pm 0,4
50	53,3 \pm 4,0	16,5 \pm 1,8
basolaterale Inkubation		
10	4,8 \pm 1,8	48,9 \pm 1,4
20	11,7 \pm 3,2	51,3 \pm 4,2
50	19,6 ¹	55,8 ¹

¹ Es stehen nur Daten einer Inkubation zur Verfügung.

Bei allen inkubierten Konzentrationen sowohl nach Zugabe auf der apikalen als auch der basolateralen Seite wurde ein Transport auf die andere Seite festgestellt. Der transportierte prozentuale Anteil stieg bei Zugabe auf der apikalen Seite dabei mit steigender inkubierter PhI-Konzentration.

3.5.2.3 Absorption in Gegenwart eines pH-Gradienten

Zusätzlich zu den Inkubationen bei pH 7,4 wurden Inkubationen in Gegenwart eines pH-Gradienten durchgeführt. Hierfür wurde das Medium der apikalen Seite auf pH 6,0 eingestellt. Das Medium der basolateralen Seite wurde bei pH 7,4 belassen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-18 und Abbildung 3-19 gezeigt, eine Zusammenfassung zeigt Tabelle 9-8 im Anhang.

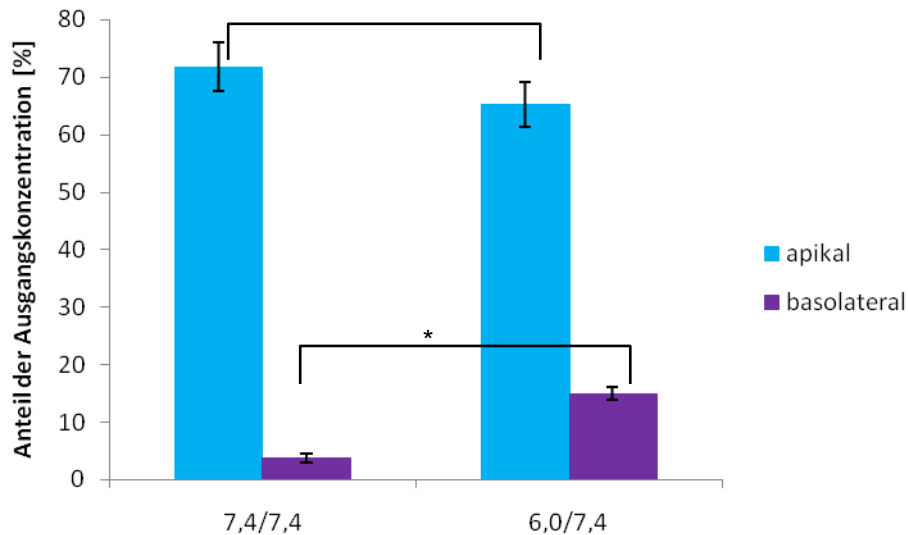


Abbildung 3-18: Absorptionsstudien mit T84-Monolayern in Gegenwart und Abwesenheit eines pH-Gradienten am Beispiel des Phloretins (50 μM). Die Zugabe erfolgte auf der apikalen Seite. Verteilung (Anteil der Ausgangskonzentration [%]) von Phloretin auf der apikalen (pH 7,4 bzw. 6,0) und basolateralen Seite (pH 7,4) der Ussing-Kammer nach 4 Stunden Inkubation. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$; * = $p < 0,001$.**

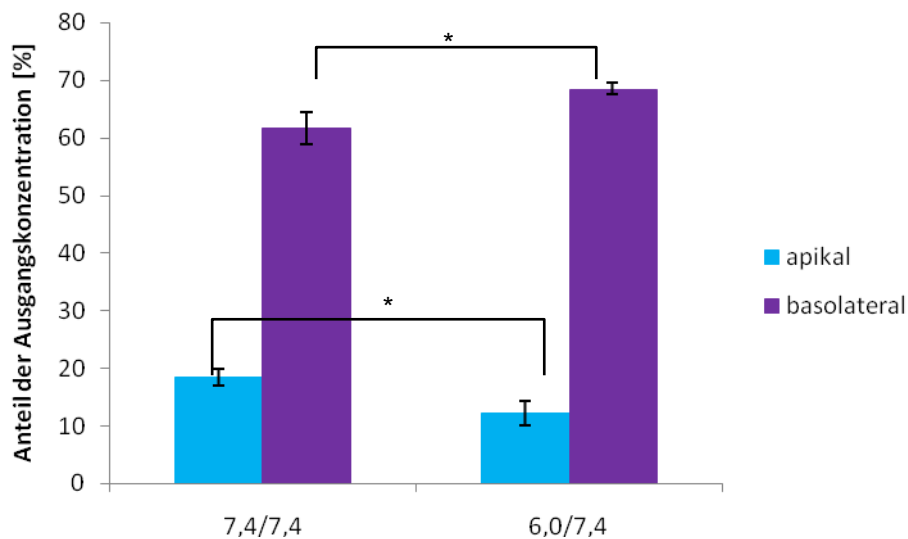


Abbildung 3-19: Rückabsorptionsstudien mit T84-Monolayern in Gegenwart und Abwesenheit eines pH-Gradienten am Beispiel des Phloretins (50 μM). Die Zugabe erfolgte auf der basolateralen Seite. Verteilung (Anteil der Ausgangskonzentration [%]) von Phloretin auf der apikalen (pH 7,4 bzw. 6,0) und basolateralen Seite (pH 7,4) der Ussing-Kammer nach 4 Stunden Inkubation. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$; * = $p < 0,001$.**

Die Absorption von Phl von der apikalen auf die basolaterale Seite der T84-Monolayer war in Gegenwart eines pH-Gradienten höher also ohne. Im Gegensatz dazu war die Transportrate bei der Zugabe des Phls auf der basolateralen Seite in Gegenwart des pH-Gradienten erniedrigt.

3.5.2.4 Absorption in Gegenwart des Metabolismushemmers Natriumazid

Um zu überprüfen, ob ein aktiver Transport an der Absorption von Phl beteiligt ist, wurden Inkubationen mit dem Metabolismushemmer Natriumazid (NaN_3) durchgeführt. Natriumazid inhibiert die mitochondriale Atmungskette der Zelle über eine Inhibierung der Cytochrom-c-Oxidase [Cheng *et al.* 2001]. Die Zugabe des Natriumazids erfolgte in beide Kammerhälften; dabei wurde im Medium eine Konzentration von 10 mM eingestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-20 und Abbildung 3-21 dargestellt und in Tabelle 9-9 (siehe Anhang) zusammengefasst.

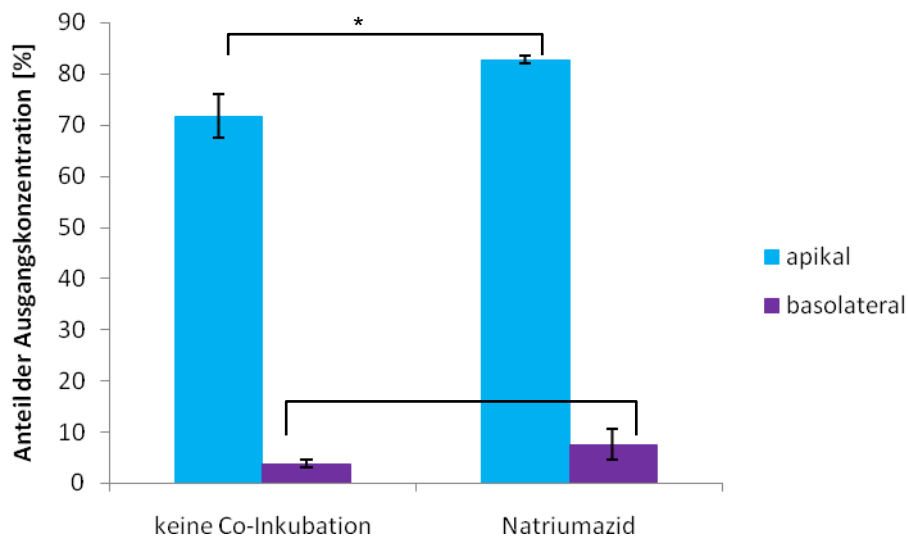


Abbildung 3-20: Absorptionsstudien mit T84-Monolayern in Gegenwart und Abwesenheit des Metabolismushemmers Natriumazid am Beispiel des Phloretins (50 μM). Die Zugabe erfolgte auf der apikalen Seite. Verteilung (Anteil der Ausgangskonzentration [%]) von Phloretin auf der apikalen und basolateralen Seite der Ussing-Kammer nach 4 Stunden Inkubation. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$; * = $p < 0,001$.**

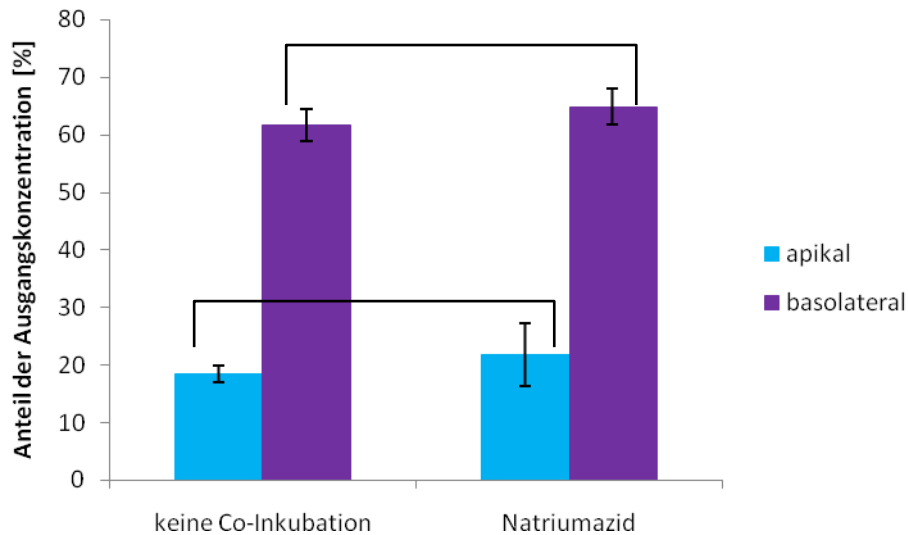


Abbildung 3-21 Rückabsorptionsstudien mit T84-Monolayern in Gegenwart und Abwesenheit des Metabolismushemmers Natriumazid am Beispiel des Phloretins (50 μM). Die Zugabe erfolgte auf der basolateralen Seite. Verteilung (Anteil der Ausgangskonzentration [%]) von Phloretin auf der apikalen und basolateralen Seite der Ussing-Kammer nach 4 Stunden Inkubation. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$; * = $p < 0,001$.**

Bei den Inkubationen mit dem Metabolismushemmer Natriumazid war sowohl bei Zugabe des Phls auf der apikalen Seite als auch auf der basolateralen Seite kein signifikanter Unterschied bei der Absorption auf die Empfängerseite bei Inkubation mit oder ohne Natriumazid detektierbar.

3.6 Metabolismus der Apfelpolyphenole in den verschiedenen Modellen

Es ist bekannt, dass es in den Zellen der intestinalen Mukosa zur Bildung von Metaboliten von Polyphenolen kommt. Deshalb wurden die Mediumüberstände und Zellsuspensionen der in 3.4 beschriebenen Versuche auf gebildete Metaboliten hin mittels HPLC-DAD und HPLC-MS/MS untersucht.

3.6.1 Metabolismus in T84-Monolayern

Bei der Inkubation der Hydroxyzimtsäuren und ihrer Derivate in den intestinalen in Kapitel 3 angegebenen Konzentrationen wurden keine Konjugate oder andere Metabolite detektiert, lediglich bei der Inkubation von Phl-G wurde zellassoziiert Phl nachgewiesen, die Konzentration entsprach $0,3 \pm 0,2\%$ der inkubierten Phl-G-Menge. Da in der Literatur (siehe 2.6.3) bei *in vitro*-Versuchen verschiedene Metabolite von Polyphenolen nachgewiesen wurden, wurde exemplarisch Ferulasäure in höheren Konzentrationen (20 bis 1000 μM , siehe 3.5.1) inkubiert und die Zellsuspension sowie die Mediumüberstände der apikalen und

basolateralen Seite mittels HPLC-MS/MS untersucht. Erst bei Konzentrationen ab 100 μM wurden Metabolite, die in Tabelle 3-10 zusammengefasst sind, nachgewiesen.

Tabelle 3-10: Metabolismus der Ferulasäure bei Inkubation mit T84-Monolayern. Retentionszeiten (Rt), Precursorionen, Productionen und Verteilung der Metabolite nach 4-stündiger Inkubation in der Ussing-Kammer, Konzentration Ferulasäure 1000 μM , n.i. = nicht identifiziert, n.d. = nicht detektiert, + = detektiert.

Rt [min]	Precursor- ionen [m/z]	Productionen [m/z]	Substanz	apikal	basolateral	zellassoziert
12,3	368,9	192,9; 174,9; 112,9	Feruloyl- glucuronid	+	+	+
14,0	273,0	192,9; 177,7; 149,1; 133,7; 96,9; 79,6	Feruloylsulfat	+	+	+
18,2	194,8	135,9	Dihydroferula- säure	n.d.	+	n.d.
19,5	192,9	177,9; 148,9; 133,9	Ferulasäure	+	+	+
19,8	307,2	232,9; 229,2; 189,0; 133,5; 114,8; 97,8	n.i.	n.d.	n.d.	+
25,7	341,3	281,1; 172,8; 158,9; 122,9; 107,9; 91,0	n.i.	+	+	+
27,4	341,3	325,9; 311,1; 297,0; 282,1; 266,9; 172,8; 159,2; 123,0; 107,9; 90,8	n.i.	+	+	+

Ferulasäure und Dihydroferulasäure wurden anhand der Retentionszeiten und Produktionenspektren in Übereinstimmung mit authentischen Referenzen identifiziert. Für Feruloylglucuronid und –sulfat waren keine Referenzen vorhanden, die Produktionenspektren stimmten aber mit den in der Literatur beschriebenen überein [Poquet *et al.* 2008b]. Zusätzlich wurden drei weitere Metabolite detektiert, die aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht identifiziert werden konnten.

In den Zellsuspensionen nach der Inkubation von PhI und Que wurden ebenfalls mittels HPLC-MS/MS im Neutral-Loss-Verfahren Spuren von Monoglucuroniden detektiert. Beim Neutral-Loss-Verfahren werden die Ionen nach einem Scan in Q1 in Q2 fragmentiert und nach einem weiteren Scan in Q3 gemessen, ob in Q2 neutrale Fragmente mit einer bestimmten Masse (in diesem Fall 176 u für Glucuronsäure) aus den Ionen eliminiert wurden. Mit diesem Verfahren wurden geringe Spuren an Glucuroniden detektiert, die Position der Glucuronidierung konnte nicht bestimmt werden.

3.6.2 Metabolismus in der Schweinedarmmukosa

Bei Studien mit Schweinedarmmukosa waren in den Mediumüberständen der in intestinalen Konzentrationen inkubierten Polyphenole nur für Kaffee- und *p*-Coumarsäuremethylester Metabolite detektierbar. Bei diesen beiden Methylestern wurden die korrespondierenden Säuren freigesetzt und gelangten zu einem geringen Anteil auf die basolaterale Seite der Schweinedarmmukosa. Der weitaus größere Anteil verblieb auf der apikalen Seite. Bei der Überprüfung der Stabilität im Inkubationsmedium wurde eine Freisetzung der Säuren jedoch nicht beobachtet (siehe Kapitel 3.2). Den zeitlichen Verlauf der Freisetzung von *p*-Coumarsäure aus *p*-Coumarsäuremethylester zeigt Abbildung 3-22. Die Verteilung der Konzentrationen nach 4 Stunden ist in Tabelle 3-11 zusammengefasst.

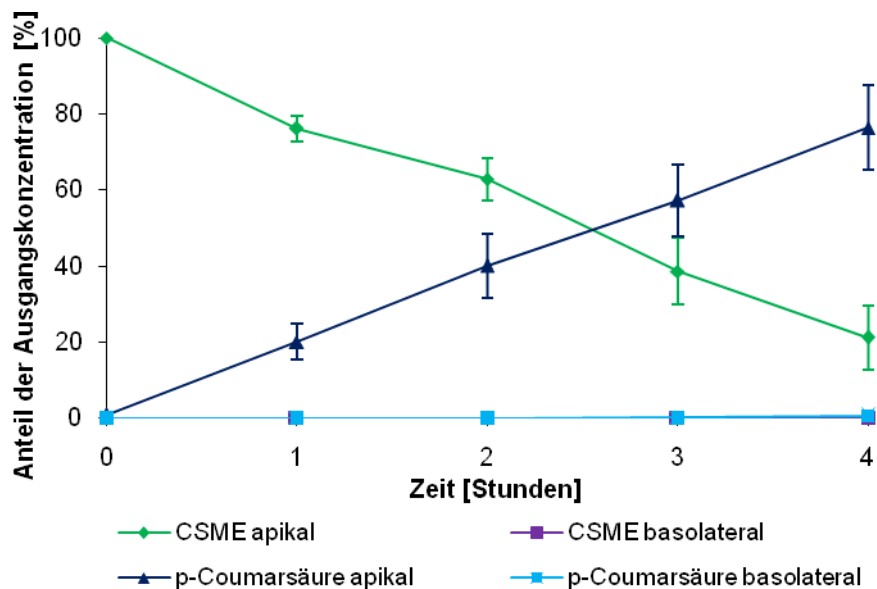


Abbildung 3-22: Zeitlicher Verlauf über 4 Stunden der Freisetzung von *p*-Coumarsäure aus *p*-Coumarsäuremethylester bei Inkubation mit Schweinedarmmukosa in der Ussing-Kammer (Anteil der Ausgangskonzentration [%]). Zugabe von *p*-Coumarsäuremethylester (20 μ M) auf der apikalen Seite. CSME = *p*-Coumarsäuremethylester. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

Tabelle 3-11: Inkubation von *p*-Coumarsäure- und Kaffeesäuremethylester mit Schweinedarmmukosa in der Ussing-Kammer. Verteilung der inkubierten Substanz und der freigesetzten korrespondierenden Säure auf der apikalen und basolateralen Seite. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. n.d. = nicht detektiert.

	inkubierte Substanz [%]		korrespondierende Säure [%]	
	apikal	basolateral	apikal	basolateral
<i>p</i> -Coumarsäuremethylester	21,2 \pm 8,4	n.d.	76,4 \pm 11,1	0,6 \pm 0,1
Kaffeesäuremethylester	45,8 \pm 13,7	n.d.	43,5 \pm 12,7	4,1 \pm 0,2

Weiterhin wurde untersucht, ob bei der Inkubation von Ferulasäure mit Schweinedarmmukosa die gleichen Metabolite gebildet werden wie bei der Inkubation mit T84-Monolayern.

Dazu wurde Ferulasäure in Konzentrationen von 20 bis 1000 μM mit Schweinedarmmukosa inkubiert. Auch hier wurden ab 100 μM Metabolite mittels HPLC-MS/MS detektiert, deren Retentionszeiten, Precursorionen und Produktionen in Tabelle 3-12 zusammengefasst sind.

Tabelle 3-12: Metabolismus der Ferulasäure bei Inkubation mit Schweinedarmmukosa. Retentionszeiten (Rt), Precursorionen, Produktionen und Verteilung der Metabolite nach vierstündiger Inkubation in der Ussing-Kammer, Konzentration Ferulasäure 500 μM , n.i. = nicht identifiziert, n.d. = nicht detektiert, + = detektiert.

Rt [min]	Precursor- ionen [m/z]	Produktionen [m/z]	Substanz	apikal	basolateral
12,3	368,9	193,1; 175,1; 112,9	Feruloylglucuronid	+	+
14,0	273,0	193,0; 149,0; 133,9	Feruloylsulfat	+	+
18,2	194,8	135,9	Dihydroferulasäure	+	+
19,5	192,9	177,9; 149,1; 134,1	Ferulasäure	+	+

In den Mediumüberständen wurden Ferula- und Dihydroferulasäure durch Vergleich von Retentionszeit, Precursorionen und Produktionenspektrum mit denen authentischer Referenzen identifiziert. Feruloylglucuronid und -sulfat wurden durch Vergleich mit literaturbekannten Daten identifiziert [Poquet *et al.* 2008b].

3.6.3 Metabolismus in humanen Biopsien

Die Hydroxycimtsäuren *p*-Coumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Isoferulasäure und Dihydroferulasäure wurden mit humanen Biopsien in einer Konzentration von 20 μM inkubiert. Nach vier Stunden wurden in den Mediumüberständen mittels HPLC-DAD und HPLC-MS/MS keine Metabolite detektiert.

3.7 Einfluss von Apfelpolyphenolen auf die intestinale Barriere

Während der Studien zum intestinalen Transport der Polyphenole in der Ussing-Kammer wurde zusätzlich deren Einfluss auf die intestinale Barriere untersucht. Als Messgröße wurde der TER herangezogen. Im Fall einer intakten intestinalen Barriere liegt ein höherer TER als bei einer aufgeweiteten intestinalen Barriere vor. Die Messung des TERs sowie die Auswertung der Daten wurden vom Kooperationspartner AG Melcher/Scheppach (Gastroenterologisches Labor des Universitätsklinikums Würzburg) durchgeführt. Die genauen Parameter sind in Kapitel 5.2.9 aufgeführt.

3.7.1 Einfluss auf T84-Monolayer

Der Einfluss der Polyphenole auf den TER wurde während der gesamten Inkubationszeit von vier Stunden aufgezeichnet. Beispielhaft ist der zeitliche Verlauf des TERs der inkubierten Dihydrochalkone in Abbildung 3-23 gezeigt.

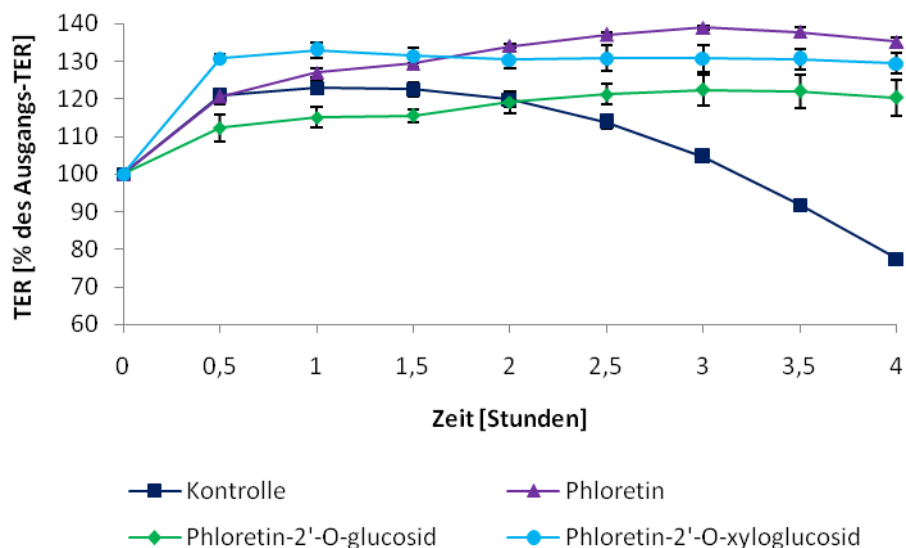


Abbildung 3-23: Zeitlicher Verlauf des transepithelialen Widerstands (TER [% des Ausgangs-TER]) der T84-Monolayer bei Inkubation mit Dihydrochalkonen (20 µM) über vier Stunden in der Ussing-Kammer. Der Anfangs-TER wurde auf 100% gesetzt. Die Kontrolle wurde mit 0,05% DMSO inkubiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

Man beobachtete zunächst einen Anstieg des TERs innerhalb der ersten 30 Minuten sowohl bei der Kontrolle (DMSO) als auch bei der Inkubation mit den Dihydrochalkonen. Die Kontrolle blieb etwa 1,5 Stunden bei ca. 120% des Anfangs-Wertes und fiel dann in den nächsten 2 Stunden auf 77% herab, während es bei der Inkubation mit den Dihydrochalkonen nicht zu diesem Abfall kam. Am Ende der Inkubation lagen die Werte zwischen 120 und 135% des Anfangs-TER. Der in Abbildung 3-23 gezeigt Verlauf des TERs bei der Inkubation der T84-Monolayer mit den Dihydrochalkonen war bei fast allen untersuchten Verbindungen (außer 3,4-Dihydroxytoluol und D-(-)-Chinasäure) in ähnlicher Form zu beobachten. Alle inkubierten Polyphenole außer die intestinalen Abbauprodukte 3,4-Dihydroxytoluol und D-(-)-Chinasäure führten zu einer Erhöhung des TER im Vergleich zur Kontrolle, bei der nur mit DMSO inkubiert wurde. Zusammengefasst sind die TER-Werte nach 4 Stunden in Tabelle 3-13 dargestellt. Die Einzeldaten, die alle 30 Minuten erfasst wurden, sind im Anhang gezeigt.

Tabelle 3-13: Transepithelialer Widerstand (TER [% des Ausgangs-TER]) der T84-Monolayer nach Inkubation mit Polyphenolen. Inkubationskonzentration, % des Anfangs-TER und Signifikanz im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

Substanz	Inkubations- konzentration [μ M]	TER [% des Ausgangs- TER]	Signifikanz
DMSO-Kontrolle		77,4 \pm 0,3	
Hydroxyzimtsäuren			
Zimtsäure	20	124,8 \pm 6,6	***
Dihydrozimtsäure	20	104,3 \pm 22,0	*
<i>p</i> -Coumarsäure	20	136,1 \pm 31,2	*
Kaffeesäure	20	124,9 \pm 23,5	*
Dihydrokaffeesäure	20	107,0 \pm 20,4	*
Ferulasäure	20	124,1 \pm 9,9	***
Isoferulasäure	20	133,6 \pm 6,4	***
Dihydroferulasäure	20	122,0 \pm 9,4	***
Hydroxyzimtsäuremethylester			
<i>p</i> -Coumarsäuremethylester	20	128,4 \pm 15,5	*
Kaffeesäuremethylester	20	115,9 \pm 32,3	*
Ester der D-(-)-Chinasäure			
4- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	10	136,9 \pm 3,7	*
5- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	10	131,7 \pm 6,1	***
1-Kaffeoylchinasäure	20	128,5 \pm 2,8	*
3-Kaffeoylchinasäure	50	131,5 \pm 0,5	***
4-Kaffeoylchinasäure	10	112,2 \pm 6,2	*
5-Kaffeoylchinasäure	50	126,7 \pm 2,9	***
Flavonoide			
Phloretin	20	135,1 \pm 1,1	***
Phloretin-2'-O-glucosid	20	120,2 \pm 4,9	*
Phloretin-2'-O-xyloglucosid	20	129,4 \pm 2,8	*
Quercetin	10	111,5 \pm 12,8	*
Quercetin-3-O-rhamnosid	10	127,4 \pm 12,8	***
(-)-Epicatechin	10	123,4 \pm 7,3	*
(+)-Catechin	10	119,7 \pm 8,8	*
Intestinale Metabolite			
3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure	20	126,0 \pm 15,5	*
3,4-Dihydroxytoluol	20	59,5 \pm 4,1	
Phloroglucin	20	109,6 \pm 10,3	*
D-(-)-Chinasäure	80	72,6 \pm 2,5	
3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure	20	117,9 \pm 10,0	*

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

Der höchste TER-Anstieg nach vierstündiger Inkubation mit den Polyphenolen wurde für *p*-Coumarsäure und 4-*p*-CouQA mit 136% des Anfangswertes erreicht. Die Mittelwerte aus drei Inkubationen sowie die errechneten Signifikanzen der Ergebnisse sind der Tabelle zu entnehmen. Die Standardabweichungen betragen z.T. über 10%, trotzdem ergaben die Berechnungen mittels Zweistichproben-T-Test nach Student (siehe Kapitel 5.3), dass die Werte sich signifikant von der Kontrolle unterschieden.

3.7.2 Einfluss auf Caprinsäure-vorbehandelte T84-Monolayer

Die Vorinkubation der T84-Monolayer mit C10 führt zu einer Erniedrigung des TERs. Nach einer 10-minütigen Behandlung mit C10 auf der apikalen und basolateralen Seite wurde es mit frischem Medium ausgewaschen. Dann erfolgte die Zugabe der Polyphenole bzw. von DMSO als Kontrolle. Exemplarisch ist der zeitliche Verlauf des TERs während der Inkubation mit Dihydrochalkonen in Abbildung 3-24 dargestellt.

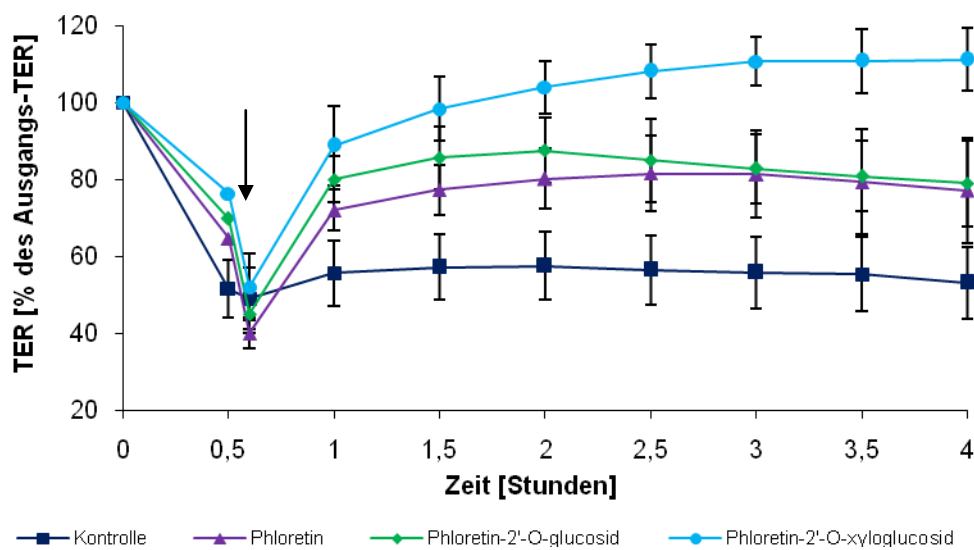


Abbildung 3-24: Zeitlicher Verlauf des transepithelialen Widerstands (TER [% des Ausgangs-TER]) der Caprinsäure (10 mM) vorbehandelten T84-Monolayer bei Inkubation mit Dihydrochalkonen (20 μ M) über vier Stunden in der Ussing-Kammer. Der Anfangs-TER wurde auf 100% gesetzt, die Zugabe der Dihydrochalkone erfolgte nach dem Auswaschen mit frischem Medium und ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Kontrolle wurde mit 0,05% DMSO inkubiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

Bei der Kontrolle stieg der TER nach dem Auswaschen des C10s nur leicht an und erreichte nach 4 Stunden 53% des Anfangswertes. Im Gegensatz dazu war bei Inkubationen mit Dihydrochalkonen ein stärkeres Ansteigen des TER zu beobachten, für Phl-XG auf 111% des Ausgangswertes.

Auch bei einem Teil der anderen inkubierten Polyphenole kam es zu einem stärkeren Ansteigen des TERs als bei der Kontrolle. Nach der Behandlung der T84-Monolayer mit C10 und anschließender Polyphenolinkubation wurden die höchsten TER-Werte bei Inkubation mit 3-CQA mit 137% des Anfangswertes gemessen. Bei den Polyphenolen Dihydrozimt- und *p*-Coumarsäure, Kaffeesäuremethylester, Epi, 3,4-Dihydroxytoluol und 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure waren keine signifikanten Steigerungen des TERs detektierbar. Alle anderen untersuchten Polyphenole erhöhten den TER im Vergleich zur Kontrolle signifikant. In Tabelle 3-14 ist der TER nach vierstündiger Inkubation mit den untersuchten Polyphenolen gezeigt.

Tabelle 3-14: Transepithelialer Widerstand (TER [% des Ausgangs-TER]) der Caprinsäure (10 mM) vorbehandelten T84-Monolayer nach Inkubation mit Polyphenolen. Die Zugabe der Polyphenole erfolgte nach dem Auswaschen mit frischem Medium. Inkubationskonzentration, % des Anfangs-TER und Signifikanz im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

Substanz	Inkubations- konzentration [μ M]	TER [% des Ausgangs- TER]	Signifikanz
DMSO-Kontrolle		53,1 \pm 9,4	
Hydroxyzimtsäuren			
Zimtsäure	20	89,0 \pm 12,4	*
Dihydrozimtsäure	20	56,4 \pm 20,3	n.s.
<i>p</i> -Coumarsäure	20	95,1 \pm 32,5	n.s.
Kaffeesäure	20	92,1 \pm 23,0	*
Dihydrokaffeesäure	20	105,6 \pm 23,2	*
Ferulasäure	20	89,6 \pm 9,5	*
Isoferulasäure	20	96,5 \pm 11,4	*
Dihydroferulasäure	20	93,7 \pm 17,0	*
Hydroxyzimtsäuremethylester			
<i>p</i> -Coumarsäuremethylester	20	84,1 \pm 19,4	*
Kaffeesäuremethylester	20	70,5 \pm 21,1	n.s.
Ester der D-(-)-Chinasäure			
4- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	10	107,8 \pm 12,9	*
5- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	10	99,9 \pm 23,6	*
1-Kaffeoylchinasäure	20	133,0 \pm 33,5	*
3-Kaffeoylchinasäure	50	137,1 \pm 16,7	*
4-Kaffeoylchinasäure	10	93,9 \pm 23,0	*
5-Kaffeoylchinasäure	50	93,3 \pm 9,3	*
Flavonoide			
Phloretin	20	77,1 \pm 13,6	*
Phloretin 2'-O-glucosid	20	78,9 \pm 11,2	*

Substanz	Inkubations- konzentration [μ M]	TER [% des Ausgangs- TER]	Signifikanz
Phloretin 2'-O-xyloglucosid	20	111,1 \pm 8,1	***
Quercetin	10	90,5 \pm 15,0	*
Quercetin 3-O-rhamnosid	10	121,1 \pm 9,0	*
(-)-Epicatechin	10	82,1 \pm 35,3	n.s.
(+)-Catechin	10	91,4 \pm 26,6	*
Intestinale Metabolite			
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure	20	90,0 \pm 21,4	*
3,4-Dihydroxytoluol	20	83,7 \pm 17,1	n.s.
Phloroglucin	20	95,0 \pm 23,4	*
D-(-)-Chinasäure	80	115,1 \pm 23,5	*
3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure	20	69,0 \pm 11,3	n.s.

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, n.s. = nicht signifikant

Die einzelnen TER-Werte aller Inkubationen mit Polyphenolen im T84-Monolayer-Modell in der Ussing-Kammer, die alle 30 Minuten erfasst wurden, sind im Anhang zusammengefasst.

3.7.3 Immunofluoreszenzfärbung des „Tight junction“-Proteins Occludin

Um die Ergebnisse der TER-Messungen aus den in der Ussing-Kammer mit T84-Zellmonolayern durchgeführten Versuchen auf Protein-Ebene zu bestätigen, wurde die mRNA-Expression des TJ-Proteins Occludin vom Kooperationspartner AG Melcher/Scheppach (Gastroenterologisches Labor des Universitätsklinikums Würzburg) untersucht. Dabei zeigte sich, dass die mRNA-Expression durch die Inkubation mit Polyphenolen beeinflusst wurde [Rogoll *et al.* 2010]. Das Protein Occludin befindet sich zwischen den Epithelzellen und ist ein wichtiger Bestandteil der intestinalen Barriere. Um zu überprüfen, ob die Änderungen der Expression auch auf Proteinebene zu erfassen sind, wurden in Würzburg Immunofluoreszenzfärbungen des TJ-Proteins Occludin durchgeführt. Dazu wurden exemplarisch vier Verbindungen (Ferulasäure, 5-CQA, PhI und PhI-G) ausgewählt. Da größere Effekte bei den Versuchen mit C10-Vorbehandlung zu erwarten waren, wurden T84-Monolayer zunächst mit C10 für eine Stunde vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den Polyphenolen über einen Zeitraum von 4 Stunden. Außerdem wurde eine Kontrolle mitgeführt, bei der DMSO zugegeben wurde. Die Monolayer wurden nach der Inkubation fixiert, mit einem Primärantikörper gegen Occludin und anschließend einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper inkubiert. Mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops wurde anschließend das Protein sichtbar gemacht. Abbildung

3-25 zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Occludins im T84-Monolayer vor der Inkubation mit C10 und den Polyphenolen.

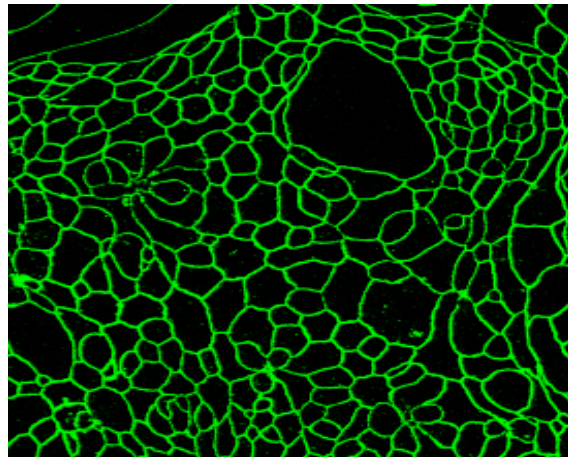


Abbildung 3-25: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines T84-Monolayers. Primärantikörper gegen Occludin, Sekundärantikörper markiert mit Alexa 488.

Das TJ-Protein Occludin lag zwischen den Zellen als ein dichtes Netz vor. Nach der Behandlung des Monolayers mit C10 (TER ca. 50% des Anfangswertes) wurden ebenfalls immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen durchgeführt. Eine dieser Aufnahmen ist in Abbildung 3-26 dargestellt.

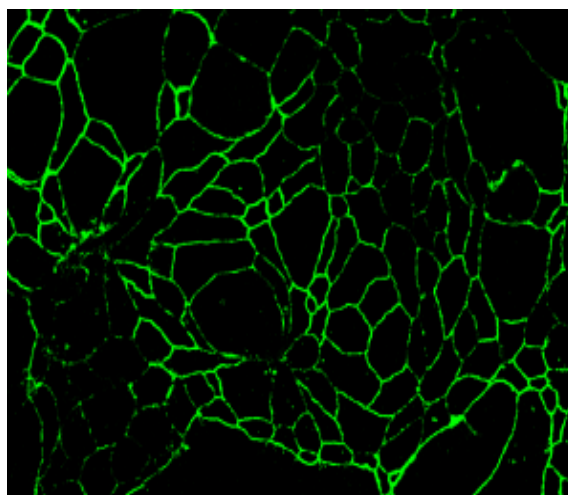


Abbildung 3-26: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines T84-Monolayers nach Caprinsäurebehandlung nachdem der transepitheliale Widerstand auf 50% des Anfangswertes gesunken war. Primärantikörper gegen Occludin, Sekundärantikörper markiert mit Alexa 488.

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten deutlich die Aufweitung und Dislokalisierung von Occludin durch die Behandlung mit C10. Die Abbildungen zeigten, dass die Behandlung mit C10, die zu einer Herabsetzung des TERs der Monolayer führt, durch die Immunfluoreszenzfärbung des TJ-Proteins Occludin sichtbar gemacht werden konnte und hier ebenfalls zu Veränderungen führt. Anschließend an diese Vorversuche erfolgte die

Inkubation mit den Polyphenolen und DMSO als Lösemittelkontrolle nach Behandlung der Monolayer mit C10.

Das Ergebnis der Kontrolle nach einstündiger Vorinkubation mit C10 zeigt Abbildung 3-27. Die Ergebnisse nach Inkubation mit den Polyphenolen nach C10-Vorbehandlung sind in Abbildung 3-28 und Abbildung 3-29 gezeigt.

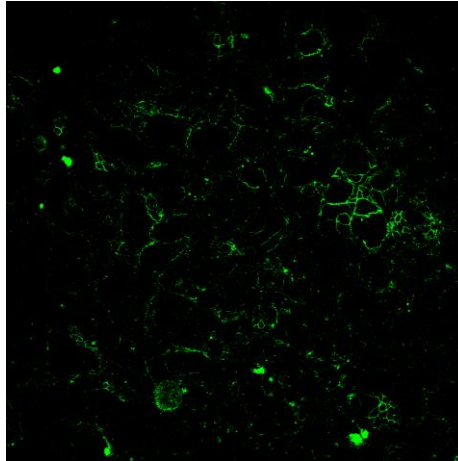


Abbildung 3-27: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines T84-Monolayers nach einstündiger Caprinsäure (10 mM) und vierstündiger Inkubation mit DMSO als Kontrolle. Primärantikörper gegen Occludin, Sekundärantikörper markiert mit Alexa 488.

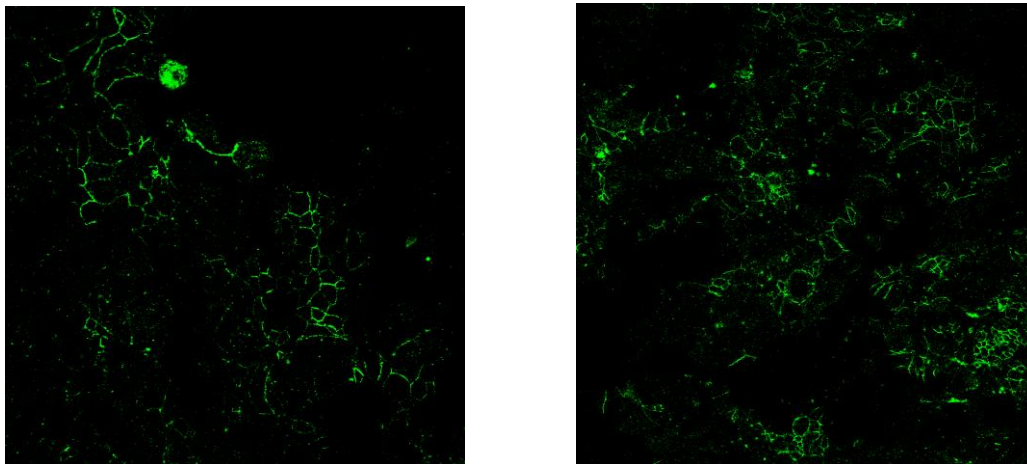


Abbildung 3-28: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von T84-Monolayern nach einstündiger Caprinsäurevorbehandlung (10 mM) und vierstündiger Inkubation mit Ferulasäure (links) und 5-Kaffeoylchinasäure (rechts). Primärantikörper gegen Occludin, Sekundärantikörper markiert mit Alexa 488.

