

---

Biologische Wirksamkeit eines Heidelbeerextrakts (HBE)  
(*Vaccinium myrtillus* L.) im Vergleich zu verkapselten  
Präparaten: Antioxidative Wirksamkeit und Modulation  
der intestinalen Verfügbarkeit der Anthocyane

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

D 386

vorgelegt von Diplom Lebensmittelchemiker  
Markus Schantz

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 22.09.2011

Betreuerin der Arbeit: Prof. Dr. Elke Richling

Kaiserslautern 2011



---

Disce ut semper victurus,  
vive ut cras moriturus!



---

Der experimentelle Teil der Arbeit entstand zwischen April 2008 und April 2011 in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Elke Richling im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 22.09.2011

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Helmut Sitzmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Elke Richling

2. Berichterstatter: Juniorprofessorin Dr. Melanie Esselen



# Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i> .....	<i>I</i>
<i>Veröffentlichungen</i> .....	<i>V</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i> .....	<i>VII</i>
<i>Zusammenfassung</i> .....	<i>XI</i>
<i>Summary</i> .....	<i>XV</i>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Anthocyane</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1 Strukturen</b> .....	<b>2</b>
<b>2.2 Biosynthese &amp; Funktion in Pflanzen</b> .....	<b>3</b>
<b>2.3 Aufnahme &amp; Gehalte in Lebensmitteln</b> .....	<b>4</b>
2.3.1 Die Heidelbeere ( <i>Vaccinium spp.</i> ).....	6
<b>2.4 Toxikologie</b> .....	<b>7</b>
<b>2.5 Einflussfaktoren auf die Stabilität</b> .....	<b>7</b>
2.5.1 Chemische Strukturen .....	8
2.5.2 pH-Wert, Temperatur & Licht.....	8
<b>2.6 Instabilität &amp; Polymerisierung</b> .....	<b>10</b>
<b>2.7 Möglichkeiten zur Stabilisierung</b> .....	<b>12</b>
2.7.1 Copigmentierung .....	12
2.7.2 Selbstassoziation .....	13
2.7.3 Bildung von Metallkomplexen.....	14
2.7.4 Molkenproteine & Serumalbumin.....	15
<b>2.8 Verkapselungstechniken und deren Bedeutung in der Lebensmittelindustrie</b> .....	<b>15</b>
<b>2.9 Pharmakokinetik</b> .....	<b>18</b>
2.9.1 Aufnahme (engl. <i>absorption</i> ) .....	19
2.9.2 Verteilung (engl. <i>distribution</i> ).....	21
2.9.3 Metabolismus (engl. <i>metabolism</i> ) .....	24
2.9.4 Ausscheidung (engl. <i>excretion</i> ).....	25
<b>2.10 Verfügbarkeit im Darm</b> .....	<b>26</b>
<b>2.11 Biologische Eigenschaften</b> .....	<b>28</b>
2.11.1 Antioxidative Wirksamkeit .....	28
2.11.2 Antiproliferative & antikarzinogene Wirksamkeit .....	32
2.11.3 Antiinflammatorische Wirksamkeit .....	35
2.11.4 Antimikrobielle Wirksamkeit.....	35
2.11.5 Prooxidative Wirksamkeit .....	35
<b>3 Oxidativer Stress</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)</b> .....	<b>37</b>
3.1.1 Verwendete ROS Induktoren .....	40
<b>3.2 Schutzmechanismen des Organismus gegen ROS</b> .....	<b>42</b>
3.2.1 Enzymatische Abwehrmechanismen.....	42
3.2.2 Nicht-enzymatische Abwehrmechanismen .....	44
<b>4 Der Magen-Darm-Trakt</b> .....	<b>46</b>
<b>4.1 Abschnitte &amp; Funktionen</b> .....	<b>46</b>
4.1.1 Mund-Rachen-Raum, Speiseröhre .....	46

4.1.2	Magen.....	46
4.1.3	Dünndarm.....	48
4.1.4	Dickdarm.....	48
<b>4.2</b>	<b>Ileostomie (Stoma des terminalen Ileums).....</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>Problemstellung.....</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>Vorstellung des Clusterprojektes .....</b>	<b>51</b>
<b>5.2</b>	<b>Ziele der vorliegenden Arbeit .....</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>Material &amp; Methoden .....</b>	<b>55</b>
<b>6.1</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>55</b>
6.1.1	Geräte.....	55
6.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	56
6.1.3	Chemikalien .....	56
<b>6.2</b>	<b>Herstellung und Charakterisierung des verwendeten Heidelbeereextrakts (HBE) .....</b>	<b>58</b>
<b>6.3</b>	<b>Herstellung der unterschiedlichen Kapselsysteme.....</b>	<b>61</b>
6.3.1	Pektinamidhohlkapseln .....	61
6.3.2	Molkenproteinkapseln .....	62
6.3.3	Apfelpektinkapseln .....	63
6.3.4	Multidisperse Hüllkapseln.....	64
6.3.5	Überblick über die verwendeten Kapselsysteme.....	66
6.3.6	Bestimmung der Anthocyankonzentrationen in den unterschiedlichen HBE-beladenen Kapselsystemen .....	67
<b>6.4</b>	<b>Zellkultivierung.....</b>	<b>69</b>
6.4.1	Verwendete Zelllinien .....	69
6.4.2	Kultivierung der Caco-2/ HT-29 Zellen .....	70
6.4.3	Bestimmung der Zellzahl .....	73
6.4.4	Testung auf Mykoplasmen .....	73
6.4.5	Aussäen von Zellen .....	74
6.4.6	Substanzinkubation und Zellernte .....	75
<b>6.5</b>	<b>Verwendete <i>in vitro</i>-Testsysteme .....</b>	<b>76</b>
6.5.1	Alamar Blue Assay .....	76
6.5.2	Bestimmung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies ROS (DCF Assay) .....	78
6.5.3	Testung auf (oxidative) DNA-Schäden (Comet Assay) .....	82
6.5.4	Bestimmung des Glutathiongehalts.....	87
6.5.5	Bestimmung des Proteingehalts (BCA Assay).....	90
<b>6.6</b>	<b>Stabilität &amp; Polymerbildung der Anthocyane im Zellkulturmedium.....</b>	<b>91</b>
<b>6.7</b>	<b>Modelle zur Simulation des Magen-Darm-Trakts .....</b>	<b>92</b>
6.7.1	End-Over-End-Apparatur .....	92
6.7.2	<i>Ex vivo</i> Modell zur Simulation der Dünndarmpassage .....	94
<b>6.8</b>	<b>HPLC-Systeme und Bedingungen .....</b>	<b>102</b>
6.8.1	HPLC-Diodenarray (DAD).....	102
6.8.2	HPLC-UV/VIS.....	102
6.8.3	Allgemeine Bedingungen .....	102
<b>7</b>	<b>Ergebnisse &amp; erste Diskussion .....</b>	<b>108</b>
<b>7.1</b>	<b>Etablierung einer geeigneten HPLC-Methode .....</b>	<b>108</b>
<b>7.2</b>	<b><i>In vitro</i> Untersuchungen zur Stabilität und Freisetzung der Anthocyane des HBE im Vergleich zu den HBE-beladenen Kapselpräparaten.....</b>	<b>110</b>
7.2.1	Magensimulation.....	111
7.2.2	Dünndarmsimulation.....	112
7.2.3	<i>Ex vivo</i> Modell (humaner Dünndarminhalt).....	115
<b>7.3</b>	<b>Stabilität der Anthocyane des HBE im Zellkulturmedium.....</b>	<b>120</b>

<b>7.4</b>	<b>Bestimmung des unlöslichen Rückstands .....</b>	<b>124</b>
7.4.1	Bestimmung des unlöslichen Rückstands aus HBE und Anthocyanfraktion .....	124
7.4.2	Bestimmung des unlöslichen Rückstands aus Cy-3-glc und Cy-3-gal .....	125
<b>7.5</b>	<b>Biologische Wirksamkeit des HBE und HBE-Subfraktionen im Vergleich zu HBE-beladenen Kapselpräparaten in der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 .....</b>	<b>126</b>
7.5.1	Testung auf Zellvitalität (Alamar Blue Assay).....	126
7.5.2	Testung auf (oxidative) DNA-Schäden (Comet Assay) .....	132
7.5.3	Bestimmung des Glutathiongehalts.....	138
7.5.4	Bestimmung intrazellulärer ROS (DCF Assay) .....	144
<b>8</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>150</b>
<b>8.1</b>	<b>Stabilität und Freisetzung der Anthocyane im simulierten Gastrointestinaltrakt (GIT) .....</b>	<b>150</b>
8.1.1	Fazit gastrointestinale Freisetzung und Stabilität.....	158
<b>8.2</b>	<b>Stabilität der Anthocyane unter Zellkulturbedingungen und Bestimmung eines unlöslichen Rückstands .....</b>	<b>160</b>
8.2.1	Fazit zur Stabilität der Anthocyane und Bildung eines unlöslichen Rückstands im Zellkulturmedium.....	163
<b>8.3</b>	<b>Antioxidative Wirksamkeit in Caco-2 Zellen .....</b>	<b>164</b>
8.3.1	Fazit zur antioxidativen Wirksamkeit .....	177
<b>9</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>178</b>
<b>10</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>i</b>
<b>10.1</b>	<b>Testung auf Zellvitalität (Alamar Blue Assay).....</b>	<b>i</b>
10.1.1	Testung des HBE und der HBE-Subfraktionen .....	ii
<b>10.2</b>	<b>Testung auf (oxidative) DNA-Schäden (Comet Assay).....</b>	<b>iv</b>
10.2.1	Etablierung des Comet Assay.....	iv
10.2.2	Testung des HBE und der HBE-Subfraktionen (ohne FPG-Behandlung) .....	v
10.2.3	Testung des HBE und der HBE-Subfraktionen (ohne FPG-Behandlung) .....	vii
10.2.4	Testung des HBE und der HBE-Subfraktionen (mit FPG-Behandlung) .....	ix
<b>10.3</b>	<b>Bestimmung des Glutathiongehalts.....</b>	<b>xi</b>
10.3.1	Testung des HBE und der HBE-Subfraktionen .....	xi
<b>10.4</b>	<b>Bestimmung intrazellulärer ROS (DCF Assay) .....</b>	<b>xiii</b>
10.4.1	Testung des HBE und der HBE-Subfraktionen .....	xiii



## Veröffentlichungen

### Publikationen

Baum, M., **Schantz, M.**, Richling, E. (2009), Rote Farbpigmente mit gesundheitlicher Wirkung. Die aktuelle Wochenschau der GDCH, Woche 52.