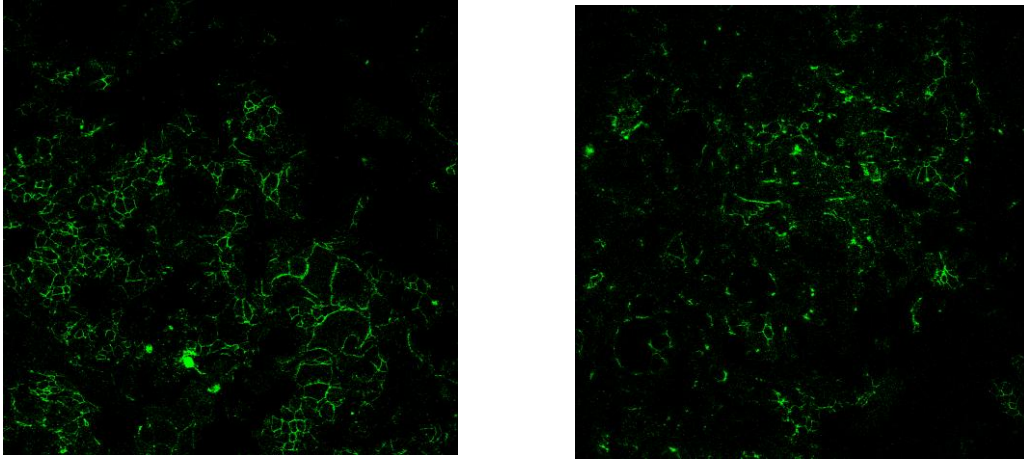


Abbildung 3-29: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von T84-Monolayern nach einstündiger Caprinsäurevorbehandlung (10 mM) und vierstündiger Inkubation mit Phloretin (links) und Phloretin-2'-O-glucosid (rechts). Primärantikörper gegen Occludin, Sekundärantikörper markiert mit Alexa 488.

Im Vergleich zur Kontrolle war bei allen Inkubationen nur eine leichte Verdichtung des Netzes des TJ-Proteins Occludin zu erkennen, obwohl die parallelen Messungen der TER-Werte einen Anstieg aufwiesen.

Ergänzend zu diesen Versuchen wurde eine einstündige Vorbehandlung der T84-Monolayer mit Polyphenolen und anschließender C10-Inkubation (eine Stunde) untersucht. Die Kontrolle ist in Abbildung 3-30 dargestellt, die Ergebnisse der Polyphenole in Abbildung 3-31 und Abbildung 3-32.

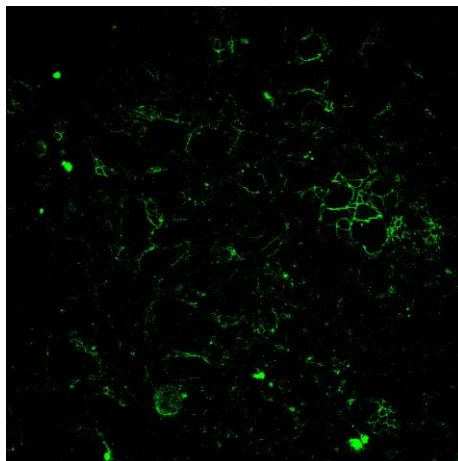


Abbildung 3-30: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines T84-Monolayers nach einstündiger Inkubation mit DMSO und anschließender einstündiger Caprinsäureinkubation (10 mM) als Kontrolle. Primärantikörper gegen Occludin, Sekundärantikörper markiert mit Alexa 488.

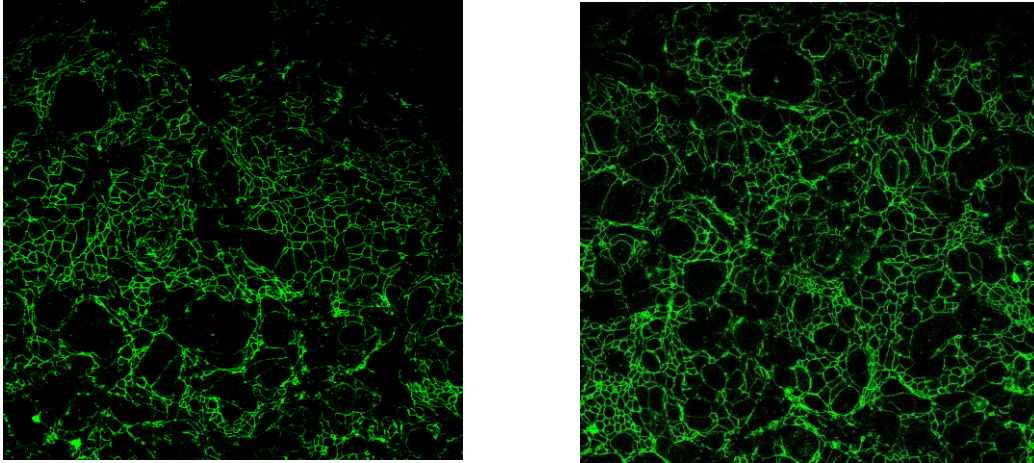


Abbildung 3-31: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von T84-Monolayern nach einstündiger Inkubation mit Ferulasäure (links) und 5-Kaffeoylchinasäure (rechts) gefolgt von einer einstündigen Inkubation mit Caprinsäure (10 mM). Primärantikörper gegen Occludin, Sekundärantikörper markiert mit Alexa 488.

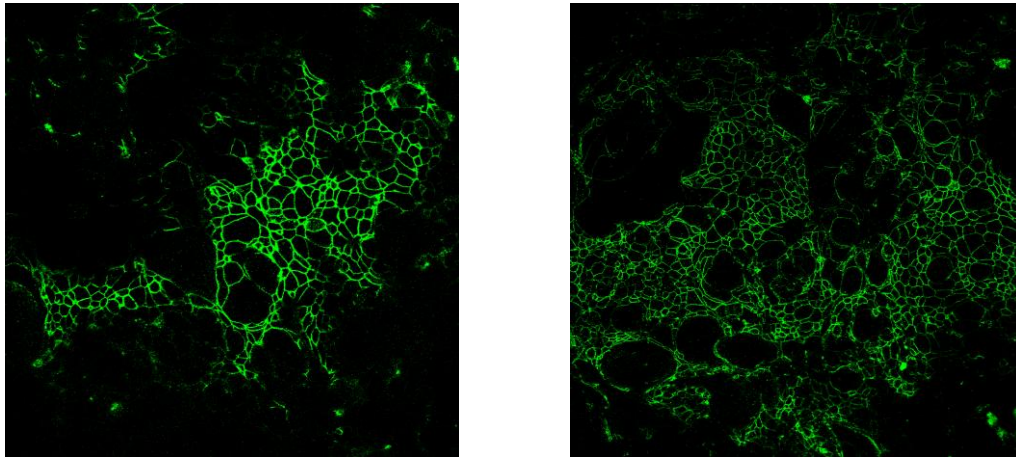


Abbildung 3-32: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von T84-Monolayern nach einstündiger Inkubation mit Phloretin (links) und Phloretin-2'-O-glucosid (rechts) gefolgt von einer einstündigen Inkubation mit Caprinsäure (10 mM). Primärantikörper gegen Occludin, Sekundärantikörper markiert mit Alexa 488.

Bei der Kontrolle lag nur ein sehr lockeres Netz des TJ-Proteins Occludin vor. Im Gegensatz dazu war nach der Vorinkubation mit Polyphenolen gefolgt von der C10-Behandlung ein dichtes Netz des Proteins zu erkennen. Bei Ferulasäure und 5-CQA war der Effekt stärker ausgeprägt als bei Phl und Phl-G. Bei der Inkubation mit den Polyphenolen wurde annähernd der gleiche Zustand wie bei den unbehandelten Monolayern (siehe Abbildung 3-25) erreicht.

4 Diskussion

Für die Bewertung von Wirkungen von Polyphenolen auf den menschlichen Körper ist es von Relevanz, in welcher Form sie an den Zielorten vorliegen [Williamson *et al.* 2005]. In einer Studie mit Probanden mit einem Stoma des terminalen Ileums wurde bestimmt, welche Polyphenole aus naturtrübem Apfelsaft in welcher Konzentration den Dickdarm erreichen. Es wurden zahlreiche intestinale Metabolite identifiziert und Konzentrationen der einzelnen Substanzen zwischen <1 und 80 µM ermittelt [Kahle *et al.* 2007, Kahle *et al.* 2005b]. In der vorliegenden Arbeit wurden die den Dickdarm erreichenden Polyphenole und einige Strukturanaloga (Zimt-, Dihydrozimt-, *p*-Coumar-, Kaffee-, Dihydrokaffee-, Ferula-, Isoferula- und Dihydroferulasäure; *p*-Coumar- und Kaffeesäuremethylester; 4-*p*-CouQA, 5-*p*-CouQA, 1-CQA, 3-CQA, 4-CQA und 5-CQA; PhI, PhI-G und PhI-XG; Que und Que-R; Epi und Cat) und ihre intestinalen Abbauprodukte (3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, 3,4-Dihydroxytoluol, Phloroglucin und D-(-)-Chinasäure) auf ihre intestinale Absorption und Metabolismus in verschiedenen Modellsystemen untersucht. Außerdem wurden Versuche zum Einfluss der Polyphenole und ihrer Metabolite auf die intestinale Barriere durchgeführt.

4.1 Synthese kommerziell nicht erhältlicher Polyphenolreferenzen

Einige nach Apfelsaftverzehr den Dickdarm erreichende Polyphenole konnten nicht käuflich erworben werden, so dass diese synthetisiert oder isoliert werden mussten. Die dann zur Verfügung stehenden Substanzen wurden zum einen für die eigenen, nachfolgend beschriebenen Versuche eingesetzt. Zum anderen wurden sie den Projektpartnern des BMBF-Netzwerkes – in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde – zur Durchführung ihrer Versuche zur Verfügung gestellt.

Es erfolgte die erfolgreiche Synthese von 1-CQA, 3-CQA und 4-CQA. PhI-XG wurde aus einem mit Laccase behandelten Apfelsaftextrakt isoliert, 4- und 5-*p*-CouQA nach alkalischer Umesterung des mit Laccase behandelten Apfelsaftextrakts.

4.2 Überprüfung der Stabilität der Polyphenole im Inkubationsmedium

Zu Beginn der Arbeiten war literaturbekannt, dass einige Polyphenole in verschiedenen Zellkulturinkubationsmedien und anderen Puffern instabil sein können (siehe 2.6.5). Beispielhaft sind hier Grünteecatechine und Que zu nennen [Boulton *et al.* 1999, Hong *et al.* 2002, Sang *et al.* 2005, Wolfram *et al.* 2002, Zhu *et al.* 1997]. Für einige Polyphenole wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit die Stabilität im verwendeten Inkubationsmedium HBSS in intestinalen Konzentrationen bei 37 °C über einen Zeitraum von 24 Stunden untersucht. Die

Untersuchung des Mediums erfolgte mittels HPLC-DAD und HPLC-MS/MS. Es zeigte sich, dass die Verbindungen strukturabhängig instabil waren.

Es lässt sich sagen, dass Hydroxyzimtsäuren, die nur eine freie oder keine Hydroxylgruppe am Phenolring (*p*-Coumarsäure, Ferulasäure) aufweisen, über den gesamten Zeitraum von 24 Stunden stabil waren. Über den Zeitraum von 24 Stunden wurden Hydroxyzimtsäuren mit zwei in *ortho*-Stellung zueinander stehenden Hydroxylgruppen wie Kaffeesäure, 5-CQA und 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure teilweise abgebaut, es waren aber immer noch geringe Mengen nachweisbar.

Que wurde bereits nach vier Stunden nicht mehr im Medium detektiert, das Glycosid Que-R dagegen war bis zu einer achtstündigen Inkubationsdauer stabil. Nach 24 Stunden war auch hier ein Abbau auf 55% der Anfangskonzentration nachweisbar. Epi, Cat und PhI wurden ebenfalls teilweise abgebaut, bei PhI-G wurde kein Abbau detektiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aglyka (PhI, Que) instabiler waren als ihre entsprechenden Glykoside (PhI-G, Que-R). Verbindungen mit zwei Hydroxylgruppen in *ortho*-Stellung zueinander (Kaffeesäure, 5-CQA, Que) waren unter den Inkubationsbedingungen nicht stabil, analoge Verbindungen mit nur einer freien Hydroxylgruppe (Ferulasäure, *p*-Coumarsäure, PhI) waren dagegen über einen längeren Zeitraum stabil.

Die Ergebnisse stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen überein. Bei Epi [Zhu *et al.* 1997] und Que wurde ebenfalls ein Abbau beschrieben [Boulton *et al.* 1999, Wolfram *et al.* 2002]. Die Glycoside des Que Que-G und Que-GR dagegen waren wie das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Que-R über den gesamte Inkubationszeitraum stabil [Wolfram *et al.* 2002]. Für Hydroxyzimtsäuren lagen bisher keine literaturbekannten Daten vor.

Bei einigen der im Medium instabilen Polyphenole wurden Abbauprodukte detektiert. Diese wurden mittels HPLC-DAD und HPLC-MS/MS identifiziert.

Bei der Inkubation von 5-CQA wurden die beiden isomeren Ester 3- und 4-CQA anhand ihrer Retentionszeiten und der identischen UV-Spektren identifiziert. In alkalischem Milieu (pH 8) wurde diese Isomerisierung bereits beschrieben [Trugo und Macrae 1984].

Die Instabilität von Cat in Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer (pH 7,4) wurde von Zhu *et al.* untersucht. Innerhalb der ersten halben Stunden kam es bei 37 °C zu einem Abbau von mehr als 75% der inkubierten Konzentration. Die Abbauprodukte wurden jedoch nicht identifiziert [Zhu *et al.* 1997]. Bei der Inkubation von EGCG, einer mit Cat und Epi strukturverwandten Substanz wurde in Zellkulturmedium (Ham's F12 und RPMI-1640 50:50)

ebenfalls ein Abbau festgestellt, zwei der Abbauprodukte wurden als EGCG-Dimere identifiziert [Sang *et al.* 2005].

Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Inkubation von Epi in HBSS kam es ebenfalls zur Bildung von zwei Abbauprodukten (AE1 und AE2). AE1 und AE2 wiesen zusätzlich zum Absorptionsmaximum des Epi bei 280 nm ein weiteres bei 253 nm auf. Dies gab bereits einen Hinweis darauf, dass es sich um Chinone handeln könnte. Dangles *et al.* untersuchten das UV-Spektrum von Cat und dem daraus oxidativ gebildeten Chinon im sichtbaren Bereich (250 bis 600 nm) und zeigten, dass es im Bereich um 250 nm im Verlauf der Bildung des Chinons zu einem starken Anstieg der Absorption kam [Dangles *et al.* 2000]. Der Oxidationsprozess zum Chinon besteht aus einer reversiblen zwei-Elektronen-zwei-Protonen-Reaktion (siehe Abbildung 4-1) [Maoela *et al.* 2009]. Die Bildung eines solchen Chinons wurde durch Oxidation mit 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazylradikalen [Sawai und Sakata 1998] und während der Fermentation von Tee beschrieben [Tanaka *et al.* 2002].

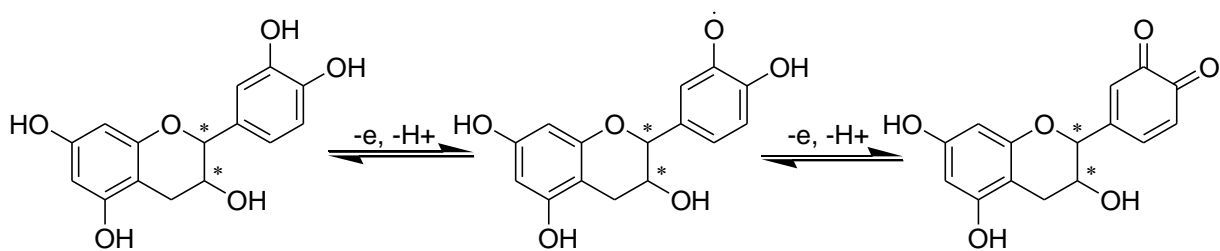


Abbildung 4-1: Oxidation des Catecholrests von Catechin oder Epicatechin zum Chinon (nach [Maoela *et al.* 2009]).

Die eigenen HPLC-ESI-MS/MS-Messungen zeigten, dass Epi ein Quasi-Molekülion von m/z 289,1, AE1 und AE2 dagegen nur m/z 287,1 aufwiesen. Die Produktionspektren von AE1 und AE2 waren identisch und wiesen genauso wie die Ausgangsverbindung ein Fragment mit der Masse 125 auf, welches dem A-Ring zugeordnet werden konnte. Da der A-Ring des Epi in AE1 und AE2 nicht verändert vorlag, das m/z jedoch um 2 u reduziert war als das des Epi wurde geschlossen, dass es sich bei AE1 und AE2 um zwei diastereomere Epi-Chinone handeln könnte. Abbildung 4-2 zeigt die Struktur des gebildeten Chinons.

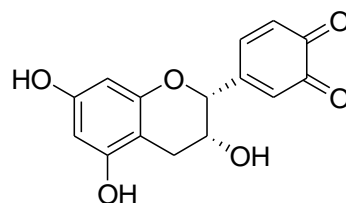


Abbildung 4-2: Struktur von (-)-Epicatechinquinon, gebildet beim Abbau von (-)-Epicatechin in HBSS bei 37 °C.

Die Stabilität von Que in Kaliumphosphatpuffer sowie in Zellkulturmedium bei pH-Werten von 7,4 wurde bereits von van der Woude *et al.* untersucht. Hier wurde ebenfalls dessen Instabilität unter den gewählten Bedingungen beschrieben, es wurde aber nicht weiter untersucht, ob Abbauprodukte entstanden waren [van der Woude *et al.* 2003].

Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Inkubation von Que in HBSS bei 37 °C über den Zeitraum von 24 Stunden entstanden zwei Abbauprodukte, die als AQ1 und AQ2 bezeichnet wurden. Aufgrund der identischen Retentionszeiten, Absorptionsmaxima und Produktionenspektren (siehe Kapitel 3.2) von AQ1 und einer Referenzlösung wurde AQ1 als 3,4-Dihydroxybenzoesäure identifiziert. Die Bildung von 3,4-Dihydroxybenzoesäure in Zellkulturmedium wurde bereits von Boulton *et al.* beschrieben [Boulton *et al.* 1999].

Das Absorptionsmaximum, die im Vergleich zu Que verkürzte Retentionszeit und das Produktionenspektrum (siehe Kapitel 3.2) von AQ2 gaben Hinweise darauf, dass es sich um 2,5,7,3',4'-Pentahydroxy-3,4-flavandion (Struktur siehe Abbildung 4-3) handeln könnte. Zur Bestätigung dieser Annahme wurde Que in mit $^{18}\text{O}_2$ -gesättigtem HBSS (siehe 5.2.4) inkubiert. Mittels ESI_{neg} -MS/MS wurden zwei Quasi-Moleküle mit m/z 317,0 (AQ2) und 319,0 ($^{18}\text{O}_2$ -AQ2) detektiert. Das Fragment für den A-Ring war bei beiden Molekülen identisch (m/z 150,9), die zum B-Ring zugehörigen Fragmente unterschieden sich jedoch jeweils um 2 (m/z 227,1 und 255,1 für AQ2 und m/z 229,1 und 257,1 für $^{18}\text{O}_2$ -AQ2, Spektren im Anhang (Abbildung 9-7 und Abbildung 9-8)). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es im B-Ring ein Sauerstoffatom eingebaut wurde und es sich um 2,5,7,3',4'-Pentahydroxy-3,4-flavandion handelt.

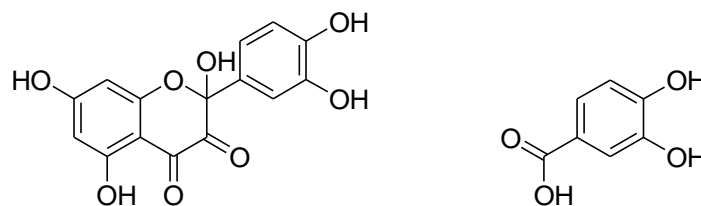


Abbildung 4-3: Strukturen der postulierten Abbauprodukte von Quercetin in HBSS bei 37 °C: 2,5,7,3',4'-Pentahydroxy-3,4-flavandion (links) und 3,4-Dihydroxybenzoesäure (rechts).

Die Oxidation von Que zu verschiedenen Produkten ist in der Literatur ausführlich diskutiert worden. Einige Gruppen detektierten das gleiche Produkt, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifiziert wurde.

In wässriger Lösung wurde die metallkatalysierte Oxidation von Flavonolen zu 2-Hydroxyphenyl-2-hydroxybenzopyran-3,4-dionen und daraus resultierenden 2-Hydroxybenzoyl-2-hydroxybenzofuran-3(2H)-onen beschrieben. Die Reaktionsprodukte standen in einem Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Strukturen (siehe Abbildung 4-4). Das Absorptionsmaximum des im HBSS gebildeten Abbauprodukts von 295 nm stimmt mit dem hier beschriebenen Maximum überein [Jungbluth *et al.* 2000]. Jungbluth *et al.* gehen davon

aus, dass die in ihren Versuchen durch Metallkatalyse entstandenen Abbauprodukte des Que die selben sind wie durch Polyphenoxidase gebildeten [Jimenez und Garcia-Carmona 1999].

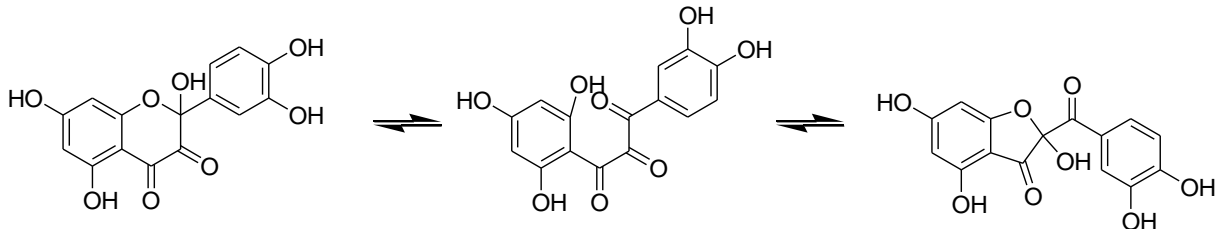


Abbildung 4-4: Gleichgewicht des oxidativ aus Quercetin gebildeten Abbauprodukts 2,5,7,3',4'-Pentahydroxy-3,4-flavandion bzw. 2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxy-3(2H)-benzofuranon (aus [Jungbluth *et al.* 2000]).

Bei der Reaktion von Que mit einem Azoradikalbildner entstand ebenfalls das von Jungbluth *et al.* beschriebene Produkt (siehe Abbildung 4-4). Die Bildung erfolgte dabei über ein Carbokation, dessen Struktur in Abbildung 4-5 gezeigt ist [Krishnamachari *et al.* 2004].

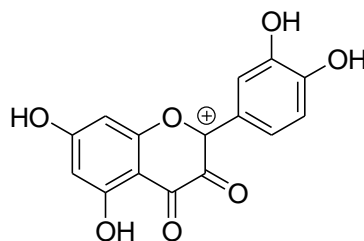


Abbildung 4-5: Aus Quercetin gebildetes Carbokation, das weiter zum oxidativen Abbauprodukt reagiert (aus [Krishnamachari *et al.* 2004]).

In einer Mischung aus Speichel, Wasserstoffperoxid und Natriumphosphat kam es ebenfalls zu einem oxidativen Abbau von Que. Das Abbauprodukt wurde ebenfalls als 2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxy-3(2H)-benzofuranon mit den Absorptionsmaxima 296 und 322 nm und dem Molekulargewicht 318 identifiziert [Hirota *et al.* 2005].

In der Natur kommt 2,5,7,3',4'-Pentahydroxy-3,4-flavandion in der Haut von Zwiebeln vor, seine antioxidative Kapazität ist höher als die von Que [Ramos *et al.* 2006]. Beim Erhitzen von Que in wässriger Lösung auf 100 °C fand bei einem leicht alkalischen pH-Wert (pH 8) bei Durchströmung mit Luft ebenfalls ein oxidativer Abbau statt. Als ein Abbauprodukt wurde unter anderem ebenfalls 2,5,7,3',4'-Pentahydroxy-3,4-flavandion detektiert. Bei Inkubationen von Que in einer Konzentration von 1 mM war nach 180 Minuten kein Que mehr detektierbar [Buchner *et al.* 2006]. In einem Puffer bestehend aus Tris[hydroxymethyl]aminomethan in Wasser und Ethanol kam es zur Bildung von 2,5,7,3',4'-Pentahydroxy-3,4-flavandion [Le Nest *et al.* 2004]. Beim oxidativen Abbau von Que durch Tyrosinase aus Pilzen wurde es ebenfalls als ein Zwischenprodukt nachgewiesen [Kubo *et al.* 2004].

Einige Gruppen identifizierten andere oxidative Abbauprodukte des Ques. In Zellkulturmedium wurde die Bildung eines oxidierten Ques (Dioxetan oder Peroxid) mit einem m/z von 335 postuliert [Boulton *et al.* 1999]. Bereits 1968 wurde die Bildung von 4-(3,5,7-Trihydroxychromonyl-(2))-1,2-benzochinon durch Oxidation von Que mit Silberchlorid, Bleioxid oder Tetrachlor-*o*-benzochinon beschrieben. Das Oxidationsprodukt wies ein Absorptionsmaximum bei 510 nm und ein Molekulargewicht von 300,2 g/mol auf [Loth und Diedrich 1968]. Nach der Reaktion von Que mit dem stabilen Radikal 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl wurde dieses Produkt ebenfalls detektiert und mittels LC-MS/MS identifiziert [Hvattum *et al.* 2004].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das bei der Inkubation von Que in HBSS-Medium bei 37 °C gebildete Abbauprodukt 2,5,7,3',4'-Pentahydroxy-3,4-flavandion in der Literatur bereits in verschiedenen Systemen durch oxidativen Abbau von Que beschrieben wurde. Die Instabilität von Que in Zellkulturmedium wurde ebenfalls von van der Woude *et al.* gezeigt [van der Woude *et al.* 2003], ob Abbauprodukte entstanden waren, wurde aber nicht näher untersucht. In der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmals der Nachweis der Bildung von 2,5,7,3',4'-Pentahydroxy-3,4-flavandion aus Que in Zellkulturmedium.

Der Vergleich der Ergebnisse des Abbaus von 5-CQA, Que und Epi in HBSS zeigt, dass drei verschiedene Mechanismen bei der Instabilität von Polyphenolen im Zellkulturmedium eine Rolle spielen könnten. Bei der Inkubation von 5-CQA kam es innerhalb von 24 Stunden lediglich zu einer Umesterung bis zu einem Gleichgewicht von 3-, 4- und 5-CQA, Que und Epi dagegen wurden oxidativ abgebaut. Der oxidative Abbau beruhte auf zwei verschiedenen Mechanismen. Aus Epi bildeten sich zwei diastereomere Chinone durch die Abstraktion von zwei Protonen und zwei Elektronen, wogegen Que zum Teil gespalten wurde und die aus dem A-Ring resultierende 3,4-Dihydroxybenzoesäure nachweisbar war. Zum anderen wurde durch den Einbau eines Sauerstoffatoms das Oxidationsprodukt 2,5,7,3',4'-Pentahydroxy-3,4-flavandion nachgewiesen. Unterschiede beim oxidativen Abbau der beiden Verbindungen wurden bereits von Sawai *et al.* beschrieben. Sie vermuteten, dass die unterschiedlichen Oxidationsprodukte in Abhängigkeit vom Vorhandensein einer olefinischen Doppelbindung zwischen C2 und C3 im C-Ring abhängt. Zur Absicherung dieser These untersuchten sie das Oxidationsprodukt von Taxifolin (Dihydroquercetin, Struktur siehe Abbildung 4-6 rechts). Hier entstand wie bei Epi ein Chinon und kein analoges Produkt zur Oxidation von Que. Die Doppelbindung im C-Ring spielt also eine entscheidende Rolle, welche Oxidationsprodukte gebildet werden können. Anhand der Untersuchung weiterer Flavonoide fand die Gruppe um Sawai heraus, dass die Hydroxylgruppe an Position C3 keinen Einfluss auf die Bildung unterschiedlicher Oxidationsprodukte hat. Der pH-Wert

der Lösungen könnte einen Einfluss auf die Bildung der Abbauprodukte haben, wurde aber von Sawai *et al.* nicht gemessen. Die Versuche erfolgten aber alle unter den gleichen Bedingungen [Sawai *et al.* 2005].

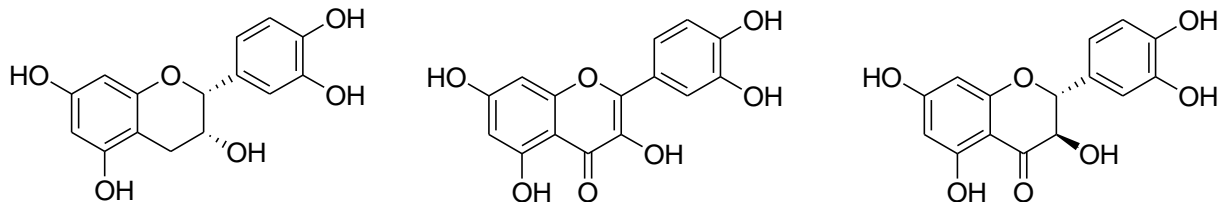


Abbildung 4-6: Strukturformeln von (-)-Epicatechin (links), Quercetin (Mitte) und Taxifolin (rechts).

Bei der Durchführung und Auswertung von Inkubationen mit Polyphenolen in Zellkulturmedium ist die Stabilität bzw. Instabilität der Polyphenole von großer Bedeutung. Es wurde festgestellt (Daten nicht gezeigt), dass es auch bei Raumtemperatur im Medium zu einem Abbau der Polyphenole kommt. Dies ist vor allem dann relevant, wenn eine größere Anzahl an Proben aufbereitet wird und diese im Autosampler über längere Zeit bei Raumtemperatur gelagert werden, um anschließend per HPLC untersucht zu werden. Bei +4 °C waren alle untersuchten Polyphenole in HBSS über 24 Stunden stabil (Daten nicht gezeigt). Bei der Auswertung von Inkubationen mit Polyphenolen mit T84-Zellen, Schweinedarmmukosa und humanen Biopsien mussten in der vorliegenden Arbeit die Abbauprodukte, die im Inkubationsmedium auch in der Abwesenheit von Zellen entstehen können, berücksichtigt werden, damit deren Bildung nicht irrtümlicherweise auf einen zellulären Metabolismus zurückgeführt wird.

4.3 Untersuchung der Generierung von Wasserstoffperoxid in der Ussing-Kammer

Wie in Kapitel 3.3 gezeigt, waren unter den in der Ussing-Kammer herrschenden Bedingungen, wie sie auch bei den in Kapitel 3.4 beschriebenen Absorptionsversuchen verwendet wurden, nach 4 Stunden Inkubation keine oder nur geringe Mengen Wasserstoffperoxid messbar. Die höchste Konzentration mit $2,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$ war bei der Inkubation mit dem Dihydrochalkon PhI ($20 \mu\text{M}$) nachweisbar.

In der Literatur wurde beschrieben, dass bei Inkubationen mit Natriumbicarbonat-haltigem Medium Wasserstoffperoxid von den Polyphenolen gebildet werden kann [Bellion *et al.* 2009]. Untersucht wurde die Bildung von Wasserstoffperoxid bei Inkubationen von Kaffeesäure (250 mM) [Akagawa *et al.* 2003], Kaffeesäure ($100 \mu\text{M}$) [Bellion *et al.* 2009], Que ($500 \mu\text{M}$) [Wee *et al.* 2003], Que ($100 \mu\text{M}$ bei Raumtemperatur) [Long *et al.* 2000] und Que ($50 \mu\text{M}$) [Lapidot *et al.* 2002]. Die höchste Wasserstoffperoxidkonzentration wurde bei

der Inkubation von Quercetin mit 183 μM gemessen [Wee *et al.* 2003]. Da diese Konzentrationen höher waren als die in der Ussing-Kammer ermittelten, wurde in weitergehenden Versuchen untersucht, ob vorhandenes Wasserstoffperoxid in der Ussing-Kammer durch die ständige Begasung ausgetrieben wird. Wasserstoffperoxid wurde in verschiedenen Konzentrationen (5 bis 50 μM) über einen Zeitraum von 4 Stunden in der Ussing-Kammer inkubiert und anschließend der Wasserstoffperoxid-Gehalt des Mediums bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen 10 und 50% der ursprünglichen Konzentration über diesen Zeitraum entwich. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass zwar bei den durchgeführten Inkubationen mit Polyphenolen geringe Mengen Wasserstoffperoxid - wie auch in der Literatur beschrieben - entstehen, diese jedoch durch die ständige Begasung wieder entfernt wurden. Zu jedem Zeitpunkt sind also nur geringe Mengen Wasserstoffperoxid vorhanden. Wie in 2.6.6 beschrieben, kann Wasserstoffperoxid einen Einfluss auf die Ergebnisse von Zellkulturversuchen haben und diese verfälschen. Liu und Sun entdeckten keinen Effekt von Wasserstoffperoxid auf die Zellproliferation von humanen Leberkarzinomzellen (HepG₂) und humanen Kolonkarzinomzellen (Caco-2) [Liu und Sun 2003]. Lee *et al.* dagegen zeigten, dass Wasserstoffperoxid cytotoxisch wirkt, bei einer Inkubationskonzentration von 25 μM Wasserstoffperoxid konnte jedoch noch kein Effekt festgestellt werden. Die Cytotoxizität in der verwendeten Zelllinie zeigte sich erst ab einer Konzentration von 50 μM [Lee *et al.* 2005].

Bellion *et al.* beschreiben außerdem, dass die inkubierten Konzentrationen der Polyphenole einen entscheidenden Einfluss auf die Wasserstoffperoxid-Bildung haben. Bei Konzentrationen der Polyphenole von 1 und 10 μM wurden nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden höchstens 3,6 μM Wasserstoffperoxid detektiert, erst bei Konzentrationen ab 100 μM wurden Wasserstoffperoxid-Konzentrationen von 50 μM nachgewiesen [Bellion *et al.* 2009]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Inkubationen mit Konzentrationen der Polyphenole von meist 20 μM durchgeführt, lediglich bei wenigen Ausnahmen wurden höhere Konzentrationen verwendet.

Unter den gewählten Bedingungen und bei den verwendeten Konzentrationen wurde nur eine geringe Wasserstoffperoxid-Bildung beobachtet, außerdem entwich ein Anteil durch die Begasung. Folglich wurde davon ausgegangen, dass bei den in der Ussing-Kammer durchgeführten Versuchen auf eine Zugabe von Katalase zur Verhinderung der Bildung von Wasserstoffperoxid verzichtet werden konnte.

4.4 Transepitheliale Absorption der Polyphenole

Die transepitheliale Absorption der nach Apfelsaftverzehr den Dickdarm erreichenden Polyphenole sowie einiger Strukturanaloga und intestinaler Abbauprodukte wurde in vier

Modellen in der Ussing-Kammer untersucht. Zunächst wurden die Polyphenole *in vitro* mit Monolayern der Kolonkarzinomzelllinie T84 inkubiert. Weiterhin erfolgte eine Inkubation der Polyphenole mit T84-Monolayern, welche zuvor mit C10 behandelt wurden. Dieses Modell simuliert den Zustand der intestinalen Mukosa bei Patienten mit CED. Im Anschluss an diese *in vitro*-Versuche wurden Inkubationen einiger ausgewählter Polyphenole mit humanen Biopsien durchgeführt. Da humane Biopsien nur in geringer Anzahl zu erhalten sind, wurden alle *in vitro* untersuchten Polyphenole *ex vivo* mit Darmmukosa des Schweins durchgeführt. Ziel war es, Erkenntnisse darüber zu erhalten, welche der den Dickdarm erreichenden Polyphenole absorbiert werden können und anschließend zu den Zielgeweben zu gelangen. Der pH-Wert des Mediums war – wenn nicht anders angegeben – 7,4. Die Applikation der Polyphenole erfolgte auf der apikalen Seite der T84-Monolayer bzw. Mukosa. Es wurde in den Konzentrationen 10 bis 80 μM inkubiert, je nachdem, in welcher Konzentration die Polyphenole nach dem Verzehr von einem Liter naturtrübem Apfelsaft den Dickdarm erreichen [Kahle *et al.* 2007, Kahle *et al.* 2005b]. Wegen einer besseren Vergleichbarkeit wurden die Ergebnisse alle in % angegeben, d.h. die Inkubationsmenge wurde 100% gesetzt und darauf basierend die Werte am Ende der Inkubationszeit berechnet.

4.4.1 T84-Monolayer

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete T84-Kolonkarzinomzelllinie stellt ein gut etabliertes Modell humaner Kolonzellen dar. Die Zellen repräsentieren die morphologischen Eigenschaften ausdifferenzierter Epithelzellen. Die Monolayer wachsen polarisiert, außerdem bilden sie TJs und simulieren damit die intestinale Barriere. Die basolaterale Seite der Zellen wächst auf dem Wachstumssubstrat, die Mikrovilli dagegen sind in Richtung des Mediums ausgerichtet [Dharmasathaphorn *et al.* 1984, Sambruy *et al.* 2001].

Die Ergebnisse wurden nicht auf die Zellzahl bezogen, da die Proteinmenge nicht bestimmt wurde. Da die Monolayer für alle Versuche unter reproduzierbaren Bedingungen gewachsen waren, war davon auszugehen, dass sich die Zellzahlen der einzelnen Monolayern nicht stark unterschieden. Zusätzlich wurde während der Anwachsphase der Monolayer der TER alle zwei Tage überprüft. Es wurden nur Monolayer mit einem TER zwischen 400 und 650 $\Omega \text{ cm}^2$ verwendet. Dieser TER war beim Aussäen von 125.000 Zellen (siehe 5.2.8) frühestens nach 2 Wochen erreicht.

4.4.1.1 Transepitheliale Absorption

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-5 zusammengefasst. Nach vier Stunden wurde die höchste transepitheliale Absorption in T84-Monolayern bei den Methylestern Kaffeesäure- und *p*-Coumarsäuremethylester (Strukturen siehe Kapitel 6) mit 45,8 und 37,2% ermittelt. Die

weniger polaren Hydroxyzimtsäuren Zimt- und Dihydrozimtsäure wurden zu 29,0 und 24,8% auf die basolaterale Seite absorbiert. Im Gegensatz dazu wurden Ferula- und Isoferulasäure nur zu 2,3 und 3,2% auf der basolateralen Seite bestimmt, die polarerer Säuren wie beispielsweise Kaffeesäure dagegen nicht. Die Unterschiede in der Absorption waren strukturabhängig. Die Methoxylierung der Hydroxyzimtsäuren führte zu einer erhöhten Absorption. Ein Transport der Kaffeesäure auf die basolaterale Seite wurde im Gegensatz zu Ferula- und Isoferulasäure nicht nachgewiesen. Die Methoxylierung der Carboxylgruppe führte zu einer noch stärkeren Absorption. Säuren ohne Hydroxylgruppen am Ring wurden ebenfalls basolateral detektiert, wobei Dihydrozimtsäure, bei der im Gegensatz zur Zimtsäure keine Doppelbindung in der Seitenkette vorliegt (Strukturformel siehe Kapitel 6), weniger stark absorbiert wurde.

Die im Dickdarm nach Apfelsaftverzehr ermittelten Ester der D-(-)-Chinasäure mit Kaffee- und *p*-Coumarsäure wurden auf der basolateralen Seite nicht detektiert.

Im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen wies die Gruppe um Konishi einen Transport von *p*-Coumar- und Kaffeesäure sowie 5-CQA auf die basolaterale Seite von Caco-2-Monolayern nach [Konishi und Kobayashi 2004b, Konishi *et al.* 2003]. Ein Grund für die unterschiedlichen Resultate könnte sein, dass Konishi *et al.* höhere Polyphenolkonzentrationen verwendet haben. Eingesetzt wurden Konzentrationen von 1 mM bis 5 mM. In der vorliegenden Arbeit wurden dagegen Konzentrationen von 20 bis 50 μ M verwendet. Diese Konzentrationen entsprechen den Dickdarm erreichenden Konzentrationen der Polyphenole nach dem Verzehr von 1 L naturtrübem Apfelsaft [Kahle *et al.* 2007].

Aus der Gruppe der Dihydrochalkone wurde nur das Aglykon PhI auf die basolaterale Seite absorbiert. Bei den beiden Glycosiden wurde kein Transport festgestellt. Que wurde nach der vierstündigen Inkubation weder apikal noch basolateral detektiert. Dies ist durch die in Kapitel 4.2 beschriebene Instabilität im Inkubationsmedium zu erklären und die dort beschriebenen Abbauprodukte des Ques wurden identifiziert. Bei Que-R wurde wie bei den anderen Glycosiden keine Absorption festgestellt. Die Ergebnisse der Untersuchungen der Glycoside stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer Gruppen [Steinert *et al.* 2008, Walgren *et al.* 1998], in der Literatur wird jedoch auch für die Glycoside von einer Absorption auf die basolaterale Seite der Monolayer berichtet [Kim *et al.* 1999, Kobayashi *et al.* 2008, Tian *et al.* 2009]. Aber auch hier wurden z.T. sehr hohe Inkubationskonzentrationen verwendet. Kobayashi *et al.* beispielsweise inkubierten das Glycosid Hesperidin in einer Konzentration von 500 μ M, 0,58% der eingesetzten Konzentration konnten sie basolateral ermitteln. Demzufolge würden die in dieser Arbeit eingesetzten intestinalen Konzentrationen (10 und 20 μ M für Flavonoide) unterhalb der analytischen Bestimmungsgrenze liegen.

Bei Epi und Cat wurde keine transepitheliale Absorption festgestellt. Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Publikationen überein [Tammela *et al.* 2004, Vaidyanathan und

Walle 2001]. Im Gegensatz zu diesen beiden Gruppen detektierten Zhang *et al.* den Transport von Epi auf die basolaterale Seite [Zhang *et al.* 2004].

Bei den untersuchten intestinalen Metaboliten wurden 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und 3,4-Dihydroxytoluol in keinem der untersuchten drei Kompartimente nachgewiesen. Im Fall von 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure zeigten bereits die Untersuchungen der Stabilität im Inkubationsmedium (siehe Kapitel 3.2), dass die Substanz nur eine geringe Stabilität aufweist. Für Verbindungen mit zwei *o*-Hydroxylgruppen wurde eine geringe Stabilität im Inkubationsmedium ermittelt. Da auch 3,4-Dihydroxytoluol dieses Strukturmerkmal aufweist, ist davon auszugehen, dass auch hier nur eine geringe Stabilität vorliegt, seine Stabilität wurde aber nicht überprüft. In dieser Arbeit wurden erstmals Phloroglucin und D-(-)-Chinasäure auf ihre intestinale Absorption hin untersucht. Phloroglucin wurde apikal, aber nicht basolateral detektiert. Bei D-(-)-Chinasäure wurde eine geringe Absorption (0,5%) auf die basolaterale Seite festgestellt.

Bei den in der Literatur beschriebenen Studien zur transepithelialen Absorption von Polyphenolen in *in vitro*-Zellmodellen war der absorbierte Anteil meist höher als bei den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen. In der Literatur wurde meist die Caco-2-Zelllinie verwendet. Bisher gibt es keinen direkten Vergleich der Absorption von Polyphenolen zwischen Caco-2- und T84-Zellen, die Absorption von Cholsäure - eine primäre Gallensäure - wurde bereits in den beiden Zelllinien miteinander verglichen und dabei für Caco-2 eine höhere Absorption als für T84 festgestellt [Loves und Simmons 2001].

Bei einigen der inkubierten Polyphenole wurde nach dem Ablauf der vierstündigen Inkubation nicht 100% der inkubierten Konzentration in den drei Kompartimenten apikale Seite, basolaterale Seite und zellassoziiert ermittelt. Bei den Verbindungen Kaffeesäure, Dihydrokaffeesäure, 3-CQA, 4-CQA, PhI, Cat, Epi, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und 3,4-Dihydroxytoluol kann dies auf deren Instabilität im Inkubationsmedium (siehe Kapitel 3.2) zurückgeführt werden. Es ist jedoch zu bemerken, dass nur einige ausgewählte exemplarische Polyphenole auf ihre Stabilität hin untersucht wurden, z.B. scheint es bei den CQAs Unterschiede in der Stabilität zu geben. Zellfrei wurde nur 5-CQA untersucht, nach 4 Stunden waren noch 61,2% der Anfangskonzentration vorhanden. Bei der Inkubation mit T84-Monolayern wurde kein Abbau von 5-CQA festgestellt, die Zellen schienen einen stabilisierenden Einfluss zu haben. Bei 1-CQA wurden ebenfalls nahezu 100% detektiert. Bei 3- und 4-CQA wurden jedoch nur 75,8 bzw. 47,9% nach 4 Stunden bestimmt. Über die Gründe hierfür kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur gemutmaßt werden. Die strukturellen Unterschiede der vier Isomere bestehen in der unterschiedlichen Position der Hydroxylgruppe der D-(-)-Chinasäure mit welcher die Kaffeesäure verestert ist (Strukturen

siehe Kapitel 6). Zur Verdeutlichung ist die Struktur der D-(-)-Chinasäure in Abbildung 4-7 gezeigt.

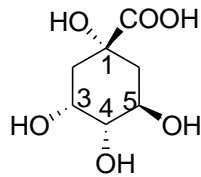


Abbildung 4-7: Struktur von D-(-)-Chinasäure

Bei 3- und 4-CQA ist jeweils eine Hydroxylgruppe der D-(-)-Chinasäure verestert, die in die Abbildungsebene hinein zeigt. Bei 1-CQA ist dies zwar ebenfalls der Fall, hier befindet sich aber an dem Kohlenstoffatom, an das die Hydroxylgruppe gebunden ist zusätzlich noch die Carboxylgruppe. Bei 5-CQA zeigt die veresterte Hydroxylgruppe aus der Ebene heraus. Eventuell könnten diese strukturellen Unterschiede einen Einfluss auf die Stabilität im zellfreien Medium und in der Gegenwart von Zellen haben.

Im Gegensatz hierzu wurde bei einigen anderen inkubierten Polyphenolen nach vier Stunden mehr als 100% der Anfangskonzentration ermittelt. Dies war der Fall bei *p*-Coumarsäure, Dihydroferulasäure, PhI-G, und D-(-)-Chinasäure. Da die verwendeten Ussing-Kammern an der Oberseite offen sind, ist es möglich, dass bei 37 °C ein Teil des Mediums verdunstet ist und daraus eine Aufkonzentrierung der Polyphenole resultierte.

Bei einem Teil der Verbindungen wurden hohe Standardabweichungen bei den Ergebnissen bestimmt, z.T. bis 16%. Da es sich bei den Monolayern um ein biologisches System handelt, werden nicht bei allen voneinander unabhängigen Versuchen die exakt gleichen Ergebnisse erzielt.

4.4.1.2 Quantifizierung der zellassozierten Polyphenolgehalte

Die Menge der Polyphenole, die nach der vierstündigen Inkubation zellassoziert vorlagen, wurde nach Lyse der Monolayer und anschließender Extraktion mit saurem Methanol bestimmt. Erfasst wurden mit dieser Methode sowohl die sich in den Zellen befindlichen als auch die an die Zellen assoziierten Polyphenolmengen. Da mit der verwendeten Methode keine Rückschlüsse auf die genaue Lokalisation gezogen werden konnten, wurde der durch die Lyse bestimmte Polyphenolgehalt als „zellassoziert“ bezeichnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-5 zusammengefasst.

Bei den untersuchten Hydroxyzimtsäuren wurden bei Zimtsäure, Ferulasäure und Isoferulasäure quantifizierbare Mengen (1,1, 0,9 und 0,3%) zellassoziert ermittelt. Die weiteren Hydroxyzimtsäuren wurden mittels HPLC-MS/MS ebenfalls nachgewiesen, die Gehalte lagen aber unterhalb der Bestimmungsgrenzen. Die Gruppe um Konishi untersuchte

in Caco-2-Zellen die zellassozierten Gehalte von einigen Hydroxyzimtsäuren, sie verwendeten jedoch Inkubationskonzentrationen von 1 und 5 mM. Die detektierten Gehalte in den Zellen lagen zwischen 0,06 und 0,25% der Ausgangskonzentration [Konishi 2005, Konishi und Kobayashi 2004a, Konishi und Kobayashi 2004b, Konishi *et al.* 2003, Konishi und Shimizu 2003]. Berücksichtigt man die verschiedenen Konzentrationen die von der Gruppe um Konishi und in dieser Arbeit verwendet wurden, stimmen die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten mit denen aus der Literatur überein. Es wurde gezeigt, dass die Hydroxyzimtsäuren nach der Inkubation in geringem Maße zellassoziert vorliegen können.

Die Methylester von *p*-Coumar- und Kaffeesäure wurden ebenfalls zellassoziert (0,9 und 1,1%) nachgewiesen, hierzu ist bisher aus der Literatur nichts bekannt.

Aus der Gruppe der Ester der D-(-)-Chinasäure mit *p*-Coumar- und Kaffeesäure wurde für 5-CQA eine quantifizierbare Menge zellassoziert ermittelt, bei den anderen Verbindungen lagen die Werte unterhalb der Bestimmungsgrenzen. Mit $0,2 \pm 0,1\%$ der inkubierten Konzentration stimmten die Ergebnisse für 5-CQA sehr gut mit den Werten aus der Literatur überein ($0,12 \pm 0,17\%$) [Konishi und Kobayashi 2004b].

Bei der Inkubation der Flavonoidaglyka Phl und Que wurden die Aglyka ebenfalls zellassoziert nachgewiesen, die Quantifizierung ergab für Phl eine Konzentration von 8,4% der eingesetzten Konzentration. Die Glycoside des Phls wurden ebenfalls zellassoziert detektiert. Que-R sowie Epi und Cat wurden dagegen nicht zellassoziert identifiziert. Ikeno *et al.* detektierten Quercetin (10 mM) ebenfalls in Caco-2-Zellen, die Ergebnisse sind aber nicht miteinander vergleichbar, da von dieser Gruppe nur die Konzentration bezogen auf die Proteinmenge (1056 ± 210 pmol/mg Protein) angegeben wurde [Ikeno *et al.* 1999]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinmenge nicht ermittelt. Nach der Inkubation von Epi wurde von Vaidyanathan und Walle keine Aufnahme in Zellen beschrieben, dieselbe Gruppe fand aber für Cat eine Aufnahme in die Zellen [Vaidyanathan und Walle 2003]. Für Phl und seine Glykoside lagen bisher keine Literaturdaten vor.

Die intestinalen Abbauprodukte waren zellassoziert nicht bestimmbar, auch hierzu gibt es keine literaturbekannten Daten.

4.4.1.3 Aufnahme der Polyphenole ins Cytoplasma

Mit der Methode, die Zellen zu lysieren und anschließend die Zellsuspension auf ihren Polyphenolgehalt hin zu untersuchen, kann nur der gesamte zellassozierte Gehalt ermittelt werden. Deshalb wurde eine schnelle und einfache Methode verwendet, um den cytosolischen Gehalt zu ermitteln. Kaiser *et al.* versetzten Zellmonolayer mit einer Digitoninlösung, um cytosolische Proteine aus den Zellen zu lösen [Kaiser *et al.* 2009]. Da bei dieser Methode durch die Digitoninbehandlung die Zellen permeabilisiert werden und bei

der anschließenden 30-minütigen Inkubation das Cytosol herausfließen kann, wurde diese Methode angewendet, um die im Cytosol vorhandenen Polyphenolmengen zu bestimmen. Nach der Abnahme des Überstandes, der das Cytosol enthält, wurden die Zellen analog zu den vorherigen Versuchen lysiert und somit der verbliebene membranassoziierte Polyphenolgehalt bestimmt. Entsprechend der Vorgehensweise in Kapitel 4.4.1.2 wurden nicht mit Digitonin behandelte Monolayer als Kontrolle – parallel zu den Digitonin behandelten Monolayern – direkt lysiert. Die hier erhaltenen Polyphenolgehalte sollten den Summen aus der Digitoninbehandlungen und den anschließenden Lysierungen entsprechen. Die Ergebnisse (siehe Abbildung 3-15 und Tabelle 9-4) zeigten, dass bei den Hydroxycimtsäuren Kaffeesäure und 5-CQA der zuvor (Kapitel 4.4.1.2) ermittelte sogenannte zellassozierte Polyphenolgehalt im Cytosol lokalisiert war, bei der anschließenden Lyse wurden keine zusätzlichen membranassoziierten Polyphenolmengen mehr ermittelt. Bei den untersuchten Flavonoiden und ihren Glykosiden wurden jeweils zwischen 25 und 40% der Polyphenolmenge, die zellassoziert bestimmt wurde, der Cytosolfraction zugeordnet. Die Ergebnisse der zur Kontrolle mitgeführten Monolayer ohne Digitoninbehandlung, bei denen der gesamte zellassozierte Gehalt durch Lyse bestimmt wurde, stimmten unter Berücksichtigung der Standardabweichung mit den Summen der zuvor mit Digitonin behandelten und dann lysierten Monolayer überein.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur zellassozierten Polyphenolmenge in den 6-Well-Platten unterschieden sich von den in Kapitel 3.4.1 vorgestellten zellassozierten Polyphenolmengen in der Ussing-Kammer. Zum Vergleich sind die Ergebnisse in Tabelle 4-1 gegenübergestellt.

Tabelle 4-1: Gegenüberstellung der zellassoziert ermittelten Polyphenolgehalte nach Inkubation in T84-Monolayern in der Ussing-Kammer und in 6-Well-Platten, angegeben in % der Inkubationskonzentration. LOQ = Bestimmungsgrenze, n.d. = nicht detektierbar.

Substanz	zellassoziert [%]	
	Ussing-Kammer	6-Well-Platte
Kaffeesäure	< LOQ	1,0 ± 0,1
5-Kaffeoylchinasäure	0,2 ± 0,1	1,4 ± 0,6
Phloretin	8,4 ± 0,1	16,5 ± 2,2
Phloretin-2'-O-glucosid	2,9 ± 0,2	6,5 ± 1,4
Quercetin	1,8 ± 0,2	20,3 ± 9,2
Quercetin-3-O-rhamnosid	n.d.	1,2 ± 0,8

Die zellassoziert ermittelten Polyphenolgehalte waren nach der Inkubation in den 6-Well-Platten für alle sechs untersuchten Polyphenolen bis zu 10-fach höher als bei den Studien in

der Ussing-Kammer. Es gibt verschiedene Faktoren, die an diesen Unterschieden beteiligt sein können. Sie sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Tabelle 4-2: Unterschiede zwischen Versuchsanordnungen, die in der Ussing-Kammer (Snapwell-Inserts) und mit 6-Well-Platten mit T84-Monolayern durchgeführt wurden.

	Ussing-Kammer	6-Well-Platte
Fläche	1,13 cm ²	9,6 cm ²
Material	Polycarbonat	Polystyrol
ausgesäte Zellzahl	125.000	1.000.000
Anwuchszeiten	mind. 2 Wochen	48 Stunden
Inkubation	dynamisch, apikale und basolaterale Seite	statisch, nur eine Seite

Wie die Tabelle zeigt, bestehen Unterschiede zwischen den verwendeten Systemen. Die Inkubation in den 6-Well-Platten wurde gewählt, um in einem schnellen Verfahren die prozentuale cytosolische Menge der Polyphenole in den Zellen zu ermitteln. Die Unterschiede spielten hinsichtlich der untersuchten Fragestellung nur eine untergeordnete Rolle, da es in beiden Versuchen zu einer Ausbildung von Monolayern kam. Aufgrund der Unterschiede (siehe Tabelle 4-2) wurden Kontrollinkubationen in den 6-Well-Platten durchgeführt, bei denen die Monolayer analog zu den Ussing-Kammer-Versuchen direkt nach der Inkubation lysiert wurden.

Zahlreiche Gruppen haben sich mit der Bestimmung der Polyphenolgehalte, die in die Zellen aufgenommen werden beschäftigt. Die meisten der zuvor in Kapitel 2.6.2 beschriebenen Publikationen verwendeten zur Bestimmung der zellulär aufgenommenen Polyphenolmengen, eine Methode, bei der die Zellen lysiert bzw. komplett extrahiert wurden. Hierbei wird sowohl der Anteil der Polyphenole erfasst, der membrangebunden vorliegt, als auch die cytosolische Fraktion. Ausnahmen hiervon sind die Publikationen von Kuo und der Gruppe um Hong [Hong *et al.* 2002, Kuo 1998]. Kuo inkubierte Caco-2-Zellen mit radioaktiv markiertem Flavon und untersuchte den transepithelialen Transport. Er konnte zwar nicht feststellen, ob die Radioaktivität auf der Zelloberfläche (membranassoziiert) oder in den Zellen lokalisiert war, fand aber durch den Austausch des Flavon haltigen Mediums mit frischem Flavon freiem Medium heraus, dass 89% der zellassoziierten Flavonkonzentration wieder in das Medium zurückgelangten und die Bindung des Flavons an die Zellmembran nur eine geringe Affinität aufwies [Kuo 1998]. Ein Kritikpunkt an diesen Ergebnissen ist jedoch, dass dieser beobachtete Efflux in das frische Medium kein Beweis dafür ist, dass das Flavon nur membranassoziiert und nicht auch cytosolisch vorlag, da auch ein Transport aus den Zellen heraus durch Effluxtransporter oder Diffusion möglich wäre. Außerdem handelt es

sich bei Flavon nicht um ein repräsentatives Polyphenol oder Flavonoid, da es im Vergleich zu den in Pflanzen vorkommenden Polyphenolen sehr lipophil ist.

Die Gruppe um Hong gewann nach der Inkubation von EGCG über einen Zeitraum von zwei Stunden in HT-29-Kolonkarzinomzellen durch mehrere Zentrifugationen zwei Fraktionen der Zellen, zum einen das Cytoplasma, zum anderen die Membranfraktionen. Membrangebunden wurden 33% bestimmt, 67% wurden in der Cytosolfraktion der Zellen erfasst [Hong *et al.* 2002].

Diese zwei Literaturquellen zusammenfassend lässt sich sagen, dass bisher keine zufriedenstellende Methode existiert, um den tatsächlich in den Zellen vorliegenden Polyphenolgehalt schnell und einfach zu bestimmen. Die Methode von Kuo liefert keine aussagekräftigen Ergebnisse, die Methode von Hong *et al.* ist durch drei Einfrier- und Auftauzyklen, dreimalige Behandlung im Ultraschallbad und fünfmaliges Zentrifugieren relativ zeit- und arbeitsaufwendig.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Methode, bei der die Membranen der Zellen mit Digitonin permeabilisiert wurden, wodurch das Cytosol aus den Zellen herausfließen kann, stellt eine geeignete, schnell und einfach durchzuführende Methode dar, um den Gehalt von Substanzen im Cytosol zu bestimmen. Angewendet wurde die Methode bisher beispielsweise zur Bestimmung von im Cytosol vorliegenden Proteinen [Kaiser *et al.* 2009] und intrazellulären Enzymaktivitäten ohne die sonst notwendige Fraktionierung der Zellen [Natali *et al.* 2007]. Für die Bestimmung der intrazellulären Konzentration von Polyphenolen wurde sie bisher nicht eingesetzt. Sie erwies sich als geeignete Methode um die Lokalisation der zellassozierten Polyphenole zu bestimmen. Die Ergebnisse der Inkubationen mit Kaffeesäure und 5-CQA, bei denen nach der Digitoninbehandlung membranassoziiert keine Polyphenole mehr detektiert wurden, zeigen auch, dass es durch die Permeabilisierung zu einem vollständigen Ausfließen des Cytosols kommt.

Weiterhin wurde versucht, die Proteinmenge der Zellen zu bestimmen um anschließend die aufgenommene Polyphenolmenge auf die Proteinmenge zu beziehen. Es wurden Proteinbestimmungen nach Bradford und mittels BCA-Assay durchgeführt, bei denen unterschiedliche Farbreagenzien eingesetzt werden, die mit dem Protein eine Farbreaktion eingehen, die anschließend photometrisch vermessen wird. Die Versuche führten jedoch zu keinem Ergebnis, da die beiden Farbreagenzien jeweils mit dem verwendeten Lysepuffer TriFast™ (der rosa gefärbt ist) zu einer braunen Farbe reagierten, bei der dann keine photometrische Messung des Proteingehalts mehr möglich war (Daten nicht gezeigt). Eine Möglichkeit um diesem Problem in Zukunft auszuweichen, wäre es, einen anderen Lysepuffer zu verwenden, mit dem eine Quantifizierung möglich ist. Aber auch ohne den Bezug der Ergebnisse auf den Proteingehalt wurden aussagekräftige Ergebnisse darüber

erhalten, wie groß der Anteil der Polyphenole ist, die nach der Inkubation an die Membran gebunden ist oder im Cytosol vorliegt.

4.4.2 Schweinedarmmukosa

Zusätzlich zu den *in vitro*-Inkubationen mit den T84-Monolayern wurden *ex vivo*-Inkubationen mit Schweinedarmmukosa des terminalen Ileums durchgeführt. Die Inkubation der Schweinedarmmukosa mit den Polyphenolen zeigte im Vergleich zu den Ergebnissen mit T84-Monolayern andere Ergebnisse (siehe Tabelle 3-6). Zimt- und Dihydrozimtsäure beispielsweise, die im T84-Modell auf die basolaterale Seite gelangten, waren bei der Schweinedarmmukosa nur apikal vorhanden. Im Gegensatz dazu wurden in diesem Modell *p*-Coumar- und Kaffeesäure auf der apikalen und basolateralen Seite bestimmt. Vergleichbar waren die Ergebnisse für Ferula- und Isoferulasäure. In beiden Modellen wurden ca. 2% der inkubierten Konzentration basolateral nachgewiesen. Dihydrokaffee- und Dihydroferulasäure lagen in beiden Modellen übereinstimmend nur apikal vor.

Mit intestinaler Mukosa von Tieren wurden bisher nur wenige Versuche zur Absorption von Polyphenolen durchgeführt. Poquet *et al.* untersuchten den Transport von Ferula- und Dihydrokaffeesäure in ESs aus verschiedenen Darmabschnitten. Die Inkubationen wurden in Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt. Sie zeigten, dass innerhalb einer 30-minütigen Inkubation von Ferulasäure (500 µM) 4,7% in ESs des *Colon ascendens* und 4,8% in ESs des *Colon descendens* auf die basolaterale Seite gelangten [Poquet *et al.* 2008b]. Diese Werte lagen in derselben Größenordnung wie die in dieser Arbeit bei der Inkubation mit Schweinedarmmukosa ermittelten. Im Gegensatz zu den Versuchen von Poquet *et al.* stammte die verwendete Schweinedarmmukosa aus dem terminalen Ileum, 10 cm vom Zökopol entfernt.

Die Inkubation von Dihydrokaffeesäure erfolgte zusätzlich zum *Colon ascendens* und *Colon descendens* noch in ESs des Jejunums [Poquet *et al.* 2008a]. Die Ergebnisse sind als Transportrate bezogen auf die Fläche angegeben, so dass sie sich nicht direkt mit den Ergebnissen zu Ferulasäure aus der Literatur [Poquet *et al.* 2008b] oder den eigenen vergleichen lassen. Es wurde aber gezeigt, dass die Transportraten in den beiden untersuchten Dickdarmsegmenten etwa gleich hoch waren, die Transportrate im Jejunum betrug nur etwa 60% davon [Poquet *et al.* 2008a].

p-Coumar- und Kaffeesäuremethylester wurden bei den hier vorgestellten Untersuchungen mit Schweinedarmmukosa nicht auf die basolaterale Seite absorbiert, diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen aus Inkubationen von Polyphenolen mit T84-Monolayern. Wie in Kapitel 3.6.2 gezeigt, wurden die korrespondierenden Säuren freigesetzt, die anschließend auf der apikalen und basolateralen Seite detektiert werden konnten.

Für die Ester der D-(-)-Chinasäure wurden unterschiedliche Ergebnisse erzielt. 4-*p*-CouQA, 5-*p*-CouQA, 1-CQA und 4-CQA wurden nur apikal ermittelt, von 3-CQA und 5-CQA dagegen wurden 1,5 und 1,9% auf der basolateralen Seite nachgewiesen. Die Inkubation der Ester erfolgte angepasst an die Konzentrationen, in denen sie den Dickdarm nach Apfelsaftverzehr erreichen. 3- und 5-CQA wurden 50 µM inkubiert, die anderen dagegen nur 10 µM. Aufgrund der geringeren Inkubationskonzentrationen kam es hier eventuell nicht zu einer Absorption auf die basolaterale Seite.

Bei keinem der untersuchten Flavonoide und ihrer Glykoside wurde eine Absorption auf die basolaterale Seite festgestellt, Phl und Que waren nach Ablauf der vierstündigen Inkubation mit Schweinedarmmukosa weder apikal noch basolateral detektierbar (siehe Tabelle 3-6). Für Que wurde in Kapitel 4.4.1.1 bereits erläutert, dass es wegen seiner Instabilität im Inkubationsmedium nicht mehr nachweisbar war. Von Phl waren bei zellfreier Inkubation nach vier Stunden noch 85,7% der Ausgangsmenge nachweisbar, eine geringe Stabilität im Medium kann also nicht der Grund sein. Es ist in der Literatur ausreichend beschrieben, dass Flavonoide an verschiedene Proteine binden und somit nicht mehr im Medium vorhanden sind. So haben beispielsweise Xiao *et al.* die Bindung einiger Flavonoidaglyka und ihrer Glycoside an Rinderserumalbumin (BSA) untersucht. Sie zeigten, dass die Aglyka an das BSA binden und dass durch die Glycosilierung die Bindung herabgesetzt wird [Xiao *et al.* 2009]. Diese Ergebnisse weisen auch darauf hin, warum nur die Aglyka nicht detektierbar waren, bei den Glycosiden aber nahezu 100% der Ausgangsmenge ermittelt wurden. Papadopoulou *et al.* untersuchten die Bindung von Que, Rutin, Cat und Epi an BSA und stellten fest, dass sie für Que am höchsten war, gefolgt von Rutin, während Cat und Epi die niedrigste Proteinbindung aufwiesen [Papadopoulou *et al.* 2005]. Für Phl wurden zur Proteinbindung bisher keine Untersuchungen durchgeführt. Aufgrund seiner Strukturähnlichkeit vor allem zu Que ist jedoch davon auszugehen, dass es ebenfalls eine hohe Bindungsaffinität zu Proteinen haben könnte und damit in den durchgeführten Studien zu einer Bindung an das Protein der Schweinedarmmukosa führte.

In Rattendünndarm wurde der intestinale Transport von Que-G bereits untersucht, dass sich nur im Zuckerrest von Que-R unterscheidet. Auch hier wurde übereinstimmend mit den vorliegenden Ergebnissen kein Transport des Glycosids auf die basolaterale Seite beobachtet [Wolffram *et al.* 2002]. Diese Ergebnisse wurden durch Day *et al.* bestätigt, die für Que-G und Que-4'-G ebenfalls keine Absorption auf die basolaterale Seite von Rattendünndarmmukosa ermittelten [Day *et al.* 2003]. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stehen die von Matsumoto *et al.*, die bis zu 0,03% der apikal inkubierten αG-Rutin-Konzentration auf der basolateralen Seite des Ileums aus Ratten detektierten [Matsumoto *et al.* 2004]. Die verwendeten Konzentrationen waren mit 1 mM im Vergleich zu den Studien der Gruppen um Wolffram und Day aber zehnfach erhöht.

Bei den Flavan-3-olen wurde in den Studien mit Schweinedarmmukosa keine Absorption auf die basolaterale Seite festgestellt, hierzu liegen in der Literatur keine Daten vor. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen aus Inkubationen mit T84-Monolayern überein.

Von den untersuchten intestinalen Metaboliten wurden 3,4-Dihydroxytoluol und D-(-)-Chinasäure auf der basolateralen Seite der Schweinedarmmukosa ermittelt, Phloroglucin und 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure dagegen nicht.

Bei einigen Polyphenolen wurden bei der Inkubation der T84-Monolayer und der Schweinedarmmukosa vergleichbare Ergebnisse erzielt, zum Teil aber auch unterschiedliche. Die Unterschiede im Aufbau zwischen den beiden Modellen sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst.

Tabelle 4-3: Unterschiede zwischen T84-Monolayern und Schweinedarmmukosa [Sambruy et al. 2001].

T84-Monolayer	Schweinedarmmukosa
Kolonkarzinomzelllinie	gesundes Gewebe
Modell für Kryptenzellen	verschiedene Zellarten (z.B. Kryptenzellen, Enterocyten)
Monolayer	Polylayer
Fläche 1,13 cm ²	Fläche 0,71 cm ²

Alle in Tabelle 4-3 aufgeführten Unterschiede können einen Einfluss auf die erzielten Ergebnisse haben. Den größten Effekt haben jedoch sicherlich die Unterschiede bezüglich des Ursprungs (Kolonkarzinomzelllinie und gesundes Gewebe) und der Zellarten (Kryptenzellen vs. Mischung aus Kryptenzellen und Enterocyten). Um die beste Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen zu gewährleisten wurden Inkubationen mit humanen Biopsien durchgeführt.

Die Schweinedarmmukosa wurde nach der Inkubation nicht auf ihre gewebeassoziierten Polyphenolgehalte hin untersucht, da sie für die Analytik der Genexpression des TJ-Proteins Occludin vom Kooperationspartner verwendet wurden. Die Daten sind im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt [Deußer et al. 2010].

4.4.3 Humane Biopsien

Die Ergebnisse (siehe Tabelle 3-7) der Inkubationen einiger ausgewählter Hydroxymethylsäuren mit humanen Biopsien zeigten ein anderes Bild als die der Untersuchungen zur Absorption mit T84-Monolayern und Schweinedarmmukosa. Keine der fünf exemplarisch inkubierten Hydroxymethylsäuren (*p*-Coumar-, Kaffee-, Ferula-, Isoferula- und Dihydroferulasäure) wurde in quantifizierbaren Konzentrationen auf der basolateralen Seite

nachgewiesen, jedoch waren alle Verbindungen außer Kaffeesäure in Spuren im Medium der basolateralen Seite identifizierbar. In der Literatur sind bisher keine Daten zu Inkubationen von humanen Biopsien mit Hydroxyzimtsäuren bekannt. In den anderen beiden Modellen (T84-Monolayer und Schweinedarmmukosa, Ergebnisse siehe Tabelle 3-5 und Tabelle 3-6) wurden ca. 2% der inkubierten Menge an Ferula- und Isoferulasäure auf der basolateralen Seite ermittelt. *p*-Coumar- und Kaffeesäure wurden von der Schweinedarmmukosa auf die basolaterale Seite absorbiert.

Ein Grund für die Unterschiede zwischen den Inkubationen mit Schweinedarmmukosa und humanen Biopsien könnte die Herkunft der Mukosa sein. Beim Schwein stammte sie aus dem terminalen Ileum, kurz vor dem Übergang in den Dickdarm. Beim Menschen wurden die Biopsien ebenfalls an diesem Übergang entnommen, jedoch im Bereich des Dickdarms, da es schwierig ist, Biopsien aus dem Dünndarm zu entnehmen. Weiterhin war die bei den humanen Biopsien dem Medium gegenüber exponierte Fläche nur 0,031 cm² groß, dies entspricht 4,4% der bei der Schweinedarmmukosa exponierten Fläche (0,71 cm²). Dadurch konnte die Absorption auch nur auf einer kleineren Fläche stattfinden.

Für Kaffeesäure wurden nach der Inkubation mit den humanen Biopsien insgesamt nur 37% der inkubierten Menge im Medium detektiert. Diese Werte unterscheiden sich von denen mit T84-Monolayern (83%) und Schweinedarmmukosa (109%). Im Gegensatz dazu wurde bei der zellfreien Inkubation (Untersuchung zur Stabilität der Polyphenole im Inkubationsmedium) nach 4 Stunden noch 29% der inkubierten Konzentration ermittelt. Die unterschiedlichen Wiederfindungen der Kaffeesäure bei den Inkubationen - bei denen das verwendete Medium, die Temperatur und die Inkubationsdauer immer die gleichen waren - könnte darin begründet sein, dass es durch die Anwesenheit der Zellen bzw. Gewebe zu einem Schutz der Kaffeesäure vor oxidativem Abbau kommt. Bei den T84-Monolayern war zwar die exponierte Fläche am größten (1,13 cm²). Jedoch war die Menge an Zellen bei der Schweinedarmmukosa größer, da es sich um eine relativ dicke Gewebeschicht handelt. Bei den humanen Biopsien ist nur eine sehr kleine Fläche dem Medium exponiert, außerdem handelte es sich hier um eine sehr dünne Schicht, die relativ wenige Zellen enthält. Dadurch kann hier weniger Schutz vor oxidativem Abbau erfolgen. Ähnliche Phänomene wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Die Schweinedarmmukosa sollte als geeignetes Modell etabliert werden um humane transepitheliale Absorption und Metabolismus *ex vivo* zu untersuchen, da humane Biopsien schwer erhältlich sind. Schweinedarmmukosa ist dagegen einfacher zugänglich, außerdem können größere Stücke gewonnen werden. Um ein geeignetes Modell für die Simulation der humanen Mukosa zu erhalten, sollten größere Stücke aus der humanen Dünndarmmukosa gewonnen werden. Da dies schlecht realisierbar ist, kann Dünndarmmukosa des Schweins als Modell verwendet werden. Wie in Kapitel 2.9 bereits erläutert wurde, weisen Mensch und

Schwein viele physiologische Gemeinsamkeiten auf, unter anderem hinsichtlich des Gastrointestinaltraktes. Die humanen Biospien zeigten sich als schlechtes Modell für die humane Dünndarmmukosa, da sie nur aus dem Bereich des Dickdarms gewonnen werden konnten und die Stücke keine geeignete Größe hatten. Bei den verwendeten T84-Zellen handelt es sich um eine Kolonkarzinomzelllinie, die viele strukturelle Merkmale von Kryptenzellen aufweisen (siehe Kapitel 2.8). Es ist also nur eine Art von Zellen vorhanden, außerdem sind die Zellen entartet, da sie aus dem Gewebe eines Karzinoms stammen. Von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Modellen für die humane intestinale Dünndarmmukosa stellte sich die Schweinedarmmukosa aufgrund der physiologischen Gemeinsamkeiten und einer leichten Zugänglichkeit als das am besten geeignete Modell heraus.

4.4.4 Charakterisierung der transepithelialen Absorption

Um näher zu charakterisieren um welche Art von Absorption es sich bei der Aufnahme der Polyphenole in den vorgestellten Modellen handelt, wurden verschiedene Versuche durchgeführt.

4.4.4.1 Untersuchung der Abhängigkeit von den „Tight junctions“

Wie in Kapitel 3.4.1 und 3.4.3 bereits beschrieben, wurde die transepitheliale Absorption in T84-Monolayern sowie C10-vorbehandelten T84-Monolayern durchgeführt. Durch die Behandlung mit C10 kommt es zu einer Aufweitung der TJs, die in einer direkten Erniedrigung des TERs resultiert [Anderberg *et al.* 1993, Wallon *et al.* 2005]. Es wurde ca. 10 Minuten mit C10 inkubiert, so lange bis der TER auf 50% des Anfangswertes gesunken war. Dann wurde das C10 mit frischem Medium ausgewaschen und mit den Polyphenolen inkubiert. Der TER stieg zwar im Laufe der Inkubationen bedingt durch die Polyphenole wieder an (siehe Kapitel 3.7.2 und 4.6), verblieb jedoch unter dem TER, der während der Inkubation der Polyphenole in unbehandelten T84-Monolayern zu messen war. Zur Verdeutlichung der Unterschiede ist der zeitliche Verlauf des TERs bei der Inkubation von Phloretin in Abbildung 4-8 dargestellt.

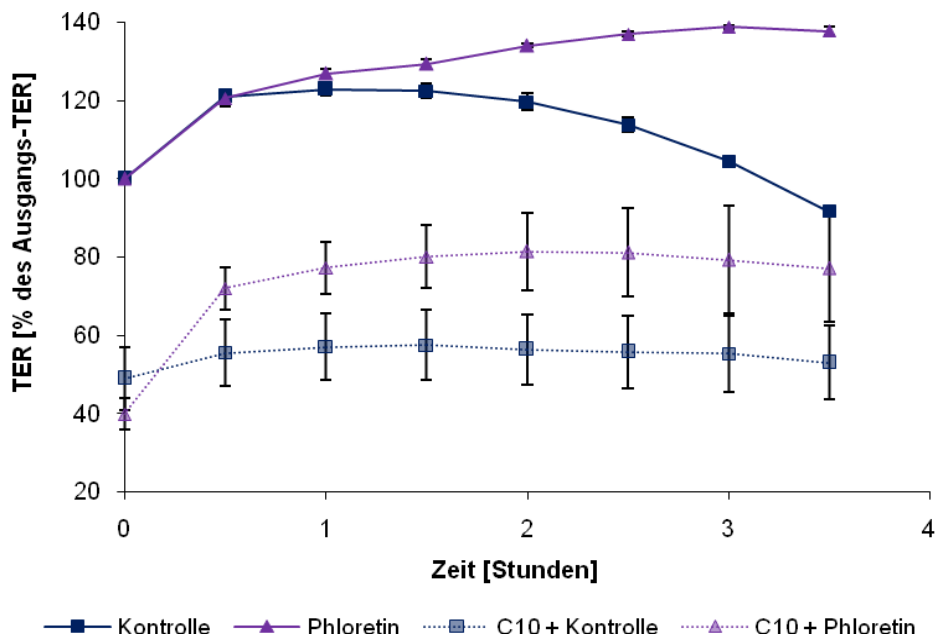


Abbildung 4-8: Transepithelialer Widerstand (TER) der unbehandelten T84-Monolayer und nach Behandlung mit Caprinsäure (C10) bei Inkubationen mit Phloretin und DMSO. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des TER [% des Ausgangs-TER] ab der Zugabe des Polyphenols.

Nach der Inkubation der mit C10 behandelten Monolayer zeigte sich keine erhöhte Absorption auf die basolaterale Seite gegenüber den unbehandelten Monolayern (außer bei PhI, Ergebnisse im Anhang Tabelle 9-2). Die Regulation der TJs hatte bei allen untersuchten Polyphenolen außer PhI keinen Einfluss auf die Absorption der untersuchten Polyphenole, es handelt sich folglich nicht um eine parazelluläre Diffusion (siehe Kapitel 2.5). In die transepitheliale Absorption von PhI könnte eine parazelluläre Diffusion involviert sein.

4.4.4.2 Studien zur Konzentrationsabhängigkeit der transepithelialen Absorption

Um die Abhängigkeit der transepithelialen Absorption von der inkubierten Polyphenolkonzentration zu bestimmen, wurden exemplarisch Ferulasäure und PhI in verschiedenen Konzentrationen inkubiert.

4.4.4.2.1 Ferulasäure

Zur weiteren Charakterisierung der transepithelialen Absorption wurde Ferulasäure über einen Konzentrationsbereich von 20 bis 1000 μM inkubiert. Wie in Kapitel 3.5.1 gezeigt, gelangten sowohl im T84-Modell als auch in der Schweinedarmmukosa bei allen untersuchten Konzentrationen ca. 2% auf die basolaterale Seite. Der prozentuale Anteil, der absorbiert wurde, war somit unabhängig von der Inkubationsmenge. In Abbildung 4-9 ist die

Transportgeschwindigkeit (die Zunahme basolateral) von Ferulasäure in T84-Monolayern in Abhängigkeit von der eingesetzten Ferulasäurekonzentration aufgetragen.

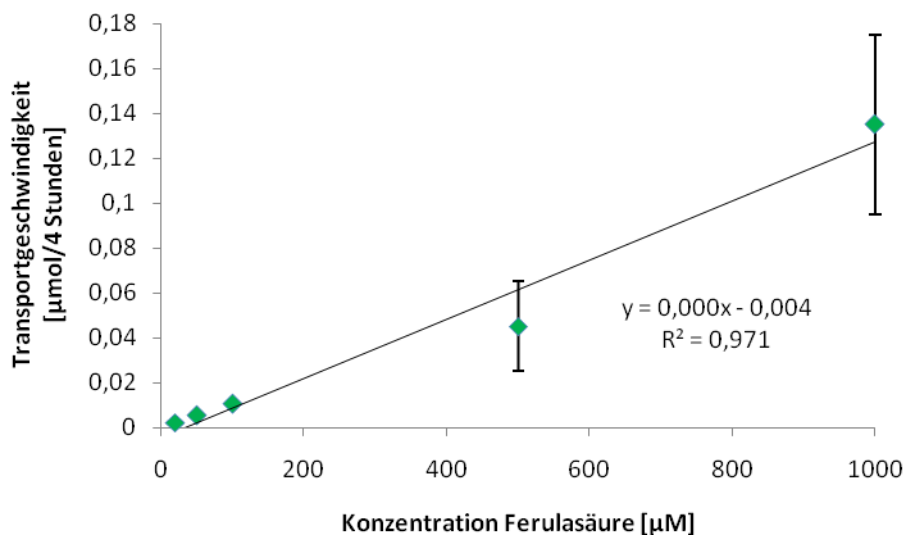


Abbildung 4-9: Transportgeschwindigkeit (Zunahme auf der basolateralen Seite) [µmol/4 Stunden] von Ferulasäure über T84-Monolayer in Abhängigkeit von der eingesetzten Ferulasäurekonzentration [µM]. Angegeben sind zusätzlich die Funktion der Ausgleichsgeraden sowie das Bestimmtheitsmaß R^2 .

Die in Abbildung 4-9 aufgetragenen Meßpunkte liegen fast alle auf einer Geraden ($R^2 = 0,971$). Wenn der Punkt (500 µM/0,045 mmol/4 Stunden), der deutlich von den anderen Punkten abweicht, bei der Erstellung der Ausgleichsgeraden nicht berücksichtigt wird, erhält man ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,999$. Handelt es sich bei einem Transport um eine einfache Diffusion, so muss die Auftragung der Transportgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration eine Gerade ergeben. Erhält man dagegen eine Hyperbel, so handelt es sich um eine erleichterte Diffusion [Rehner und Daniel 2002]. Die erhaltene Gerade weist darauf hin, dass es sich bei der Absorption von Ferulasäure um eine einfache Diffusion handelt.

Die Auftragung der Ergebnisse der Inkubation von Ferulasäure mit Schweinedarmmukosa ergibt ebenfalls eine Gerade (Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,8$). Sie ist im Anhang (siehe Abbildung 9-9) gezeigt.

In Caco-2-Monolayern zeigten Poquet *et al.* ebenfalls, dass der Transport von Ferulasäure linear und nicht sättigbar war. Sie schlussfolgerten daraus, dass Ferulasäure zum größten Teil über passive Diffusion die basolaterale Seite erreicht. In weiteren Versuchen zeigten sie aber, dass erleichterte Diffusion durch MCTs ebenfalls eine Rolle spielt [Poquet *et al.* 2008b].

4.4.4.2 Phloretin

Phl wurde in den Konzentrationen 10, 20 und 50 μM inkubiert. Es zeigte sich, dass der auf die basolaterale Seite gelangende Anteil mit der Erhöhung der Inkubationskonzentration anstieg (siehe Tabelle 3-9). In Abbildung 4-10 ist die Transportgeschwindigkeit (Zunahme auf der basolateralen Seite) von Phl in T84-Monolayern gegen die inkubierte Konzentration aufgetragen.

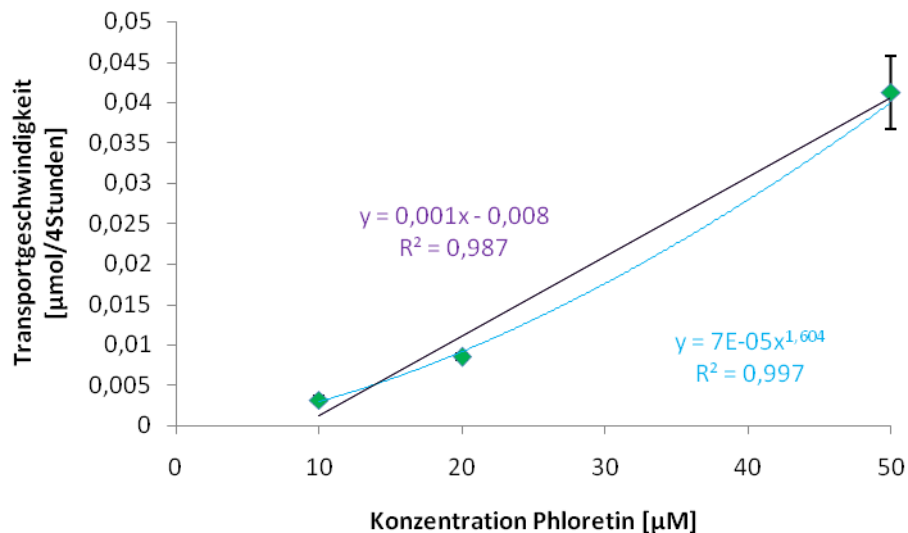


Abbildung 4-10: Transportgeschwindigkeit (Zunahme auf der basolateralen Seite) von Phloretin über T84-Monolayer in $\mu\text{mol}/4$ Stunden gegen Konzentration Phloretin in μM . Angegeben sind zusätzlich die Funktion der Ausgleichsgeraden in violett und die Funktion der Hyperbel in hellblau sowie das jeweilige Bestimmtheitsmaß R^2 .

Durch die drei in den Versuchen ermittelten Meßpunkte lassen sich sowohl eine Gerade als auch eine Hyperbel legen. Da Konzentrationen bis 50 μM verwendet wurden, lässt sich nicht erkennen, ob die Transportgeschwindigkeit ein Plateau erreicht, wie es im Falle einer erleichterten Diffusion oder einem aktiven Transport messbar wäre. Es könnte sich bei der Absorption von Phloretin sowohl um eine einfache Diffusion handeln, als auch um eine erleichterte Diffusion oder einen aktiven Transport. Deshalb wurden weitergehend Inkubationen mit dem Metabolismushemmer Natriumazid und in Gegenwart eines pH-Gradienten durchgeführt (siehe 4.4.4.4 und 4.4.4.5).