Kraus, M., Kahle, K., Ridder, F., **Schantz, M.**, Scheppach, W., Schreier, P., Richling, E., (2010), Colonic availability of bilberry anthocyanins in humans. In: Flavor and health benefits of small berries, (M. Quian und A. Rimando, eds). ACS Symposium Series, Nr. 1035, Boca Raton.

**Schantz, M.**, Mohn, C., Baum, M., Richling, E. (2010), Antioxidative efficiency of an anthocyanin rich bilberry extract in the human colon tumor cell lines Caco-2 and HT-29. J. Berry Res., 1, 25-33.

**Schantz, M.**, Erk, T., Richling, E. (2010), Metabolism of green tea catechins by the human small intestine. Biotechnol. J., 5, 1050-1059

**Schantz, M.**, Richling, E. (2010), Anthocyane mit gesundheitlicher Wirkung. HighChem: Aktuelles aus der Lebensmittelchemie, Kap. 3, S. 50-51.

Weidel, E., **Schantz, M.**, Richling, E. (2011), Anthocyanin contents in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) juices and fruit drinks. Fruit Processing., 3, 102-107.

Müller, D., **Schantz, M.**, Richling, E. (2011), HPLC analysis of anthocyanins in bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.), blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) and corresponding juices. J. Food Sci., im Druck.

Oidtmann, J., **Schantz, M.**, Mäder, K., Baum, M., Berg, S., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., Schwarz, K., Richling, E. (2011), Controlled release of encapsulated anthocyanins in the simulated gastro-intestinal (GI) tract. J. Agric. Food Chem., eingereicht.

### Vorträge

**Schantz, M.**, Oidtmann, J., Baum, M., Mäder, K., Berg, S., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., Schwarz, K., Richling, E. (2011), Studien zur kontrollierten Freisetzung und Stabilität von verkapselten Anthocyanen im simulierten Gastrointestinaltrakt. Lebensmittelchemische Gesellschaft; Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Regionalverbände Nord & Süd-West, Kassel.

### **Posterpräsentationen**

**Schantz, M.**, Erk, T., Richling, E. (2009), Studien zur Stabilität von Grüntee catechinen im humanen Dünndarm. Lebensmittelchemische Gesellschaft; Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Regionalverband Süd-West, Koblenz.

**Schantz, M.**, Erk, T., Richling, E. (2009), Degradation of green tea catechins. DFG-Sentatskommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln (SKLM) Symposium, Kaiserslautern.

**Schantz, M.**, Mohn, C., Baum, M., Richling, E. (2009), Antioxidative Wirksamkeit von Heidelbeer-Anthocyanen in humanen Kolonepithelzellen., 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Berlin.

**Schantz, M.**, Mohn, C., Baum, M., Richling, E. (2009), Antioxidative efficiency of bilberries: Intestinal Degradation and antioxidative effectiveness of an anthocyanin rich bilberry extract., 4th International Conference on Polyphenols and Health, Leeds, England.

**Schantz, M.**, Müller, D., Baum, M., Richling, E. (2010), Anthocyangehalte in frischen Heidelbeeren und Heidelbeersäften., 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Stuttgart-Hohenheim.

**Schantz, M.**, Baum, M., Richling, E. (2011), Antioxidative Wirksamkeit eines anthocyanreichen Heidelbeerextrakts *in vitro.*, 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Frankfurt am Main.

**Schantz, M.**, Oidtmann, J., Baum, M., Mäder, K., Berg, S., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., Schwarz, K., Richling, E. (2011), Does encapsulation of anthocyanins improve their antioxidative capacity and bioavailability?, 40. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Halle (Saale).

**Schantz, M.**, Oidtmann, J., Baum, M., Mäder, K., Berg, S., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., Schwarz, K., Richling, E. (2011), Encapsulation of bilberry anthocyanins- modulation of gastrointestinal release and antioxidative efficiency, ILSI Europe International Symposium on Health Benefits of Foods, Prag, Tschechien.

**Schantz, M.**, Oidtmann, J., Baum, M., Mäder, K., Berg, S., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., Schwarz, K., Richling, E. (2011), Antioxidative efficiency and gastrointestinal release of an anthocyanin rich bilberry extract (BE) in comparison to different BE encapsulation systems., 5th International Conference on Polyphenols and Health, Barcelona, Spanien.

## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ADI-Wert	(engl. <i>acceptable daily intake</i> )
ARE	ARE Element (engl. <i>antioxidant responsive element</i> )
BSA	„bovine serum albumin“
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
bidest.	bidestilliert
Caco-2	humane Kolonkrebszelllinie
CED	chronischentzündliche Darmerkrankung
cm	Zentimeter
D	Deutschland
DAD	Diodenarraydetektor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCF	Dichlorofluorescein
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxy ribonucleic acid</i> )
DSS	engl. <i>dextran sodium sulfat</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Kinase (engl. <i>extracellular regulated kinase</i> )
FeSSIF	Medium zur Dünndarmsimulation (engl. <i>fed state simulated intestinal fluid</i> )
FKS	Fötale Kälberserum
FPG	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
g	Gramm
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLUT	Glukosetransporter (engl. <i>glucose transporter</i> )
GP <sub>x</sub>	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GSR	Glutathionreduktase
GSSG	Glutathion (oxidierte Form)
h	Stunde
HBE	Heidelbeerextrakt
HCOOH	Ameisensäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
HSA	Serumalbumin (engl. <i>human serum albumin</i> )
HT-29	humane Kolonkrebszelllinie

---

I	Italien
IS	Interner Standard
kg	Kilogramm
l	Liter
LMA	“low melting agarose”
LPO	Lipidperoxidation
LOD	Nachweisgrenze (engl. <i>Limit of detection</i> )
LOQ	Bestimmungsgrenze (engl. <i>Limit of quantification</i> )
m	Meter
M	molar (mol/l)
Md	Menadion
MDA	Malondialdehyd
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
NMA	“normal melting agarose”
Nrf2	Transkriptionsfaktor (engl. <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i> )
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid (engl. <i>nitric oxygen</i> )
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase (engl. <i>nitric oxide synthase</i> )
NQO	NADPH-abhängige Quinone-Oxidoreduktase
ORAC	engl. <i>oxygen radical scavenging antioxidant capacity</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration ( <i>potentia Hydrogenii</i> )
p.a.	pro analysis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNS	reaktive Stickstoffspezies (engl. <i>reactive nitrogen species</i> )
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rotations per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SSA	Sulfosalicylsäure
s	Sekunde
SGF	Medium zur Magensimulation (engl. <i>simulated gastric fluid</i> )
SGLT	Natrium abhängiger Glukosetransporter (engl. <i>sodium-dependent glucose transporter</i> )
SOD	Superoxiddismutase
T	Temperatur
TBH	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TEAC	<i>Trolox equivalent antioxidative capacity</i>
GSH	Glutathion
UV	ultraviolett

---

V	Volt
VIS	visueller Bereich des Lichtspektrums
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. <i>World Health Organization</i> )
XO	Xanthinoxidase
$\lambda$	Wellenlänge
$\lambda_{\text{ex/em}}$	detektierte/ emittierte Wellenlänge am Fluoreszenzdetektor
$\lambda_{\text{max}}$	Absorptionsmaximum



## Zusammenfassung

In den letzten Jahren stieg aufgrund eines zunehmenden Ernährungsbewusstseins die Nachfrage nach Lebensmitteln mit gesundheitsfördernden Inhaltsstoffen an. Dabei wird vor allem einer Ernährung reich an Obst und Gemüse protektive Eigenschaften zugesprochen. Besonders für sekundäre Pflanzenstoffe wie die Gruppe der Anthocyane werden positive gesundheitliche Eigenschaften, wie antiinflammatorische-, antioxidative- und chemo-präventive Wirkungen postuliert. Für die beschriebenen biologischen Wirkmechanismen ist jedoch die Verfügbarkeit der Anthocyane am Ort der Resorption von entscheidender Bedeutung. Im pharmazeutischen Bereich werden Verkapselungstechniken angewandt, um das Erreichen des Wirkstoffs am potentiellen Wirkort zu gewährleisten. Voraussetzung ist jedoch, dass die Bioaktivität des Wirkstoffs dabei nicht herabgesetzt wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Modulation der Stabilität und der Freisetzung der Anthocyane anhand von unterschiedlichen Wild Heidelbeerextrakt (*Vaccinium myrtillus* L., HBE)-beladenen Verkapselungssystemen im Vergleich zu nicht verkapseltem HBE unter Bedingungen des Gastrointestinaltrakts untersucht. Die HBE-beladenen Kapselsysteme (Pektinamidhohl-, Molkenprotein-, multidisperse Hüll- und Apfelpektinkapseln) wurden von verschiedenen Projektpartnern des Clusterprojekts *„Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen: Untersuchungen zum Einfluss der Mikrostruktur und der molekularen Zusammensetzung auf die Stabilisierung und kontrollierte Freisetzung von sekundären Pflanzenstoffen und deren Auswirkung auf biologische Signalparameter“* zur Verfügung gestellt. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit bildeten Untersuchungen, ob Kapselsysteme einen Einfluss auf die biologische Aktivität von Inhaltsstoffen des HBE ausüben.

In Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Mäder (Uni Halle) wurden *in vitro* Systeme zur Simulation der Magen- und Dünndarmpassage eingesetzt, um die Freisetzung der Anthocyane aus HBE-beladenen Kapselpräparaten vergleichend zum HBE zu untersuchen. Anschließend erfolgte am Beispiel der Anthocyane die Erfassung der Anthocyangehalte mittels HPLC-UV/VIS. Die Anthocyanfreisetzung fand unabhängig vom Kapseltyp während der Magensaftsimulation innerhalb von 10 min statt. Die freigesetzten Anthocyane erwiesen sich als stabil über den restlichen Inkubationszeitraum von 2 h. Anthocyane liegen beim pH-Wert des Magens (pH 1.5) als stabilisierte Flavyliumkationen vor, wodurch ihr Abbau verhindert wird. Im Gegensatz dazu wurde während der Dünndarmsimulation (pH 6.8) eine Abnahme der Anthocyankonzentration des HBE festgestellt. Durch den Einsatz von Verkapselungstechniken konnten unabhängig vom Kapseltyp die Freisetzung und Stabilität der Anthocyane signifikant erhöht werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Proteine (Molkenproteine), die vom Arbeitskreis Prof. Kulozik (TU München) zur Verfügung gestellt wurden, die Anthocyane während der Dünndarmsimulation stabilisierten.

Des Weiteren wurde ein *ex vivo* Modell mit humanem Dünndarminhalt von Patienten mit künstlichem Darmausgang (Ileostoma) zur weiterführenden Untersuchung der Stabilität und Freisetzung von Anthocyanen des HBE etabliert. Mit steigender HBE Konzentration wurde

ein verzögerter Abbau der Anthocyane beobachtet. Zusätzlich zu den Inkubationen in humanem Dünndarminhalt (pH 6.3) wurde HBE in einem Reduktionspuffer (pH 6.3) vergleichend inkubiert. Dabei ergaben sich Hinweise, dass ein Abbau der Anthocyane durch intestinale Enzyme oder mikrobielle Enzymaktivitäten erfolgte. In Inkubationen der unterschiedlichen HBE-beladenen Kapselsysteme mit humanem Dünndarminhalt wurde eine Freisetzung der Anthocyane im Zeitraum bis zu 8 h gemessen. Dabei ergab sich eine Kompensation des Anthocyanabbaus durch kontinuierliche Freisetzung.

Mittels der durchgeführten Freisetzungs- und Stabilitätsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die vorliegenden Verkapselungstechniken zu einer unerwünschten Freisetzung der Anthocyane während der Magenpassage führten. Im Dünndarmmilieu trugen diese Kapselsysteme zu einer kontinuierlichen Freisetzung, einer damit einhergehenden Kompensation des Anthocyanabbaus und somit höheren Wirkstoffkonzentrationen am potentiellen Wirkort bei. Folglich ist es in Zukunft notwendig, die Kapselsysteme so zu optimieren, dass eine Anthocyanfreisetzung im Magen verhindert wird und somit die intakten Kapseln den Dünndarm erreichen.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war mittels *in vitro* Experimenten an den humanen Darmkrebszelllinien Caco-2 und HT-29 zu prüfen, ob die verwendeten Verkapselungssysteme einen Einfluss auf die biologische Wirksamkeit der Anthocyane ausüben. Zusätzlich sollte untersucht werden, welche Subfraktionen des HBE (Anthocyan-, Polymer- und Phenolcarbonsäurefraktion), die vom Arbeitskreis Prof. Winterhalter (TU Braunschweig) zur Verfügung gestellt wurden, zu dessen biologischen Wirksamkeit beitragen.

Um eine Aussage über potentielle zytotoxische Effekte des HBE, der HBE-Subfraktionen und der HBE-beladenen Kapselsysteme auf humane Darmkrebszellen treffen zu können, wurde der Farbreaktionstest „Alamar blue Assay“, in dem die mitochondriale Aktivität als Maß für die Vitalität der Zelle bestimmt wird, durchgeführt. Die antioxidative Wirksamkeit wurde als Modulation unterschiedlicher Biomarker, wie oxidative DNA-Schäden, der Gehalt an Glutathion und die Reduktion intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), in Kurz- und Langzeitinkubationen untersucht.

Es zeigte sich, dass weder der HBE noch die eingesetzten HBE-Subfraktionen (Anthocyan-, Polymer- und Phenolcarbonsäurefraktion) zytotoxische Wirkungen an der Zelllinie Caco-2 aufwiesen. Eine antioxidative Wirksamkeit wurde in der Erhöhung des Glutathiongehalts durch Zellinkubation mit HBE und Phenolcarbonsäurefraktion im Konzentrationsbereich von 100 - 500 µg/ml nachgewiesen. Des Weiteren wurde eine Abnahme des Gehalts an induzierten intrazellulären ROS (50 - 500 µg/ml HBE), sowie eine Erniedrigung Menadion-induzierter oxidativer DNA-Schäden (5 - 50 µg/ml HBE) beobachtet. Inkubationen mit Anthocyan- und Polymerfraktion zeigten keine antioxidativen Effekte in den verwendeten Zellsystemen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass nur die Phenolcarbonsäurefraktion zur antioxidativen Kapazität des HBE beiträgt.

In Inkubationen mit multidispersen Hüllkapseln stellte sich heraus, dass diese aufgrund ihrer äußeren Ölphase in dieser Formulierung nicht für die *in vitro* Experimente geeignet waren,

da die Ölphase ein Aufschwimmen im Zellkulturmedium bewirkte. Von den eingesetzten Kapselsystemen wurde lediglich bei Inkubationen mit Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln im Konzentrationsbereich von 50 - 500 µg/ml eine signifikante Reduktion der Zellvitalität beobachtet. Eine tendenzielle Erhöhung des Glutathiongehalts der Zelle (100 - 500 µg/ml), eine Erniedrigung der induzierten ROS (100 - 500 µg/ml) und eine Reduktion Menadion-induzierter oxidativer DNA-Schäden (5 - 10 µg/ml) wurde nach Inkubation mit den Kapselsystemen (Pektinamidhohl-, Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln) nachgewiesen. Das antioxidative Potential des HBE wurde durch die Verkapselungstechniken nicht reduziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl der HBE, die Phenolcarbonsäurefraktion als auch die HBE-beladenen Kapselsysteme antioxidativ wirksam (Erhöhung des GSH-Gehalts, Erniedrigung der intrazellulären ROS und Schutz vor oxidativen DNA-Schäden) sind. Welche weiteren Inhaltstoffe zur Wirksamkeit des HBE beitragen muss in weiterführenden *in vitro* Studien charakterisiert werden. Insgesamt führte der Einsatz von Verkapselungstechniken zu keiner Reduzierung der biologischen Wirksamkeit bei gleichzeitiger Stabilisierung der Anthocyane des HBE. Damit stellen Kapselsysteme eine gute Möglichkeit dar, die Freisetzung bioaktiver Stoffe im Körper zu steigern, ohne deren Effektivität zu beeinflussen. Die in dieser Arbeit beobachteten *in vitro* Effekte auf ausgewählte Biomarker des oxidativen Stresses, müssten in weiterführenden *in vivo* Studien verifiziert werden.



## Summary

In recent years an increased awareness of nutrition and health by consumers has generated a growing demand for foods with beneficial properties. In particular, a diet rich in fruits and vegetables showed protective effectiveness. Especially for secondary plant compounds such as anthocyanins positive beneficial health properties have been postulated. For the described biological mechanisms, the availability of anthocyanins at the site of absorption has a crucial importance. In the pharmaceutical area capsule systems are used to ensure the arrival of a *compound* at the active site, provided that the bioactivity of the drug is not reduced.

In the context of the present work, the modulation of the stability and the release of anthocyanins from bilberry extract (BE) (*Vaccinium myrtillus* L.) loaded capsule systems in comparison to not encapsulated BE were characterized under conditions of the gastrointestinal tract. The BE loaded capsules (pectin amide concave-, multidisperse cladding-, whey protein- and apple pectin capsules) were provided by different project partners of the cluster project „*Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen: Untersuchungen zum Einfluss der Mikrostruktur und der molekularen Zusammensetzung auf die Stabilisierung und kontrollierte Freisetzung von sekundären Pflanzenstoffen und deren Auswirkung auf biologische Signalparameter*“. Another main focus of this work was to characterize the impact of encapsulation on the biological activity of BE ingredients.

In cooperation with the working group of Prof. Mäder (Uni Halle) gastrointestinal release and stability studies of BE and different BE loaded capsule systems were performed. Subsequently, the total anthocyanin concentrations of the systems were characterized by HPLC-UV/VIS. Within the first 10 min of incubation in gastric fluid, a release of encapsulated anthocyanins was observed. The liberated anthocyanins remained stable until the end of incubation time of 2 h. The stability is based on the flavylium cation which existed at these gastric conditions (pH 1.5). In contrast to the SGF incubations a continuous degradation of BE anthocyanins during small intestine simulations (pH 6.8) were observed. Due to encapsulation techniques, the stability and release of anthocyanins could be significantly modified. Subsequently, proteins (whey proteins) provided by the working group of Prof. Kulozik (TU München) caused an anthocyanin stabilization during simulation of the small intestine passage.

Furthermore an *ex vivo* model with human small intestine content provided by ileostomy patients to investigate the stability and the release of BE anthocyanins was established. A higher BE concentration resulted in a slower anthocyanin degradation. Additionally, BE incubations with small intestine fluid (pH 6.3) and buffer (pH 6.3) were performed under comparable conditions. The revealed results of these incubations provided evidence that a degradation of anthocyanins is affected by intestinal enzymes or microbial enzyme activity. By incubations of different BE loaded capsule systems with human small intestinal fluid a

continuous release of anthocyanins were shown, demonstrating compensation of anthocyanin degradation.