4.4.4.3 Untersuchungen zur Rückabsorption von Phloretin

Da literaturbekannt ist, dass es in den intestinalen Zellen auch Transporter gibt, die eine Absorption von der basolateralen auf die apikalen Seite ermöglichen, es also während der Inkubationen auch zu einer Rückabsorption der Polyphenole kommen kann, wurde die Rückresorption anhand der Inkubation des Dihydrochalkons Phl untersucht. Die Zugabe von

Phl erfolgte dazu auf der basolateralen Seite der T84-Monolayer. Es zeigte sich, dass bei der Inkubation auf der apikalen Seite 3,8% der inkubierten Konzentration auf die Empfängerseite (basolateral) gelangten. Bei Inkubation auf der basolateralen Seite war ein signifikant höherer Anteil (18,5%) auf der Empfängerseite (apikal) zu ermitteln (siehe Abbildung 3-17).

Für Phl wurde eine Rückabsorption von der basolateralen auf die apikale Seite in intestinalen Zellmodellen bisher noch nicht beschrieben, dafür aber für eine Reihe der anderen, im Rahmen dieser Arbeit untersuchten, Polyphenole. Für *p*-Coumarsäure war die Permeation über Caco-2-Monolayer von der basolateralen auf die apikale Seite etwas höher als in die entgegengesetzte Richtung [Konishi *et al.* 2003]. Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse derselben Gruppe zur intestinalen Permeation von Ferulasäure und 5-CQA. Hier war die Permeation von apikal nach basolateral höher als umgekehrt [Konishi und Kobayashi 2004b, Konishi und Shimizu 2003]. Poquet *et al.* bestätigten diese Beobachtungen ebenfalls für Ferulasäure [Poquet *et al.* 2008b]. Für Kaffeesäure wurde beschrieben, dass die Absorption sich zwischen den Zugaben auf der apikalen und basolateralen Seite nicht unterscheidet [Konishi und Kobayashi 2004b]. Bei Que war der Transport von basolateral nach apikal gegenüber dem in die Gegenrichtung signifikant erhöht. Auch für die beiden untersuchten Glycoside des Ques wurde in dieser Richtung ein höherer Transport festgestellt [Walgren *et al.* 1998]. Für Epi wurde von apikal nach basolateral keine Absorption nachgewiesen, in die andere Richtung dagegen schon [Vaidyanathan und Walle 2001]. Die in der Literatur beschriebenen Versuche wurden alle mit Caco-2-Monolayern durchgeführt und führten zu dem Schluss, dass in der apikalen Membran der Zellen eine Efflux-Pumpe lokalisiert sein muss, die unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Polyphenolen aufweist. Für Epi scheint sie besonders hoch, da es für diese Substanz nicht möglich war, einen Transport von der apikalen Seite auf die basolaterale Seite festzustellen. Als eine in Caco-2-Zellen identifizierte Pumpe wurde P-Glycoprotein beschrieben. In weiteren Versuchen mit spezifischen Inhibitoren der Transportproteine wurde P-Glycoprotein aber ausgeschlossen und MRP2 als wirksame Pumpe identifiziert [Vaidyanathan und Walle 2001]. Da bei der Zugabe von Phloretin in der vorliegenden Arbeit auf die basolaterale Seite auch eine höhere Absorption auf die entgegengesetzte Seite als bei Zugabe auf der apikalen Seite beobachtet wurde, lässt sich daraus schlussfolgern, dass auch hier ein Effluxtransporter in der apikalen Seite in den Transport involviert sein könnte. Um dies abzuklären, wurden Versuche mit dem Metabolismushemmer Natriumazid durchgeführt (siehe Kapitel 5.2.17.4).

Es zeigte sich, dass Polyphenole, die einmal auf die basolaterale Seite absorbiert wurden, auch wieder auf die apikale Seite transportiert werden können. Dieses Problem tritt bei allen Modellen auf, bei denen eine Entnahme der Substanzen auf der basolateralen Seite - wie sie im Menschen durch den Abtransport mit dem Blut gegeben wäre - nicht stattfindet. Daraus kann man schlussfolgern, dass die tatsächliche Absorption in den Modellen auf die

basolaterale Seite höher sein könnte, als es die erzielten Ergebnisse zeigten. Eine Konsequenz hieraus wäre, die Durchführung der Versuche zu ändern, indem in regelmäßigen Abständen das Medium auf der basolateralen Seite durch frisches, polyphenolfreies Medium ersetzt würde. Dies würde aber die Analytik der Mediumüberstände erschweren, da es insgesamt zu einer starken Verdünnung der Polyphenole im Medium der basolateralen Seite kommen würde.

4.4.4.4 Untersuchungen mit Phloretin in Gegenwart eines pH-Gradienten

Weiterhin wurde die Abhängigkeit der PhI-Absorption von einem pH-Gradienten untersucht. Dazu wurde das Medium auf der apikalen Seite auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt, auf der basolateralen Seite wurde es bei 7,4 belassen. Untersuchungen zu einer pH-Gradient abhängigen Absorption von Polyphenolen wurden in verschiedenen Publikationen beschrieben [Kobayashi *et al.* 2008, Konishi und Kobayashi 2004b, Konishi *et al.* 2003, Konishi und Shimizu 2003, Poquet *et al.* 2008b].

Die in der vorliegenden Arbeit für PhI erzielten Ergebnisse stimmen mit den für andere Polyphenole beschriebenen überein. Auch hier wurde in Gegenwart des pH-Gradienten eine signifikant höhere Absorption auf die basolaterale Seite detektiert. Bei der Zugabe des PhIs auf der basolateralen Seite wurde im Gegensatz dazu eine signifikant geringere Absorption in Gegenwart des pH-Gradienten gemessen (siehe Abbildung 3-18 und Abbildung 3-19).

Für PhI liegen keine Literaturdaten vor, aber *p*-Coumarsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure und 5-CQA sowie das Citrusflavonoid Hesperetin und sein Glycosid Hesperidin wurden untersucht. Bei allen untersuchten Hydroxyzimtsäuren sowie dem Aglykon Hesperetin war die Absorption von der apikalen auf die basolaterale Seite in Gegenwart des pH-Gradienten höher als bei gleichem pH-Wert auf beiden Seiten. Beim Glycosid Hesperidin war die Absorption in beiden Fällen gleich hoch [Kobayashi *et al.* 2008, Konishi und Kobayashi 2004b, Konishi *et al.* 2003, Konishi und Shimizu 2003, Poquet *et al.* 2008b].

Bei Applikation der Polyphenole auf der basolateralen Seite wurden bei dem Citrusflavonoid Hesperetin eine geringere Absorption in Gegenwart des pH-Gradienten beobachtet [Kobayashi *et al.* 2008], bei den Hydroxyzimtsäuren dagegen war die Absorption bei Zugabe auf der basolateralen Seite unabhängig vom pH-Gradienten gleich [Konishi und Kobayashi 2004b, Konishi *et al.* 2003, Konishi und Shimizu 2003].

Die Tatsache, dass die Absorption von PhI bei einem niedrigeren pH-Wert auf der apikalen Seite als auf der basolateralen zu einer höheren Absorption auf die basolaterale Seite (bzw. eine niedrigere auf die apikale) führt, spricht dafür, dass es sich um eine transzelluläre Diffusion handelt. Die transzelluläre Diffusion ist eine nichtionische Diffusion, d.h. dissoziierbare Substanzen gelangen in der nichtionisierten Form durch die Membran. Je

niedriger der pH-Wert ist, desto mehr Moleküle der leicht sauren Polyphenole liegen in nichtionisierter Form vor. Es kann also vermehrt eine transzelluläre Diffusion stattfinden. Poquet *et al.* erklärten so die Absorption von Ferulasäure auf die basolaterale Seite von Caco-2-Monolayern, sie konnten aber auch nicht ausschließen, dass eine erleichterte Diffusion ebenfalls an der Absorption beteiligt ist [Poquet *et al.* 2008b].

4.4.4.5 Untersuchungen mit Phloretin in Gegenwart des Zellmetabolismushemmers Natriumazid

Um zu untersuchen, ob die Absorption einer Substanz mit Hilfe eines Energie abhängigen Transporters (beispielsweise ABC-Transporter) stattfindet, wurden Koinkubationen mit dem Metabolismushemmer Natriumazid in einer Konzentration von 10 mM von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt [Kobayashi *et al.* 2008, Konishi und Kobayashi 2004b, Poquet *et al.* 2008b]. Natriumazid hemmt den Zellmetabolismus über die Hemmung der mitochondrialen Atmungskette [Cheng *et al.* 2001]. Dadurch kann kein aktiver Transport mehr stattfinden. Die Ergebnisse der Inkubationen von Phl in T84-Monolayern zeigten, dass es keinen Unterschied in der Absorption zwischen den Inkubationen mit und ohne Natriumazid gab. Dies bedeutet, dass bei der Phl-Absorption kein aktiver Transport involviert ist. Für Phl gibt es bisher keine literaturbekannten Daten, aber Poquet *et al.* stellten für Ferulasäure im Gegensatz zu den eigenen Inkubationen mit Phloretin fest, dass ca. 15 bis 20% der Absorption Transporter vermittelt sind [Poquet *et al.* 2008b]. Für Kaffeesäure und Hesperetin wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Bei der Inkubation von 5-CQA dagegen hatte Natriumazid wie bei den eigenen Inkubationen von Phl keinen Effekt auf die transepitheliale Absorption [Kobayashi *et al.* 2008, Konishi und Kobayashi 2004b].

4.4.5 Zusammenfassung zur transepithelialen Absorption

Die Ergebnisse aus den Absorptionsstudien in den verschiedenen Modellen weisen darauf hin, dass die untersuchten Apfelpolyphenole und ihre intestinalen Metabolite durch eine passive, transzelluläre Diffusion auf die basolaterale Seite des Darmepithels gelangen könnten. Bei Phl könnte eine parazelluläre Diffusion mitinvolviert sein. Die Hinweise darauf wurden aus verschiedenen Versuchen gewonnen. Zunächst konnte bei der Inkubation mit C10-vorbehandelten Monolayern, bei denen die TJs aufgeweitet waren [Anderberg *et al.* 1993, Wallon *et al.* 2005], keine veränderte Absorption festgestellt werden (außer bei Phl). Dies zeigte, dass es sich nicht um eine parazelluläre Diffusion handelt, da diese durch die TJs reguliert wird. Inkubationen von Ferulasäure und Phl mit verschiedenen Konzentrationen zeigten für Ferulasäure eindeutig, dass es sich bei der Absorption um eine einfache Diffusion und nicht um eine erleichterte Diffusion handelt, da die Transportgeschwindigkeit mit der

inkubierten Konzentration linear zunahm. Bei PhI dagegen ergab die Auftragung der Transportgeschwindigkeit gegen die inkubierte Konzentration kein eindeutiges Ergebnis. Weitere Versuche mit dem Metabolismushemmer Natriumazid zeigten aber, dass kein aktiver Energie abhängiger Transport bei der Absorption des PhI involviert zu sein scheint. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass viele Flavonoidglykoside hydrophob genug sind, um durch Membranen zu diffundieren. Die untersuchten Flavonoidglykoside waren nicht basolateral nachweisbar. Dies deckt sich ebenfalls mit der Tatsache, dass Flavonoidglykoside im humanen Plasma nicht nachweisbar sind (zusammengefasst von [Williamson *et al.* 2005]). Die Hydrophobizität einer Substanz kann man über ihren Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (Log P) ausdrücken. Umso hydrophober eine Substanz, desto höher ist Log P. Die Log P-Werte der untersuchten Polyphenole wurden nicht in Versuchen ermittelt, sie lassen sich aber mit Hilfe des im Internet verfügbaren Programms „OSIRIS Property Explorer“ berechnen. Die berechneten Werte von über 5000 Substanzen stimmten sehr gut mit den in Versuchen ermittelten überein [Organic Chemistry Portal 2010]. Die errechneten Log P-Werte aller untersuchten Polyphenole sind im Anhang in Tabelle 9-10 zusammengefasst. PhI wies mit 2,45 von allen in dieser Arbeit untersuchten Polyphenolen den höchsten Log P-Wert auf. Bei PhI war auch die transepitheliale Absorption am höchsten. Bei anderen Polyphenolen dagegen scheinen noch andere Faktoren in die Absorption involviert zu sein, da beispielsweise Que und Epi fast den gleichen Log P (1,80 und 1,88) haben, Que aber im Gegensatz zu Epi zellassoziiert nachzuweisen war. Auch bei den Hydroxymitsäuren korreliert der errechnete Log P nicht mit den ermittelten Ergebnissen. Die dehydrierten Verbindungen haben einen höheren Log P als die korrespondierenden Säuren, wurden aber in keinem der untersuchten Modelle basolateral (außer Dihydroxymitsäure) nachgewiesen. Reynolds *et al.* zeigten in ihrer Studie, dass die durch passive Diffusion erfolgende humane intestinale Absorption außer vom Log P-Wert noch von anderen Parametern, darunter dem pKa-Wert und der Anzahl der Wasserstoffdonatoren (Hydroxyl- und Aminogruppen) abhängt [Reynolds *et al.* 2009].

Für einige Polyphenole gibt es in der Literatur bereits Hinweise auf den Mechanismus ihrer intestinalen Absorption. Die meisten Ergebnisse stammen aus der Gruppe um Konishi, die davon ausgeht, dass die Absorption der meisten Polyphenole über einen MCT stattfindet. Für *p*-Coumarsäure, Ferulasäure und Hesperetin zeigten sie, dass ein MCT für die Absorption verantwortlich ist, zeigten aber auch, dass es bei *p*-Coumarsäure nicht MCT1 sein kann [Kobayashi *et al.* 2008, Konishi *et al.* 2003, Konishi und Shimizu 2003, Watanabe *et al.* 2006]. Für Kaffeesäure zeigte die Gruppe, dass sowohl ein Transport über MCT als auch eine passive Diffusion an der transepithelialen Aufnahme beteiligt sind, 5-CQA dagegen gelangt nur über passive parazelluläre Diffusion auf die basolaterale Seite [Konishi und Kobayashi 2004b]. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse anderer Gruppen, die

sowohl für Ferulasäure als auch für Que eine passive transzelluläre Diffusion - bei Ferulasäure kombiniert mit einem erleichterte Transport über MCT - beschrieben haben [Poquet *et al.* 2008b, Walgren *et al.* 1998]. Tian *et al.* untersuchten 36 verschiedene Flavonoide und kamen zu dem Schluss, dass bei den meisten Flavonoiden passive Diffusion für die Aufnahme verantwortlich ist, es wurde nicht näher untersucht ob trans- oder parazelluläre Mechanismen eine Rolle spielten [Tian *et al.* 2009]. An der Aufnahme von Anthocyanen dagegen scheinen andere Mechanismen beteiligt zu sein, Faria *et al.* beschreiben, dass GLUT2 in ihre intestinale Absorption involviert ist [Faria *et al.* 2009]. In dieser Arbeit konnten Literaturdaten für Ferulasäure bestätigt werden und zum ersten Mal gezeigt werden, dass die transepitheliale Absorption von Phloretin auf Diffusionsprozessen beruht.

4.5 Metabolismus der Polyphenole in den untersuchten Modellen

Bei Inkubationen der Polyphenole mit T84-Monolayern wurden bei intestinalen Konzentrationen keine Metabolite in den Mediumüberständen detektiert. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.6 dargestellt. In den Zellsuspensionen wurden nach PhI- und Que-Zugabe Spuren von Glucuroniden mittels HPLC-MS/MS detektiert, bei der Inkubation von PhI-G wurde zellassoziert freies PhI nachgewiesen. Da in der Literatur (zusammengefasst in Kapitel 2.6.3) bereits ab Konzentrationen von 10 μM Metabolite, darunter Glucuronide und Sulfate bei der Inkubation von Kolonkarzinomzellen (meist Caco-2) detektiert wurden, wurde am Beispiel der Ferulasäure untersucht, ob die Zelllinie T84 in der Lage ist, diese Phase-II-Metabolite zu bilden. Dazu wurde Ferulasäure in Konzentrationen von 20 bis 1000 μM inkubiert, Metabolite wurden ab 100 μM mittels HPLC-MS/MS nachgewiesen. Identifiziert wurden Feruloylglucuronid, Feruloylsulfat und Dihydroferulasäure. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen [Kern *et al.* 2003, Poquet *et al.* 2008b]. Auf die Identität der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen unbekannt Metabolite gibt es in der Literatur keine Hinweise. Auch anhand der aufgenommenen HPLC-MS/MS-Produktionenspektren konnten keine Hinweise auf die Identität der Verbindungen gewonnen werden. Zur Strukturaufklärung dieser Verbindungen müssten größere Mengen isoliert werden, die anschließend weiter untersucht werden könnten.

Die Untersuchung der Mediumüberstände und Zellsuspensionen nach Inkubationen mit Ferulasäure zeigte außerdem, dass Feruloylglucuronid, Feruloylsulfat und die beiden nicht-identifizierten Metabolite mit einem m/z von 341,3 in allen drei Kompartimenten (apikal, zellassoziert und basolateral) nachweisbar waren. Dihydroferulasäure dagegen wurde nur auf der basolateralen Seite nachgewiesen, ein Metabolit mit m/z 307,2 wurde nur zellassoziert erfasst. Poquet *et al.* wiesen dagegen Feruloylglucuronid und Dihydro-

ferulasäure sowohl auf der apikalen und als auch auf der basolateralen Seite nach [Poquet *et al.* 2008b].

Die beobachtete Freisetzung von PhI aus PhI-G wurde in der Literatur für Que aus Que-Glucosiden bei der Inkubation mit Rattendünndarmmukosa beschrieben [Day *et al.* 2003, Wolfram *et al.* 2002]. Bei der Inkubation des Que-R kam es in den T84-Monolayern dagegen nicht zu einer Freisetzung des Aglykons. *In vitro* wurde die Bildung von Que-Glucuroniden bei der Inkubation von Caco-2-Zellen bereits gezeigt [Ikeno *et al.* 1999]. In menschlichem Urin wurden ebenfalls Que-Glucuronide nachgewiesen [Hong und Mitchell 2004].

Die Bildung von PhI-Glucuroniden wurde in Zellkulturstudien bisher noch nicht beschrieben, Mizuma und Awazu fanden Hinweise auf die Bildung eines PhI-Glucuronids bei Inkubation von PhI in ESs aus Rattendarm [Mizuma und Awazu 1998]. Die *in vivo*-Bildung von PhI-Glucuroniden nach Apfelsaft- und Apfelsiderverzehr wurde beschrieben [Kahle *et al.* 2007, Marks *et al.* 2009].

In vitro wurde von Moon *et al.* gezeigt, dass eine Vielzahl von Flavonoiden in der Lage ist, verschiedene Enzyme des Phase-I- und Phase-II-Metabolismus zu beeinflussen. Es kommt zu Aktivierungen dieser Enzyme, teilweise wurde aber auch ihre Inhibierung beschrieben. Für Que beispielsweise wurde aber auch beschrieben, dass es die UDP-Glucuronyltransferase 1A1 (UGT1A1) aktiviert und gleichzeitig selbst ein Substrat der UGT1A1 ist (zusammengefasst von [Moon *et al.* 2006]).

Die Inkubationen von Schweinedarmmukosa mit Kaffee- und *p*-Coumarsäuremethylester ergab im Gegensatz zu den T84-Inkubationen eine Freisetzung der korrespondierenden Säuren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Ergebnissen von Kern *et al.*, die bei der Inkubation verschiedener Hydroxyzimtsäuremethylester mit Caco-2-Monolayern ebenfalls die freien Säuren nachwiesen [Kern *et al.* 2003]. Esterasen, die Hydroxyzimtsäuren freisetzen, wurden sowohl in den Mukosazellen als auch im Lumen des Dün- und Dickdarms von Ratten und Menschen detektiert. Diese sind in der Lage, Säuren aus Weizen und Roggenkleie freizusetzen. Gegenüber 5-CQA wurde diese Aktivität im Dünndarm jedoch nicht entdeckt, sondern nur in Extrakten aus humanem Faeces. Diese Ergebnisse wurden bei Versuchen mit Ratten bestätigt. Die mukosalen Esterasen waren in der Lage Methylester der Kaffeesäure zu spalten, Ester der D-(-)-Chinasäure dagegen nicht [Andreasen *et al.* 2001]. Die Ergebnisse der Inkubationen der Methylester und D-(-)-Chinasäureester mit *p*-Coumar- und Kaffeesäure - die Methylester wurde gespalten, die D-(-)-Chinasäureester nicht - stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen überein.

Versuche von Kern *et al.* mit Medium, das zuvor mit Caco-2-Zellen inkubiert wurde, aber bei der Inkubation mit den Hydroxyzimtsäureestern frei von Zellen war, deuten darauf hin, dass

zumindest ein Teil der Esterasen ins Medium abgegeben wird, es sich also um lösliche Enzyme handelt [Kern *et al.* 2003].

Da bei den inkubierten Polyphenolen (außer für Kaffee- und *p*-Coumarsäuremethylester) in intestinalen Konzentrationen keine Metabolite detektiert wurden, wurden zusätzlich Inkubationen von Schweinedarmmukosa mit Ferulasäure in Konzentrationen bis zu 1000 µM analog der T84-Inkubationen durchgeführt. Hier waren ebenfalls ab 100 µM Metabolite detektierbar. Es waren aber nur Feruloylglucuronid, Feruloylsulfat und Dihydroferulasäure in den Mediumüberständen nachweisbar. Die mit den T84-Monolayern gebildeten bisher nicht identifizierten Metabolite wurden in der Schweinedarmmukosa nicht detektiert. Alle drei gebildeten Metabolite wurden sowohl apikal als auch basolateral nachgewiesen. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Mukosastücke des Schweins stammten aus dem terminalen Ileum, etwa 10 cm vom Zökopol entfernt. Die Ergebnisse der Inkubation mit Ferulasäure zeigten, dass die Mukosa dieses Darmabschnitts in der Lage ist, die Phase-II-Metaboliten Feruloylglucuronid und -sulfat zu bilden. Dies wird durch die Ergebnisse von Espin *et al.* bestätigt, die im Lumen des Dünndarms keine Glucuronide nach dem Verzehr polyphenolhaltiger Nahrung fanden, dafür aber im Gewebe des Dünndarms [Espin *et al.* 2007]. Das Vorhandensein der Metabolite in den Überständen der Ussing-Kammer auf der apikalen und basolateralen Seite kann darauf zurückgeführt werden, dass in diesem Modell kein Abtransport der Metabolite durch das Blut auf der basolateralen Seite möglich ist und es folglich zu einer Rückresorption auf die apikale Seite kommen kann. Dadurch kommt es zu einer Gleichgewichtseinstellung.

Obwohl der Hauptort des Phase-II-Metabolismus in der Leber lokalisiert ist, wurden im humanen Jejunum, Ileum und Kolon UGT1A8 und UGT1A10 detektiert, die in Leber und Niere nicht nachzuweisen sind [Cheng *et al.* 1999, Strassburg *et al.* 1999]. Bei Inkubationen verschiedener Flavonoide mit stabil exprimierter UGT1A8 und UGT1A10 wurden von Cheng *et al.* Glucuronide nachgewiesen, wobei die Glucuronidierungsrate bei UGT1A8 deutlich höher war als bei UGT1A10 [Cheng *et al.* 1999]. UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6 und UGT1A9 kommen sowohl in der Leber als auch im Darm vor [Strassburg *et al.* 1999].

Im humanen Dünndarm wurde die Bildung von Glucuroniden und Sulfaten von Polyphenolen auch *in vivo* beschrieben. Stalmach *et al.* detektierten verschiedene Glucuronide und Sulfate von Flavan-3-olen in Ileostomabeuteln nach dem Verzehr von grünem Tee [Stalmach *et al.* 2009]. Nach dem Konsum von Apfelsaft wurden in der Flüssigkeit der Ileostomabeutel Glucuronide und Sulfate des Dihydrochalkons PhI (sowie Mischungen aus den beiden) identifiziert [Marks *et al.* 2009], Kahle *et al.* wiesen ebenfalls ein PhI-Glucuronid nach dem Verzehr von naturtrübem Apfelsaft nach [Kahle *et al.* 2007]. Bisher gelang es lediglich Kahle *et al.* die Position der Glucuronidierung mittels NMR zu bestimmen: sie identifizierten Phloretin-2'-O-glucuronid [Kahle *et al.* 2007].

Lewinsky *et al.* untersuchten die Aktivität von Mikrosomen – die stabil exprimierte UGT1A10 enthielten – *in vitro* gegenüber 42 Bioflavonoiden und vermuteten anhand ihrer erhaltenen Ergebnisse, dass der B-Ring der Flavonoide mit UGT1A10 hydrophobe Interaktionen eingeht und es zu π - π -Wechselwirkungen kommt. Die Ketogruppe des C-Rings bildete mit dem Enzym Wasserstoffbrückenbindungen aus und am A-Ring kam es zu den Glucuronidierungen [Lewinsky *et al.* 2005]. Schematisch sind diese Annahmen in Abbildung 4-11 zusammengefasst.

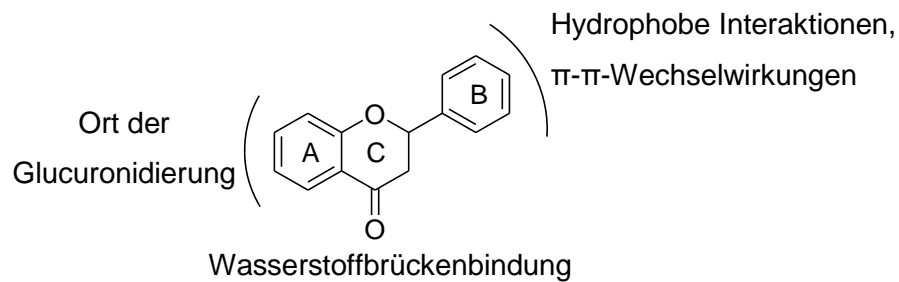


Abbildung 4-11: Schematische Darstellung der möglichen Interaktionen zwischen Flavonoiden und der aktiven Stelle von UGT1A10 (nach [Lewinsky *et al.* 2005]).

Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Glucuroniden von Phl und Que, die in den T84-Inkubationen in Spuren nachweisbar waren, um Glucuronide des A-Rings handelt, bei Ferulasäure besteht die Möglichkeit zur Bildung eines Glucuronids nur an der 4-Position.

Im Gegensatz dazu zeigten van der Woude *et al.*, dass bei der Inkubation von Que mit humanen S9-Dünndarmhomogenaten und der Kolonkarzinomzelllinie HT29 die Glucuronidierung sowohl am A-Ring als auch am B-Ring stattfinden kann. Es wurde aber nicht beschrieben, welche UGTs an den Glucuronidierungen beteiligt waren [van der Woude *et al.* 2004].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl im T84-Modell als auch bei den Schweinedarmmukosainkubationen bei den in intestinalen Konzentrationen inkubierten Polyphenolen (außer Spuren von Glucuroniden bei Phl und Que und bei den Methylestern mit Schweinedarmmukosa) keine Bildung von Metaboliten beobachtet wurde. Inkubationen mit höheren Ferulasäurekonzentrationen zeigten exemplarisch, dass diese ab Inkubationskonzentrationen von 100 μ M detektierbar sind. Die gewählten Testsysteme sind damit in der Lage, Metabolite (Glucuronid, Sulfat, Dihydroferulasäure) zu bilden. Bei den eingesetzten intestinalen Konzentrationen (unter 100 μ M) kam es eventuell nicht zu einer Metabolisierung oder es ist zu vermuten, dass die Konzentrationen der gebildeten Metabolite unter den Nachweisgrenzen lagen. In den Mediumüberständen der humanen Biopsien wurden keine Metabolite detektiert. Hier wurden nur Konzentrationen unter 100 μ M verwendet, außerdem

war hier die Oberfläche der eingesetzten Mukosa wesentlich kleiner als bei den Schweinedarminkubationen (0,031 cm² bei den humanen Biopsien, 0,71 cm² bei der Schweinedarmmukosa), d.h. sie enthielt weniger Zellen, die die benötigten Enzyme zur Metabolisierung bereitstellen. Die Gewinnung größerer Biopsiestücke ist im Rahmen der Routineuntersuchungen, bei denen die Biopsien entnommen werden, nicht möglich. Weiterführend sollten auch hier Inkubationen mit höheren Konzentrationen durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob in diesem Modell Metabolite gebildet werden.

4.6 Einfluss von Polyphenolen auf die intestinale Barriere

Die intestinale Barriere stellt einen Filter mit einer selektiven Permeabilität dar. Sie erlaubt unter anderem Nährstoffen die Passage auf die basolaterale Seite. Schädliche Substanzen wie z. B. Mikroorganismen, luminalen Antigenen und pro-inflammatorischen Faktoren dagegen werden an der Passage gehindert [Farhadi *et al.* 2003]. Wie in 2.7.3 beschrieben, korrelieren Defekte der intestinalen Barriere mit CED [Laukoetter *et al.* 2008]. Der Status der intestinalen Barriere, d.h. die Größe der parazellulären Zwischenräume kann *in vitro* über die Messung des TERs bestimmt werden. Da die intestinale Barriere durch die TJs gebildet wird, wurde zusätzlich zur Messung des TERs die Expression des TJ-Proteins Occludin mittels Immunfluoreszenzmikroskopie im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Alle untersuchten Polyphenole - bis auf die intestinalen Abbauprodukte 3,4-Dihydroxytoluol und D-(-)-Chinasäure – erhöhten bei einer vierstündigen Inkubation den TER der T84-Monolayer im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen (DMSO) (siehe Tabelle 3-13). Diese Ergebnisse stehen mit denen anderer Gruppen im Einklang. So erhöhten Que [Amasheh *et al.* 2008, Suzuki und Hara 2009], Apfeltresterextrakte [McCann *et al.* 2007], Que-Glycoside [Ohno *et al.* 2006] und eine Mischung aus Procyanidinen [Erlejman *et al.* 2006] den TER der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 ebenfalls signifikant. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Coates *et al.* Sie zeigten, dass Himbeerextrakte, die Anthocyane, Ellagtannine und Hydroxyzimtsäurederivate enthalten, keinen signifikanten Effekt auf den TER der Caco-2-Monolayer hatten [Coates *et al.* 2007]. Über den Einfluss des Dihydrochalkons PhI und seiner Derivate auf den TER von Zellmonolayern gab es bisher in der Literatur bisher keine Hinweise.

Um Schäden und Reparatur der intestinalen Barriere zu untersuchen wurden zahlreiche schädliche Substanzen eingesetzt. Es zeigte sich, dass die Barriere sich von Schäden erholen kann [Scheppach *et al.* 1996]. Eine dieser Substanzen ist C10, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit als TER-reduzierende Substanz eingesetzt wurde. Die Wirkung beruht

darauf, dass C10 die TJs durch eine verminderte ATP-Bildung beeinflusst, was zu einer Kontraktion der perijunktionalen Actomyosinringe führte [Wallon *et al.* 2005]. In Caco-2-Zellen wurde beobachtet, dass 10 mM C10 zur Dilatation der TJs führte [Anderberg *et al.* 1993]. Die Cytokine TNF α und IFN γ , die in Patienten mit CED gebildet werden, verändern die TJs ebenfalls über eine Actomyosinkontraktion [Prasad *et al.* 2005]. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde eine Vorbehandlung der T84-Monolayer mit C10 als *in vitro*-Modell für CED gewählt.

Die T84-Monolayer wurden so lange (ca. 5 Minuten) mit C10 (10 mM) inkubiert, bis der TER auf etwa 50% des Anfangswertes gesunken war. Anschließend wurde mit frischem Medium ausgewaschen, bis das C10 weitgehend entfernt war. Der TER der Kontrolle stieg innerhalb der vierstündigen Inkubation leicht auf $53,1 \pm 9,4\%$ an (Ergebnisse siehe Tabelle 3-14). Bei den meisten inkubierten Polyphenolen war nach vier Stunden ein signifikant höherer TER (bis zu 137%) messbar. Ausnahmen bildeten die Verbindungen Dihydrozimtsäure, *p*-Coumarsäure, Kaffeesäuremethylester, Epi, 3,4-Dihydroxytoluol und 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure (siehe Tabelle 3-14). Bisher sind keine *in vitro*-Zellkulturstudien mit durch Chemikalien gesenktem TER bekannt, bei der durch Inkubation mit Polyphenolen ein Anstieg des TERs erreicht wurde. Scheppach *et al.* inkubierten Rattendarmmukosa nach einer Säure induzierten Schädigung und fanden, dass L-Glutamin zu einer Erhöhung des TERs führte, n-Butyrat dagegen hatte keinen Effekt im Vergleich zu den Kontrollen [Scheppach *et al.* 1996].

Vom Kooperationspartner AG Melcher/Scheppach wurden parallel zu den Messungen des TERs die mRNA-Level der TJ assoziierten Proteine ZO-1, Occludin und Claudin-4 ermittelt (Daten nicht in dieser Arbeit gezeigt, [Rogoll *et al.* 2010]). Es zeigte sich, dass die untersuchten Polyphenole einen Einfluss auf alle drei untersuchten Gene hatten. In den verwendeten intestinalen Konzentrationen (analog zu den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten) wurde ein bis zu 5,7-facher Anstieg der mRNA-Expression beobachtet. Um die Ergebnisse auf Proteinebene abzusichern, wurden T84-Monolayer mit vier ausgewählten Polyphenolen (5-CQA, Ferulasäure, PhI und PhI-G) inkubiert und das TJ-Protein Occludin anschließend nach Immunfluoreszenzfärbung mikroskopiert.

Entsprechend der Inkubationen in der Ussing-Kammer wurden die T84-Monolayer zunächst mit C10 behandelt. Die Dislokalisierung des Occludins konnte gut gezeigt werden. Weiler *et al.* zeigten ebenfalls mittels Immunfluoreszenzmikroskopie die Dislokalisierung des TJ-Proteins Occludin durch Behandlung mit einer Chemikalie (12-O-Tetradodecanoyl-phorbol-13-acetat). Die Dislokalisierung ging hier mit einer Erniedrigung des TERs einher [Weiler *et al.* 2005].

Bei den eigenen vorgestellten Studien erfolgte eine vierstündige Inkubation mit den Polyphenolen. Hier waren die Effekte einer verminderten Dislokalisierung im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle nicht signifikant.

In einem weiteren Versuchsaufbau wurden die T84-Monolayer zuerst für eine Stunde mit den Polyphenolen vorinkubiert, anschließend erfolgte die Zugabe der C10. Dieser Aufbau sollte als Modell für eine präventive Wirkung der Polyphenole im menschlichen Darm dienen. Es wurde gezeigt, dass bei der Kontrolle eine stärkere Dislokalisierung des Occludins vorlag, wogegen das Occludin der zuvor mit Polyphenolen behandelten Monolayer nicht so stark dislokalisiert wurde. Die Effekte waren bei Ferulasäure und 5-CQA stärker als bei PhI und PhI-G, diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit den ermittelten TER-Daten nach Inkubation der Polyphenole mit T84-Monolayern in der Ussing-Kammer (siehe Tabelle 3-14). Bei den beiden Hydroxyzimtsäuren lag der TER nach der vierstündigen Inkubation bei etwa 90%, nach Inkubation mit den Dihydrochalkonen dagegen nur bei etwa 80%. Es ist aber zu berücksichtigen, dass jeweils Standardabweichungen von etwa 10% zu messen waren.

Über den Wirkmechanismus der Polyphenole und ihrer intestinalen Abbauprodukte auf die TJs und damit auf die intestinale Barriere lässt sich bisher nur spekulieren. Bekannt ist, dass die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK, engl. Myosin Light Chain Kinase) einen Einfluss auf die Regulation der TJ-Barrierefunktion sowohl im Zellmodell als auch in isolierter Nagermukosa hat. Außerdem korrelierten die MLCK-Expression und Myosin-leichte-Ketten-Phosphorylierung (MLC-Phosphorylierung, engl. Myosin Light Chain) mit dem Ausmaß der aktiven Entzündung [Blair *et al.* 2006, Turner 2006, Turner *et al.* 1999, Turner *et al.* 1997]. Für Myricetin und Strukturanaloga wurde die Inhibition der MLCK beschrieben [Hagiwara *et al.* 1988]. In Ratten wurde nach dem Verzehr von schwarzem und grünem Tee, welcher Flavanole und Catechine enthält, weniger phosphorylierte MLC detektiert als in der Kontrollgruppe (Wasser) [Negishi *et al.* 2004]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Polyphenole über eine Inhibition der MLCK den TER der Monolayer steigern könnten. Die Wirkung der Apfelpolyphenole auf die MLCK und ob dabei ein Zusammenhang zum Anstieg des TERs besteht, sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Die Ergebnisse zeigen, dass Apfelpolyphenole, ihre intestinalen Metabolite und ihre Strukturanaloga zu einer Verbesserung der Funktion der intestinalen Barriere von T84-Monolayern beitragen können. Betrachtet man den Zusammenhang zwischen der intestinalen Barriere und CED, führen die vorgestellten Ergebnisse zu dem Schluss, dass der Konsum von Äpfeln und Apfelprodukten sowie anderer polyphenolhaltigen Nahrungsmitteln positive Effekte auf die intestinale Barriere hat, und bei gesunden Menschen vor CED schützen könnte. Dass Nahrungsmittelbestandteile bzw. ihre intestinalen Metabolite durch

die Reduzierung der parazellulären Permeabilität und damit Verbesserung der intestinalen Barriere eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der epithelialen Barrierefunktion bei gesunden und kranken Menschen spielen können, wurde bereits 1997 postuliert [Mariadason *et al.* 1997]. Um Beweise für einen Schutz vor CED oder gar eines therapeutischen Effekts bei Patienten mit CED zu erhalten, müssten langfristig auf Grundlage der bereits erzielten *in vitro*-Ergebnisse *in vivo*- und Humanstudien durchgeführt werden.

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Verzeichnis der verwendeten Chemikalien

$^{18}\text{O}_2$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aceton	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Acetonitril (HPLC grade)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ameisensäure	Chemsolute, Renningen
Ammoniak	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammonium Eisen (II)sulfat-hexahydrat	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Caprinsäure (C10)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Carbogengas	AirLiquide, Düsseldorf
CDCl_3	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chinasäure D-(-)-	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chinasäure U- ^{13}C -D-(-)-	Isolife, Wageningen, Niederlande
Dichlormethan	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Diethylether	Sigma-Aldrich, Steinheim
Digitonin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethoxypropan 2,2-	Sigma-Aldrich, Steinheim
4-(Dimethylamino)pyridin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylformamid N,N-	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
HBSS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hexan	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kieselgel 60 (0,063 – 0,2 mm)	MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA
Laccase-behandelter Apfelsaftextrakt	Forschungsanstalt Geisenheim
Lithiumhydroxid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol (HPLC grade)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Methanol [d_4]	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumbicarbonat	Merck, Darmstadt

Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumethanolat 21%	selbst hergestellt aus Natrium und Ethanol (Merck, Darmstadt)
Natriumhydrogenphosphat di-	Merck, Darmstadt
Natriumsulfat	Merck, Darmstadt
Oxalychlorid	Merck, Darmstadt
Perchlorsäure 70%	Fluka, Steinheim
ProLong Antifade Reagenz	Invitrogen, Darmstadt
Pyridin	Merck, Darmstadt
Salzsäure (37%)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Seesand	Merck, Darmstadt
Sorbitol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetrahydrofuran	Sigma-Aldrich, Steinheim
Toluol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
<i>p</i> -Toluolsulfonsäure	Merck, Darmstadt
TriFast™	Peqlab, Erlangen
Triton X-100	Roche, Mannheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid 37%	VWR, Darmstadt
Xylenol-Orange <i>tetra</i> -	Sigma-Aldrich, Steinheim

Wasser wurde aus der hauseigenen Entionisierungsanlage entnommen, bidest. Wasser wurde zusätzlich bidestilliert.

5.1.2 Lösungen für die Zellkultur

Medium für T84-Zellen	217,5 mL DMEM (mit Glucose 4500 mg/L, Sigma-Aldrich, Steinheim)
	217,5 mL Ham's F-12 (Sigma-Aldrich, Steinheim)
	50 mL fötales Kälberserum (FKS, Invitrogen, Darmstadt)
	5 mL Penicillin/Streptomycin (5000 units/mL bzw. 5000 µg/mL, Invitrogen, Darmstadt)
	5 mL L-Glutamin (200 mM, Invitrogen, Darmstadt)
HBSS	mit Glucose, Sigma-Aldrich, Steinheim
0,05% Trypsin-EDTA	Invitrogen, Darmstadt

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung; Stammlösung 10x)	90 g Natriumchlorid, 7,26 g di-Natriumhydrogenphosphat, 2,1 g Kaliumdihydrogenphosphat mit bidest. Wasser auf 1 L auffüllen, pH 7,2 bis 7,4; vor Gebrauch 1/10 verdünnen und steril autoklavieren
---	---

5.1.3 Verwendete Polyphenole

Catechin (+)	Roth, Karlsruhe
Coumarsäure <i>p</i> -	Fluka, Steinheim
Coumaroylchinasäure 4- <i>p</i> -	eigene Isolierung
Coumaroylchinasäure 5- <i>p</i> -	eigene Isolierung
Coumarsäuremethylester <i>p</i> -	Prof. Dr. P. Schreier, Universität Würzburg
Dihydroferulasäure	ABCR, Karlsruhe
Dihydrokaffeesäure	Fluka, Steinheim
Dihydroxybenzoesäure 3,4-	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dihydroxyphenyllessigsäure 3,4-	Fluka, Steinheim
Dihydroxytoluol 3,4-	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dihydrozimtsäure	Acros Organics, Geel, Belgien
Epicatechin (-)-	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ferulasäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hydroxyphenyl)propionsäure 3-(4-	Fluka, Steinheim
Isoferulasäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaffeesäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaffeesäuremethylester	Prof. Dr. P. Schreier, Universität Würzburg
Kaffeoylchinasäure 1-	eigene Synthese und Isolierung
Kaffeoylchinasäure 3-	eigene Synthese und Isolierung
Kaffeoylchinasäure 4-	eigene Synthese und Isolierung
Kaffeoylchinasäure 5-	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phloretin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phloretin-2'- <i>O</i> -glucosid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phloretin-2'- <i>O</i> -xyloglucosid	eigene Isolierung
Phloroglucin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Quercetin	Merck, Darmstadt
Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnosid	Roth, Karlsruhe
Trimethoxyzimtsäure 3,4,5-	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zimtsäure	Fluka, Steinheim

5.1.4 Verzeichnis der verwendeten Einmalartikel

6-Well-Platten	Greiner Bio-one, Frickenhausen
96-Well-Platten	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Dünnschichtchromatographieplatten	ALUGRAM SIL G/UV, 0,2 mm Kieselgel 60 mit Fluoreszenz-Indikator UV ₂₅₄ , Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Einmalspritzen	1 mL, Terumo, Somerset, New Jersey, USA
Falcons 15 und 50 mL	Greiner Bio-one, Frickenhausen
HPLC-Vials	Buddeberg, Mannheim
Inserts für Vials	Wagner & Munz, München
Kryoröhrchen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Membranfilter	PVDF, 13 mm, 0,45 µm, Pall Corporation, Port Washington, Michigan, USA
Nanosep 3K omega	Pall, Port Washington, Michigan, USA
Petrischalen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Snapwell-Inserts	12 mm, 0,4 µm, Corning Inc., Corning, New York, USA
Transwell-Inserts	24 mm, 1 µm, Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturflaschen (25, 75 und 125 cm ²)	Greiner Bio-one, Frickenhausen

5.1.5 Verzeichnis der verwendeten Geräte

Biofreezer (-86 °C)	Sanyo, München
Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Feinwaage	CP64-0CE, Sartorius, Göttingen
Gefriertrocknung	Christ, Osterode am Harz
Konfokales Lasermikroskop	Leica TCS SP2, Wetzlar
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Zeiss, Oberkochen
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
NMR AMX-400	Bruker, Rheinstetten
Ölpumpe und Vakuumcontroller	RD8 und VAP5, Vacuubrand GmbH & CoKG, Wertheim
pH-Meter	Hanna Instruments, Ann Arbor, Michigan, USA
Pipetten	Research, Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipettus, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

Platten-Photometer	Sirius HT Injector, MWG, Ebersberg
Rotivapor und Vacuumcontoler	R110 und B161, Büchi Labortechnik GmbH, Essen
Thermomixer	5436, Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad	Sonorex, Bandelin, Berlin
Ussing-Kammer (Kaiserslautern)	K. Mußler, Aachen; Software Clamp 2.14, 2001
Ussing-Kammer (Würzburg)	P2302 Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
UV-Lampe	CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG & Co. GmbH, Berlin
Voltohmometer	EVOM, World Precision Instruments Inc., Aston, Großbritannien
Vortex	Genius 3, IKA, Staufen
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifuge groß	5804R, Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge klein	5417R, Eppendorf, Hamburg

5.1.6 Verwendete HPLC-Geräte

HPLC-System 1: HPLC-DAD (Agilent 1200 HPLC System)

Entgaser	G1379B (Agilent, Waldbronn)
Binäre HPLC-Pumpe	G1312A (Agilent, Waldbronn)
Thermostatisierter Autosampler	G1329A in Kombination mit G1320B (Agilent, Waldbronn)
Säulenofen	G1316A (Agilent, Waldbronn)
Diodenarraydetektor	G1315D (Agilent, Waldbronn)
Software	ChemStation Revision B.02.01 SR2 (Agilent, Waldbronn)
Eluent A	0,1% Ameisensäure in Wasser bidest.
Eluent B	Acetonitril (Gradient 1a) bzw. Methanol (Gradient 1b)
Gradient 1a	linear 1% B auf 50% B in 40 min
Gradient 1b	linear 10% B auf 60% B in 40 min
Fluss	1 mL/min
Temperatur Autosampler	4 °C
Injektionsvolumen	10 µL
Säule	Zorbax C18 4,5 x 150 mm, 5 µm Partikelgröße (Agilent, Waldbronn)
Temperatur Säule	30 °C

Detektion 254, 280, 320 bzw. 360 nm

Zu Beginn der HPLC-Messungen dieser Arbeit wurde als Eluent B Acetonitril mit dem Gradienten 1a verwendet. Aufgrund einer Knappheit und der extremen Preissteigerung von Acetonitril im Herbst 2008 wurde alternativ Methanol mit dem Gradienten 1b verwendet. Die chromatographischen Trennleistungen bezugnehmend auf die hier untersuchten Polyphenole waren vergleichbar.

HPLC-System 2: HPLC-MS/MS

Entgaser	DG-2080-53 3-Line-Degasser (Jasco, Groß-Umstadt)
Steuerung	LC-Net II/ADC (Jasco, Groß-Umstadt)
Binäre HPLC-Pumpe	PU-2080 Plus Intelligent HPLC Pump (Jasco, Groß-Umstadt)
Thermostatisierter Autosampler	AS-2057 Plus Intelligent Sampler (Jasco, Groß-Umstadt), 4 °C
Massenspektrometer	API 3200 Triple Quadrupole LC-MS/MS Mass Spectrometer mit Valcovalve (Applied Biosystems, Darmstadt)
Software	Analyst 1.4.2 (Jasco, Groß-Umstadt)
Bedingungen 2a	
Eluent	0,1% Ameisensäure in Wasser bidest. – Acetonitril 1/99 (v/v)
Fluss	0,5 mL/min
Injektionsvolumen	20 µL
Säule	Atlantis RP 18 4,6 x 150 mm, 3 µm (Waters, Eschborn)
Ionisierung	Electrospray Ionisation (ESI), -4,5 kV
Betriebsmodus	MRM (multiple reaction monitoring)
MRM-Transition D-(-)- Chinasäure	191 → 85
MRM-Transition U- ¹³ C-D-(-)- Chinasäure	198 → 89
Curtain Gas	Stickstoff, 25 psi bei 450 °C
Gas 1	60 psi
Gas2	50 psi
Declustering Potential	-55 V
Entrance Potential	-10,5 V

Cell Entrance Potential	-28 V
Kollisionsgas	Stickstoff, 6 Units
Kollisionsenergie	-30 V
Cell Exit Potential	0 V
Electron Multiplier Voltage	2,2 kV
Dwell Time	150 ms
Bedingungen 2b	
Eluent A	0,1% Ameisensäure in Wasser bidest.
Eluent B	Acetonitril
Gradient	1% B auf 40% B in 40 min, linear
Fluss	1 mL/min
Injektionsvolumen	20 µL
Säule	Zorbax C18 4,5 x 150 mm, 5 µm Partikelgröße (Agilent, Waldbronn)
Ionisierung	Electrospray-Ionisation (ESI), -4,5 kV
Betriebsmodus	Full scan (120 – 900 amu)
Curtain Gas	Stickstoff, 25 psi bei 450 °C
Gas 1	50 psi
Gas2	40 psi
Declustering Potential	-40 V
Entrance Potential	-4,5 V
Electron Multiplier Voltage	2,2 kV
Scandauer	1 s
Dwell Time	2 ms
Bedingungen 2c	
Eluent A	0,1% Ameisensäure in Wasser bidest.
Eluent B	Acetonitril
Gradient	1% B auf 40% B in 40 min, linear
Fluss	1 mL/min
Injektionsvolumen	20 µL
Säule	Zorbax C18 4,5 x 150 mm, 5 µm Partikelgröße (Agilent, Waldbronn)
Ionisierung	ESI, -4,5 kV
Betriebsmodus	Product ion
Curtain Gas	Stickstoff, 25 psi bei 450 °C
Gas 1	50 psi
Gas2	40 psi

Declustering Potential	-40 V
Entrance Potential	-4,5 V
Kollisionsgas	Stickstoff, 6 Units
Kollisionsenergie	-20 V
Electron Multiplier Voltage	2,2 kV
Scandauer	1 s
Dwell Time	2 ms
Bedingungen 2d	
Eluent	0,1% Ameisensäure in Wasser bidest. – Methanol 70/30 (v/v)
Fluss	0,3 mL/min
Injektionsvolumen	60 µL
Säule	Hypersil Gold 2,1 x 100 mm, 3 µm (Thermo Scientific, Dreieich)
Ionisierung	ESI, -4,5 kV
Betriebsmodus	MRM (multiple reaction monitoring)
MRM-Transition	siehe Tabelle 5-2
Curtain Gas	Stickstoff, 15 psi bei 450 °C
Gas 1	50 psi
Gas2	35 psi
Kollisionsgas	Stickstoff, 6 Units
Electron Multiplier Voltage	2,2 kV
Dwell Time	150 ms

HPLC-System 3 (Semipräparative HPLC)

Pumpe	Merck Hitachi L-6210 Intelligent Pump
Detektor	Knauer Variable Wavelength-Monitor 190/400
Schreiber	Servogor S
Eluent A	0,1% Ameisensäure in Wasser bidest.
Eluent B	Methanol
Gradient 3a	linear 1% B auf 60% B in 34 min
Gradient 3b	linear 15% B auf 60% B in 60 min
Fluss 3a	2,2 mL/min
Fluss 3c	2,0 mL/min
Injektionsvolumen	100 µL
Säule	Waters Atlantis Prep T3 (C18), 10 x 250 mm, 5 µm Partikelgröße

Detektion 320 bzw. 280 nm

HPLC-System 4

Degasser	Helium-Online-Entgasung
Binäre HPLC-Pumpe, Säulenofen und Diodenarraydetektor	Photodiodenarray Hewlett Packard 1090 Serie
Software	HP ChemStation for LC
Eluent A	0,1% Ameisensäure in Wasser bidest.
Eluent B	Acetonitril
Gradient	isokratisch 8% B
Fluss	1 mL/min
Temperatur Autosampler	4 °C
Injektionsvolumen	20 µL
Säule	Waters Symmetry C18, 4,6 x 250 mm, 5 µm
Temperatur Säule	40 °C
Detektion	254, 280, 320 bzw. 360 nm

5.2 Methoden

5.2.1 *Synthese und Isolierungen einzelner Polyphenole*

5.2.1.1 *Synthese von 1-Kaffeoylchinasäure*

5.2.1.1.1 *Darstellung von 3,4-O-Isopropyliden-1,5-chinalacton*

Für die Darstellung von 3,4-O-Isopropyliden-1,5-chinalacton wurden gemäß Rohloff *et al.* [Rohloff *et al.* 1998] 10,0 g (52 mmol) D-(-)-Chinasäure, 0,1 g (0,5 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure, 22,6 mL (183 mmol) 2,2-Dimethoxypropan und 50,6 mL Aceton in einem 250 mL Zweihalskolben unter Rückfluss und Schutzatmosphäre bei ca. 85 °C drei Stunden gekocht. Nach dem Abkühlen auf 50 °C wurde mit 0,4 mL (4,6 mmol) Natriumethanolat neutralisiert. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotavapor bei 75 mmHg und 40 °C zu einem blassgelben festen Rückstand aufkonzentriert und in 120 mL Ethylacetat / Wasser (3/1, v/v) (EtOAc) aufgenommen. Nach Abtrennung der organischen Phase im Scheidetrichter wurde die wässrige Phase mit 10 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 5% Natriumbicarbonatlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach der Filtration wurde die Lösung am Rotavapor bei 75 mmHg und 55-60 °C bis zur Trockne eingeeengt.

Neben dem Hauptprodukt 3,4-O-Isopropyliden-1,5-chinalacton wurde Ethyl-3,4-isopropyliden-1,5-chinasäureester als Nebenprodukt erhalten. 5 mg des Hauptprodukts wurden in 600 μL CDCl_3 aufgenommen und für die Aufnahme eines $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums verwendet. Die Feststoffausbeute betrug 8,234 g (38 mmol) und entsprach damit 73%, etwa 19% davon fielen jedoch auf das Nebenprodukt.

5.2.1.1.2 Synthese von acetyliertem Kaffeesäurechlorid

Für die Darstellung von acetyliertem Kaffeesäurechlorid wurden 7,2 g (40 mmol) Kaffeesäure, 0,1 g (1 mmol) 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP), 20 mL Pyridin und 9,4 mL Essigsäureanhydrid gemäß Sefkow [Sefkow 2001] bei 0 °C unter Schutzgas vereinigt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung über ca. 40 g Eis geschüttet und mit 10 mL 2 M Salzsäure angesäuert. Im Anschluss wurde die wässrige Lösung mit 80 mL EtOAc/Tetrahydrofuran (THF) (3/1, v/v) extrahiert, die organischen Phasen gesammelt und diese über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde die Lösung am Rotavapor bei 75 mmHg und 35 °C bis zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde in einem Gemisch aus 150 mL Hexan, 5 mL EtOAc und etwas Diethylether aufgenommen. Die gebildete O-Acetylkaffeesäure wurde in 200 mL Toluol mit fünf Tropfen N,N-Dimethylformamid aufgenommen und bei -5 °C unter Schutzgas 7 mL Oxalylchlorid zugegeben. Dieses Gemisch wurde drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, unter Vakuum einrotiert und aus Toluol umkristallisiert. Das entstandene Säurechlorid wurde abgenutscht und getrocknet. Die Mutterlauge wurde erneut eingeeengt und zusätzlich ausgefallenes Produkt ebenfalls abgenutscht und getrocknet, um eine höhere Ausbeute zu erreichen. 5 mg Produkt wurden in 600 μL CDCl_3 aufgenommen und für die Aufnahme eines $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums verwendet. Es wurden 7,56 g (17 mmol) reines acetyliertes Kaffeesäurechlorid erhalten, dies entsprach einer Ausbeute von 42,5%.

5.2.1.1.3 Darstellung von acetylierter 1-Kaffeoylchinasäure

Für die Darstellung von acetylierter 1-Kaffeoylchinasäure wurden gemäß Sefkow *et al.* [Sefkow *et al.* 2001] 2,1 g (entsprechen 8 mmol reinem) 3,4-O-Isopropyliden-1,5-chinalacton, 80 mL Dichlormethan, 2 mL Pyridin, 0,4 g (3 mmol) DMAP und 3,9 g (8,9 mmol) acetyliertes Kaffeesäurechlorid unter Schutzgas bei Raumtemperatur vermischt und vier Stunden gerührt. Nach dem Ansäuern auf pH 3 (durch Zutropfen von 1 M Salzsäure) wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend erfolgte die Addition von 30 mL Wasser. Durch mehrfaches Ausschütteln mit 30 mL Dichlormethan wurde die wässrige Phase extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Filtration bis zur Trockne am Rotavapor eingeeengt.

Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Dafür wurden 4,5 g acetylierte Kaffeoylchinasäure in Dichlormethan gelöst und an Kieselgel 60 adsorbiert. Die Säule wurde mit Filterflocken, etwas Seesand und Kieselgel 60 (Korngröße 0,063 – 0,2 mm) angeschlemmt, mit EtOAc/Hexan (1/1, v/v) gefüllt und mit einer Rüttelmaschine verdichtet. Anschließend erfolgte die Zugabe der an Kieselgel 60 adsorbierten acetylierten CQA. Im Folgenden wurden Fraktionen von 50 mL gesammelt, einrotiert und mittels Referenz (acetylierte 1-CQA von Michael Sefkow, Uni Leipzig) auf einer DC-Platte identifiziert. Die Identifikation der Reinsubstanz erfolgte mit Hilfe von R_f -Werten und $^1\text{H-NMR}$ -Spektren. Fraktionen, die nachweislich keine 1-CQA enthielten, wurden verworfen. Fraktionen, die ausschließlich nur eine Substanz enthielten, wurden vereinigt. Fraktionen, die weitere Substanzen enthielten, wurden ebenfalls vereinigt und für eine spätere Aufreinigung bei -24 °C aufbewahrt. Die vereinigten Fraktionen wurden anschließend getrocknet und je 5 mg in 600 μL CDCl_3 aufgenommen und für die Aufnahme eines $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums verwendet. Es wurden 1,526 g (3,3 mmol) Produkt erhalten, was einer Ausbeute von 41,4% entsprach. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte, dass noch Verunreinigungen von unverestertem 3,4-O-Isopropyliden-1,5-chinalacton vorlagen, was im weiteren Verlauf zu einer deutlichen Reduzierung der Ausbeute führte.

5.2.1.1.4 Synthese von 1-Kaffeoylchinasäure

Für die abschließende Darstellung von 1-CQA gemäß Sefkow *et al.* [Sefkow *et al.* 2001] wurden 0,5 g (1 mmol) aufgereinigter Ester, 25 mL THF, 10 mL Wasser und 4,1 mL Lithiumhydroxid (1 M in Wasser, 4,1 mmol) bei Raumtemperatur vermischt und für fünf Stunden gerührt. Nach Ansäuern auf pH 1 (durch Zugabe von 2 M Salzsäure) wurde für weitere 19 Stunden gerührt. Danach wurden zum Reaktionsgemisch 50 mL Dichlormethan hinzugefügt. Nach Abtrennung der wässrigen Phase wurde diese mit Natriumchlorid gesättigt und dreimal mit je 15 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Filtration bis zur Trockne einrotiert. Das so erhaltene Rohprodukt wurde aus Diethylether umkristallisiert. Um eine größere Ausbeute zu erhalten wurde die organische Dichlormethanphase mit 50 mL 0,1 M Salzsäure ausgeschüttelt und erneut wie oben beschrieben behandelt. 3 mg Produkt wurden in 600 μL $[\text{d}_4]\text{Methanol}$ aufgenommen und für die Aufnahme eines $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums verwendet (siehe Abbildung 5-1).

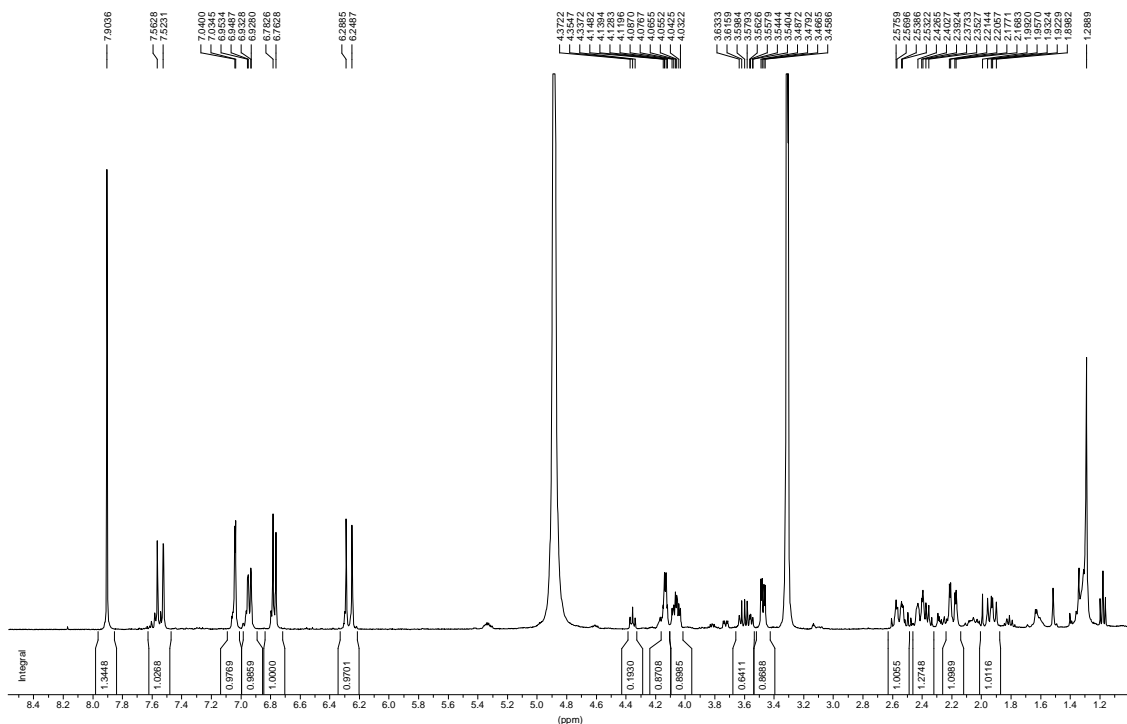


Abbildung 5-1: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der synthetisierten 1-Kaffeoylchinasäure.

$^1\text{H-NMR}$ ([d_4] MeOH): δ = 7,54 (d, J = 15.9 Hz, 1 H), 7,04 (d, J = 2.2 Hz, 1 H), 6,94 (dd, J = 10.2, 6.3 Hz, 1 H), 6,77 (d, J = 7.9 Hz, 1 H), 6,26 (d, J = 15.9 Hz, 1 H), 4,13 (dd, J = 8, 3.5 Hz, 1 H), 4,09 – 4,03 (m, 1 H), 2,48 (dd, J = 8.3, 3.2 Hz, 1 H), 2,55 (dd, J = 14.9, 2.5 Hz, 1 H), 2,41 (d, J = 9.5 Hz, 1 H), 2,19 (dd, J = 14.9, 3.5 Hz, 1H), 1,95 (dd, J = 13.7, 9.9 Hz, 1 H).

Es wurden 22,7 mg (0,06 mmol) 1-CQA erhalten, dies entsprach einer Ausbeute von 6%. Außerdem enthielt das Produkt ca. 30% Verunreinigungen. Anschließend erfolgte eine semi-präparative Aufreinigung an HPLC-System 3, Bedingungen 3a. Die Überprüfung auf Reinheit (> 95%) erfolgte an HPLC-System 1, Bedingungen 1a.

5.2.1.2 Synthese von 3- und 4-Kaffeoylchinasäure

Die Umesterung der 5-CQA in 3- und 4-CQA wurde nach Trugo und Macrae [Trugo und Macrae 1984] durchgeführt. Dazu wurden 50 mg 5-CQA in 5 mL Wasser gelöst, der pH-Wert mit Ammoniak auf 8 eingestellt und im Heizblock für 15 Minuten auf 80 °C erhitzt. Danach wurde mit Salzsäure auf pH 2,5 bis 3 eingestellt. Anschließend wurde das Gemisch aus den drei CQAs analytisch am HPLC-System 4 aufgetrennt, die Eluate mehrerer Läufe gesammelt, gleiche Substanz enthaltende Eluate vereinigt und das Lösemittel entfernt. Die Reinheit der CQAs wurde mittels HPLC-DAD überprüft (HPLC-System 1, Bedingungen 1a) und die Reinsubstanzen (> 95%) dann für weitere Versuche eingesetzt.

5.2.1.3 Isolierung und Synthese von 4- und 5-*p*-Coumaroylchinasäure

Zur Darstellung von 4- und 5-*p*-CouQA wurde ein mit Laccase (Polyphenoloxidase, EC 1.10.3.2) behandelter Apfelsaftextrakt [Will *et al.* 2007], der von der Forschungsanstalt Geisenheim bereitgestellt wurde, verwendet. Durch die Behandlung mit dem Enzym Laccase enthält dieser keine Verbindungen mehr, die zwei Hydroxylgruppen in ortho-Stellung zueinander aufweisen. Polyphenole des Apfelsaftextraktes wie CQAs, Que-Derivate und Cat-Derivate werden dadurch entfernt, wobei CouQAs und Phl-Derivate erhalten bleiben [Will *et al.* 2007].

Um etwa gleiche Mengen der beiden CouQAs zu erhalten, wurde eine Umesterung wie unter 5.2.1.2 beschrieben durchgeführt. Die anderen im mit Laccase behandelten Apfelsaftextrakt enthaltenen Polyphenole blieben erhalten, störten aber bei der weiteren Umsetzung und Isolierung nicht. Für die Umesterung wurden etwa 70 mg des mit Laccase behandelten Apfelsaftextraktes in 3,5 mL Wasser suspendiert. Die Umesterungssuspension wurde vor dem Injizieren in die HPLC membranfiltriert (0,45 µm). Die Isolierung erfolgte am HPLC-System 4, die Eluate mehrerer Läufe wurden gesammelt, gleiche Substanz enthaltende Eluate vereinigt und das Lösungsmittel entfernt. Nach Gefriertrocknung wurde die Reinheit (> 95%) an HPLC-System 1 (Bedingungen 1a) überprüft und 4- und 5-*p*-CouQA für die weiteren Versuche verwendet.

5.2.1.4 Isolierung von Phloretin-2'-*O*-xyloglucosid

Phl-XG wurde aus dem mit Laccase behandelten Apfelsaftextrakt (siehe 5.2.1.3) mittels semi-präparativer HPLC isoliert. Dazu wurde HPLC-System 3 mit dem Gradienten 3b verwendet. Auch hier wurden die vereinigten Eluate vom Lösemittel befreit und mittels HPLC-DAD (HPLC-System 1, Bedingungen 1a) auf Reinheit (>95%) untersucht.

5.2.2 Stammlösungen der Polyphenole für die Inkubationen

Von allen Polyphenolen wurden Stammlösungen (20 mM bis 2000 mM) für die Inkubationen in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Sie wurden 2000fach konzentriert hergestellt, um bei der Zugabe von 2,5 µL der DMSO-Stammlösung zu 5 mL Medium die gewünschte Konzentration des Polyphenols (zwischen 10 und 1000 µM) und eine konstante DMSO-Konzentration von 0,05% im Medium zu erhalten.

5.2.3 Kalibriergeraden, interner Standard, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

5.2.3.1 Polyphenole

Zur Erstellung der Kalibriergeraden für die einzelnen Polyphenole wurden Stammlösungen in DMSO mit der Konzentration 3 g/L hergestellt. Nach dem Lösen des Feststoffes (evtl. im Ultraschallbad) wurden drei dieser Stammlösungen in einem 1,5 mL HPLC-Vial zusammengegeben und gut durchmischt. Anschließend wurden 14 Verdünnungen in Methanol/Wasser (70/30, v/v) (400 mg/L, 160 mg/L, 64 mg/L, 25,6 mg/L, 10,24 mg/L, 4,10 mg/L, 1,64 mg/L, 0,66 mg/L, 0,26 mg/L, 0,10 mg/L, 41,9 µg/L, 16,8 µg/L, 6,7 µg/L und 2,7 µg/L) ebenfalls in HPLC-Vials hergestellt. Als interner Standard wurde 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure (IS) mit einer Konzentration von 100 mg/L in Methanol verwendet. Die zu vermessenden Proben wurden im Verhältnis 10:1 mit dem IS versetzt. Die Vermessung erfolgte an HPLC-System 1. Anschließend wurden die Peakflächen der Polyphenole bei der Wellenlänge des jeweiligen Absorptionsmaximums und des IS bei 320 nm integriert, der Quotient gebildet und gegen den Quotienten der Konzentrationen aufgetragen. Durch die Punkte wurde die Ausgleichsgerade gelegt. Abbildung 5-2 zeigt beispielhaft die ermittelte Kalibriergerade für Ferulasäure.

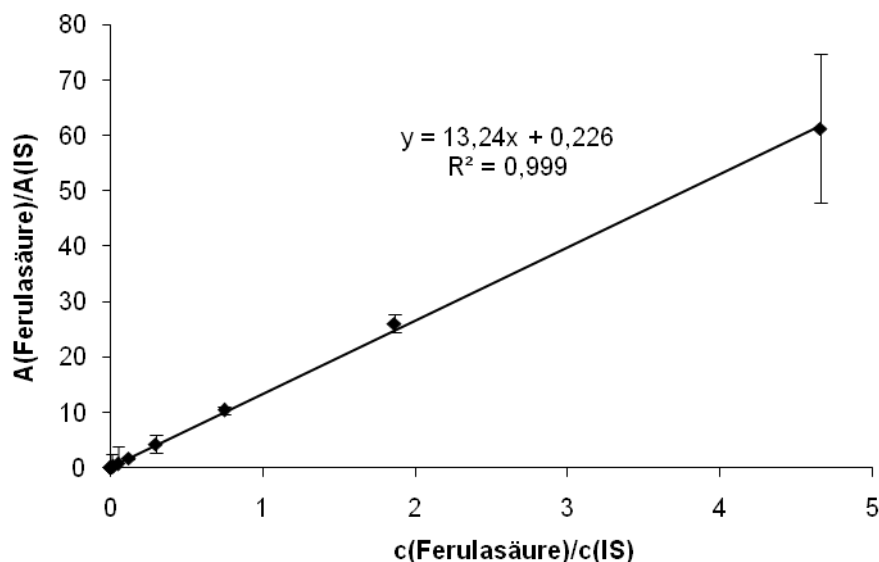


Abbildung 5-2: HPLC-DAD-Kalibriergerade (2,7 µg/L bis 400 mg/L) bei 320 nm für Ferulasäure mit Verwendung des internen Standards (IS) 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure. Die Konzentrationen sind in mg/L, die Flächen in mAu/min angegeben.

Außerdem wurden aus den Chromatogrammen die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt. Nach MacDougall und Crummet gilt eine Substanz bei einem Signal-Rausch-

Verhältnis über 1:3 als nachweisbar und bei einem Signal-Rausch-Verhältnis über 1:10 als bestimmbar [MacDougall und Crummett 1980]. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der untersuchten Substanzen sind in Tabelle 5-1 zusammengefasst. Außerdem sind dort die bei den Untersuchungen verwendeten Konzentrationen angegeben. Abweichungen sind entsprechend bei der Beschreibung der Methode vermerkt.

Tabelle 5-1: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen bei Analyse mittels HPLC-DAD sowie die verwendeten Konzentrationen bei den Inkubationen.

	verwendete Konzentration [μM]	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/L}$]	Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g/L}$]
Hydroxyzimtsäuren			
Zimtsäure	20	16,8	41,9
Dihydrozimtsäure	20	660	1640
<i>p</i> -Coumarsäure	20	16,8	41,9
Kaffeesäure	20	16,8	41,9
Dihydrokaffeesäure	20	100	260
Ferulasäure	20	16,8	41,9
Isoferulasäure	20	16,8	41,9
Dihydroferulasäure	20	41,9	100
Hydroxyzimtsäuremethylester			
<i>p</i> -Coumarsäuremethylester	20	41,9	100
Kaffeesäuremethylester	20	16,8	41,9
Ester der D-(-)-Chinasäure			
4- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	10	260	660
5- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	10	260	660
1-Kaffeoylchinasäure	10	41,9	100
3-Kaffeoylchinasäure	50	41,9	100
4-Kaffeoylchinasäure	10	41,9	100
5-Kaffeoylchinasäure	50	41,9	100
Flavonoide			
Phloretin	20	16,8	41,9
Phloretin 2'-O-glucosid	20	41,9	100
Phloretin 2'-O-xyloglucosid	20	41,9	100
Quercetin	10	16,8	41,9
Quercetin 3-O-rhamnosid	10	41,9	100
(-)-Epicatechin	10	41,9	100
(+)-Catechin	10	41,9	100
Intestinale und chemische Abbauprodukte			
3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure	20	100	260

	verwendete Konzentration [μM]	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/L}$]	Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g/L}$]
3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure	20	260	660
3,4-Dihydroxytoluol	20	41,9	100
3,4-Dihydroxybenzoesäure	-	2,7	6,7
Phloroglucin	20	1640	4100

5.2.3.2 D(-)-Chinasäure

Es wurden sieben Standardlösungen von D(-)-Chinasäure in einem Gemisch aus Ethanol, Wasser und Ameisensäure (29,9/70/0,1; v/v/v) mit Konzentrationen im Bereich 9,8 ng/mL bis 10 $\mu\text{g/mL}$ zur Erstellung einer Kalibriergeraden hergestellt. Vom internen Standard U- ^{13}C -D(-)-Chinasäure (^{13}C -IS) wurde eine Lösung mit der Konzentration 200 ng/mL in einem Gemisch aus Ethanol, Wasser und Ameisensäure (29,9/70/0,1; v/v/v) hergestellt. Jeweils 50 μL der Kalibrierlösung wurden mit 50 μL ^{13}C -IS zusammen in ein HPLC-Vial mit Insert gegeben und gut vermischt. Anschließend erfolgte die dreifache Vermessung jeder Probe am HPLC-MS/MS-System 2 mit den Bedingungen 2a. Die Mittelwerte der Flächen der D(-)-Chinasäure sowie des ^{13}C -IS wurden ermittelt und ihr Quotient gegen den Quotienten der Konzentrationen in Excel aufgetragen. Durch die Punkte wurde die Ausgleichsgerade gelegt (siehe Abbildung 5-3).

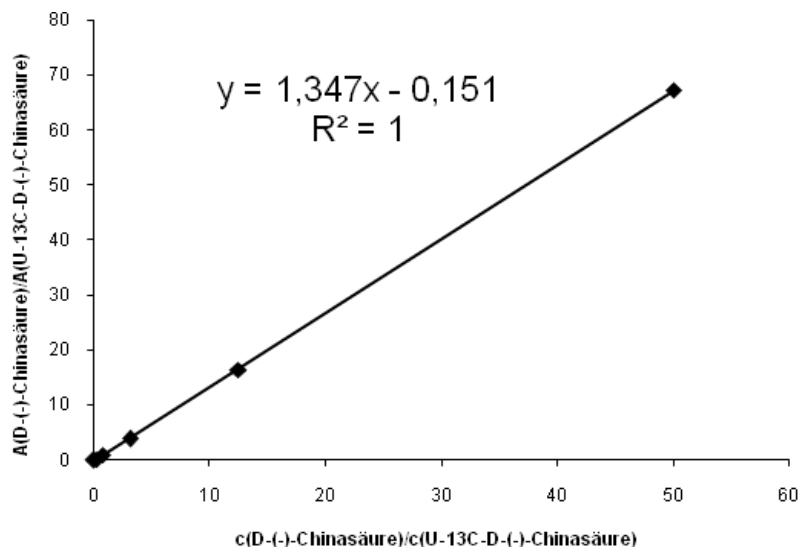


Abbildung 5-3: HPLC-ESI-MS/MS-Kalibriergerade (9,8 ng/mL bis 10 $\mu\text{g/mL}$) für D(-)-Chinasäure im MRM-Modus mit Verwendung des internen Standards U- ^{13}C -D(-)-Chinasäure (Konzentration 200 ng/mL). Die Konzentrationen sind in ng/mL, die Flächen in cps/min angegeben.

Die Nachweisgrenze lag bei 24,4 pg, die Bestimmungsgrenze bei 195,4 pg.

5.2.4 Bestimmung der Stabilität der Polyphenole im Inkubationspuffer

Zur Bestimmung der Stabilität der Polyphenole wurden 2,5 µL der DMSO-Stammlösungen (siehe 5.2.2) mit 5 mL HBSS in ein 15 mL Falcon gegeben und mit leicht geöffnetem Deckel über einen Zeitraum von 24 Stunden im Brutschrank (5% CO₂) bei 37 °C inkubiert. Nach 0, 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden wurden jeweils 300 µL Probe entnommen, in ein 1,5 mL HPLC-Vial pipettiert und 30 µL der internen Standardlösung (IS) dazugegeben. Anschließend wurde der Polyphenolgehalt der gebildeten Abbauprodukte mittels HPLC-DAD (HPLC-System 1) und HPLC-ESI_{neg}-MS/MS (HPLC-System 2, Bedingungen 2b) analysiert.

Que wurde zusätzlich für eine Stunde bei 37 °C mit ¹⁸O₂ vorbegeastem HBSS inkubiert. Die Lösung wurde anschließend gefriergetrocknet, der Rückstand in Methanol/Wasser aufgenommen und mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS im Full-Scan-Modus sowie im Produktionenmode (*m/z* 319; 30 eV) vermessen (HPLC-System 2c).

Als Konsequenz aus den Ergebnissen wurde zur Vermessung der Mediumproben ein auf 4 °C gekühlter Autosampler verwendet. Außerdem erfolgte die Probenaufbereitung sofort nach dem Auftauen der Proben, um Verluste durch den oxidativen Abbau der Polyphenole zu vermeiden.

5.2.5 Wasserstoffperoxid-Generierung im Inkubationsmedium

Die Inkubation der Polyphenole in der Ussing-Kammer erfolgte ohne Inserts mit Zellmonolayern wie unter 5.2.9 beschrieben.

Zur Durchführung des FOX1-Assays wurden Reagenz A und B angesetzt:

Reagenz A: Ammoniumeisen(II)sulfat 25 mM in 11 M Perchlorsäure gelöst.

Reagenz B: Sorbitol (100 mM), Xylenol-Orange (125 µM) in destilliertem Wasser gelöst.

Die Reaktionslösung wurde jeweils kurz vor Zugabe zur Probe aus einem Teil Reagenz A und 100 Teilen Reagenz B frisch angesetzt. Es wurde eine Wasserstoffperoxid-Kalibrierreihe mit den folgenden Konzentrationen in destilliertem Wasser erstellt: 1 M, 10 mM, 100 µM, 80 µM, 60 µM, 40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM.

Zur Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Konzentration im Medium wurde nach der vierstündigen Inkubation der Polyphenole in der Ussing-Kammer 20 µL der zu untersuchenden Proben, der Wasserstoffperoxid-Standardreihe sowie eines Leerwerts (destilliertes Wasser) in 96 Well-Zellkulturplatten pipettiert. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten. Nach Zugabe von jeweils 200 µL Reaktionslösung wurden die Ansätze im Photometer zunächst 20 Minuten bei 25 °C inkubiert, anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm unter der Verwendung der Software Gen 5 (Biotec Instruments) gemessen. Die Auswertung erfolgte anschließend mit Excel.

5.2.6 Allgemeine Kultur der Zellen

Das Arbeiten mit den Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank. Die Kultivierung der Zellen der Kolonkarzinomzelllinie T84 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA; CCL-248) erfolgte in Zellkulturflaschen (75 bzw. 175 cm²) als Monolayer im Brutschrank bei konstanten 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Als Nährmedium diente eine Mischung aus „Ham's F-12 nutrient mixture“ und DMEM (1:1) supplementiert mit 10% FKS, Penicillin und Streptomycin sowie 2,5 mM Glutamin.

Die Zellen wurden im Kryoröhrchen bei 37 °C soweit angetaut, dass noch ein Teil gefroren blieb und in ein 50 mL Falcon mit 5 mL vorgewärmtem Medium überführt. Anschließend wurde bei 900 rpm 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 5 mL Medium (20% FKS) resuspendiert. Die Suspension wurde in eine kleine Zellkulturflasche (25 cm²) pipettiert und in den Brutschrank verbracht. Nach 3 Tagen erfolgte der erste Mediumwechsel. Das Wachstum der Zellen wurde mit dem Lichtmikroskop kontrolliert.

Dreimal pro Woche erfolgte ein Mediumwechsel. Dazu wurde das Medium vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt und neues Medium (5 mL bei 25 cm²-Flasche, 15 mL bei 75 cm²-Flasche und 40 mL bei 175 cm²-Flasche) dazugegeben.

Wenn die Zellen in der Flasche etwa 90%ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie subkultiviert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, der Monolayer mit 5 mL PBS (bei einer 75 cm²-Flasche) gewaschen und anschließend 3 mL Trypsinlösung darauf gegeben. Dann wurden die Zellen bei 37 °C bis zum Beginnen der Ablösung inkubiert und durch vorsichtiges Klopfen vom Boden gelöst. Durch Zugabe von 7 mL FKS-haltigem Medium wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Aufziehen in die Pipette vereinzelt und 25 µL der Zellsuspension zu 25 µL Trypanblau in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß gegeben. Nach dem Vermischen wurde die Suspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellzahl bestimmt, indem vier Großquadrate mit einem Volumen von jeweils 0,1 µL ausgezählt wurden. Aus dem Mittelwert wurde - unter Berücksichtigung der Verdünnung und des Volumens - die Zellzahl in der Zellsuspension berechnet. Anschließend wurden die Zellen zur Weiterkultivierung in neue Zellkulturflaschen (1 Million pro 75 cm²-Flasche), Snapwell-Inserts (siehe 5.2.7) oder Transwell-Inserts (siehe 5.2.18) ausgestreut.

5.2.7 Kultivierung und Inkubation der Zellen in 6-Well-Platten zur Ermittlung der cytosolischen und zellassozierten Konzentrationen

In 6-Well-Platten werden pro Well 1 Million T84-Zellen in 2 mL Kulturmedium gegeben und 48 Stunden anwachsen gelassen. Zur Inkubation der Zellen wurde das Medium in den Wells abgesaugt und 2 mL der Inkubationslösung (mit dem Polyphenol in einer Konzentration von

50 μM) zugegeben. Es wurden jeweils 2 Wells mit der gleichen Substanz über 4 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 4 Stunden wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und jeweils ein Well pro Substanz wie in 5.2.14.2 beschrieben behandelt, um die cytosolische Konzentration des Polyphenols zu bestimmen. Das zweite Well wurde mit 0,5 mL TriFast™ für 15 Minuten inkubiert, die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und die Suspension in 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die weitere Behandlung wie in 5.2.14.1 beschrieben.

5.2.8 Kultivierung der T84-Monolayer auf Snapwell-Inserts

125.000 Zellen der Kolonkarzinomzelllinie T84 wurden auf 1 μm permeablen Snapwell-Inserts (Polycarbonat, Corning Inc., Wiesbaden) mit einem Durchmesser von 12 mm ausgesät. Auf die basolaterale Seite wurden 1,5 mL Medium gegeben, auf die apikale 0,5 mL. Der TER der Monolayer wurde nach dem Mediumwechsel mittels einer Endohm 24 Kammer (WPI, Berlin) bestimmt und dokumentiert. Die Monolayer wurden frühestens nach zwei Wochen, nach Erreichen der Konfluenz und einem reproduzierbarem TER für die Transportexperimente verwendet.

5.2.9 Ussing-Kammer-Experimente mit T84-Monolayern

Alle Inkubationen in der Ussing-Kammer - außer die in Kapitel 5.2.17 beschriebenen - wurden vom Kooperationspartner AG Melcher/Scheppach in der Gastroenterologie des Universitätsklinikums Würzburg durchgeführt. Die Snapwell-Inserts wurden in P2302 Ussing-Kammer Inserts (Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten) eingesetzt. Nach dem Zusammenbau der Kammer wurden gleichzeitig in beide Kammerhälften 5 mL auf 37 °C vorgewärmte HBSS als Inkubationsmedium zugegeben. Anschließend wurden die Messelektroden eingesetzt. Während des gesamten Versuchs wurde die Temperatur auf 37 °C gehalten sowie mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast. Nach einer Equilibrierungsphase von 30 Minuten wurden 2,5 μL der DMSO-Stammlösungen der Polyphenole (siehe 5.2.2) auf die apikale Seite gegeben. Zwei Minuten nach Zugabe der Polyphenole (um eine gleichmäßige Verteilung der Testsubstanzen im Medium zu gewährleisten) sowie 1, 2, 3 und 4 Stunden nach Beginn der Inkubation wurden 0,5 mL Aliquote aus beiden Kammerhälften entnommen, tiefgefroren und bis zur Messung bei -80 °C gelagert. Während der Inkubation wurde die transepitheliale Potentialdifferenz ΔPD in 2 Minuten Intervallen unter "current-clamped"-Bedingungen gemessen. Der TER wurde bei einer Spannung von 100 mA nach dem Ohmschen Gesetz berechnet (siehe 2.6). Nach Beendigung der Inkubation wurden durch Lyse mittels TriFast™-Reagenz Zellsuspensionen gewonnen. Dazu wurden auf jedes Insert 0,5 mL TriFast™ gegeben, 15 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit einem Zellschaber das Lysat von der Membran gelöst und mit einer Pipette resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden bis zur Messung ebenfalls bei -80 °C gelagert. Die Versuche wurden alle als Triplikate durchgeführt.

5.2.10 Ussing-Kammer-Experimente mit Caprinsäure-Vorinkubation

Die Snapwell-Inserts wurden wie in 5.2.9 beschrieben in die Ussing-Kammer eingebaut. Nach der Equilibrierungsphase von 30 Minuten wurden 0,5 mL einer 100 mM-Lösung (Endkonzentration 10 mM) C10 in die basolaterale Kammerhälfte gegeben, der TER wurde dabei beobachtet. Nach einer Inkubationszeit von ca. 10 Minuten war der TER auf ca. 50% des Ausgangswertes gesunken. Durch mehrmaliges Abnehmen von 2 mL Medium und Zugabe von je 2 mL frischem HBSS wurde das C10 „ausgewaschen“ [Wallon *et al.* 2005]. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den Polyphenolen wie unter 5.2.9 beschrieben.