The performed *in vitro* release and stability studies led suggest that the present techniques of encapsulation (pectin amide concave-, whey protein- and apple pectin capsules with shellac coating) resulted in an undesired release of the anthocyanins during stomach passage. Furthermore, the results demonstrated that BE loaded capsule systems induced a continuous release, a compensation of anthocyanin degradation and an increased level of active agents in the small intestine. Consequently, it would be necessary to optimize the capsule systems that an early release in the stomach would be minimized, and the intact capsule would reach the small intestine.

A further focus of the present work was to perform *in vitro* experiments with human colon cancer cell lines Caco-2 and HT-29 to examine the impact of encapsulation techniques on the biological potency of BE anthocyanins. Additionally, BE subfractions (anthocyanin-, phenylcarbonic acid- and polymer fraction) provided from the working group of Prof. Winterhalter (TU Braunschweig) were used to characterize single BE constituents contributing to the cellular effects of BE.

To elucidate potential cytotoxicity of BE, BE subfractions and BE loaded capsule systems on human colon cancer cell lines, the alamar blue assay was conducted, quantifying mitochondrial activity as marker for cell vitality. The antioxidant efficiency was measured by modulation of different biomarkers, e.g. oxidative DNA damage, GSH level and reduction of intracellular generated reactive oxygen species (ROS) in short and long time incubation periods.

No effects on the Caco-2 cell vitality could be detected by incubations with BE and BE subfractions (anthocyanin-, phenylcarbonic acid- and polymer fraction). The antioxidant efficiency was measured as increased cellular GSH level after incubations with BE or phenylcarbonic acid fraction at an concentration range of 100 - 500  $\mu\text{g/ml}$ .

Furthermore, a significant decrease of induced intracellular ROS level (50 - 500  $\mu\text{g/ml}$ ) as well as a reduction of menadione-induced oxidative DNA-damage (5 - 50  $\mu\text{g/ml}$ ) was observed. In cell experiments using anthocyanin- and polymer fractions, no antioxidant effects were detected. These results illustrated that only the phenylcarbonic acid fraction contributed to the antioxidant capacity of BE.

Multidisperse cladding capsules were not qualified for the use in *in vitro* cell culture assays due to their outer phase of oil. Whereas in investigations of other BE loaded capsule systems, significant reduction of the cell vitality was observed after incubation with whey protein- and apple pectin capsules at concentrations of 50 - 500  $\mu\text{g/ml}$ . Additionally, a slight increase of cellular GSH level (100 - 500  $\mu\text{g/ml}$ ), a compensation of ROS (100 - 500  $\mu\text{g/ml}$ ) and a decrease of DNA strand breaks (5 - 10  $\mu\text{g/ml}$ ) were detected by cell incubations with pectin amide concave-, whey protein- and apple pectin capsules. Overall, the potent antioxidant properties of the BE were not reduced by the encapsulation techniques.

In conclusion, the BE, the phenolcarbonic acid fraction as well as the BE loaded capsule systems showed antioxidant capacity (increasing GSH level, reduction of intracellular ROS

---

and prevention of oxidative DNA damage). However, which single constituents of the BE contributed to the observed cellular mechanism of action have to be characterized in further *in vitro* studies. Overall, this study elucidated that encapsulation techniques did not affect biological potency of BE, whereby an enhanced stabilization of anthocyanins was considered. Hence, capsule systems might provide an opportunity to increase anthocyanin concentration at their potential target site of action without a loss of their effectiveness. The observed *in vitro* effects of BE on the investigated biomarkers of oxidative stress must be verified in a human proof of concept study.



# 1 Einleitung

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die in vielen Obst und Gemüsesorten enthaltenen sind, haben in den vergangenen Jahren zunehmend an Bedeutung zur potentiellen Prävention von Erkrankungen gewonnen, in deren Pathogenese das Auftreten von oxidativem Stress eine wichtige Rolle spielt. Vor allem die Gruppe der Anthocyanidine, die in Pflanzen als Anthocyanidinglykoside (Anthocyane) vorkommen, rückten aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften und der damit verbundenen Möglichkeit, freie Radikale abzufangen, immer mehr in den Fokus des öffentlichen Interesses [Clifford, 2000].

Anthocyane gehören zur Gruppe der Flavonoide und sind in hohen Konzentrationen in Obst und Gemüse enthalten, wo sie für eine intensive Färbung verantwortlich sind. Je nach Anthocyanengehalt kann dies zu einem Farbspektrum von rot bis blau-schwarz führen [Yoshida et al., 2009]. Neben Heidel-, Johannis- und Holunderbeeren gelten vor allem Rotweine und Traubensäfte als anthocyanreiche Lebensmittel [Pascual-Teresa et al., 2008]. Zusätzlich sind Anthocyane wegen ihrer intensiv färbenden Wirkung als natürliche Farbstoffe in Lebensmitteln aller Art zugelassen und sind gemäß Zusatzstoffzulassungsverordnung (ZZuV) als Zusatzstoff E163 zu kennzeichnen [Beck-Texte, 2010]. Dies führte dazu, dass die tägliche Aufnahme stark variierte und je nach Ernährungsgewohnheit im Bereich von wenigen Milligramm bis über 200 mg pro Tag lag [Wu et al., 2006a].

Es wird vermutet, dass Anthocyane aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften in der Lage sind die Oxidation von Makromolekülen (DNA, RNA und Proteine) zu verringern und somit vor zahlreichen Erkrankungen, wie Krebs und koronaren Herzerkrankungen, zu schützen [He et al., 2010]. Diese potente Wirksamkeit der Anthocyane im Organismus wird jedoch zum einen durch deren Pharmakokinetik (Bioverfügbarkeit, Metabolismus, Ausscheidung) und zum anderen durch ihre limitierte Stabilität beeinflusst [McGhie et al., 2007]. So liegen Anthocyane lediglich bei einem pH-Wert von 1 - 3 als stabilisierte Flavylium-Kationen vor [Pascual-Teresa et al., 2008].

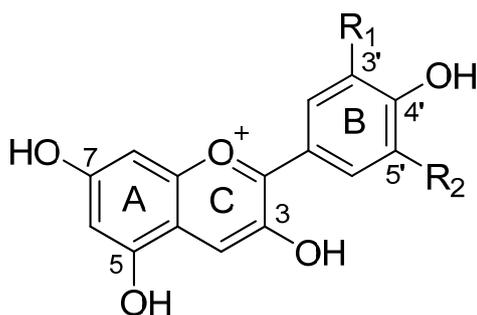
Um eine Stabilisierung der Anthocyane zu erreichen und gleichzeitig die Verfügbarkeit am Hauptort der Resorption (Darmepithel) zu erhöhen, stellen Verkapselungssysteme eine attraktive Möglichkeit dar [Champagne et al., 2007]. Die dazu benötigten Techniken, Wirkstoffe in Kapseln einzuschließen, um das Erreichen des potentiellen Wirkortes zu gewährleisten, waren bisher jedoch vorwiegend aus dem pharmazeutischen Bereich bekannt. Für den Lebensmittelbereich zulässige Formulierungen existierten kaum, wodurch ein dringender Bedarf besteht geeignete Systeme zu entwickeln, die uneingeschränkt Lebensmitteln zugesetzt werden dürfen [Augustin et al., 2009; Vos et al., 2010]. Dadurch ergibt sich nicht nur die Möglichkeit den Freisetzungsort der verkapselten Wirkstoffe (Anthocyane), sondern auch deren Kinetik und die zelluläre Aufnahme *in vivo* gezielt zu beeinflussen. Ein weiterer Vorteil würde im Falle der Anthocyane eine Stabilisierung der Struktur im niedrigen pH-Bereich in der Kapsel bedeuten, was zu einem breiteren Anwendungsspektrum, z.B. in Lebensmitteln mit neutralem pH-Wert (Joghurt, Säfte) führen könnte.

## 2 Anthocyane

Eine wichtige Substanzgruppe aus der Familie der Flavonoide sind die Anthocyane, die mit über 600 Verbindungen die größte Gruppe an wasserlöslichen Pigmenten im Pflanzenreich darstellen [Crozier *et al.*, 2009]. Die Namensgebung entstammt aus dem Griechischen und setzt sich aus den Wörtern „anthos“ für Blüte und „kyanos“ für blau zusammen. Anthocyane sind in vielen Pflanzen, Blüten und Früchten für die Farben von blau bis orange-rot verantwortlich, wobei sie hauptsächlich als Glykoside vorliegen [Pascual-Teresa *et al.*, 2008].

### 2.1 Strukturen

Die Anthocyane sind eine Gruppe chemisch verwandter Pflanzenfarbstoffe, die im Gegensatz zu den anderen Flavonoiden als strukturelles Merkmal eine positive Ladung am aromatischen C-Ring tragen und als Flavyliumkationen bezeichnet werden. Liegt das Flavyliumkation in nicht-glykosylierter Form vor, so wird es als Anthocyanidin (Aglykon) andernfalls als Anthocyan, bezeichnet. Des Weiteren unterscheiden sich die Anthocyanidine bzw. die Anthocyane untereinander aufgrund der unterschiedlichen Substitution und Variabilität an Hydroxy- und Methoxygruppen am B-Ring. Eine steigende Anzahl an Hydroxygruppen trägt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums der Anthocyane in den längeren Wellenlängenbereich und somit zu einer Farbveränderung bei. In der Natur wurden über 17 verschiedene Anthocyanidine identifiziert, von denen lediglich sechs ubiquitär verteilt sind (siehe Abb. 2.1) [Clifford, 2000; Cooney *et al.*, 2004; Pascual-Teresa *et al.*, 2008].



Anthocyanidin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Pelargonidin	H	H
Cyanidin	OH	H
Delphinidin	OH	OH
Petunidin	OCH <sub>3</sub>	OH
Peonidin	OCH <sub>3</sub>	H
Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Abb. 2.1: Übersicht über die sechs am häufigsten in der Natur vorkommenden Anthocyanidine [Pascual-Teresa *et al.*, 2008].