5.2.11 Inkubationen mit Schweinedünndarmmukosa in der Ussing-Kammer

Aus dem Schlachthof (Südfleisch Schlachthof GmbH Würzburg) wurde direkt nach der Schlachtung eines gesunden Schweins ein Stück des terminalen Ileums, ca. 10 cm vom Zökalpol entfernt entnommen und in ein Transportgefäß gefüllt mit HBSS gegeben. Dann erfolgte der Transport ins Labor. Im Labor wurde sofort mit den Versuchen begonnen. Das Darmstück wurde der Länge nach aufgeschnitten und mit HBSS gereinigt. Anschließend wurden *Lamina epithelialis* und *Lamina propria mucosae* durch vorsichtiges Schaben mit der Kante eines Glasobjektträgers von den übrigen Schichten entfernt. Dann erfolgte das Einspannen in den für tierisches Gewebe vorgesehenen Einsatz (0,71 cm²) der Ussing-Kammer.

Nach dem Einsetzen in die Kammer wurde auf beiden Seiten 5 mL vorgewärmtes HBSS zugegeben. Die dem Medium exponierte Fläche der Schweinedarmmukosa betrug 0,71 cm². Anschließend wurden die Messelektroden eingesetzt. Während des gesamten Versuchs wurde die Temperatur auf 37 °C gehalten sowie mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast. Nach einer Equilibrierungsphase von 30 Minuten wurden 2,5 µL der DMSO-Stammlösungen der Polyphenole (siehe 5.2.2) auf die apikale Seite gegeben. Zwei Minuten nach Zugabe der Polyphenole (um eine gleichmäßige Verteilung der Testsubstanzen im Medium zu gewährleisten) sowie 1, 2, 3 und 4 Stunden nach Beginn der Inkubation wurden 0,5 mL Aliquote aus beiden Kammerhälften entnommen, tiefgefroren und bei -80 °C bis zur Messung gelagert. Während der Inkubation wurde die transepitheliale Potentialdifferenz ΔPD in 2 Minuten Intervallen unter “current-clamped”-Bedingungen gemessen. Der TER wurde bei einer Spannung von 100 mA nach dem Ohmschen Gesetz berechnet (siehe 2.6). Die

Versuche wurden als Triplikate durchgeführt. Die Schweinedarmmukosa wurde nach den Versuchen aus der Kammer entnommen und für weitere Versuche eingesetzt, die nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden [Deußer *et al.* 2010].

5.2.12 Inkubationen mit humanen Biopsien in der Ussing-Kammer

Im Universitätsklinikum Würzburg wurden im Rahmen von Routine-Endoskopie-Untersuchungen des Dickdarms mit dem Einverständnis der Patienten (Ethikantrag der Universität Würzburg Nr. 136/09) zusätzliche Biopsien aus der Nähe des Zökals entnommen. Diese wurden direkt nach der Entnahme in ein mit HBSS gefülltes Gefäß gegeben und sofort ins Labor transportiert. Dort wurden die Biopsien mit HBSS gereinigt und in für Biopsien vorgesehene Einsätze der Ussing-Kammer eingespannt. Nach dem Einsetzen in die Kammer wurden auf beiden Seiten 5 mL vorgewärmtes HBSS zugegeben. Die dem Medium exponierte Fläche der Biopsie betrug $0,031 \text{ cm}^2$. Anschließend wurden die Messelektroden eingesetzt. Während des gesamten Versuchs wurde die Temperatur auf 37 °C gehalten sowie mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) begast. Nach einer Equilibrierungsphase von 30 Minuten wurden $2,5 \text{ }\mu\text{L}$ der DMSO-Stammlösungen der Polyphenole (siehe 5.2.2) auf die apikale Seite gegeben. Zwei Minuten nach Zugabe der Polyphenole (um eine gleichmäßige Verteilung der Testsubstanzen im Medium zu gewährleisten) sowie 1, 2, 3 und 4 Stunden nach Beginn der Inkubation wurden $0,5 \text{ mL}$ Aliquote aus beiden Kammerhälften entnommen, tiefgefroren und bei -80 °C bis zur Messung gelagert. Während der Inkubation wurde die transepitheliale Potentialdifferenz ΔPD in 2 Minuten Intervallen unter "current-clamped"-Bedingungen gemessen. Der TER wurde bei einer Spannung von 100 mA nach dem Ohmschen Gesetz berechnet (siehe 2.6). Die Versuche wurden als Triplikate durchgeführt.

5.2.13 Bestimmung der Polyphenolkonzentration in den Mediumüberständen

5.2.13.1 Bestimmung mittels HPLC-Diodenarraydetektion (HPLC-DAD)

Die bei -80 °C gelagerten Proben der Mediumüberstände aus den Ussing-Kammerversuchen wurden zügig bei Raumtemperatur aufgetaut. Proben aus Inkubationen mit Schweinedarmmukosa und Biopsien wurden membranfiltriert ($0,45 \text{ }\mu\text{m}$, PVDF), Proben aus Inkubationen mit T84-Monolayern wurden ohne Filtration vermessen. $300 \text{ }\mu\text{L}$ der Probe wurden in ein braunes HPLC-Vial gegeben und mit $30 \text{ }\mu\text{L}$ IS gut vermischt. Anschließend wurden die Proben am HPLC-System 1 vermessen. Aus den erhaltenen Flächen der Polyphenolpeaks und des IS wurden anhand der jeweiligen Kalibriergerade (siehe 5.2.3) die Konzentration des Polyphenols in beiden Kammerhälften berechnet. Zur besseren Vergleichbarkeit der

Ergebnisse wurden in dieser Arbeit die Null-Stunden-Werte gleich 100% gesetzt und dann die prozentuale Verteilung der Polyphenole berechnet.

5.2.13.2 Bestimmung mittels HPLC-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS)

Die nach 5.2.13.1 und 5.2.14.1 aufbereiteten Proben wurden zusätzlich mittels HPLC-MS/MS im Scanmodus vermessen. Dazu wurde HPLC-System 2, Bedingungen 2b verwendet.

Zur Strukturaufklärung der gebildeten Metabolite von Ferulasäure wurde der Produktionenmode verwendet, die Parameter von 2b blieben dabei gleich, es wurde in Quadrupol 1(Q1) das jeweilige Precursorion selektiert, in Q2 mit 30 eV und 6 Units Stickstoff fragmentiert und in Q3 ein Produktionenscan durchgeführt.

Um in den Mediumüberständen der Biopsien hochsensitiv die Hydroxyzimtsäuren auf der basolateralen Seite nachzuweisen, wurde im Multiple-Reaction-Monitoring-Modus (MRM-Modus) gearbeitet. Dazu wurden anhand von Referenzsubstanzen die optimalen Parameter für jede Hydroxyzimtsäure erstellt. Die verwendeten substanzspezifischen Parameter sind in Tabelle 5-2 zusammengefasst, die verwendeten sonstigen Bedingungen sind unter 2d zu finden.

Tabelle 5-2: Substanzspezifische Parameter im Multiple-Reaction-Monitoring-Modus (MRM) für die Hydroxyzimtsäuren. DP = Declustering Potential, EP = Entrance Potential, CEP = Cell Entrance Potential, CE = Collision Energy, CXP = Cell Exit Potential.

	Kaffeesäure	Dihydroferulasäure	Isoferulasäure	Ferulasäure	<i>p</i> -Coumarsäure
Precursorion [<i>m/z</i>]	178,9	195,0	193,0	193,0	162,8
Fragment [<i>m/z</i>]	135,0	136,0	134,0	134,0	119,1
DP	-25	-30	-30	-30	-30
EP	-4,5	-11	-9,5	-7,5	-9,5
CEP	-14	-16	-12	-12	-14
CE	-22	-22	-22	-22	-22
CXP	-4	-2	-2	-4	-2

5.2.14 Bestimmung der zellassozierten und intrazellulären Polyphenolkonzentrationen

5.2.14.1 Zellassozierte Konzentrationen

Die bei -80 °C gelagerten Zellsuspensionen wurden im Ultraschallbad über 20 Minuten aufgetaut. Anschließend wurden 200 µL der Suspensionen durch eine 3 kDa-Membran

(Nanosep 3K omega) bei 10.000 rpm und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die Membran einmal mit 100 µL und zweimal mit 50 µL 10%iger Ameisensäure in Methanol gewaschen. Zu 300 µL der vereinigten Eluate wurden 30 µL IS gegeben und die Probe an den HPLC-Systemen 1 und 2 vermessen.

5.2.14.2 Intrazelluläre Konzentrationen

Direkt nach der Inkubation mit den Polyphenolen (siehe Kapitel 5.2.7) wurde der Monolayer zweimal mit 1 mL PBS gewaschen. Dann wurde 1 mL Digitoninlösung (20 µg/mL in PBS) dazu gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Mit einer Pipette wurde der Überstand, der die cytosolischen Polyphenole enthielt, vorsichtig entnommen und 300 µL davon mit 30 µL IS in einem HPLC-Vial versetzt und zur Vermessung an HPLC-System 1 eingesetzt. Im Anschluss daran wurde der Monolayer wie in 5.2.9 beschrieben mit TriFast™ lysiert und nach 5.2.14.1 zur Vermessung an HPLC-System 1 vorbereitet. Als Kontrolle wurden Monolayer direkt nach der Inkubation ohne vorherige Behandlung mit Digitonin mit TriFast™ lysiert und wie oben beschrieben weiter behandelt.

5.2.15 Bestimmung der D(-)-Chinasäurekonzentrationen in den Mediumüberständen

Die Mediumüberstände aus den Schweinedarminkubationen wurden zunächst membranfiltriert (0,45 µm). Für die Bestimmung der D(-)-Chinasäurekonzentration in den Mediumüberständen der T84- und Schweinedarminkubationen wurden die apikalen Proben zunächst 100fach mit Wasser verdünnt. Die basolateralen Proben wurden unverdünnt verwendet. Dann wurden 50 µL der Probe mit 50 µL ¹³C-IS in einem HPLC-Vial mit Insert gut vermischt und die Konzentration der D(-)-Chinasäure an HPLC-System 2 mit der MRM-Methode 2a bestimmt. Die Peakflächen wurden ausgewertet und anhand der Kalibriergeraden (siehe 5.2.3.2) die D(-)-Chinasäurekonzentration ermittelt.

5.2.16 Inkubation mit Ferulasäure in unterschiedlichen Konzentrationen

T84-Monolayer und Schweinedarmmukosa wurden analog zu 5.2.9 und 5.2.11 zusätzlich mit den Konzentrationen 50, 100, 500 und 1000 µM inkubiert. Für jede Konzentration wurde eine Stammlösung wie unter 5.2.2 beschrieben hergestellt, um bei allen Inkubationen die gleiche DMSO-Konzentration im Medium zu erreichen.

5.2.17 Inkubationen von Phloretin mit T84-Monolayern unter verschiedenen Bedingungen

Die Inkubationen mit Phloretin unter den im Folgenden beschriebenen Bedingungen wurden an der TU Kaiserslautern durchgeführt. Die im Einzelnen verwendeten Inkubationsbedingungen sind im Folgenden aufgeführt.

5.2.17.1 Zugabe von Phloretin auf der basolateralen Seite

Die Zugabe von Phl in die Ussing-Kammer (K. Mußler, Aachen) in einer Konzentration von 50 μM erfolgte in einem Teil der Kammern auf der apikalen Seite, in einem Teil der Kammern auf der basolateralen Seite.

5.2.17.2 Inkubation von Phloretin mit unterschiedlichen Konzentrationen

Die Inkubation von Phl erfolgte in verschiedenen Konzentrationen. In die Ussing-Kammern (apikale bzw. basolaterale Seite) wurden verschiedene Stammlösungen appliziert, um die Konzentrationen 10, 20 und 50 μM zu erhalten.

5.2.17.3 Inkubation von Phloretin in Gegenwart eines pH-Gradienten

Weiterhin wurden Inkubationen mit Phl in einer Konzentration von 50 μM in Gegenwart eines pH-Gradienten durchgeführt. Dazu wurde nach dem Einspannen der T84-Monolayer in die Ussing-Kammer auf die basolaterale Seite das übliche HBSS mit einem pH-Wert von 7,4 gegeben. Auf die apikale Seite wurde HBSS gegeben, das vorher mit verdünnter Salzsäure auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt wurde. Nach einer 30-minütigen Equilibrationsphase erfolgte die Zugabe des Phls auf der apikalen bzw. basolateralen Seite.

5.2.17.4 Inkubation von Phloretin in Gegenwart des Metabolismushemmers Natriumazid

Die T84-Monolayer wurden außerdem mit Phl in Gegenwart des Metabolismushemmers Natriumazid inkubiert. Dazu wurden nach dem Einspannen der T84-Monolayer in jede Ussing-Kammer-Hälfte 50 μL einer 1 M Natriumazidlösung in Wasser gegeben, um eine Konzentration von 10 mM auf beiden Seiten zu erreichen. Nach der 30-minütigen Equilibration erfolgte die Zugabe des Phloretins auf der apikalen bzw. basolateralen Seite.

5.2.18 Immunofluoreszenzfärbung zur Detektion des „Tight junction“-Proteins Occludin

Die Durchführung der Immunofluoreszenzfärbungen erfolgte beim Kooperationspartner AG Melcher/Scheppach (Gastroenterologie des Universitätsklinikums Würzburg). Zur Immunofluoreszenzfärbung wurden 500.000 Zellen der Zelllinie T84 auf Transwell-Inserts (24 mm, 1 µm Porengröße, PET, Becton Dickinson, Heidelberg) ausgesät. Nach einer Anwachszeit von 12 bis 14 Tagen wurden die Monolayer nach zwei verschiedenen Schemata inkubiert. Nach Schema 1 wurden die Monolayer analog zu den Ussing-Kammer-Inkubationen eine Stunde mit 10 mM C10 vorinkubiert, dann erfolgte für 4 Stunden die Inkubation der Polyphenole (siehe Tabelle 5-3). Nach Schema 2 wurden die Monolayer eine Stunde mit dem Polyphenol (siehe Tabelle 5-3) vorinkubiert, anschließend erfolgte für eine Stunde die Inkubation mit 10 mM C10. Alle Inkubationen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ durchgeführt. Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit -20 °C kaltem Methanol für 5 Minuten fixiert. Nach dem Absaugen des Methanols wurde die Platte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 5-3: Verwendete Konzentrationen bei den Inkubationen für die Immunofluoreszenzmikroskopie.

Substanz	Konzentration [µM]
5-Kaffeoylchinasäure	50
Ferulasäure	20
Phloretin	20
Phloretin-2'-O-glucosid	20

Die Zellen wurden anschließend bei Raumtemperatur dreimal für je eine Minute mit PBS zur Rehydrierung gewaschen. Dann erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 0,25% Triton X-100 in PBS über 10 Minuten. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS für je eine Minute wurden die unspezifischen Antikörperbindungsstellen mit 1% BSA in PBS über 30 Minuten geblockt. Dann erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers (in 1% BSA in PBS, siehe Tabelle 5-4), die Inkubation erfolgte bei 4 °C über 2 Stunden. Nachdem die Monolayer wiederum zweimal mit PBS für je eine Minute gewaschen wurden, erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers (siehe Tabelle 5-4) in 1% BSA (in PBS) gefolgt von einer einstündigen Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anschließend wurde dreimal mit PBS (je zwei Minuten) gewaschen und die Membran (mit dem Monolayer darauf) mit einem Skalpell aus den Wells ausgeschnitten. Die Membran wurde bei Raumtemperatur auf einen supergefrosteten Objektträger gelegt und mit 2 Tropfen ProLong-Antifade-Reagenz zum

Schutz vor dem Ausbleichen überschichtet. Abschließend wurde ein Deckglas auf die Membran gegeben und die Objektträger 24 Stunden im Kühlschrank aushärten gelassen.

Tabelle 5-4: Verdünnungen und Hersteller der verwendeten Antikörper zur Immunfluoreszenzmikroskopie.

Antikörper	verwendete Verdünnung	Hersteller
primärer Antikörper		
Anti-Occludin	1:300	33-1500, Invitrogen, Darmstadt
sekundärer Antikörper		
Goat-anti-Mouse-Antikörper markiert mit Alexa 488	10 µg/mL	A11029, Invitrogen, Darmstadt

Nach dem Aushärten wurden die Objektträger an einem konfokalen Lasermikroskop (Leica TCS SP2) mikroskopiert. Als Anregungswellenlänge wurden 495 nm, als Emissionswellenlänge 519 nm eingestellt.

5.3 Statistik

Zur Berechnung der Ergebnisse der Einzelversuche wurden die Daten von Mehrfachdurchführungen gemittelt. Die Endergebnisse sind arithmetische Mittelwerte (MW) aus unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Als Fehler ist die Standardabweichung (Stabw) angegeben. Berechnet wurde sie mit der Formel:

$$\text{Stabw} = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n}}$$

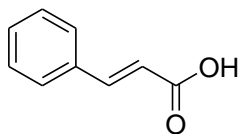
Dabei ist \bar{x} der arithmetische Stichprobenmittelwert und n der Stichprobenumfang.

Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels einseitigem unabhängigem Zweistichproben-T-Test nach Student. Als signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ und als hochsignifikant eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,001$ angenommen.

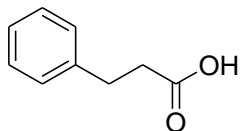
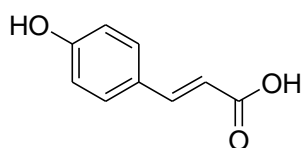
6 Strukturübersicht

Hydroxyzimtsäuren

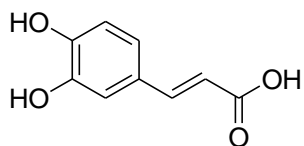
Zimtsäure



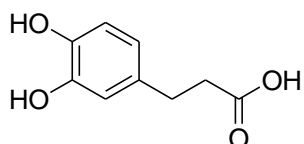
Dihydrozimtsäure

*p*-Coumarsäure

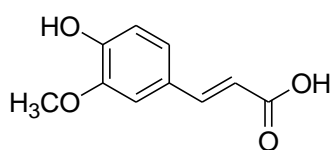
Kaffeesäure



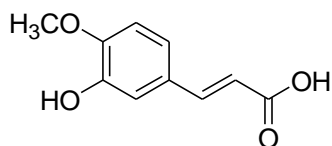
Dihydrokaffeesäure



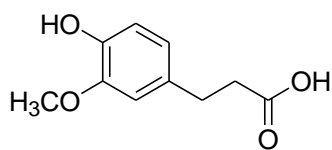
Ferulasäure



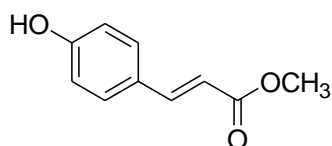
Isoferulasäure



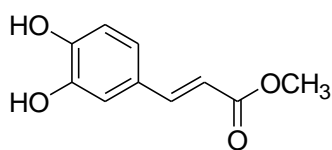
Dihydroferulasäure



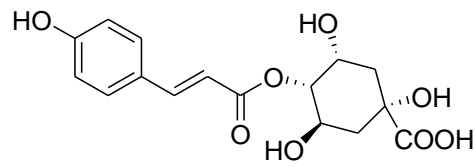
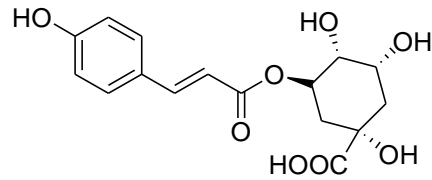
Hydroxyzimtsäuremethylester

p-Coumarsäuremethylester

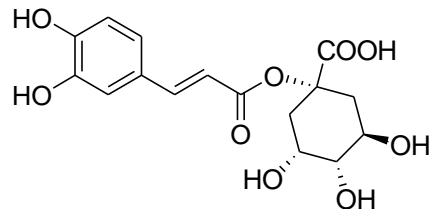
Kaffeesäuremethylester



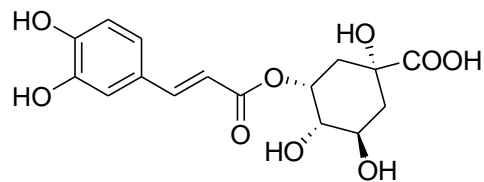
Ester der D-(-)-Chinasäure

4-*p*-Coumaroylchinasäure5-*p*-Coumaroylchinasäure

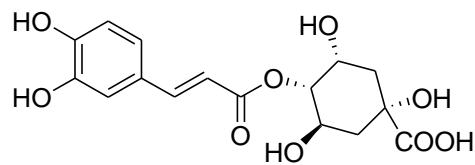
1-Kaffeoylchinasäure



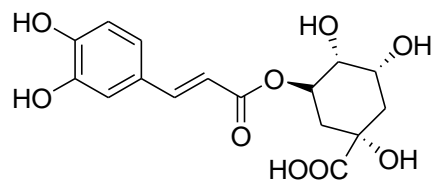
3-Kaffeoylchinasäure



4-Kaffeoylchinasäure

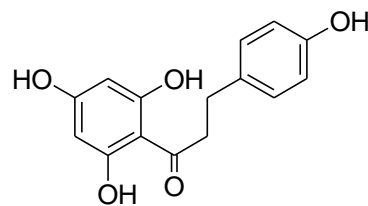
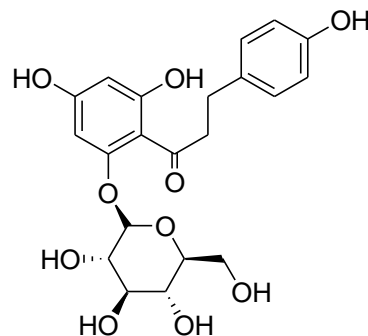


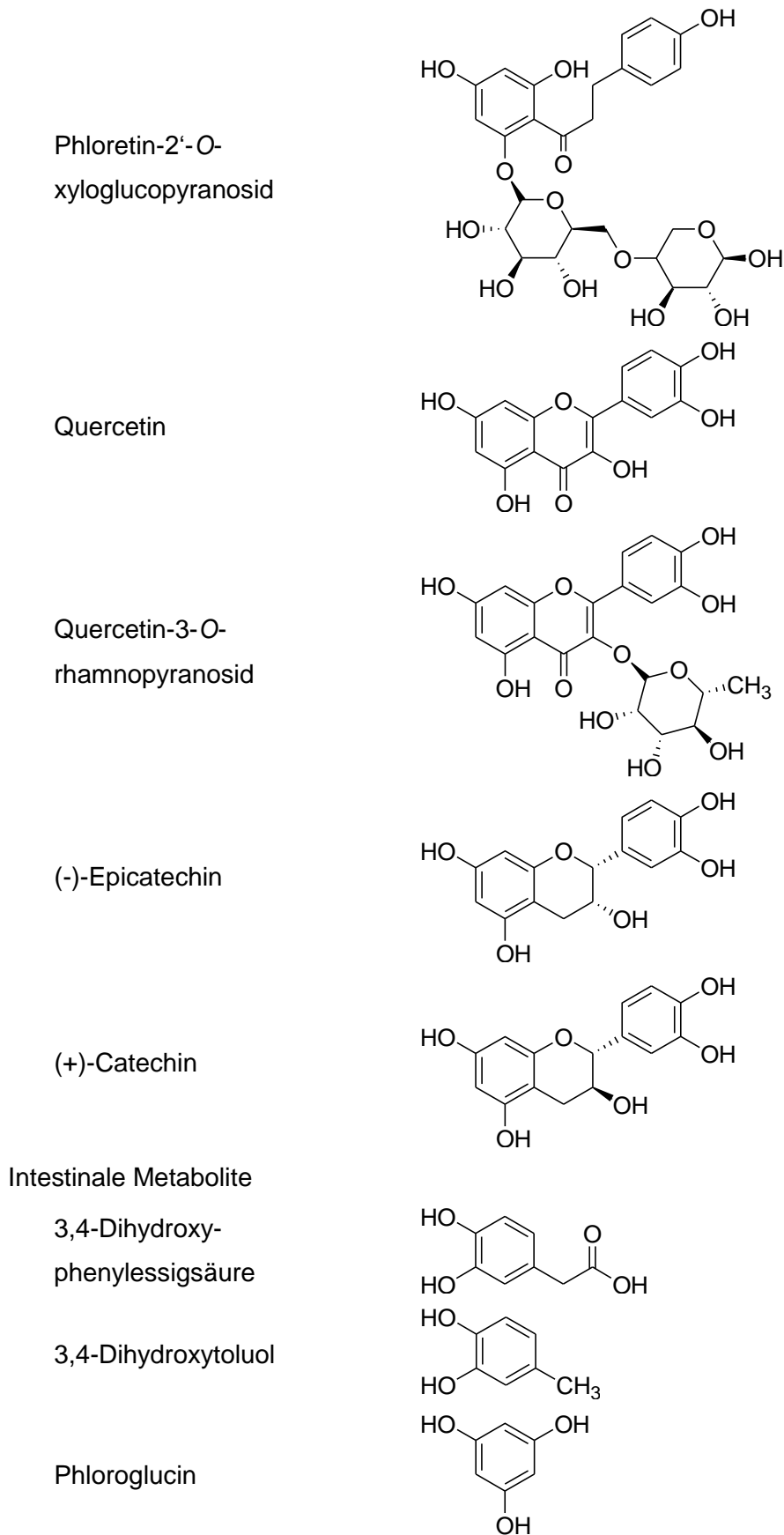
5-Kaffeoylchinasäure



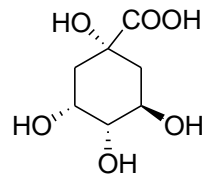
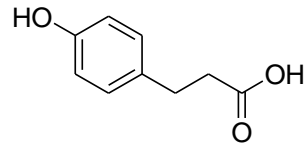
Flavonoide

Phloretin

Phloretin-2'-*O*-
glucopyranosid

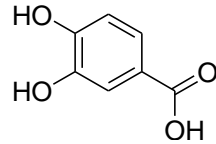
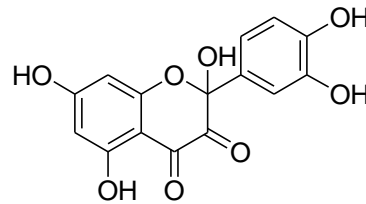


D-(-)-Chinasäure

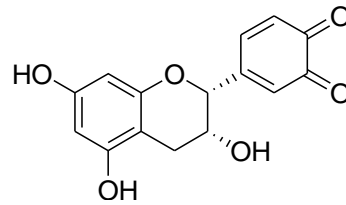
3-(4-Hydroxyphenyl)-
propionsäure

Chemische Abbauprodukte

3,4-Dihydroxybenzoesäure

2,5,7,3',4'-Pentahydroxy-3,4-
flavandion

(-)-Epicatechinon



7 Literatur

Akagawa, M., Shigemitsu, T. und Suyama, K.; Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 2632-2640.

Alessandro, R., Di Bella, M. A., Flugy, A. M., Fontana, S., Damiani, F., Corrado, C., Colomba, P., Todaro, M., Russo, D., Santoro, A., Kohn, E. C. und De Leo, G.; Comparative study of T84 and T84SF human colon carcinoma cells: in vitro and in vivo ultrastructural and functional characterization of cell culture and metastasis. *Virchows Arch.* **2006**, *449*, 48-61.

Almond, G. W.; Research applications using pigs. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.* **1996**, *12*, 707-716.

Amasheh, M., Schlichter, S., Amasheh, S., Mankertz, J., Zeitz, M., Fromm, M. und Schulzke, J. D.; Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 1067-1073.

Anderberg, E. K., Lindmark, T. und Artursson, P.; Sodium caprate elicits dilatations in human intestinal tight junctions and enhances drug absorption by the paracellular route. *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 857-864.

Anderson, J. M. und Van Itallie, C.; Physiology and Function of the Tight junction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2009**, *1*, 002584.

Andreasen, M. F., Kroon, P. A., Williamson, G. und Garcia-Conesa, M. T.; Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5679-5684.

Argenzio, R. A., Henrikson, C. K. und Liacos, J. A.; Restitution of barrier and transport function of porcine colon after acute mucosal injury. *Am. J. Physiol.* **1988**, *255*, G62-G71.

Argenzio, R. A. und Meuten, D. J.; Short-chain fatty acids induce reversible injury of porcine colon. *Dig. Dis. Sci.* **1991**, *36*, 1459-1468.

Arnott, I. D., Kingstone, K. und Ghosh, S.; Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **2000**, *35*, 1163-1169.

Aron, P. M. und Kennedy, J. A.; Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 79-104.

Ayrton, A. und Morgan, P.; Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica* **2001**, *31*, 469-497.

Bellion, P., Oik, M., Will, F., Dietrich, H., Baum, M., Eisenbrand, G. und Janzowski, C.; Formation of hydrogen peroxide in cell culture media by apple polyphenols and its effect on antioxidant biomarkers in the colon cell line HT-29. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 1226-1236.

Beltran, A. R., Ramirez, M. A., Carraro-Lacroix, L. R., Hiraki, Y., Reboucas, N. A. und Malnic, G.; NHE1, NHE2, and NHE4 contribute to regulation of cell pH in T84 colon cancer cells. *Pflugers Arch.* **2008**, *455*, 799-810.

Bergmann, H., Triebel, S., Kahle, K. und Richling, E.; The metabolic fate of apple polyphenols in humans. *Curr. Nutr. Food Sci.* **2010**, *6*, 19-35.

Blair, S. A., Kane, S. V., Clayburgh, D. R. und Turner, J. R.; Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease. *Lab. Invest.* **2006**, *86*, 191-201.

Blaut, M. und Clavel, T.; Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J. Nutr.* **2007**, *137*, 751S-755S.

Boudry, G., Lalles, J. P., Malbert, C. H., Grondahl, M. L., Unmack, M. A. und Skadhauge, E.; Soybean impairs Na(+)-dependent glucose absorption and Cl⁻ secretion in porcine small intestine. *Reprod. Nutr. Dev.* **2003**, *43*, 409-418.

Boulton, D. W., Walle, U. K. und Walle, T.; Fate of the flavonoid quercetin in human cell lines: chemical instability and metabolism. *J. Pharm. Pharmacol.* **1999**, *51*, 353-359.

Boyer, J. und Liu, R. H.; Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr. J.* **2004**, *3*, 5-19.

Brand, W., van der Wel, P. A., Rein, M. J., Barron, D., Williamson, G., van Bladeren, P. J. und Rietjens, I. M.; Metabolism and transport of the citrus flavonoid hesperetin in Caco-2 cell monolayers. *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36*, 1794-1802.

Bremer, S., Hoof, T., Wilke, M., Busche, R., Scholte, B., Riordan, J. R., Maass, G. und Tummler, B.; Quantitative Expression Patterns of Multidrug-Resistance P-Glycoprotein (Mdr1) and Differentially Spliced Cystic-Fibrosis Transmembrane-Conductance Regulator Messenger-Rna Transcripts in Human Epithelia. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *206*, 137-149.

Buchner, N., Krumbein, A., Rohn, S. und Kroh, L. W.; Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 3229-3235.

Cai, K. und Bennick, A.; Effect of salivary proteins on the transport of tannin and quercetin across intestinal epithelial cells in culture. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *72*, 974-980.

Chen, Z. Y., Peng, C., Jiao, R., Wong, Y. M., Yang, N. und Huang, Y.; Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4485-4499.

Cheng, A. M., Morrison, S. W., Yang, D. X. und Hagen, S. J.; Energy dependence of restitution in the gastric mucosa. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2001**, *281*, C430-438.

Cheng, K. W., Wu, Q., Zheng, Z. P., Peng, X., Simon, J. E., Chen, F. und Wang, M.; Inhibitory effect of fruit extracts on the formation of heterocyclic amines. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10359-10365.

Cheng, Z., Radomska-Pandya, A. und Tephly, T. R.; Studies on the substrate specificity of human intestinal UDP-glucuronosyltransferases 1A8 and 1A10. *Drug Metab. Dispos.* **1999**, *27*, 1165-1170.

Clayburgh, D. R., Shen, L. und Turner, J. R.; A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab. Invest.* **2004**, *84*, 282-291.

Coates, E. M., Popa, G., Gill, C. I., McCann, M. J., McDougall, G. J., Stewart, D. und Rowland, I.; Colon-available raspberry polyphenols exhibit anti-cancer effects on in vitro models of colon cancer. *J. Carcinog.* **2007**, *6*, 4-16.

Cohen, J. D., Kao, H. W., Tan, S. T., Lechago, J. und Snape, W. J., Jr.; Effect of acute experimental colitis on rabbit colonic smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **1986**, *251*, G538-545.

Comerford, K. M., Wallace, T. J., Karhausen, J., Louis, N. A., Montalto, M. C. und Colgan, S. P.; Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 3387-3394.

Crozier, A., Jaganath, I. B. und Clifford, M. N.; Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1001-1043.

Dangles, O., Fargeix, G. und Dufour, C.; Antioxidant properties of anthocyanins and tannins: a mechanistic investigation with catechin and the 3',4',7-trihydroxyflavylium ion. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2000**, *2*, 1653-1663.

Day, A. J., Gee, J. M., DuPont, M. S., Johnson, I. T. und Williamson, G.; Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 1199-1206.

Denker, B. M. und Nigam, S. K.; Molecular structure and assembly of the tight junction. *Am. J. Physiol.* **1998**, *274*, F1-9.

Deußer, H., Rogoll, D., Scheppach, W., Volk, A., Backhaus, K., Melcher, R. und Richling, E.; *Ex vivo* studies on porcine gastrointestinal absorption and metabolism of apple polyphenols. **2010**, in Vorbereitung.

Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.; Online: <http://www.dge.de/modules.php?name=News&file=article&sid=413>, 17. August **2010**.

Dharmasathaphorn, K., McRoberts, J. A., Mandel, K. G., Tisdale, L. D. und Masui, H.; A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport. *Am. J. Physiol.* **1984**, *246*, G204-208.

Douglas, W. R.; Of Pigs and Men and Research: A Review of Applications and Analogies of the pig, *sus scrofa*, in Human Medical Research. *Space Life Sci.* **1972**, *3*, 226-234.

Dupas, C., Marsset Baglieri, A., Ordonaud, C., Tome, D. und Maillard, M. N.; Chlorogenic acid is poorly absorbed, independently of the food matrix: A Caco-2 cells and rat chronic absorption study. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 1053-1060.

Eisenbrand, G. und Schreier, P.; *RÖMPP Lexikon Lebensmittelchemie*. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart, **2006**.

Englund, G., Rorsman, F., Ronnblom, A., Karlbom, U., Lazorova, L., Grasjo, J., Kindmark, A. und Artursson, P.; Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *29*, 269-277.

Erlejman, A. G., Fraga, C. G. und Oteiza, P. I.; Procyanidins protect Caco-2 cells from bile acid- and oxidant-induced damage. *Free Radical Biol. Med.* **2006**, *41*, 1247-1256.

Espin, J. C., Gonzalez-Barrio, R., Cerda, B., Lopez-Bote, C., Rey, A. I. und Tomas-Barberan, F. A.; Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10476-10485.

Fahlman, B. M. und Krol, E. S.; Inhibition of UVA and UVB radiation-induced lipid oxidation by quercetin. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 5301-5305.

Farhadi, A., Banan, A., Fields, J. und Keshavarzian, A.; Intestinal barrier: an interface between health and disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2003**, *18*, 479-497.

Faria, A., Pestana, D., Azevedo, J., Martel, F., de Freitas, V., Azevedo, I., Mateus, N. und Calhau, C.; Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells - Putative involvement of GLUT2. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 1430-1437.

Feil, W., Lacy, E. R., Wong, Y. M. M., Burger, D., Wenzl, E., Starlinger, M. und Schiessel, R.; Rapid Epithelial Restitution of Human and Rabbit Colonic Mucosa. *Gastroenterology* **1989**, *97*, 685-701.

Fridrich, D., Kern, M., Pahlke, G., Volz, N., Will, F., Dietrich, H. und Marko, D.; Apple polyphenols diminish the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in HT29 colon carcinoma cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 594-601.

Furuse, M.; Molecular Basis of the Core Structure of Tight Junctions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2009**,

Gassler, N., Rohr, C., Schneider, A., Kartenbeck, J., Bach, A., Obermuller, N., Otto, H. F. und Autschbach, F.; Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **2001**, *281*, G216-228.

Gerhauser, C.; Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components. *Planta Med.* **2008**, *74*, 1608-1624.

Gliszczynska-Swiglo, A. und Tyrakowska, B.; Quality of commercial apple juices evaluated on the basis of the polyphenol content and the TEAC antioxidant activity. *J. Food Sci.* **2003**, *68*, 1844-1849.

Gökmen, V., Artik, N., Acar, J., Kahraman, N. und Poyrazoglu, Z.; Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid compositions of apple juice. *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, *213*, 194-199.

Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P. und Jaramillo, B. E.; Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2003**, *81*, 1-44.

Hagiwara, M., Inoue, S., Tanaka, T., Nunoki, K., Ito, M. und Hidaka, H.; Differential effects of flavonoids as inhibitors of tyrosine protein kinases and serine/threonine protein kinases. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 2987-2992.

Haslam, I. S., Jones, K., Coleman, T. und Simmons, N. L.; Induction of P-glycoprotein expression and function in human intestinal epithelial cells (T84). *Biochem. Pharmacol.* **2008a**, *76*, 850-861.

Haslam, I. S., Jones, K., Coleman, T. und Simmons, N. L.; Rifampin and digoxin induction of MDR1 expression and function in human intestinal (T84) epithelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **2008b**, *154*, 246-255.

Health Protection Agency Culture Collections; Online: http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=88021101&collection=ecacc_gc, 22.April **2010**.

Hilgendorf, C., Ahlin, G., Seithel, A., Artursson, P., Ungell, A. L. und Karlsson, J.; Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab. Dispos.* **2007**, *35*, 1333-1340.

Hirota, S., Takahama, U., Ly, T. N. und Yamauchi, R.; Quercetin-dependent inhibition of nitration induced by peroxidase/H₂O₂/nitrite systems in human saliva and characterization of an oxidation product of quercetin formed during the inhibition. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3265-3272.

Hong, J., Lu, H., Meng, X., Ryu, J. H., Hara, Y. und Yang, C. S.; Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 7241-7246.

Hong, Y. J. und Mitchell, A. E.; Metabolic profiling of flavonol metabolites in human urine by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6794-6801.

Huemmer, W., Dietrich, H., Will, F., Schreier, P. und Richling, E.; Content and mean polymerization degree of procyanidins in extracts obtained from clear and cloudy apple juices. *Biotechnol. J.* **2008**, *3*, 234-243.

Hunter, J. und Hirst, B. H.; Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *25*, 129-157.

Hunter, J., Hirst, B. H. und Simmons, N. L.; Epithelial secretion of vinblastine by human intestinal adenocarcinoma cell (HCT-8 and T84) layers expressing P-glycoprotein. *Br. J. Cancer* **1991**, *64*, 437-444.

Hvattum, E., Stenstrom, Y. und Ekeberg, D.; Study of the reaction products of flavonols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl using liquid chromatography coupled with negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1570-1581.

Ikeno, A., Hashimoto, K., Shimizu, M., Terao, J., Kumazawa, S. und Nakayama, T.; Absorption and Metabolism of Quercetin in Caco-2 Cells. *Food Sci. Technol. Res.* **1999**, *5*, 90-92.

Irvine, E. J. und Marshall, J. K.; Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology* **2000**, *119*, 1740-1744.

Jedrychowski, W. und Maugeri, U.; An apple a day may hold colorectal cancer at bay: recent evidence from a case-control study. *Rev. Environ. Health* **2009**, *24*, 59-74.

Jiang, Z. Y., Woollard, A. C. und Wolff, S. P.; Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett.* **1990**, *268*, 69-71.

Jimenez, M. und Garcia-Carmona, F.; Oxidation of the flavonol quercetin by polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 56-60.

Jungbluth, G., Ruhling, I. und Ternes, W.; Oxidation of flavonols with Cu(II), Fe(II) and Fe(III) in aqueous media. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2000**, 1946-1952.

Kahle, K.; Polyphenole aus Apfelsaft: Studien zur Verfügbarkeit im Humanstoffwechsel. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2008**.

Kahle, K., Huemmer, W., Kempf, M., Scheppach, W., Erk, T. und Richling, E.; Polyphenols are intensively metabolized in the human gastrointestinal tract after apple juice consumption. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10605-10614.

Kahle, K., Kraus, M. und Richling, E.; Polyphenol profiles of apple juices. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005a**, *49*, 797-806.

Kahle, K., Kraus, M., Scheppach, W. und Richling, E.; Colonic availability of apple polyphenols--a study in ileostomy subjects. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005b**, *49*, 1143-1150.

Kaiser, E., Pust, S., Kroll, C. und Barth, H.; Cyclophilin A facilitates translocation of the Clostridium botulinum C2 toxin across membranes of acidified endosomes into the cytosol of mammalian cells. *Cell. Microbiol.* **2009**, *11*, 780-795.

Kern, S. M., Bennett, R. N., Needs, P. W., Mellon, F. A., Kroon, P. A. und 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.

Kim, M., Kometani, T., Okada, S. und Shimuzu, M.; Permeation of hesperidin glycosides across Caco-2 cell monolayers via the paracellular pathway. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, *63*, 2183-2188.

Klingberg, T. D., Pedersen, M. H., Cencic, A. und Budde, B. B.; Application of measurements of transepithelial electrical resistance of intestinal epithelial cell monolayers to evaluate probiotic activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 7528-7530.

Kobayashi, S., Tanabe, S., Sugiyama, M. und Konishi, Y.; Transepithelial transport of hesperetin and hesperidin in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biochim. Biophys. Acta.* **2008**, *1778*, 33-41.

Kobori, M., Masumoto, S., Akimoto, Y. und Takahashi, Y.; Dietary quercetin alleviates diabetic symptoms and reduces streptozotocin-induced disturbance of hepatic gene expression in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 859-868.

Konishi, Y.; Modulations of food-derived substances on intestinal permeability in Caco-2 cell monolayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 2297-2299.

Konishi, Y.; Transepithelial transport of microbial metabolites of quercetin in intestinal Caco-2 cell monolayers. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 601-607.

Konishi, Y. und Kobayashi, S.; Microbial metabolites of ingested caffeic acid are absorbed by the monocarboxylic acid transporter (MCT) in intestinal Caco-2 cell monolayers. *J. Agric. Food Chem.* **2004a**, *52*, 6418-6424.

Konishi, Y. und Kobayashi, S.; Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal caco-2 cell monolayers. *J. Agric. Food Chem.* **2004b**, *52*, 2518-2526.

- Konishi, Y., Kobayashi, S. und Shimizu, M.; Transepithelial transport of p-coumaric acid and gallic acid in Caco-2 cell monolayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 2317-2324.
- Konishi, Y. und Shimizu, M.; Transepithelial transport of ferulic acid by monocarboxylic acid transporter in Caco-2 cell monolayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 856-862.
- Krishnamachari, V., Levine, L. H., Zhou, C. und Pare, P. W.; In vitro flavon-3-ol oxidation mediated by a B ring hydroxylation pattern. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 795-804.
- Kubo, I., Nihei, K. und Shimizu, K.; Oxidation products of quercetin catalyzed by mushroom tyrosinase. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5343-5347.
- Kuo, S. M.; Transepithelial transport and accumulation of flavone in human intestinal Caco-2 cells. *Life Sci.* **1998**, *63*, 2323-2331.
- Labib, S., Erb, A., Kraus, M., Wickert, T. und Richling, E.; The pig caecum model: a suitable tool to study the intestinal metabolism of flavonoids. *Mol. Nutr. Food Res.* **2004**, *48*, 326-332.
- Labib, S., Hummel, S., Richling, E., Humpf, H. U. und Schreier, P.; Use of the pig caecum model to mimic the human intestinal metabolism of hispidulin and related compounds. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 78-86.
- Lafay, S. und Gil-Izquierdo, A.; Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem. Rev.* **2008**, *7*, 301-311.
- Lampe, J. W.; Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, *70*, 475S-490S.
- Lapidot, T., Walker, M. D. und 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.* **2002**, *50*, 3156-3160.
- Laukoetter, M. G., Nava, P. und Nusrat, A.; Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **2008**, *14*, 401-407.

Le Nest, G., Caille, O., Woudstra, M., Roche, S., Burlat, B., Belle, V., Guigliarelli, B. und Lexa, D.; Zn-polyphenol chelation: complexes with quercetin, (+)-catechin, and derivatives: II Electrochemical and EPR studies. *Inorg. Chim. Acta* **2004**, *357*, 2027-2037.

Lee, K. W., Hur, H. J., Lee, H. J. und Lee, C. Y.; Antiproliferative effects of dietary phenolic substances and hydrogen peroxide. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1990-1995.

Leslie, E. M., Deeley, R. G. und Cole, S. P.; Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *204*, 216-237.

Lewinsky, R. H., Smith, P. A. und Mackenzie, P. I.; Glucuronidation of bioflavonoids by human UGT1A10: structure-function relationships. *Xenobiotica* **2005**, *35*, 117-129.

Li, H., Flachowsky, H., Fischer, T. C., Hanke, M. V., Forkmann, G., Treutter, D., Schwab, W., Hoffmann, T. und Szankowski, I.; Maize Lc transcription factor enhances biosynthesis of anthocyanins, distinct proanthocyanidins and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Planta* **2007**, *226*, 1243-1254.

Liu, R. H. und Sun, J.; Antiproliferative activity of apples is not due to phenolic-induced hydrogen peroxide formation. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1718-1723.

Liu, Z., Li, N. und Neu, J.; Tight junctions, leaky intestines, and pediatric diseases. *Acta Paediatr.* **2005**, *94*, 386-393.

Long, L. H., Clement, M. V. und Halliwell, B.; Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *273*, 50-53.

Loth, H. und Diedrich, H.; Quinones from Flavone and Flavonol Derivatives. *Tetrahedron Lett.* **1968**, 715-718.

Loucks, D. C. und Buell, M. G.; The Differing Protective Effects of Short-Chain Fatty-Acids on Ethanol-Induced Colonic Mucosal Injury. *Gastroenterology* **1994**, *106*, A1036-A1036.

Lowes, S. und Simmons, N. L.; Human intestinal cell monolayers are preferentially sensitive to disruption of barrier function from basolateral exposure to cholic acid: correlation with membrane transport and transepithelial secretion. *Pflugers Arch.* **2001**, *443*, 265-273.

Lowes, S. und Simmons, N. L.; Multiple pathways for fluoroquinolone secretion by human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *135*, 1263-1275.

MacDougall, D. und Crummett, W. B.; Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 2242-2249.

Madara, J. L., Stafford, J., Dharmasathaphorn, K. und Carlson, S.; Structural analysis of a human intestinal epithelial cell line. *Gastroenterology* **1987**, *92*, 1133-1145.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. und Jimenez, L.; Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727-747.

Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. und Remesy, C.; Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* **2005**, *81*, 230S-242S.

Maoela, M. S., Arotiba, O. A., Baker, P. G. L., Mabusela, W. T., Jahed, N., Songa, E. A. und Iwouha, E. I.; Electroanalytical determination of catechin flavonoid in ethyl acetate extracts of medicinal plants. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2009**, *4*, 1497-1510.

Mariadason, J. M., Barkla, D. H. und Gibson, P. R.; Effect of short-chain fatty acids on paracellular permeability in Caco-2 intestinal epithelium model. *Am. J. Physiol.* **1997**, *272*, G705-712.

Marin, M. L., Greenstein, A. J., Geller, S. A., Gordon, R. E. und Aufses, A. H., Jr.; A freeze fracture study of Crohn's disease of the terminal ileum: changes in epithelial tight junction organization. *Am. J. Gastroenterol.* **1983**, *78*, 537-547.

Marks, S. C., Mullen, W., Borges, G. und Crozier, A.; Absorption, metabolism, and excretion of cider dihydrochalcones in healthy humans and subjects with an ileostomy. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 2009-2015.

Masumoto, S., Akimoto, Y., Oike, H. und Kobori, M.; Dietary phloridzin reduces blood glucose levels and reverses SglT1 expression in the small intestine in streptozotocin-induced diabetic mice. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4651-4656.

Matsumoto, M., Matsukawa, N., Mineo, H., Chiji, H. und Hara, H.; A soluble flavonoid-glycoside, alphaG-rutin, is absorbed as glycosides in the isolated gastric and intestinal mucosa. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 1929-1934.

Maubon, N., Le Vee, M., Fossati, L., Audry, M., Le Ferrec, E., Bolze, S. und Fardel, O.; Analysis of drug transporter expression in human intestinal Caco-2 cells by real-time PCR. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2007**, *21*, 659-663.

McCann, M. J., Gill, C. I., O' Brien, G., Rao, J. R., McRoberts, W. C., Hughes, P., McEntee, R. und Rowland, I. R.; Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 1224-1230.

McCool, D. J., Marcon, M. A., Forstner, J. F. und Forstner, G. G.; The T84 human colonic adenocarcinoma cell line produces mucin in culture and releases it in response to various secretagogues. *Biochem. J.* **1990**, *267*, 491-500.

McGuckin, M. A., Eri, R., Simms, L. A., Florin, T. H. und Radford-Smith, G.; Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* **2009**, *15*, 100-113.

Miller, E. R. und Ullrey, D. E.; The pig as a model for human nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* **1987**, *7*, 361-382.

Mitic, L. L., Van Itallie, C. M. und Anderson, J. M.; Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **2000**, *279*, G250-254.

Mizuma, T. und Awazu, S.; Inhibitory effect of phloridzin and phloretin on glucuronidation of p-nitrophenol, acetaminophen and 1-naphthol: kinetic demonstration of the influence of glucuronidation metabolism on intestinal absorption in rats. *Biochim. Biophys. Acta.* **1998**, *1425*, 398-404.

Moon, Y. J., Wang, X. und Morris, M. E.; Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol. In Vitro* **2006**, *20*, 187-210.

Morris, M. E. und Zhang, S.; Flavonoid-drug interactions: Effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sci.* **2006**, *78*, 2116-2130.

Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Ruth, P. und Schäfer-Korting, M.; *Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 9. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, **2008**.

Natali, F., Siculella, L., Salvati, S. und Gnoni, G. V.; Oleic acid is a potent inhibitor of fatty acid and cholesterol synthesis in C6 glioma cells. *J. Lipid Res.* **2007**, *48*, 1966-1975.

Negishi, H., Xu, J. W., Ikeda, K., Njelekela, M., Nara, Y. und Yamori, Y.; Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 38-42.

Neveu, V., Perez-Jimenez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D. und Scalbert, A.; Online: <http://www.phenol-explorer.eu>, 5. Mai **2010**.

Nishimura, M. und Naito, S.; Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2005**, *20*, 452-477.

Ohno, Y., Naganuma, T., Ogawa, T. und Muramoto, K.; Effect of lectins on the transport of food factors in caco-2 cell monolayers. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 548-553.

Olthof, M. R., Hollman, P. C. und Katan, M. B.; Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 66-71.

Organic Chemistry Portal; Online: <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>, 26. August **2010**.

Papadopoulou, A., Green, R. J. und Frazier, R. A.; Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 158-163.

Pariwat, P., Homvisasevongsa, S., Muanprasat, C. und Chatsudthipong, V.; A natural plant-derived dihydroisosteviol prevents cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *324*, 798-805.

Piche, T., Barbara, G., Aubert, P., Bruley des Varannes, S., Dainese, R., Nano, J. L., Cremon, C., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Galmiche, J. P. und Neunlist, M.; Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* **2009**, *58*, 196-201.

Pietta, P. G.; Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035-1042.

Poquet, L., Clifford, M. N. und Williamson, G.; Investigation of the metabolic fate of dihydrocaffeic acid. *Biochem. Pharmacol.* **2008a**, *75*, 1218-1229.

Poquet, L., Clifford, M. N. und Williamson, G.; Transport and metabolism of ferulic acid through the colonic epithelium. *Drug Metab. Dispos.* **2008b**, *36*, 190-197.

Porath, D., Riegger, C., Drewe, J. und Schwager, J.; Epigallocatechin-3-gallate impairs chemokine production in human colon epithelial cell lines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 1172-1180.

Powell, D. W.; Barrier function of epithelia. *Am. J. Physiol.* **1981**, *241*, G275-288.

Prasad, S., Mingrino, R., Kaukinen, K., Hayes, K. L., Powell, R. M., MacDonald, T. T. und Collins, J. E.; Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab. Invest.* **2005**, *85*, 1139-1162.

Prime-Chapman, H. M., Fearn, R. A., Cooper, A. E., Moore, V. und Hirst, B. H.; Differential multidrug resistance-associated protein 1 through 6 isoform expression and function in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *311*, 476-484.

Prior, R. L.; Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *78*, 570S-578S.

Ramos, F. A., Takaishi, Y., Shirotori, M., Kawaguchi, Y., Tsuchiya, K., Shibata, H., Higuti, T., Tadokoro, T. und Takeuchi, M.; Antibacterial and antioxidant activities of quercetin oxidation products from yellow onion (*Allium cepa*) skin. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3551-3557.

Rasmussen, S. E., Frederiksen, H., Struntze Krogholm, K. und Poulsen, L.; Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 159-174.

Rechner, A.; Einfluss der Verarbeitungstechnik auf die Polyphenole und antioxidative Kapazität von Apfel und Beerenobstsäften. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, **2000**.

Rehner, G. und Daniel, H.; *Biochemie der Ernährung*. 2. Auflage, Spektrum, Akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin, **2002**.

Reynolds, D. P., Lanevskij, K., Japertas, P., Didziapetris, R. und Petrauskas, A.; Ionization-specific analysis of human intestinal absorption. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 4039-4054.

Rogoll, D., Bergmann, H., Hellenschmidt, D., Heinze, J., Scheppach, W., Melcher, R. und Richling, E.; Influence of apple polyphenols on the intestinal barrier in a colonic cell model. *J. Appl. Bot. Food Qual.* **2010**, *83*, 110-117.

Rohloff, J. C., Kent, K. M., Postich, M. J., Becker, M. W., Chapman, H. H., Kelly, D. E., Lew, W., Louie, M. S., McGee, L. R., Prisbe, E. J., Schultze, L. M., Yu, R. H. und Zhang, L.; Practical Total Synthesis of the Anti-Influenza Drug GS-4104. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4545-4550.

Romier, B., Schneider, Y. J., Larondelle, Y. und During, A.; Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutr. Rev.* **2009**, *67*, 363-378.

Ross, J. A. und Kasum, C. M.; Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.* **2002**, *22*, 19-34.

Sambruy, Y., Ferruzza, S., Ranaldi, G. und De Angelis, I.; Intestinal cell culture models: applications in toxicology and pharmacology. *Cell Biol. Toxicol.* **2001**, *17*, 301-317.

Sandek, A., Rauchhaus, M., Anker, S. D. und von Haehling, S.; The emerging role of the gut in chronic heart failure. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2008**, *11*, 632-639.

Sang, S., Lee, M. J., Hou, Z., Ho, C. T. und Yang, C. S.; Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9478-9484.

Sawai, Y., Moon, J. H., Sakata, K. und Watanabe, N.; Effects of structure on radical-scavenging abilities and antioxidative activities of tea polyphenols: NMR analytical approach using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3598-3604.

Sawai, Y. und Sakata, K.; NMR analytical approach to clarify the antioxidative molecular mechanism of catechins using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 111-114.

Scalbert, A., Johnson, I. T. und Saltmarsh, M.; Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005a**, *81*, 215S-217S.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C. und Jimenez, L.; Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005b**, *45*, 287-306.

Scalbert, A., Morand, C., Manach, C. und Remesy, C.; Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed. Pharmacother.* **2002**, *56*, 276-282.

Scalbert, A. und Williamson, G.; Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2073S-2085S.

Scheppach, W., Dusel, G., Kuhn, T., Loges, C., Karch, H., Bartram, H. P., Richter, F., Christl, S. U. und Kasper, H.; Effect of L-glutamine and n-butyrate on the restitution of rat colonic mucosa after acid induced injury. *Gut* **1996**, *38*, 878-885.

Schieber, A., Keller, P. und Carle, R.; Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2001**, *910*, 265-273.

Schürmann, G.; Der künstliche Darmausgang Enterostoma - Wann wird was wie angelegt? *DCCV-Journal "Bauchredner"* **2001**, 1, 12-18.

Sefkow, M.; First efficient synthesis of chlorogenic acid. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1137-1141.

Sefkow, M., Kelling, A. und Schilde, U.; First efficient syntheses of 1-, 4-, and 5-caffeoylquinic acid. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2735-2742.

Seithel, A., Karlsson, J., Hilgendorf, C., Bjorquist, A. und Ungell, A. L.; Variability in mRNA expression of ABC- and SLC-transporters in human intestinal cells: comparison between human segments and Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, 28, 291-299.

Shao, X., Bai, N., He, K., Ho, C. T., Yang, C. S. und Sang, S.; Apple polyphenols, phloretin and phloridzin: new trapping agents of reactive dicarbonyl species. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, 21, 2042-2050.

Shapiro, H., Singer, P., Halpern, Z. und Bruck, R.; Polyphenols in the treatment of inflammatory bowel disease and acute pancreatitis. *Gut* **2007**, 56, 426-435.

Shimazaki, T., Tomita, M., Sadahiro, S., Hayashi, M. und Awazu, S.; Absorption-enhancing effects of sodium caprate and palmitoyl carnitine in rat and human colons. *Dig. Dis. Sci.* **1998**, 43, 641-645.

Shimizu, M.; Modulation of intestinal functions by food substances. *Nahrung* **1999**, 43, 154-158.

Soler, A. P., Miller, R. D., Laughlin, K. V., Carp, N. Z., Klurfeld, D. M. und Mullin, J. M.; Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer. *Carcinogenesis* **1999**, 20, 1425-1431.

Stalmach, A., Troufflard, S., Serafini, M. und Crozier, A.; Absorption, metabolism and excretion of Choladi green tea flavan-3-ols by humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, 53 Suppl 1, S44-53.

Steinert, R. E., Ditscheid, B., Netzel, M. und Jahreis, G.; Absorption of black currant anthocyanins by monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells mounted in Ussing type chambers. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 4995-5001.

Strassburg, C. P., Nguyen, N., Manns, M. P. und Tukey, R. H.; UDP-glucuronosyltransferase activity in human liver and colon. *Gastroenterology* **1999**, *116*, 149-160.

Su, L., Shen, L., Clayburgh, D. R., Nalle, S. C., Sullivan, E. A., Meddings, J. B., Abraham, C. und Turner, J. R.; Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis. *Gastroenterology* **2009**, *136*, 551-563.

Suzuki, T. und Hara, H.; Quercetin enhances intestinal barrier function through the assembly of zonula occludens-2, occludin, and claudin-1 and the expression of claudin-4 in Caco-2 cells. *J. Nutr.* **2009**, *139*, 965-974.

Taipalensuu, J., Tornblom, H., Lindberg, G., Einarsson, C., Sjoqvist, F., Melhus, H., Garberg, P., Sjoström, B., Lundgren, B. und Artursson, P.; Correlation of Gene Expression of Ten Drug Efflux Proteins of the ATP-Binding Cassette Transporter Family in Normal Human Jejunum and in Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cell Monolayers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *299*, 164-170.

Tammela, P., Laitinen, L., Galkin, A., Wennberg, T., Heczko, R., Vuorela, H., Slotte, J. P. und Vuorela, P.; Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids and alkyl gallates in Caco-2 cells and in phospholipid vesicles. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *425*, 193-199.

Tanaka, T., Mine, C., Watarumi, S., Fujioka, T., Mihashi, K., Zhang, Y. J. und Kouno, I.; Accumulation of epigallocatechin quinone dimers during tea fermentation and formation of theasinensins. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1582-1587.

Tian, X. J., Yang, X. W., Yang, X. und Wang, K.; Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model. *Int. J. Pharm.* **2009**, *367*, 58-64.

Trugo, L. C. und Macrae, R.; Chlorogenic Acid Composition of Instant Coffees. *Analyst* **1984**, *109*, 263-266.

Turner, J. R.; Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am. J. Pathol.* **2006**, *169*, 1901-1909.

Turner, J. R., Angle, J. M., Black, E. D., Joyal, J. L., Sacks, D. B. und Madara, J. L.; PKC-dependent regulation of transepithelial resistance: roles of MLC and MLC kinase. *Am. J. Physiol.* **1999**, *277*, C554-562.

Turner, J. R., Rill, B. K., Carlson, S. L., Carnes, D., Kerner, R., Mrsny, R. J. und Madara, J. L.; Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. *Am. J. Physiol.* **1997**, *273*, C1378-1385.

Ussing, H. H. und Zerahn, K.; Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* **1951**, *23*, 110-127.

Vaidyanathan, J. B. und Walle, T.; Transport and metabolism of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human intestinal cell line Caco-2. *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 1420-1425.

Vaidyanathan, J. B. und Walle, T.; Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-)-epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *307*, 745-752.

van der Woude, H., Boersma, M. G., Vervoort, J. und 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.

van der Woude, H., Gliszczynska-Swiglo, A., Struijs, K., Smeets, A., Alink, G. M. und Rietjens, I. M.; Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. *Cancer Lett.* **2003**, *200*, 41-47.

Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e. V.; Online: <http://www.fruchtsaft.net>, 05. Mai **2010**.

Vodicka, P., Smetana, K., Jr., Dvorankova, B., Emerick, T., Xu, Y. Z., Ourednik, J., Ourednik, V. und Motlik, J.; The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Ann. N Y Acad. Sci.* **2005**, *1049*, 161-171.

- Walgren, R. A., Walle, U. K. und Walle, T.; Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 1721-1727.
- Wallon, C., Braaf, Y., Wolving, M., Olaison, G. und Soderholm, J. D.; Endoscopic biopsies in Ussing chambers evaluated for studies of macromolecular permeability in the human colon. *Scand. J. Gastroenterol.* **2005**, *40*, 586-595.
- Watanabe, H., Yashiro, T., Tohjo, Y. und Konishi, Y.; Non-involvement of the human monocarboxylic acid transporter 1 (MCT1) in the transport of phenolic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 1928-1933.
- Wee, L. M., Long, L. H., Whiteman, M. und Halliwell, B.; Factors affecting the ascorbate- and phenolic-dependent generation of hydrogen peroxide in Dulbecco's Modified Eagles Medium. *Free Radic. Res.* **2003**, *37*, 1123-1130.
- Weiler, F., Marbe, T., Scheppach, W. und Schaubert, J.; Influence of protein kinase C on transcription of the tight junction elements ZO-1 and occludin. *J. Cell. Physiol.* **2005**, *204*, 83-86.
- White, J. F.; Intestinal pathophysiology in autism. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **2003**, *228*, 639-649.
- Will, F., Zessner, H., Becker, H. und Dietrich, H.; Semi-preparative isolation and physico-chemical characterization of 4-coumaroylquinic acid and phloretin-2 '-xylogluco side from laccase-oxidized apple juice. *LWT-Food Sci. Technol.* **2007**, *40*, 1344-1351.
- Williamson, G., Barron, D., Shimoi, K. und Terao, J.; In vitro biological properties of flavonoid conjugates found in vivo. *Free Radic. Res.* **2005**, *39*, 457-469.
- Winkel-Shirley, B.; Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* **2001**, *126*, 485-493.
- Wojdylo, A., Oszmianski, J. und Laskowski, P.; Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6520-6530.

- Wolffram, S., Block, M. und Ader, P.; Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 630-635.
- Wu, C. H., Lin, J. A., Hsieh, W. C. und Yen, G. C.; Low-density-lipoprotein (LDL)-bound flavonoids increase the resistance of LDL to oxidation and glycation under pathophysiological concentrations of glucose in vitro. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 5058-5064.
- Wu, X., Pittman, H. E., 3rd und Prior, R. L.; Fate of anthocyanins and antioxidant capacity in contents of the gastrointestinal tract of weanling pigs following black raspberry consumption. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 583-589.
- Wyatt, J., Vogelsang, H., Hubl, W., Waldhoer, T. und Lochs, H.; Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* **1993**, *341*, 1437-1439.
- Xiao, J., Cao, H., Wang, Y., Zhao, J. und Wei, X.; Glycosylation of Dietary Flavonoids Decreases the Affinities for Plasma Protein. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *57*, 6642-6648.
- Yang, C. S., Sang, S., Lambert, J. D. und Lee, M. J.; Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52 Suppl 1*, S139-151.
- Zhang, L., Zheng, Y., Chow, M. S. und Zuo, Z.; Investigation of intestinal absorption and disposition of green tea catechins by Caco-2 monolayer model. *Int. J. Pharm.* **2004**, *287*, 1-12.
- Zhao, Z. und Moghadasian, M. H.; Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chem.* **2008**, *109*, 691-702.
- Zhu, Q. Y., Zhang, A. Q., Tsang, D., Huang, Y. und Chen, Z. Y.; Stability of green tea catechins. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4624-4628.

8 Danksagung

Mein Dank gilt:

- Elke für die Überlassung des interessanten Themas dieser Doktorarbeit, für das entgegengebrachte Vertrauen, die wertvollen Hilfestellungen, die Ideen und anregenden Diskussionen.
- den „Würzburgern“. Prof. Dr. Scheppach und Ralph für ihre guten Ideen und anregenden Diskussionen; Antje, Donata, Kerstin und allen anderen guten Seelen im Labor für die Durchführung eines Teils der Experimente und die hilfreichen Diskussionen und Antworten auf alle möglichen Fragen. Ganz besonders danke ich Doro, ohne die die ganze Durchführung so nicht hätte stattfinden können, für ihre Hilfe bei den Auswertungen und anderen Problemen.
- den Forschungspraktikanten Barbara Lang, Miriam Essers, Andreas Rau, Manuel Fischer und Isabel Groh deren Arbeiten in meine Dissertation eingeflossen sind.
- Karl-Heinz und Xinlai für ihre Hilfe bei den Synthesen.
- Phillip für die Hilfe bei den Wasserstoffperoxidmessungen, Ingrid, Eva, Ari und Rainer für ihre Hilfe bei kleineren und größeren Problemen, Sylvia für ihre Hilfe im Labor.
- dem Arbeitskreis von Prof. A. Rosenwald (Pathologie Universitätsklinik Würzburg) für die Nutzung des konfokalen Lasermikroskops.
- Prof. Schrenk und den anderen Mitgliedern des „Apfelnetzwerks“ für ihre konstruktive Kritik und die gute Zusammenarbeit.
- Doris Leipold für die gute, produktive und herzliche Zusammenarbeit.
- Julia und Franz für die schönen Zeiten am MS.
- dem ganzen Arbeitskreis Richling für die gute Zusammenarbeit, die Hilfe bei manchen Dingen, die Diskussionen und den Spaß, den wir bei der Arbeit hatten.
- den Diplomanden Steffi und Simone sowie allen Forschungspraktikanten die ich betreuen durfte.
- dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die finanzielle Unterstützung.
- Markus für die ruhige Zeit in unserem gemeinsamen Büro, für seine kritischen Bemerkungen zu fast allem (aus denen ich oft Nutzen gezogen habe), seine Bereitschaft mir immer zu helfen und seine Freundschaft.
- Gina, Gudi, Jens und Robert für die herzliche Freundschaft.
- den Korrekturlesern Mama, Markus, Stefan, Eva, Anja, Silke und Tamara für ihre wertvollen Anmerkungen.
- meinen Eltern und Geschwistern und ganz besonders meinem Mann Stefan, für die Unterstützung in jeder Hinsicht während des Studiums und der Promotion.

9 Anhang

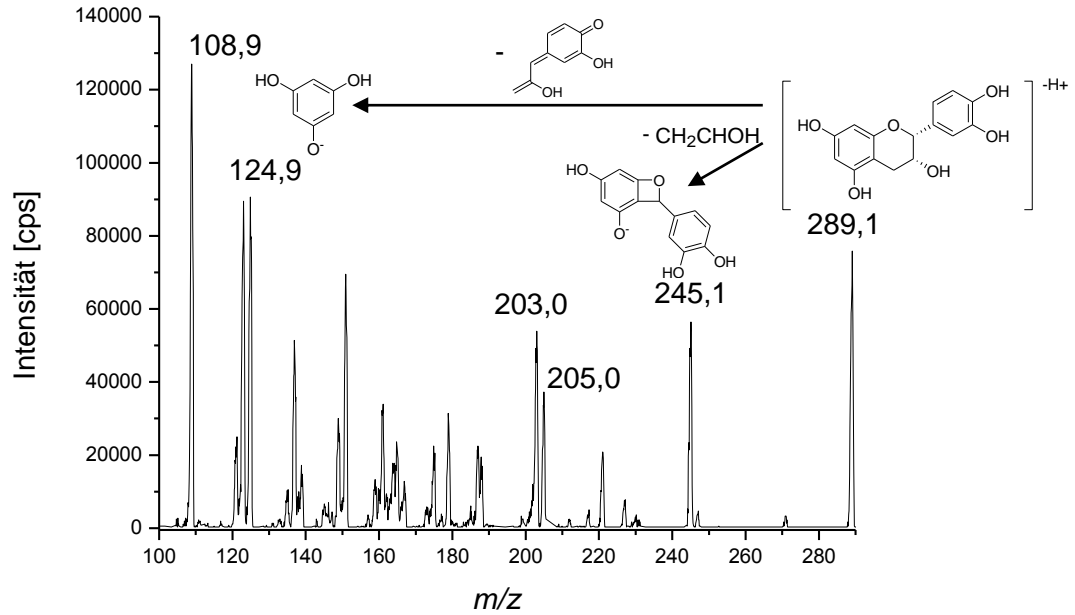


Abbildung 9-1: ESI_{neg}-MS/MS-Produktionenspektrum von (-)-Epicatechin (Precursorion $m/z = 289,1$).

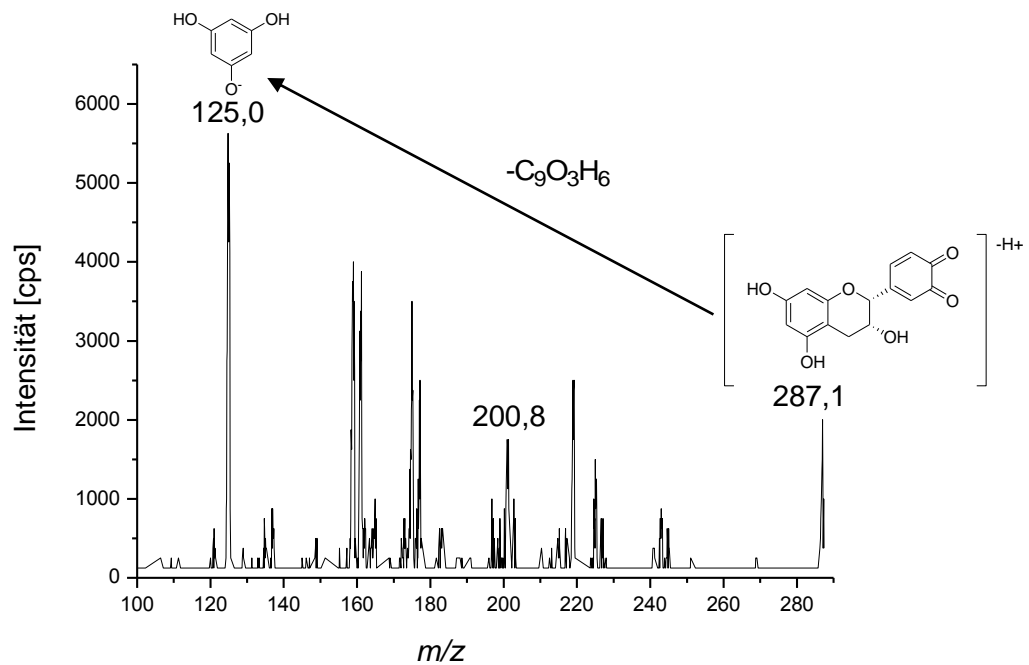


Abbildung 9-2: ESI_{neg}-MS/MS-Produktionenspektrum von (-)-Epicatechinchinon (Precursorion $m/z = 287,1$), Abbauprodukt von (-)-Epicatechin.

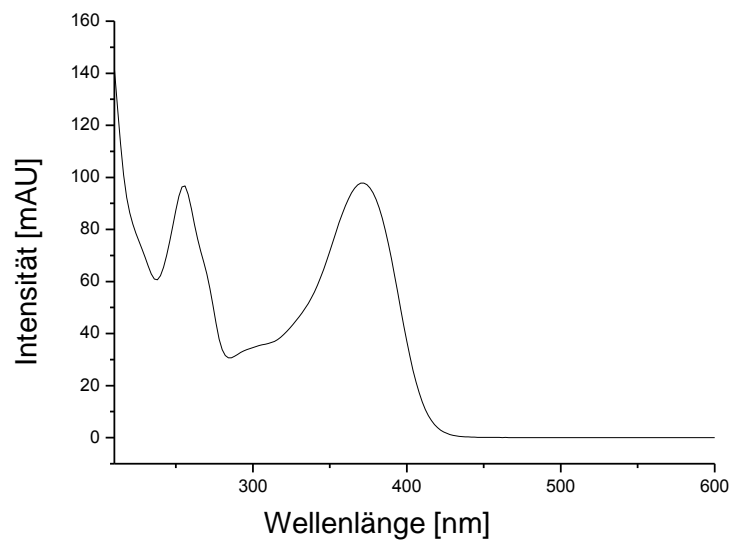


Abbildung 9-3: UV/VIS-Spektrum von Quercetin.

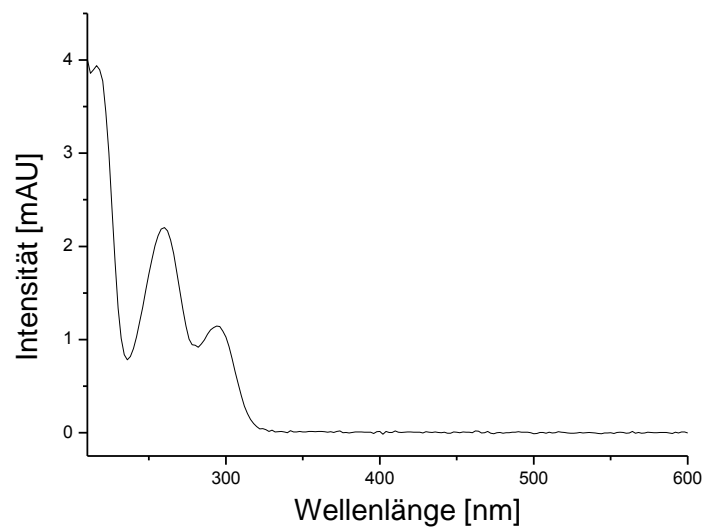


Abbildung 9-4: UV/VIS-Spektrum von 3,4-Dihydroxybenzoesäure, Abbauprodukt AQ1 von Quercetin in HBSS.

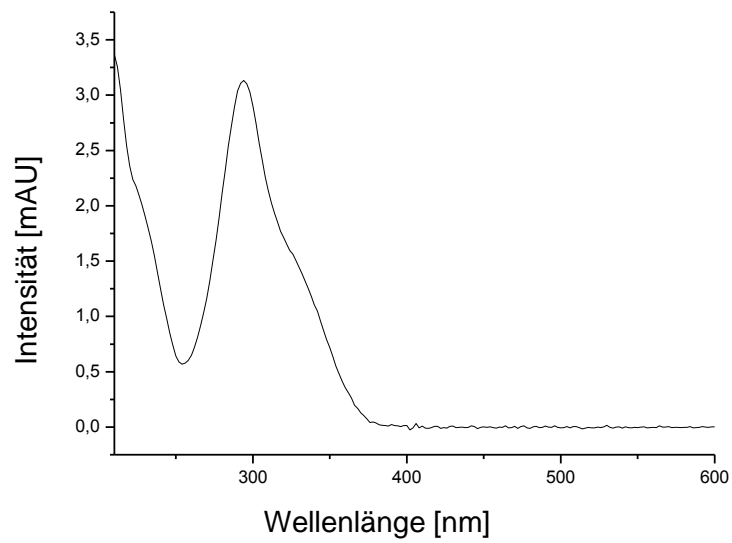


Abbildung 9-5: UV/VIS-Spektrum von 2,5,7,3',4'-Pentahydroxy-3,4-flavandion, Abbauprodukt AQ2 von Quercetin in HBSS.

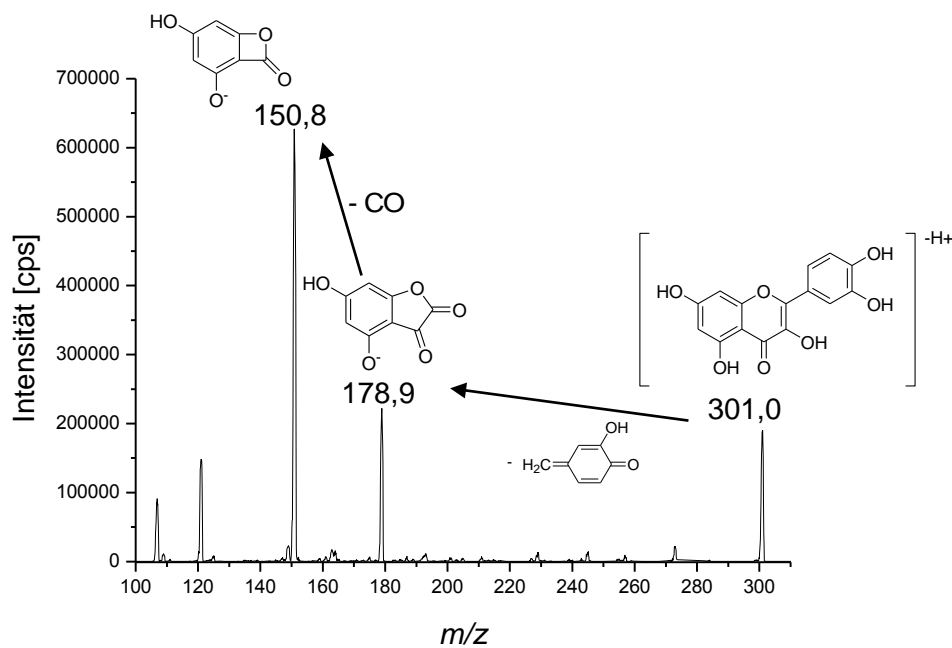


Abbildung 9-6: ESI_{neg}-MS/MS-Produktionspektrum von Quercetin (Precursorion $m/z = 301,0$).

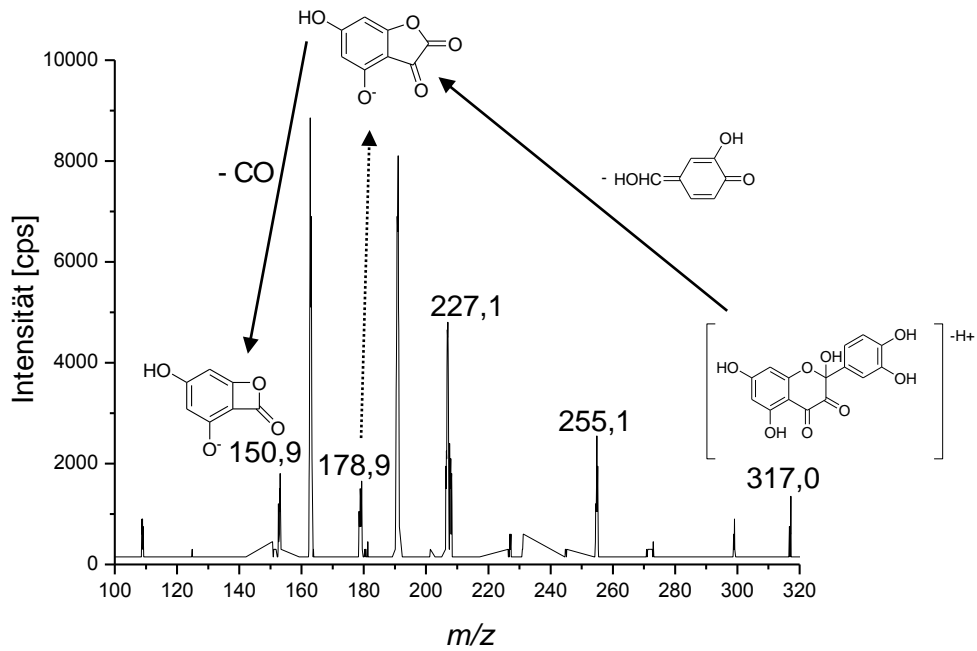


Abbildung 9-7: ESI_{neg}-MS/MS-Produktionenspektrum von 2,5,7,3',4'-Pentahydroxy-3,4-flavandion, Abbauprodukt AQ2 von Quercetin in HBSS (Precursorion $m/z = 317,0$).

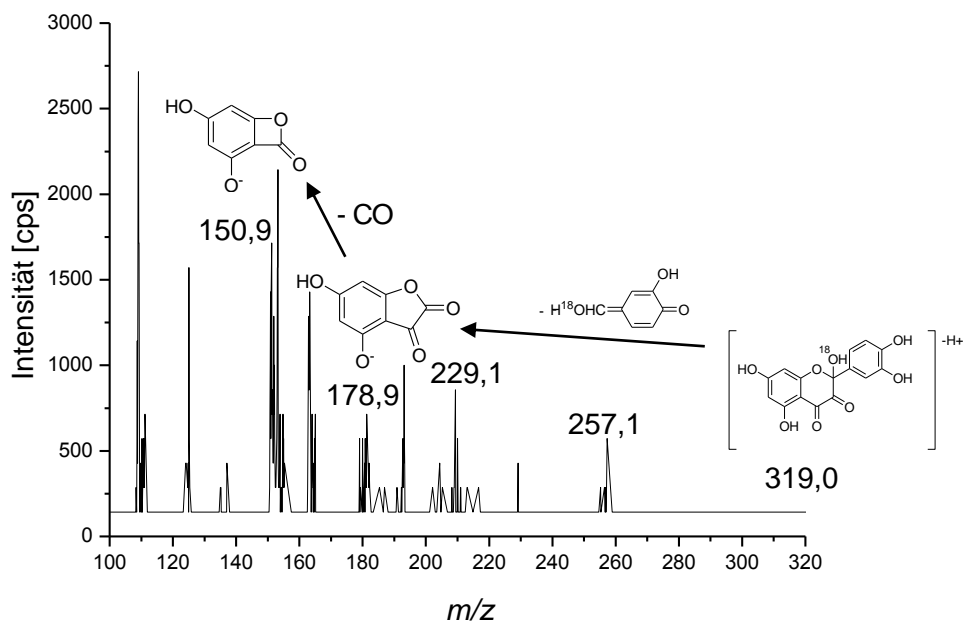


Abbildung 9-8: ESI_{neg}-MS/MS-Produktionenspektrum von 2,5,7,3',4'-Pentahydroxy-3,4-flavandion, Abbauprodukt ¹⁸O₂-AQ2 von Quercetin in mit ¹⁸O₂-gesättigtem HBSS (Precursorion $m/z = 319,0$).

Tabelle 9-1: Absorptionsstudien mit T84-Monolayern. Verteilung (Anteil der Inkubationskonzentration [%]) der Hydroxyzimtsäuren, Flavonoide und D(-)-Chinasäure auf der apikalen und basolateralen Seite der Ussing-Kammer. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. n.d.= nicht detektierbar.