Die Anthocyanidine liegen in Gemüse und Früchten nicht frei als Aglykon, sondern an einen Zucker gebunden, als Glykoside, vor. Die Zuckerreste können stark variieren, wobei am häufigsten Glukopyranose, Galaktopyranose und Arabinofuranose sowie in selteneren Fällen Rhamnopyranose oder Xylofuranose beschrieben sind. Weiterhin können Di- und

Triglykoside, die  $\alpha$ - oder  $\beta$ - mit dem Anthocyanidin verknüpft und zusätzlich mit verschiedenen organischen Säuren verestert sind, vorkommen [Pascual-Teresa et al., 2008]. Die Zucker sind meist in den Positionen 3, 5, 7 und in selteneren Fällen an den Positionen 3', 5' mit dem Aglykon konjugiert [Clifford, 2000].

Das Absorptionsmaxima ( $\lambda_{\max}$ ) der Anthocyane hängt einerseits vom pH-Wert und andererseits von der Position und Anzahl der Hydroxygruppen, deren Methylierung, sowie Art und Position des Zuckers ab. Die Anthocyane weisen jeweils zwei Absorptionsmaxima auf, eines liegt im sichtbaren Bereich bei ca. 520 nm und ein weniger intensives im UV-Bereich bei ca. 280 nm (siehe Kap. 6.8.3.4).

## 2.2 Biosynthese & Funktion in Pflanzen

Die Biosynthese der Anthocyane findet im Zytosol der Pflanze über den Phenylpropanoidweg statt (siehe Abb. 2.2).

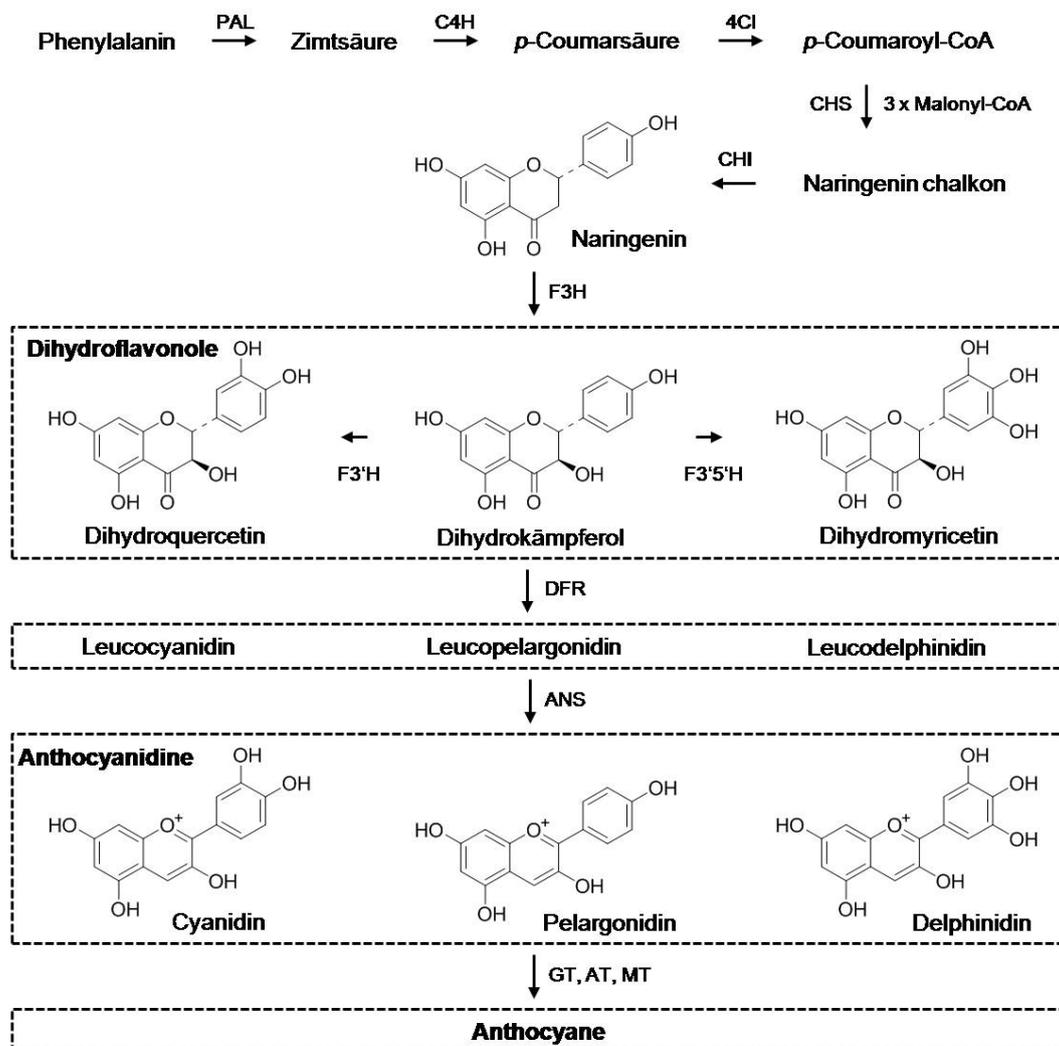


Abb. 2.2: Biosyntheseweg der Anthocyane in Pflanzen (Darstellung modifiziert nach Springob et al. und Tanaka et al.). PAL: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, C4H: Zimtsäure-4-Hydroxylase,

4Cl: 4-Coumaroyl-CoA-Ligase, CHS: Chalkonsynthase, CHI: Chalkonisomerase, F3H: Flavanon-3-Hydroxylase, F3'H: Flavanoid-3'-Hydroxylase, F3'5'H: Flavanoid-3',5'-Hydroxylase, DFR: Dihydroflavonol-4-Reduktase, ANS: Anthocyanidinsynthase, GT: Glukosyltransferase, AT: Anthocyan-Acyltransferase, MT: Malonyltransferase [Springob et al., 2003; Tanaka et al., 2008].

Anthocyane können in den verschiedensten Teilen der Pflanze, in Blättern, Stängel, Blüten, Früchten und Wurzeln, im Zellsaft der Vakuolen und in den Außenbereichen der Epidermis, lokalisiert sein [Harborne et al., 2001; Yoshida et al., 2009]. Die Anthocyangehalte der Pflanzen können jedoch aufgrund unterschiedlicher Einflussfaktoren stark variieren. Zunächst können sich Genotypen einer Art unterscheiden, woraus Gehaltsdifferenzen zwischen den Sorten resultieren. Weiterhin spielen UV-Licht, Temperatur, Reifegrad, Lagerung und die Verarbeitung zu Lebensmitteln eine entscheidende Rolle [Wu et al., 2006a].

Des Weiteren sind Anthocyane als farbgebende Komponente in Pflanzen von zentraler Bedeutung. Die durch Anthocyane verursachte Färbung wirkt auf Tiere attraktiv und trägt dadurch zur Bestäubung und Samenverbreitung bei. Weiterhin dienen Anthocyane in Pflanzen als Phytoalexine und schützen dadurch vor dem Befall von biotischen Stressfaktoren wie Pilz- und Bakterieninfektionen [Balakumar et al., 1993]. Einen weiteren Schutzmechanismus der Anthocyane in Pflanzen, stellt die Absorption von UV-Strahlung dar [Brouillard et al., 2010].

## 2.3 Aufnahme & Gehalte in Lebensmitteln

Anthocyane bilden im Pflanzenreich die größte Gruppe an wasserlöslichen Farbpigmenten im Farbspektrum von blau bis orange-rot. Gefärbte Beeren, Früchte und daraus hergestellte Säfte bzw. Rotweine, sowie bestimmte Gemüsearten sind reich an Anthocyanen (siehe Tab. 2.1) [Clifford, 2000]. Am häufigsten kommen in der Natur die nicht methoxylierten Anthocyane (Cyanidin, Delphinidin und Pelargonidin), in pigmentierten Blättern 80%, Früchten 69% und Blumen 50%, vor. Der prozentuale Anteil an Anthocyanidinen in Früchten und Gemüse lautet wie folgt: 50% Cyanidin, 12% Delphinidin, 12% Pelargonidin, 12% Peonidin, 7% Petunidin und 7% Malvidin [Kong et al., 2003]. Des Weiteren ist bekannt, dass etwa 90% der Anthocyane an Glukose gebunden vorliegen, wobei Cyanidin-3-O-glukosid das in der Natur am häufigsten vorkommende Anthocyan ist [Pascual-Teresa et al., 2008].

Durch den Konsum von Früchten, besonders Beeren, sowie der Genuss von Rotwein und Traubensaft sind für einen großen Teil der täglichen Aufnahme von Anthocyanen verantwortlich. Allein durch den Konsum von jährlich weltweit ca. 10.000 t Trauben werden erhebliche Mengen an Anthocyanen aufgenommen [Clifford, 2000]. Die tägliche Aufnahmemenge variiert stark und liegt je nach Schätzung im Bereich von wenigen Milligramm bis über 200 mg pro Tag. In Deutschland (Bayern) wurden ca. 2.7 mg pro Tag [Böhm et al., 1998], in Finnland 82.5 mg pro Tag und in den USA 180 - 215 mg pro Tag aufgenommen [Kuhnau, 1976]. Neuere Daten, bei deren Evaluierung mehr als 100 gebräuchliche Nahrungsmittel berücksichtigt wurden, zeigten, dass die tägliche Aufnahme in

den USA lediglich 12.5 mg pro Person betrug [Wu et al., 2006a]. Es muss jedoch beim Festlegen der täglichen Aufnahmemenge berücksichtigt werden, dass die Anthocyanaufnahme stark von den Verzehrsgewohnheiten der Konsumenten abhängig ist. So können beispielsweise durch den Verzehr einer Portion Heidelbeeren 500 mg Anthocyane aufgenommen werden, wohingegen eine Portion Holunderbeeren 2.000 mg Anthocyane enthalten kann [He et al., 2010].

Tab. 2.1: Auszug von Anthocyangehalten ausgewählter Früchte und Gemüse.

Lebensmittel	Anthocyangehalt [mg/100 g Frischgewicht]	Hauptverbindung*	Referenz
Cranberry ( <i>Vaccinium macrocarpon</i> )	140	Peo-3-O-gal	[Prior et al., 2001]
Himbeere ( <i>Rubus occidentalis</i> )	687	Cy-3-O-soph	[Wu et al., 2006a]
Holunderbeere ( <i>Sambucus nigra</i> )	1374	Cy-3-O-glc	[Wu et al., 2004]
Johannisbeere ( <i>Ribes nigrum</i> )	476	Del-3-O-rut	[Wu et al., 2006a]
Kulturheidelbeere ( <i>Vaccinium corymbosum</i> )	180	Del-3-O-glc	[Latti et al., 2008]
Rotkraut ( <i>Brassica oleracea</i> convar. <i>capitata</i> var. <i>rubra</i> )	322	Del-3-O-glc	[Wu et al., 2006a]
Rotwein	67	Mal-3-O-glc	[Nyman et al., 2001]
Wildheidelbeere ( <i>Vaccinium myrtillus</i> )	487	Del-3-O-glc	[Wu et al., 2006a]

\* Hauptverbindungen: Peo-3-O-gal: Peonidin-3-O-galaktosid, Cy-3-O-soph: Cyanidin-3-O-sophorosid, Cy-3-O-glc: Cyanidin-3-O-glukosid, Del-3-O-rut: Delphinidin-3-O-rutinosid, Del-3-O-glc: Delphinidin-3-O-glukosid, Mal-3-O-glc: Malvidin-3-O-glukosid.

Wie in Tab. 2.1 gezeigt, weisen Heidelbeeren nicht nur hohe Konzentrationen auf, sondern besitzen auch ein weites Spektrum an Anthocyanen (15 verschiedene) [Kahkonen et al., 2003; Latti et al., 2008]. Da in dieser Arbeit ein kommerziell erhältlicher Heidelbeerextrakt (siehe

Kapitel 6.2) verwendet wurde, soll in den nächsten Kapiteln näher auf die Heidelbeere (*Vaccinium spp.*) eingegangen werden.

### **2.3.1 Die Heidelbeere (*Vaccinium spp.*)**

Die europäische Heidelbeere, lat.: *Vaccinium myrtillus* L. gehört zur Gattung der Heidegewächse (*Ericaceae*). Es handelt sich um eine erbsengroße, dunkel- bis schwarzblaue Beerenfrucht, die in den Höhenlagen der nördlichen Hemisphäre heimisch ist. Je nach Anbauregion ist sie auch unter weiteren Namen wie Blaubeere, Mostbeere, Bickbeere oder Schwarzbeere bekannt. Die Heidelbeere enthält ca. 85% Wasser, 0.7% Protein, 0.6% Fett, 7.4% Kohlenhydrate, 4.9% Ballaststoffe und 2% Mineralstoffe. Allgemein wird zwischen zwei Arten, der Kultur- (*Vaccinium corymbosum* L.) und der Wildheidelbeere (*Vaccinium myrtillus* L.) unterschieden [Abolins et al., 2009; Lee et al., 2004].

#### **2.3.1.1 Die Wildheidelbeere (*Vaccinium myrtillus* L.)**

Bei der Wildheidelbeere (*Vaccinium myrtillus* L.) handelt es sich um einen buschigen Zwergstrauch, der vorwiegend auf feucht-sauren Böden in Sumpf- und Moorlandschaften gedeiht und eine Höhe von 20 bis 40 cm erreicht. Die Gattung *Vaccinium* ist vorwiegend auf der nördlichen Hemisphäre beheimatet, wobei in tropischeren Gebieten, wie es zum Teil in Asien der Fall ist, ihr Wachstum auf das Hochgebirge beschränkt ist. In der Erntezeit, die sich von Juli bis September erstreckt, tragen die Sträucher schwarzblaue Früchte mit 1 cm Durchmesser, die einzeln am Heidelbeerstrauch hängen.

Im Unterschied zu anderen Heidelbeerarten liegen die farbgebenden Anthocyane der Wildheidelbeeren sowohl in der Schale als auch im Fruchtfleisch vor [Abolins et al., 2009; Lee et al., 2004].

#### **2.3.1.2 Die Kulturheidelbeere (*Vaccinium corymbosum* L.)**

Die Kulturheidelbeere (*Vaccinium corymbosum* L.) ist durch Züchtung oder Selektion aus der Wildheidelbeere hervorgegangen. Wachstum und Gestalt des Heidelbeerstrauches kann in zwei Gruppen, „highbush“ und „lowbush blueberries“, eingeteilt werden. Sie erreichen in der Regel eine Höhe von 2 bis 5 m und gedeihen am besten auf sauren, nährstoffarmen, humusreichen Moor- und Sandböden. Die Früchte der Kulturheidelbeere sind im Vergleich zur Wildheidelbeere größer und besitzen ein helleres Fruchtfleisch. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die farbgebenden Anthocyane vorwiegend in der Schale und nicht im Fruchtfleisch zu finden sind. Je nach Sorte und Klima liefern die Sträucher einen Ertrag zwischen 3 und 5 kg Frucht pro Strauch. Aktuelle Daten aus dem Jahr 2008 gehen von einer weltweiten Ernte zwischen 300.000 t und 350.000 t pro Jahr aus, wobei sich der Heidelbeeranbau auf fünf Staaten - USA 60%, Kanada 29%, Polen 2%, Litauen 1% und Deutschland 1% - verteilt (siehe Abb. 2.3) [Abolins et al., 2009; FAO, 2008; Lee et al., 2004].

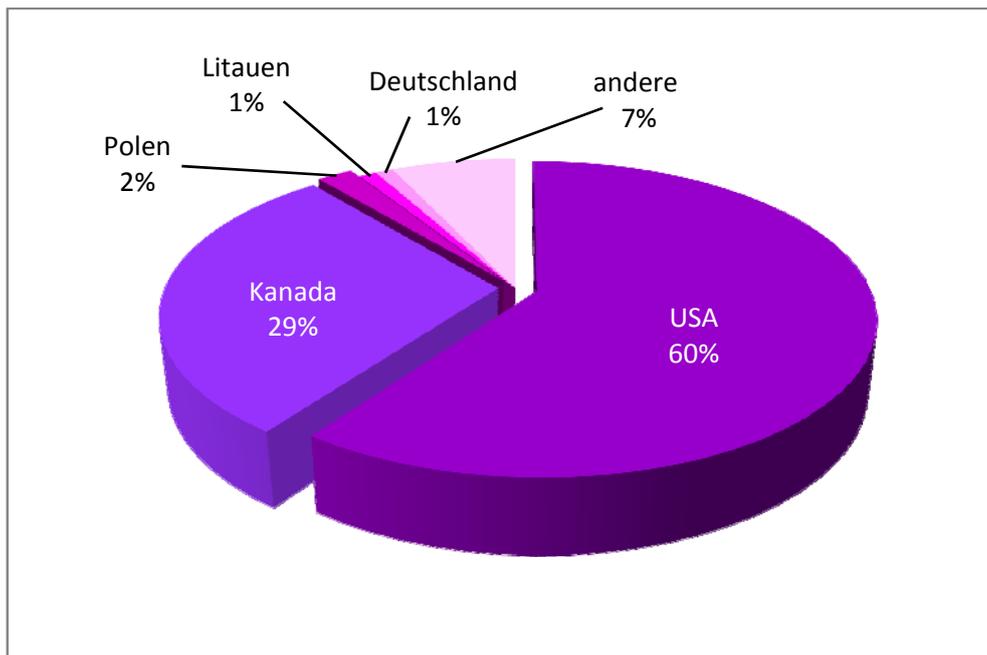


Abb. 2.3: Hauptanbauländer für Heidelbeeren weltweit [%] [FAO, 2008].

## 2.4 Toxikologie

Das „Joint Expert Committee of Food Additives“ der WHO (engl. *World Health Organization*) legte 1982 einen ADI-Wert (engl. *acceptable daily intake*) von 2.5 mg/kg Körpergewicht für Anthocyane aus Traubenschalenextrakt fest [Hallagan *et al.*, 1995]. Die akute orale Toxizität ist sehr gering. Dies konnte in einer Studie mit Probanden nach einer oralen Gabe von 180 mg/kg Anthocyane pro Tag über einen Zeitraum von 6 Monaten gezeigt werden [Upton, 2001]. Im Jahr 1967 wurde ein LD<sub>50</sub> einer Kombination aus Cyanidin-3-O-glukosid, Delphinidin-3-O-glukosid, Petunidin-3-O-glukosid und Malvidin-3-O-glukosid bei Mäusen von 25 g/kg KG und bei Ratten von 20 g/kg KG festgelegt [Hallagan *et al.*, 1995]. In weiteren Studien, die sich mit der Toxizität von Anthocyanen befassten, wurden keine toxischen, genotoxischen und reproduktionstoxischen Effekte ermittelt [Becci *et al.*, 1983a; Becci *et al.*, 1983b; Hallagan *et al.*, 1995].

## 2.5 Einflussfaktoren auf die Stabilität

Die Stabilität der Anthocyane ist von der Änderung unterschiedlichster Faktoren (pH-Wert, Lagertemperatur, Konzentration, Licht, Sauerstoff, Lösemittel, Enzymen, Proteinen und Metallionen) abhängig [Cavalcanti *et al.*, 2011]. Einige dieser Faktoren und deren Auswirkung auf die Stabilität sind in Tab. 2.2 aufgeführt, wobei auf die wichtigsten im Folgenden noch näher eingegangen wird.

Tab. 2.2: Übersicht der Einflüsse verschiedener Faktoren auf die Stabilität der Anthocyane.