Substanz	Seite	1 h	2 h	3 h	4 h
Hydroxyzimtsäuren					
Zimtsäure	apikal	90,3 \pm 0,8	86,3 \pm 3,1	79,4 \pm 3,9	74,1 \pm 3,4
	basolateral	13,0 \pm 1,0	19,9 \pm 2,1	26,4 \pm 2,8	29,0 \pm 4,9
Dihydrozimtsäure	apikal	102,2 \pm 0,3	85,2 \pm 1,2	85,7 \pm 3,3	67,1 \pm 5,8
	basolateral	n.d.	n.d.	17,9 \pm 13,5	24,8 \pm 0,6
<i>p</i> -Coumarsäure	apikal	102,6 \pm 1,5	106,4 \pm 3,2	109,8 \pm 2,9	109,7 \pm 1,7
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kaffeesäure	apikal	94,0 \pm 0,4	92,2 \pm 2,6	89,5 \pm 2,8	82,9 \pm 6,7
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dihydrokaffeesäure	apikal	67,4 \pm 7,9	51,5 \pm 9,9	36,8 \pm 8,1	23,2 \pm 6,3
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ferulasäure	apikal	97,9 \pm 3,4	100,9 \pm 1,2	102,4 \pm 4,3	102,7 \pm 4,4
	basolateral	0,0 \pm 0,0	0,5 \pm 0,1	1,8 \pm 0,6	2,3 \pm 0,2
Isoferulasäure	apikal	98,4 \pm 3,8	99,5 \pm 5,5	100,4 \pm 8,7	102,4 \pm 12,8
	basolateral	0,3 \pm 0,6	0,9 \pm 1,0	2,0 \pm 1,6	3,2 \pm 2,5
Dihydroferulasäure	apikal	100,8 \pm 0,6	106,1 \pm 4,9	110,5 \pm 2,6	115,0 \pm 10,1
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hydroxyzimtsäure-methylester					
<i>p</i> -Coumarsäuremethylester	apikal	77,5 \pm 1,0	64,2 \pm 1,7	54,3 \pm 2,4	52,8 \pm 4,0
	basolateral	20,8 \pm 1,0	31,8 \pm 1,5	36,3 \pm 1,5	37,9 \pm 2,2
Kaffeesäuremethylester	apikal	80,9 \pm 8,3	69,7 \pm 2,0	62,1 \pm 2,4	62,8 \pm 0,7
	basolateral	32,7 \pm 1,3	37,9 \pm 0,4	64,0 \pm 0,4	45,8 \pm 3,1
Ester der D(-)-Chinasäure					
4- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	apikal	98,0 \pm 4,1	93,6 \pm 1,9	91,2 \pm 2,3	88,2 \pm 5,3
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	apikal	97,4 \pm 9,4	95,1 \pm 0,9	96,6 \pm 9,8	93,9 \pm 10,5
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1-Kaffeoylchinasäure	apikal	95,8 \pm 1,8	102,4 \pm 8,5	97,8 \pm 9,4	94,9 \pm 3,6
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-Kaffeoylchinasäure	apikal	91,6 \pm 0,0	89,4 \pm 0,5	83,3 \pm 1,2	75,8 \pm 1,0
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4-Kaffeoylchinasäure	apikal	81,9 \pm 0,7	72,9 \pm 1,0	61,8 \pm 1,0	47,9 \pm 1,3
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5-Kaffeoylchinasäure	apikal	100,8 \pm 3,0	99,8 \pm 2,4	102,2 \pm 4,1	104,9 \pm 9,1
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Flavonoide					
Phloretin	apikal	75,3 \pm 0,8	64,8 \pm 0,3	58,2 \pm 2,0	52,1 \pm 0,6
	basolateral	0,3 \pm 0,1	1,3 \pm 0,0	2,3 \pm 0,1	3,8 \pm 0,6
Phloretin-2'- <i>O</i> -glucosid	apikal	96,7 \pm 2,0	101,2 \pm 12,7	108,9 \pm 10,1	110,5 \pm 6,4
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phloretin-2'- <i>O</i> -xyloglucosid	apikal	99,7 \pm 0,8	102,4 \pm 2,2	101,1 \pm 4,4	103,4 \pm 1,5
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin	apikal	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnosid	apikal	93,0 \pm 13,8	120,5 \pm 33,4	116,9 \pm 25,0	99,9 \pm 6,2
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(-)-Epicatechin	apikal	96,5 \pm 4,0	93,9 \pm 0,7	90,7 \pm 3,3	88,8 \pm 0,9
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(+) -Catechin	apikal	82,6 \pm 6,6	66,4 \pm 5,4	58,5 \pm 7,2	44,8 \pm 4,8
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Substanz	Seite	1 h	2 h	3 h	4 h
Intestinale Metabolite					
3,4-Dihydroxyphenyl- essigsäure	apikal	34,9 ± 26,2	8,0 ± 11,3	n.d.	n.d.
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3,4-Dihydroxytoluol	apikal	45,8 ± 12,5	21,2 ± 7,7	6,2 ± 5,2	n.d.
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phloroglucin	apikal	98,4 ± 7,0	98,1 ± 7,9	90,5 ± 9,7	86,8 ± 2,7
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
D-(-)-Chinasäure	apikal	126,5 ± 18,4	134,8 ± 6,0	103,0 ± 6,4	136,4 ± 16,5
	basolateral	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1

Tabelle 9-2: Absorptionsstudien mit T84-Monolayern nach Caprinsäurevorinkubation (C10). Inkubationskonzentrationen und Verteilung (Anteil der Inkubationskonzentration [%]) der Hydroxyzimtsäuren, Flavonoide und D(-)-Chinasäure auf der apikalen und basolateralen Seite der Ussing-Kammer nach 4 Stunden Inkubation. Zusätzlich ist angegeben, ob die Werte auf der basolateralen Seite sich signifikant von den Werten auf der basolateralen Seite nach Inkubation ohne C10 (siehe Tabelle 3-5) unterscheiden. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. n.d.= nicht detektierbar, - = keine Signifikanz, * = Signifikanz $p \leq 0,05$.

Substanz	Inkubations- konzentration [μ M]	Anteil der Inkubationskonzentration [%]		
		apikal	basolateral	Signifikanz
Hydroxyzimtsäuren				
Zimtsäure	20	77,1 \pm 6,7	32,9 \pm 1,2	-
Dihydrozimtsäure	20	75,0 \pm 2,1	24,0 \pm 2,3	-
<i>p</i> -Coumarsäure	20	82,6 \pm 26,4	n.d.	-
Kaffeesäure	20	42,2 \pm 25,7	n.d.	-
Dihydrokaffeesäure	20	58,1 \pm 4,5	n.d.	-
Ferulasäure	20	96,6 \pm 6,4	2,9 \pm 0,4	-
Isoferulasäure	20	94,5 \pm 5,4	6,4 \pm 1,6	-
Dihydroferulasäure	20	98,3 \pm 4,4	n.d.	-
Hydroxyzimtsäuremethylester				
<i>p</i> -Coumarsäuremethylester	20	50,8 \pm 2,0	37,2 \pm 3,2	-
Kaffeesäuremethylester	20	57,3 \pm 7,0	38,7 \pm 7,9	-
Ester der D(-)-Chinasäure				
4- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	10	79,5 \pm 4,8	n.d.	-
5- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	10	80,5 \pm 9,2	n.d.	-
1-Kaffeoylchinasäure	10	92,8 \pm 5,2	n.d.	-
3-Kaffeoylchinasäure	50	87,6 \pm 3,7	n.d.	-
4-Kaffeoylchinasäure	10	74,6 \pm 9,7	n.d.	-
5-Kaffeoylchinasäure	50	80,0 \pm 14,9	n.d.	-
Flavonoide				
Phloretin	20	43,2 \pm 9,4	6,6 \pm 0,7	*
Phloretin-2'-O-glucosid	20	97,0 \pm 9,5	n.d.	-
Phloretin-2'-O-xyloglucosid	20	103,7 \pm 3,0	n.d.	-
Quercetin	10	n.d.	n.d.	-
Quercetin-3-O-rhamnosid	10	94,7 \pm 5,8	n.d.	-
(-)-Epicatechin	10	75,2 \pm 13,11	n.d.	-
(+)-Catechin	10	28,3 \pm 6,2	n.d.	-
Intestinale Metabolite				
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure	10	n.d.	n.d.	-
3,4-Dihydroxytoluol	20	n.d.	n.d.	-
Phloroglucin	20	95,2 \pm 8,1	n.d.	-

Substanz	Inkubations- konzentration [μ M]	Anteil der Inkubationskonzentration [%]		
		apikal	basolateral	Signifikanz
D-(-)-Chinasäure	80	103,1 \pm 27,5	0,2 \pm 0,1	-

Tabelle 9-3: Absorptionsstudien mit T84-Monolayern nach Caprinsäurevorbehandlung. Verteilung (Anteil der Inkubationskonzentration [%]) der Hydroxyzimtsäuren, Flavonoide und D-(-)-Chinasäure auf der apikalen und basolateralen Seite der Ussing-Kammer. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus n = 3 unabhängigen Experimenten. n.d.= nicht detektierbar.

Substanz	Seite	1 h	2 h	3 h	4 h
Hydroxyzimtsäuren					
Zimtsäure	apikal	98,7 \pm 7,3	89,9 \pm 6,1	86,2 \pm 10,5	77,1 \pm 6,7
	basolateral	12,6 \pm 0,5	19,7 \pm 0,1	28,3 \pm 0,1	32,9 \pm 1,2
Dihydrozimtsäure	apikal	91,0 \pm 5,6	90,1 \pm 4,2	84,1 \pm 4,9	75,0 \pm 6,1
	basolateral	8,9 \pm 0,4	15,4 \pm 1,3	18,2 \pm 1,7	24,0 \pm 2,3
<i>p</i> -Coumarsäure	apikal	96,8 \pm 9,0	99,5 \pm 9,8	106,6 \pm 2,8	82,6 \pm 26,4
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kaffeesäure	apikal	65,0 \pm 20,7	51,2 \pm 27,6	46,5 \pm 25,9	42,2 \pm 25,7
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dihydrokaffeesäure	apikal	85,0 \pm 4,2	74,7 \pm 5,7	66,9 \pm 1,6	58,1 \pm 4,5
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ferulasäure	apikal	101,1 \pm 6,0	98,2 \pm 5,9	100,1 \pm 4,1	96,6 \pm 6,4
	basolateral	0,1 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	1,9 \pm 0,2	2,9 \pm 0,4
Isoferulasäure	apikal	95,6 \pm 3,0	96,9 \pm 4,2	96,0 \pm 1,4	94,5 \pm 5,4
	basolateral	0,7 \pm 0,4	2,5 \pm 0,3	4,1 \pm 0,9	6,4 \pm 1,6
Dihydroferulasäure	apikal	97,5 \pm 3,5	101,8 \pm 4,1	100,1 \pm 4,1	98,3 \pm 4,4
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hydroxyzimtsäure-methylester					
<i>p</i> -Coumarsäuremethylester	apikal	70,4 \pm 8,7	62,2 \pm 2,7	55,6 \pm 5,4	50,8 \pm 2,0
	basolateral	25,2 \pm 3,5	29,6 \pm 2,2	35,1 \pm 4,9	37,2 \pm 3,2
Kaffeesäuremethylester	apikal	88,3 \pm 4,9	72,6 \pm 5,4	67,0 \pm 8,4	57,3 \pm 7,0
	basolateral	31,7 \pm 6,1	38,6 \pm 8,4	40,3 \pm 8,1	38,7 \pm 7,9
Ester der D-(-)-Chinasäure					
4- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	apikal	91,0 \pm 2,3	89,8 \pm 1,9	78,7 \pm 2,8	79,5 \pm 3,5
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	apikal	102,0 \pm 2,4	99,8 \pm 5,3	99,4 \pm 5,1	80,5 \pm 9,2
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1-Kaffeoylchinasäure	apikal	98,9 \pm 3,3	95,6 \pm 2,0	95,5 \pm 3,8	92,8 \pm 5,2
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-Kaffeoylchinasäure	apikal	99,7 \pm 0,4	100,8 \pm 0,5	96,3 \pm 1,3	87,6 \pm 3,7
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4-Kaffeoylchinasäure	apikal	91,7 \pm 1,9	85,4 \pm 3,9	79,6 \pm 7,8	74,6 \pm 9,7
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5-Kaffeoylchinasäure	apikal	89,0 \pm 7,2	84,9 \pm 12,6	83,0 \pm 13,7	80,0 \pm 14,9
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Flavonoide					
Phloretin	apikal	70,4 \pm 1,4	55,2 \pm 5,0	41,6 \pm 2,9	43,2 \pm 9,4
	basolateral	4,1 \pm 0,5	5,6 \pm 0,7	6,8 \pm 1,4	6,6 \pm 0,7
Phloretin-2'-O-glucosid	apikal	100,8 \pm 2,2	102,6 \pm 1,4	100,0 \pm 2,4	97,0 \pm 0,5
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phloretin-2'-O-xyloglucosid	apikal	100,9 \pm 3,6	107,7 \pm 12,4	105,3 \pm 7,6	103,7 \pm 3,0
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin	apikal	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3-O-rhamnosid	apikal	98,9 \pm 3,2	97,2 \pm 4,9	96,3 \pm 4,8	94,7 \pm 5,8
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(-)-Epicatechin	apikal	94,2 \pm 2,3	93,8 \pm 1,6	91,0 \pm 2,8	75,2 \pm 13,1
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(+) -Catechin	apikal	61,5 \pm 4,2	47,0 \pm 5,9	32,7 \pm 4,7	28,3 \pm 6,2
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Intestinale Metabolite					
3,4-Dihydroxyphenyl-	apikal	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Substanz	Seite	1 h	2 h	3 h	4 h
essigsäure	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3,4-Dihydroxytoluol	apikal	67,1 ± 0,5	51,1 ± 6,5	30,3 ± 8,7	n.d.
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phloroglucin	apikal	110,4 ± 2,0	96,1 ± 14,8	88,1 ± 7,7	95,2 ± 8,1
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
D-(-)-Chinasäure	apikal	76,0 ± 6,9	85,8 ± 5,9	84,5 ± 7,4	103,1 ± 27,5
	basolateral	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1

Tabelle 9-4: Anteil der Inkubationskonzentration [%] ausgewählter Polyphenole im Cytosol, Zell-assoziiert und gesamt Zell-assoziiert in T84-Zellen nach vierstündiger Inkubation (50 µM). Die cytosolische Konzentration wurde nach Permeabilisierung der Zellen mit Digitonin ermittelt, anschließend wurde durch Lyse der Zell-assoziierte Anteil bestimmt. In einem weiteren Versuch wurde zur Kontrolle die gesamte Zell-assoziierte Konzentration durch Lyse ohne vorherige Digitonin-Behandlung bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte ± Stabw aus mindestens n = 4 unabhängigen Experimenten. n.d.= nicht detektierbar.

Substanz	cytosolisch [%]	Zell-assoziiert [%]	cytosolisch + Zell-assoziiert [%]	Zell-assoziiert gesamt [%]
Kaffeesäure	0,6 ± 0,0 ¹	n.d.	0,6 ± 0,0	1,0 ± 0,0 ²
5-Kaffeoylchinasäure	0,4 ± 0,1 ³	n.d.	0,4 ± 0,1	1,4 ± 0,6
Phloretin	2,9 ± 0,4	8,1 ± 1,2	11,0 ± 1,6	16,5 ± 2,2
Phloretin-2'-O-glucosid	2,1 ± 0,1	5,2 ± 1,8 ⁴	7,3 ± 1,9	6,5 ± 1,4 ⁴
Quercetin	2,8 ± 0,6	8,2 ± 2,5	11,0 ± 3,1	20,3 ± 9,2
Quercetin-3-O-rhamnosid	0,2 ± 0,1 ³	0,3 ± 0,2 ¹	0,5 ± 0,3	1,2 ± 0,8

¹ Mittelwert aus n = 2, drei Proben n.d., ² Mittelwert aus n = 3, zwei Proben n.d., ³ Mittelwert aus n = 4, eine Probe n.d., ⁴ Mittelwert aus n = 3, eine Probe n.d.

Tabelle 9-5: Absorptionsstudien mit Schweinedarmmukosa. Verteilung (Anteil der Inkubationskonzentration [%]) der Hydroxyzimtsäuren, Flavonoide und D(-)-Chinasäure auf der apikalen und basolateralen Seite der Ussing-Kammer. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus n = 3 unabhängigen Experimenten. n.d.= nicht detektierbar.

Substanz	Seite	1 h	2 h	3 h	4 h
Hydroxyzimtsäuren					
Zimtsäure	apikal	97,1 \pm 0,7	96,5 \pm 2,0	97,9 \pm 2,6	93,9 \pm 1,5
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dihydrozimtsäure	apikal	114,1 \pm 4,2	101,3 \pm 2,5	82,7 \pm 5,7	92,0 \pm 1,7
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>p</i> -Coumarsäure	apikal	104,8 \pm 0,5	105,0 \pm 4,7	106,5 \pm 8,5	100,5 \pm 2,0
	basolateral	0,0 \pm 0,0	0,1 \pm 0,2	1,0 \pm 0,0	3,3 \pm 1,8
Kaffeensäure	apikal	99,5 \pm 1,9	99,6 \pm 3,2	101,0 \pm 2,3	105,4 \pm 9,7
	basolateral	n.d.	3,0 \pm 0,0	3,4 \pm 0,0	3,7 \pm 0,1
Dihydrokaffeensäure	apikal	94,6 \pm 4,4	97,8 \pm 4,5	98,7 \pm 1,9	91,1 \pm 2,8
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ferulasäure	apikal	96,1 \pm 6,6	95,5 \pm 7,6	95,3 \pm 4,0	89,9 \pm 2,0
	basolateral	n.d.	0,4 \pm 0,5	1,0 \pm 0,7	1,2 \pm 1,1
Isoferulasäure	apikal	97,2 \pm 5,3	97,5 \pm 4,4	95,6 \pm 5,2	91,6 \pm 16,0
	basolateral	n.d.	2,6 \pm 2,6	4,0 \pm 3,4	3,9 \pm 2,9
Dihydroferulasäure	apikal	106,0 \pm 5,9	105,7 \pm 6,8	107,4 \pm 3,9	108,2 \pm 5,1
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hydroxyzimtsäure-methylester					
<i>p</i> -Coumarsäuremethylester	apikal	76,2 \pm 3,4	62,8 \pm 5,5	38,6 \pm 8,7	21,2 \pm 8,4
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kaffeensäuremethylester	apikal	75,8 \pm 11,8	63,0 \pm 17,6	54,9 \pm 18,9	45,8 \pm 13,7
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ester der D(-)-Chinasäure					
4- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	apikal	99,1 \pm 4,5	91,6 \pm 0,9	95,8 \pm 4,6	90,9 \pm 3,3
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	apikal	103,9 \pm 2,9	106,9 \pm 2,3	102,9 \pm 3,4	57,4 \pm 21,8
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1-Kaffeoylchinasäure	apikal	90,2 \pm 2,8	87,8 \pm 1,9	78,3 \pm 3,7	79,5 \pm 5,8
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-Kaffeoylchinasäure	apikal	104,0 \pm 1,2	102,6 \pm 2,5	103,8 \pm 1,9	105,9 \pm 3,5
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	1,5 \pm 0,2
4-Kaffeoylchinasäure	apikal	94,4 \pm 3,0	90,8 \pm 6,0	89,8 \pm 6,6	81,6 \pm 14,1
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5-Kaffeoylchinasäure	apikal	98,8 \pm 2,2	101,4 \pm 3,0	99,0 \pm 6,1	94,4 \pm 7,2
	basolateral	n.d.	n.d.	1,7 \pm 0,7	1,9 \pm 1,0
Flavonoide					
Phloretin	apikal	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phloretin-2'-O-glucosid	apikal	91,2 \pm 1,0	83,6 \pm 3,4	81,7 \pm 5,5	75,7 \pm 6,7
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phloretin-2'-O-xyloglucosid	apikal	92,9 \pm 4,8	99,2 \pm 8,8	99,2 \pm 6,8	103,9 \pm 0,9
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin	apikal	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3-O-rhamnosid	apikal	95,9 \pm 5,2	90,6 \pm 0,5	89,3 \pm 0,3	95,5 \pm 5,5
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(-)-Epicatechin	apikal	100,1 \pm 0,8	106,3 \pm 1,1	93,2 \pm 6,5	96,5 \pm 6,0
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(+) -Catechin	apikal	96,7 \pm 1,3	94,0 \pm 3,0	96,9 \pm 2,4	91,0 \pm 7,7
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Intestinale Metabolite					
3,4-Dihydroxyphenyl-essigsäure	apikal	92,8 \pm 0,7	85,0 \pm 0,9	74,3 \pm 1,3	63,9 \pm 4,8
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3,4-Dihydroxytoluol	apikal	86,6 \pm 2,3	74,9 \pm 1,9	69,5 \pm 2,5	52,7 \pm 3,4

Substanz	Seite	1 h	2 h	3 h	4 h
Phloroglucin	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	1,8 ± 0,9
	apikal	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	apikal	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
D-(-)-Chinasäure	apikal	105,1 ± 7,4	104,9 ± 8,2	100,5 ± 6,6	110,4 ± 10,2
	basolateral	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,3

Tabelle 9-6: Absorptionsstudien mit humanen Biopsien. Verteilung (Anteil der Inkubationskonzentration [%]) der Hydroxyzimtsäuren auf der apikalen und basolateralen Seite der Ussing-Kammer. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. n.d.= nicht detektierbar.

Substanz	Seite	1 h	2 h	3 h	4 h
Hydroxyzimtsäuren					
<i>p</i> -Coumarsäure	apikal	100,1 \pm 1,0	100,4 \pm 0,6	99,9 \pm 4,4	92,8 \pm 15,4
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kaffeesäure	apikal	70,6 \pm 7,6	57,7 \pm 12,3	47,7 \pm 14,2	37,3 \pm 15,2
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ferulasäure	apikal	95,7 \pm 6,1	92,6 \pm 5,3	87,7 \pm 5,0	83,7 \pm 3,5
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Isoferulasäure	apikal	102,1 \pm 7,2	97,8 \pm 1,0	95,8 \pm 2,5	94,0 \pm 3,3
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dihydroferulasäure	apikal	105,9 \pm 14,3	104,0 \pm 12,2	104,3 \pm 8,9	93,3 \pm 7,0
	basolateral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

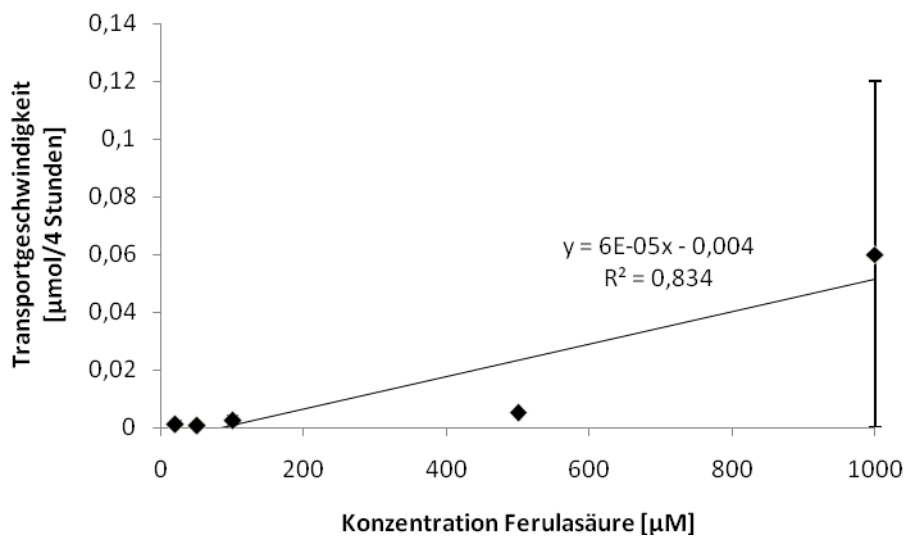


Abbildung 9-9: Transportgeschwindigkeit (Zunahme auf der basolateralen Seite) [µmol/4 Stunden] von Ferulasäure über Schweinedarmmukosa in Abhängigkeit von der eingesetzten Ferulasäurekonzentration [µM].

Tabelle 9-7: Phloretin-Absorptionsstudien mit T84-Monolayern, Inkubation auf der apikalen bzw. auf der basolateralen Seite (Konzentration 50 μ M). Verteilung (Anteil der Inkubationskonzentration [%]) von Phloretin auf der Inkubations- und Aufnahmeseite der Ussing-Kammer nach 4 h Inkubation. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus n = 3 unabhängigen Experimenten. Werte die mit gleichem Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant; signifikant unterschiedliche Werte tragen unterschiedliche Buchstaben, hochsignifikant unterschiedliche Werte sind zusätzlich mit * gekennzeichnet.**

Inkubations- seite	Anteil der Inkubationskonzentration [%]	
	Inkubationsseite	Aufnahmeseite
apikal	71,8 \pm 4,2 ^a	3,8 \pm 0,8 ^{c***}
basolateral	61,7 \pm 2,8 ^b	18,5 \pm 1,5 ^{d***}

Tabelle 9-8: Absorptionsstudien mit T84-Monolayern am Beispiel des Phloretins, Inkubation auf der apikalen bzw. auf der basolateralen Seite (Konzentration 50 μ M) in Gegenwart und Abwesenheit eines pH-Gradienten. Verteilung (Anteil der Inkubationskonzentration [%]) von Phloretin auf der apikalen und basolateralen Seite der Ussing-Kammer nach 4 h Inkubation. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus n = 3 unabhängigen Experimenten. Werte die mit gleichem Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant; signifikant unterschiedliche Werte tragen unterschiedliche Buchstaben, hochsignifikant unterschiedliche Werte sind zusätzlich mit * gekennzeichnet.**

pH-Wert	Anteil der Inkubationskonzentration [%]	
	apikal	basolateral
apikale Inkubation		
7,4/7,4	71,8 \pm 4,2 ^a	3,8 \pm 0,8 ^b
6,0/7,4	65,3 \pm 3,9 ^a	15,0 \pm 1,2 ^c
basolaterale Inkubation		
7,4/7,4	18,5 \pm 1,5 ^d	61,7 \pm 2,8 ^f
6,0/7,4	12,3 \pm 2,1 ^e	68,5 \pm 1,0 ^g

Tabelle 9-9: Absorptionsstudien mit T84-Monolayern am Beispiel des Phloretins (50 μM), Co-Inkubation mit Natriumazid (10 mM), Inkubation des Phloretins auf der apikalen bzw. auf der basolateralen Seite (Konzentration 50 μM). Verteilung (Anteil der Inkubationskonzentration [%]) von Phloretin auf der apikalen und basolateralen Seite der Ussing-Kammer nach 4 h Inkubation. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. Werte die mit gleichem Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant; signifikant unterschiedliche Werte tragen unterschiedliche Buchstaben, hochsignifikant unterschiedliche Werte sind zusätzlich mit * gekennzeichnet.**

Co-Inkubation	Anteil der Inkubationskonzentration [%]	
	apikal	basolateral
apikale Inkubation		
keine	71,8 \pm 4,2 ^a	3,8 \pm 0,8 ^c
Natriumazid	82,7 \pm 0,7 ^b	7,6 \pm 2,9 ^c
basolaterale Inkubation		
keine	18,5 \pm 1,5 ^d	61,7 \pm 2,8 ^e
Natriumazid	21,8 \pm 5,4 ^d	64,9 \pm 3,1 ^e

Tabelle 9-10: Mit Hilfe des „OSIRIS Property Explorers“ berechnete Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten Log P der untersuchten Polyphenole bei pH 7,4.

Substanz	Log P
Hydroxyzimtsäuren	
Zimtsäure	1,63
Dihydrozimtsäure	1,76
<i>p</i> -Coumarsäure	1,33
Kaffeesäure	1,03
Dihydrokaffeesäure	1,17
Ferulasäure	1,23
Isoferulasäure	1,23
Dihydroferulasäure	1,36
Hydroxyzimtsäuremethylester	
<i>p</i> -Coumarsäuremethylester	1,78
Kaffeesäuremethylester	1,48
Ester der D-(-)-Chinasäure	
4- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	-0,14
5- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	-0,14
1-Kaffeoylchinasäure	-0,44
3-Kaffeoylchinasäure	-0,44
4-Kaffeoylchinasäure	-0,44
5-Kaffeoylchinasäure	-0,44
Flavonoide	
Phloretin	2,45
Phloretin-2'-O-glucosid	0,34
Phloretin-2'-O-xyloglucosid	-0,85
Quercetin	1,80
Quercetin-3-O-rhamnosid	0,91
(-)-Epicatechin	1,88
(+)-Catechin	1,88
Intestinale Metabolite	
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure	0,70
3,4-Dihydroxytoluol	1,70
Phloroglucin	1,08
D-(-)-Chinasäure	-1,93

Tabelle 9-11: Transepithelialer Widerstand (TER) der T84-Monolayer nach Inkubation mit Polyphenolen. Angegeben in % des Anfangs-TER. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

Substanz	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h
Kontrolle	121,1 \pm 1,3	122,9 \pm 1,7	122,5 \pm 2,0	119,7 \pm 2,0	113,9 \pm 1,9	104,5 \pm 0,2	91,8 \pm 0,2	77,4 \pm 0,3
Hydroxyzimtsäuren								
Zimtsäure	137,7 \pm 2,3	134,3 \pm 4,0	132,0 \pm 5,1	131,2 \pm 6,3	130,0 \pm 7,4	129,9 \pm 9,2	128,0 \pm 10,8	122,1 \pm 6,7
Dihydrozimtsäure	111,2 \pm 1,9	114,4 \pm 5,1	115,0 \pm 7,4	115,0 \pm 9,7	113,5 \pm 11,8	111,4 \pm 14,5	109,0 \pm 17,1	104,3 \pm 22,0
<i>p</i> -Coumarsäure	118,4 \pm 12,3	127,6 \pm 17,4	134,1 \pm 23,0	137,0 \pm 26,3	139,2 \pm 27,6	139,6 \pm 31,5	138,8 \pm 30,4	136,1 \pm 31,2
Kaffeesäure	112,6 \pm 1,6	115,1 \pm 8,1	118,8 \pm 12,6	121,6 \pm 16,6	124,6 \pm 18,6	126,1 \pm 20,1	127,2 \pm 22,0	124,9 \pm 23,5
Dihydrokaffeesäure	115,0 \pm 6,1	113,6 \pm 9,5	108,9 \pm 9,8	103,5 \pm 9,0	98,9 \pm 9,5	93,8 \pm 11,9	89,7 \pm 14,3	84,3 \pm 16,5
Ferulasäure	116,7 \pm 0,6	122,0 \pm 2,6	124,7 \pm 5,5	126,8 \pm 8,4	128,7 \pm 10,0	128,7 \pm 11,3	127,7 \pm 11,9	124,1 \pm 10,4
Isoferulasäure	115,4 \pm 0,1	122,5 \pm 1,3	127,3 \pm 1,7	130,6 \pm 2,0	132,9 \pm 2,0	134,2 \pm 1,9	134,6 \pm 0,2	133,6 \pm 2,0
Dihydroferulasäure	129,2 \pm 1,8	133,6 \pm 3,4	133,0 \pm 4,1	131,5 \pm 5,7	131,1 \pm 6,2	129,4 \pm 7,1	127,5 \pm 8,1	125,3 \pm 9,5
Hydroxyzimtsäure-methylester								
<i>p</i> -Coumarsäuremethylester	112,4 \pm 1,7	115,9 \pm 3,9	114,6 \pm 8,6	113,0 \pm 10,4	115,6 \pm 14,7	122,1 \pm 17,4	130,7 \pm 18,2	128,4 \pm 15,5
Kaffeesäuremethylester	111,1 \pm 4,1	114,4 \pm 11,1	116,1 \pm 16,8	116,1 \pm 22,4	118,6 \pm 26,5	118,7 \pm 29,5	118,7 \pm 29,1	115,9 \pm 32,3
Ester der D(-)-Chinasäure								
4- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	124,3 \pm 7,0	132,3 \pm 5,8	134,6 \pm 7,3	135,4 \pm 1,0	137,0 \pm 1,0	140,1 \pm 5,3	140,1 \pm 6,0	136,9 \pm 3,7
5- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	122,5 \pm 0,5	136,5 \pm 0,4	142,5 \pm 1,3	144,3 \pm 3,4	142,9 \pm 5,0	138,7 \pm 6,6	135,1 \pm 7,4	131,7 \pm 8,5
1-Kaffeoylchinasäure	113,5 \pm 0,9	117,0 \pm 2,0	119,3 \pm 2,1	123,1 \pm 2,3	126,2 \pm 3,4	128,6 \pm 3,6	129,3 \pm 2,7	128,5 \pm 2,8
3-Kaffeoylchinasäure	120,5 \pm 0,0	120,5 \pm 0,5	120,6 \pm 0,2	122,2 \pm 0,9	124,3 \pm 1,2	126,6 \pm 0,8	129,3 \pm 1,3	131,6 \pm 0,4
4-Kaffeoylchinasäure	131,3 \pm 5,7	126,7 \pm 5,8	122,1 \pm 6,4	119,1 \pm 7,2	117,0 \pm 7,2	115,3 \pm 6,2	114,2 \pm 5,9	112,2 \pm 6,2
5-Kaffeoylchinasäure	111,4 \pm 4,1	113,9 \pm 6,4	118,4 \pm 4,8	120,0 \pm 6,1	122,5 \pm 5,2	124,8 \pm 4,4	126,5 \pm 3,0	126,7 \pm 2,9
Flavonoide								
Phloretin	125,6 \pm 2,0	126,9 \pm 1,1	129,4 \pm 1,1	134,0 \pm 0,5	137,0 \pm 0,5	138,9 \pm 0,5	137,8 \pm 1,1	135,1 \pm 1,1

Substanz	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h
Phloretin-2'-O-glucosid	112,3 ± 3,6	115,1 ± 2,9	115,4 ± 1,7	119,1 ± 2,9	121,2 ± 2,9	122,3 ± 4,1	122,0 ± 4,5	120,2 ± 4,9
Phloretin-2'-O-xyloglucosid	130,8 ± 0,9	132,9 ± 2,0	131,4 ± 2,1	130,4 ± 2,3	130,7 ± 3,4	130,8 ± 3,6	130,5 ± 2,7	129,4 ± 2,8
Quercetin	112,7 ± 3,7	115,2 ± 7,0	116,5 ± 9,8	116,2 ± 9,3	116,2 ± 14,1	116,5 ± 14,1	114,9 ± 14,1	111,5 ± 12,8
Quercetin-3-O-rhamnosid	118,4 ± 3,7	123,8 ± 7,0	125,9 ± 9,8	125,3 ± 9,3	126,1 ± 14,1	124,8 ± 14,1	126,2 ± 14,1	127,4 ± 12,8
(-)-Epicatechin	101,0 ± 0,3	101,2 ± 4,5	103,1 ± 0,8	116,3 ± 1,7	121,7 ± 1,1	124,7 ± 2,0	127,2 ± 4,0	123,4 ± 7,3
(+)-Catechin	115,4 ± 1,8	117,8 ± 4,4	118,7 ± 9,8	120,5 ± 10,3	121,0 ± 10,3	121,9 ± 9,1	120,9 ± 10,3	119,7 ± 8,8
Intestinale Metabolite								
3,4-Dihydroxyphenyl-essigsäure	113,0 ± 4,9	116,9 ± 7,3	119,4 ± 10,4	121,6 ± 11,6	124,3 ± 13,6	125,5 ± 14,9	126,5 ± 15,9	126,0 ± 15,5
3,4-Dihydroxytoluol	119,2 ± 0,3	116,2 ± 0,6	109,2 ± 0,0	101,8 ± 1,0	92,8 ± 1,8	82,4 ± 2,5	71,2 ± 3,4	59,5 ± 4,1
Phloroglucin	117,4 ± 0,8	120,2 ± 0,0	120,0 ± 2,4	120,0 ± 4,7	119,3 ± 6,4	117,5 ± 7,7	114,4 ± 9,2	109,6 ± 10,3
D-(-)-Chinasäure	106,7 ± 3,4	100,9 ± 4,1	95,3 ± 4,5	90,4 ± 4,5	85,4 ± 4,1	81,0 ± 3,2	76,9 ± 2,8	72,6 ± 2,5
3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure	123,6 ± 4,9	125,8 ± 6,6	123,9 ± 6,6	122,3 ± 6,3	121,8 ± 5,6	121,5 ± 6,0	120,3 ± 7,7	117,9 ± 10,0

Tabelle 9-12: Transepithelialer Widerstand (TER) der Caprinsäure-vorbehandelten T84-Monolayer nach Inkubation mit Polyphenolen. Die Zugabe der Polyphenole erfolgte nach dem Auswaschen mit frischem Medium. Angegeben in % des Anfangs-TER. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

Substanz	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h
Kontrolle	49,0 \pm 8,0	55,6 \pm 8,6	57,1 \pm 8,6	57,5 \pm 9,0	56,4 \pm 9,0	55,8 \pm 9,3	55,3 \pm 9,6	53,1 \pm 9,4
Hydroxyzimtsäuren								
Zimtsäure	48,0 \pm 6,0	80,9 \pm 7,8	86,3 \pm 8,0	90,0 \pm 9,2	91,8 \pm 10,8	92,9 \pm 13,1	92,7 \pm 15,0	91,7 \pm 16,1
Dihydrozimtsäure	49,0 \pm 15,7	75,6 \pm 17,2	78,8 \pm 17,1	77,8 \pm 17,9	70,1 \pm 20,4	64,3 \pm 21,4	59,3 \pm 22,7	56,4 \pm 20,3
<i>p</i> -Coumarsäure	53,0 \pm 22,4	82,9 \pm 23,7	89,1 \pm 24,7	92,1 \pm 26,6	94,1 \pm 27,5	94,9 \pm 29,4	95,8 \pm 31,3	95,1 \pm 32,5
Kaffeesäure	51,0 \pm 8,4	78,4 \pm 10,1	82,1 \pm 12,7	86,8 \pm 15,0	89,4 \pm 17,8	90,8 \pm 19,2	92,6 \pm 22,4	92,1 \pm 23,0
Dihydrokaffeesäure	51,0 \pm 3,1	92,7 \pm 2,1	99,6 \pm 1,9	104,2 \pm 3,8	106,4 \pm 5,1	107,1 \pm 12,7	107,1 \pm 17,5	105,6 \pm 23,2
Ferulasäure	48,0 \pm 3,6	88,0 \pm 1,9	96,0 \pm 2,1	99,8 \pm 1,0	101,7 \pm 3,7	101,8 \pm 7,3	101,7 \pm 13,7	99,1 \pm 18,0
Isoferulasäure	48,0 \pm 6,1	89,2 \pm 3,3	96,8 \pm 1,4	100,9 \pm 2,9	100,2 \pm 5,6	98,2 \pm 8,4	98,4 \pm 9,1	96,5 \pm 11,4
Dihydroferulasäure	63,0 \pm 8,0	93,3 \pm 16,1	99,9 \pm 21,9	104,5 \pm 24,9	106,4 \pm 25,2	107,4 \pm 26,1	105,7 \pm 31,1	100,3 \pm 26,1
Hydroxyzimtsäure-methylester								
<i>p</i> -Coumarsäuremethylester	48,0 \pm 12,8	83,5 \pm 13,1	88,4 \pm 15,3	91,2 \pm 16,7	91,6 \pm 17,7	90,7 \pm 18,1	87,9 \pm 18,6	84,1 \pm 19,4
Kaffeesäuremethylester	61,0 \pm 3,2	71,3 \pm 4,6	74,3 \pm 7,3	75,1 \pm 9,3	76,1 \pm 12,9	74,9 \pm 14,1	73,2 \pm 16,8	70,5 \pm 21,0
Ester der D(-)-Chinasäure								
4- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	53,0 \pm 4,6	112,2 \pm 10,3	120,3 \pm 14,2	124,5 \pm 17,1	126,3 \pm 18,2	123,9 \pm 16,0	119,0 \pm 11,7	107,8 \pm 12,8
5- <i>p</i> -Coumaroylchinasäure	55,0 \pm 7,2	86,6 \pm 12,6	91,1 \pm 16,8	94,5 \pm 20,1	97,4 \pm 23,2	99,6 \pm 25,6	101,3 \pm 27,5	99,8 \pm 23,6
1-Kaffeoylchinasäure	60,0 \pm 16,2	101,6 \pm 11,8	113,4 \pm 13,5	121,4 \pm 15,6	125,5 \pm 16,6	129,4 \pm 20,0	132,6 \pm 32,5	133,0 \pm 33,5
3-Kaffeoylchinasäure	56,0 \pm 5,0	113,0 \pm 8,7	119,1 \pm 11,6	124,4 \pm 14,7	129,2 \pm 16,8	133,1 \pm 17,4	135,3 \pm 16,8	137,1 \pm 16,7
4-Kaffeoylchinasäure	51,0 \pm 6,1	82,0 \pm 7,6	86,0 \pm 10,7	89,0 \pm 13,5	90,8 \pm 16,2	92,1 \pm 18,5	93,0 \pm 20,5	93,9 \pm 23,0
5-Kaffeoylchinasäure	57,0 \pm 9,3	94,8 \pm 9,4	102,4 \pm 8,3	103,7 \pm 7,5	103,4 \pm 6,4	100,5 \pm 7,9	97,3 \pm 9,3	93,3 \pm 9,3
Flavonoide								

Substanz	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h
Phloretin	40,0 ± 4,0	72,0 ± 5,3	77,3 ± 6,6	80,1 ± 8,0	81,5 ± 9,9	81,2 ± 11,3	79,3 ± 13,8	77,1 ± 13,6
Phloretin-2'-O-glucosid	45,0 ± 5,0	80,0 ± 6,1	85,7 ± 8,2	87,5 ± 8,7	84,9 ± 10,7	82,7 ± 8,9	80,8 ± 9,3	78,9 ± 11,2
Phloretin-2'-O-xyloglucosid	52,0 ± 8,7	88,7 ± 10,4	98,4 ± 8,4	104,0 ± 6,8	108,1 ± 7,0	110,7 ± 6,4	110,8 ± 8,4	111,1 ± 8,1
Quercetin	55,0 ± 10,6	86,9 ± 11,3	91,9 ± 8,7	93,5 ± 5,9	92,8 ± 6,4	91,8 ± 11,3	90,7 ± 12,8	90,5 ± 15,0
Quercetin-3-O-rhamnosid	50,0 ± 0,5	88,2 ± 4,1	96,3 ± 5,2	105,9 ± 4,7	112,7 ± 7,6	116,4 ± 9,4	121,1 ± 9,0	121,1 ± 9,0
(-)-Epicatechin	53,0 ± 4,2	88,1 ± 3,5	92,4 ± 7,9	92,2 ± 15,3	89,6 ± 20,2	86,7 ± 25,2	82,8 ± 30,7	82,1 ± 35,3
(+)-Catechin	56,0 ± 6,4	97,4 ± 6,7	98,6 ± 5,3	97,8 ± 4,9	96,0 ± 10,2	95,4 ± 17,2	93,9 ± 22,2	91,4 ± 26,6
Intestinale Metabolite								
3,4-Dihydroxyphenyl-essigsäure	55,0 ± 3,9	83,5 ± 6,0	85,6 ± 7,2	84,9 ± 9,7	81,8 ± 12,7	78,5 ± 15,0	76,1 ± 18,3	73,8 ± 21,4
3,4-Dihydroxytoluol	48,0 ± 1,0	87,2 ± 4,3	94,0 ± 8,2	96,0 ± 10,2	94,0 ± 11,6	89,3 ± 12,7	87,8 ± 14,6	83,7 ± 17,1
Phloroglucin	53,0 ± 0,5	92,6 ± 1,6	98,3 ± 5,4	97,3 ± 9,4	94,7 ± 14,4	89,6 ± 20,5	89,7 ± 20,5	86,0 ± 23,4
D-(-)-Chinasäure	57,0 ± 6,8	98,5 ± 9,2	105,2 ± 11,8	111,0 ± 14,8	113,4 ± 17,4	113,9 ± 19,0	114,7 ± 20,7	115,1 ± 23,5
3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure	48,0 ± 6,5	87,1 ± 7,6	91,6 ± 12,4	92,8 ± 15,9	92,4 ± 18,8	91,3 ± 19,3	89,9 ± 14,7	86,8 ± 11,3

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Hannah Deußler geb. Bergmann
Geburtsdatum	4. Februar 1983
Geburtsort	Offenbach am Main
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet

Ausbildung

12/2006 - 10/2010	Dissertation (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Elke Richling, Lebensmittelchemie und Toxikologie, Lehrstuhl für Molekulare Ernährungsforschung, Technische Universität Kaiserslautern)
10/2002 – 10/2006	Studium der Lebensmittelchemie mit Abschluss Erstes Staatsexamen (Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg)
03/2006 – 07/2006	Forschungspraktikum "Methodenentwicklung zur Isolierung und Analytik von Fermentationsprodukten" (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Peter Schreier, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg)
09/1993 – 06/2002	Gymnasium mit Abschluss Allgemeine Hochschulreife (Franziskanergymnasium Kreuzburg, Großkrotzenburg)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation selbstständig verfasst, die für die Arbeit benutzen Hilfsmittel genannt habe und die Ergebnisse beteiligter Mitarbeiter sowie anderer Autoren klar gekennzeichnet habe. Ich habe weder die Dissertation oder Teile der Dissertation als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht noch ein Promotionsverfahren bei einer Hochschule beantragt.

Kaiserslautern, den 14. September 2010