Faktor	Grund	Stabilität	Referenz
Konzentration	Selbstassoziation	↑	[Castaneda-Ovando et al., 2009]
Konjugation	Glykosylierung	↑	[Borkowski et al., 2005]
Metalle	Komplexbildung	↑	[Schreiber et al., 2010]
Proteine	Proteinbindung	↑	[Viljanen et al., 2005]
Temperatur	Hydrolyse (T > 80 °C)	↓	[Aramwit et al., 2010]
Sauerstoffgehalt	Verstärkung anderer Faktoren	↓	[Odriozola-Serrano et al., 2009]
Licht	Abbau/ Zerfall	↓	[Chiste et al., 2010]
Enzyme	Abbau/ Zerfall	↓	[Huang, 1955]
pH-Wert > 3	Abbau/ Zerfall	↓	[Wang et al., 2010]

### 2.5.1 Chemische Strukturen

Sowohl durch Acylierung als auch durch Glykosylierung des Anthocyanidins kommt es zu einer Veränderung der physikalischen (Molekülgröße) und chemischen Eigenschaften (Polarität) der Anthocyane. Eine Acylierung des B-Rings mit Hydroxy- und Methoxygruppen verringert deren Stabilität in neutralen Medien [Fleschhut et al., 2006]. Im Gegensatz dazu wird durch Glykosylierung und die daraus resultierenden intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen die Stabilität und Wasserlöslichkeit des Anthocyanins erhöht [Borkowski et al., 2005].

### 2.5.2 pH-Wert, Temperatur & Licht

Der Vorgang der pH-abhängigen Strukturänderung ist ein reversibler Prozess, bei dem die chemische Struktur der Anthocyane vom pH-Wert der Lösung beeinflusst wird. So liegen bei einem pH-Wert von 1 - 3 die Anthocyane überwiegend als Flavyliumkationen, bei 4 - 5 als Halbacetale, bei 6 - 8 als chinoide Basen und bei einem pH von 7 - 8 als Chalkone vor [Brouillard et al., 1977; Pascual-Teresa et al., 2008]. Einhergehend mit dieser strukturellen

Veränderung der Anthocyane kommt es zu einer Farbveränderung von rot (Flavyliumkation) über tiefblau (ionische Anhydrobase) zu gelb (Chalkon) [Pascual-Teresa et al., 2008].

Die strukturelle Abhängigkeit der unterschiedlichen Molekülstrukturen der Anthocyane in wässrigen Lösungen, bei unterschiedlichen pH-Werten, ist in Abb. 2.4 ausführlich dargestellt [McGhie et al., 2007].

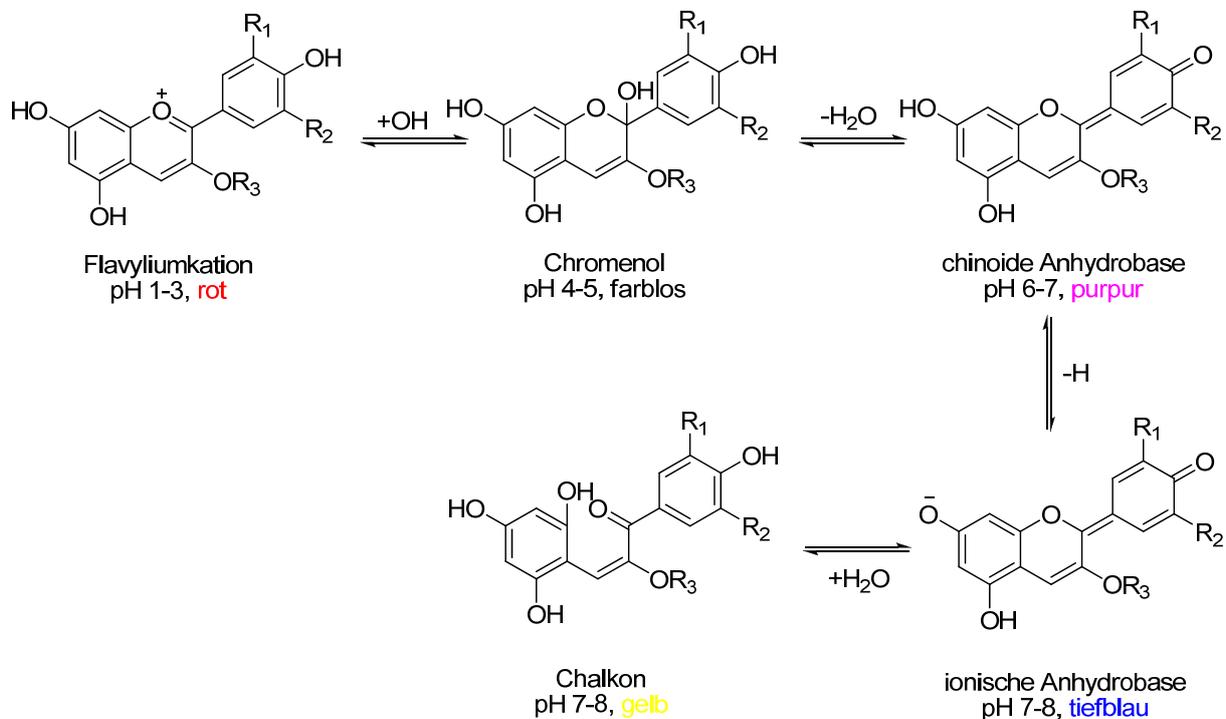


Abb. 2.4: Struktur und Farbe der Anthocyane bei unterschiedlichen pH-Werten (R<sub>1</sub>: H, OH, OCH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>: H, OH, OCH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub>: Zuckerkomponente) [McGhie et al., 2007].

Temperaturen < 60 °C beeinflussen die Stabilität der Anthocyane nicht. Eine Erhöhung der Temperatur (> 80 °C) führt jedoch im ersten Schritt zu einer Abspaltung des Zuckerrestes, sowie im zweiten Schritt zu einer Öffnung des Ringsystems und damit zu einer verstärkten Chalkon-Bildung [Wang et al., 2010]. Nach Abkühlen und Ansäuern ist es möglich, einen Teil der entstandenen Chalkone in Flavyliumkationen zurückzuführen [Jackman et al., 1987].

Sonnenstrahlung beeinflusst Anthocyane auf zwei unterschiedlichen Wegen. Einerseits ist Sonnenstrahlung notwendig zur Biosynthese der Anthocyane in Pflanzen, andererseits wird dadurch deren Abbau beschleunigt. In einer Studie von Chiste und Mitarbeitern wurde gezeigt, dass verschiedene Lichtquellen (UV-, Infrarot- und Fluoreszenz-Licht) zu einem unterschiedlich schnellen Abbau der Anthocyane führten [Chiste et al., 2010]. Als optimale Lagerbedingungen haben sich niedrige Temperaturen unter Lichtausschluss herausgestellt [Castaneda-Ovando et al., 2009].

## 2.6 Instabilität & Polymerisierung

Die Anthocyane sind sehr instabil (siehe Kap. 2.5) und können aufgrund unterschiedlichster Einflüsse einem Abbau unterliegen. In Studien von Sadiłova *et al.* zeigte sich, dass die Endprodukte des thermischen Zerfalls bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 1 und pH 3.5) gleich waren, ihr Entstehungsweg dorthin aber unterschiedlich. Am Beispiel von Cyanidin-3-O-glukosid wird der Abbau abhängig vom pH-Wert (siehe Abb. 2.5) aufgezeigt [Sadiłova *et al.*, 2006; Sadiłova *et al.*, 2007].

In saurem Medium bildete sich nach Deglykosylierung das Aglykon, welches weiter in eine Phenolsäure (Protokatechusäure) und einen Phenolaldehyd (Phloroglucinolaldehyd) zerfällt. Demgegenüber öffnete sich bei pH 3.5 im ersten Schritt der Pyryliumring und es bildete sich das Chalkonglukosid. Daraus entstehen nach erfolgter Deglykosylierung ebenfalls die schon in Schritt eins beschriebenen Abbauprodukte [Sadiłova *et al.*, 2006; Sadiłova *et al.*, 2007]. Die Geschwindigkeit des Abbaus nimmt mit steigender Temperatur zu und ist stark vom pH-Wert abhängig. Im Vergleich der Abbaugeschwindigkeiten von Anthocyanen und Anthocyanidinen wurde ein stabilisierender Effekt durch Glykosylierung beobachtet [Wang *et al.*, 2010].

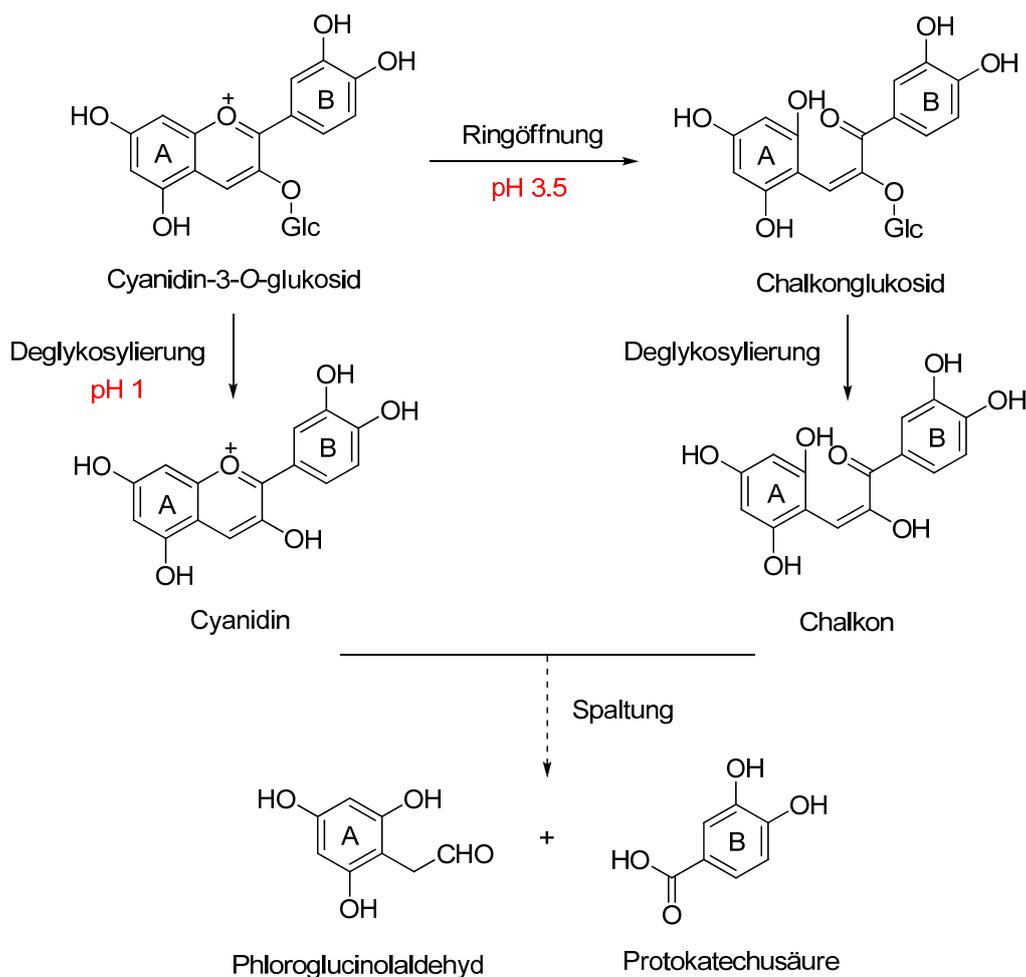


Abb. 2.5: pH-Wert abhängiger Abbau am Beispiel von Cyanidin-3-O-glukosid (modifiziert nach [Sadiłova *et al.*, 2006; Sadiłova *et al.*, 2007]).

Der aus dem A-Ring entstehende Phloroglucinolaldehyd ist für alle Aglyka identisch, wohingegen die aus dem B-Ring gebildete aromatische Carbonsäure für das jeweilige Anthocyanidin charakteristisch ist (siehe Tab. 2.3) [Fleschhut et al., 2006].

Tab. 2.3: Beim Zerfall der Anthocyanidine entstehende Carbonsäuren [Fleschhut et al., 2006].

Anthocyanidin	Korrespondierende Carbonsäure
Pelargonidin	4-Hydroxybenzoesäure
Cyanidin	3,4-Dihydroxybenzoesäure (Protokatechusäure)
Delphinidin	3,4,5-Trihydroxybenzoesäure (Gallussäure)
Peonidin	4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure (Vanillinsäure)
Petunidin	4,5-Dihydroxy-3-methoxybenzoesäure
Malvidin	4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoesäure (Syringasäure)

Anthocyanverluste können durch Dimerisierung bzw. Polymerisierung auftreten. Schon seit einigen Jahren wird vermutet, dass Anthocyane nicht nur einem Zerfall, sondern auch einer Bildung von braun gefärbten Pigmenten unterliegen [Jackman et al., 1987]. In einer neueren Studie bei der Herstellungsprozesse und Lagerung von Heidelbeerprodukten untersucht wurden, konnte ebenfalls die Bildung von Polymeren beobachtet werden [Brownmiller et al., 2008]. Der genaue Mechanismus, der zur Polymerbildung führt, sowie der strukturelle Aufbau dieser Polymere sind zu diesem Zeitpunkt ungeklärt. Lediglich die Bildung von Cyanidindimeren in neutralem Medium, sowie deren molare Masse und Fragmentierungsmuster konnten bisher teilweise identifiziert werden (siehe Abb. 2.6) [Fleschhut et al., 2006]. Ein weiterer von Dixon et al. postulierter Mechanismus der Anthocyanpolymerisierung könnte, aufgrund der strukturellen Verwandtschaft zu den Flavan-3-olen, analog der Bildung von Proanthocyanidinen verlaufen [Dixon et al., 2005]. Weitere mögliche Mechanismen zur Polymerisation von Anthocyanen stellen eine Acetaldehyd-vermittelte Bindung mit phenolischen Stoffen, eine direkte Anthocyan-Tannin Verknüpfung oder eine Komplexbildung mit phenolischen Säuren, dar [Remy et al., 2000; Rentzsch et al., 2007].

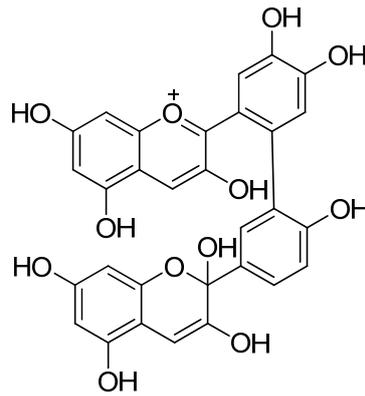


Abb. 2.6: Postulierte Anthocyan-Dimer-Bildung nach [Fleschhut et al., 2006].

## 2.7 Möglichkeiten zur Stabilisierung

Heutzutage sind unterschiedliche Methoden, die zur Stabilisierung von Anthocyanen beitragen, bekannt. Zu den wichtigsten Mechanismen gehören die in der Natur auftretenden Assoziationsreaktionen (Copigmentierung, Selbstassoziation, Bildung von Metallkomplexen), die spontan in Pflanzen ablaufen können.

Innovative Stabilisierungstechniken, die in der Lebensmittelchemie/ -technologie immer mehr an Bedeutung gewinnen, stellen Methoden zur Verkapselung von Anthocyanen dar. Hierbei besteht die Möglichkeit Reinsubstanzen, anthocyanreiche Extrakte oder ausgewählte Fraktionen in unterschiedliche Verkapselungssysteme einzubringen und dadurch deren Freisetzung und Farbstabilität, je nach Bedarf, modulieren zu können. In den folgenden Kapiteln soll nun näher auf die zugrunde liegenden Stabilisierungsmechanismen der Natur und im Anschluss auf Technologien in der Lebensmittelindustrie eingegangen werden.

### 2.7.1 Copigmentierung

Bei der Herstellung von Lebensmitteln aus anthocyanreichen Rohwaren besitzt der Copigmentierungseffekt eine große Bedeutung, da die Farbe ein Qualitätsmerkmal für Produkte darstellt [Eiro et al., 2002]. Die Copigmentierung ist definiert als hydrophobe  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung zwischen planaren Anthocyanen (Flavyliumkationen) und anderen planaren, meist farblosen Molekülen (wie z.B. Benzoe- oder Zimtsäuren). Diese Verknüpfungen führen zum einen zu einer Intensivierung der Farbe und somit zu höheren Absorptionswerten (hyperchromer Effekt), was mit einer Stabilisierung der Anthocyanmoleküle einhergeht. Andererseits können Farbänderungen auftreten (bathochromer Effekt), die auf eine Verschiebung des Absorptionsmaximums in den längeren Wellenbereich zurückzuführen sind [Asen et al., 1972; Brouillard et al., 2010]. Erklärt wird der hyperchrome Effekt in wässriger Lösung durch eine Anlagerung von  $H_2O$ -Molekülen um den entstandenen Anthocyan-Pigment-Komplex, wodurch ein engerer Kontakt zwischen den beiden Strukturen (Anthocyan und Copigmentierungspartner) ermöglicht wird. Der bathochrome Effekt kann

durch eine Polaritätsänderung in der näheren Umgebung des Anthocyans erklärt werden und kann auf eine Entfernung von H<sub>2</sub>O-Molekülen durch weniger polare organische Copigmente zurückgeführt werden [Brouillard *et al.*, 2010].

Des Weiteren kann die Copigmentierung durch zwei unterschiedliche Copigmentierungseffekte (intermolekulare und intramolekulare) beschrieben werden, die den Hauptmechanismus der Farbstabilisierung in Pflanzen darstellen [Eiro *et al.*, 2002; Malien-Aubert *et al.*, 2001]. Beide Arten der Copigmentierung sind in der Natur weit verbreitet und in höheren Pflanzen für die Pigmentierung anthocyanhaltiger Blüten verantwortlich [Goto *et al.*, 1991]. Diese Stabilisierung der Anthocyanmoleküle ist auf inter- und intramolekulare hydrophobe Wechselwirkungen zwischen aromatischen Ringen und anderen aromatischen Strukturen zurückzuführen. Hierbei kommt es zu sandwichartigen Stapellagen, bei denen zusätzlich Wasserstoffbrücken und Charge-Transfer-Wechselwirkungen eine Rolle spielen [Brouillard *et al.*, 2010; Goto *et al.*, 1991].

### 2.7.2 Selbstassoziation

Die Selbstassoziation führt wie die Copigmentierung zu einer Stabilisierung zweier oder mehrerer Anthocyanmoleküle und wurde erstmals durch Asen *et al.* im Jahre 1972 beschrieben [Asen *et al.*, 1972]. Hierbei zeigte sich, dass mit steigender Anthocyankonzentration eine Zunahme der Absorption zu beobachten war. Man geht davon aus, dass dies auf eine vertikale Stapelung der Anthocyane, die durch hydrophobe Wechselwirkungen der aromatischen Gruppen stabilisiert werden, zurückzuführen ist. Daraus resultiert eine positive Abweichung vom Lambert-Beerschen Gesetz, d.h. die Farbintensität steigt mit zunehmender Anthocyankonzentration steiler an [Cavalcanti *et al.*, 2011].

In einer aktuellen Studie mit Anthocyanen aus Rotwein konnte gezeigt werden, dass mit steigender Anzahl an Methoxygruppen am B-Ring das Ausmaß der Selbstassoziation und somit die Farbe und Stabilität der Anthocyane zunimmt. In Abb. 2.7 ist die Selbstassoziation von Anthocyanen modifiziert nach Castaneda-Ovando *et al.* dargestellt [Castaneda-Ovando *et al.*, 2009].

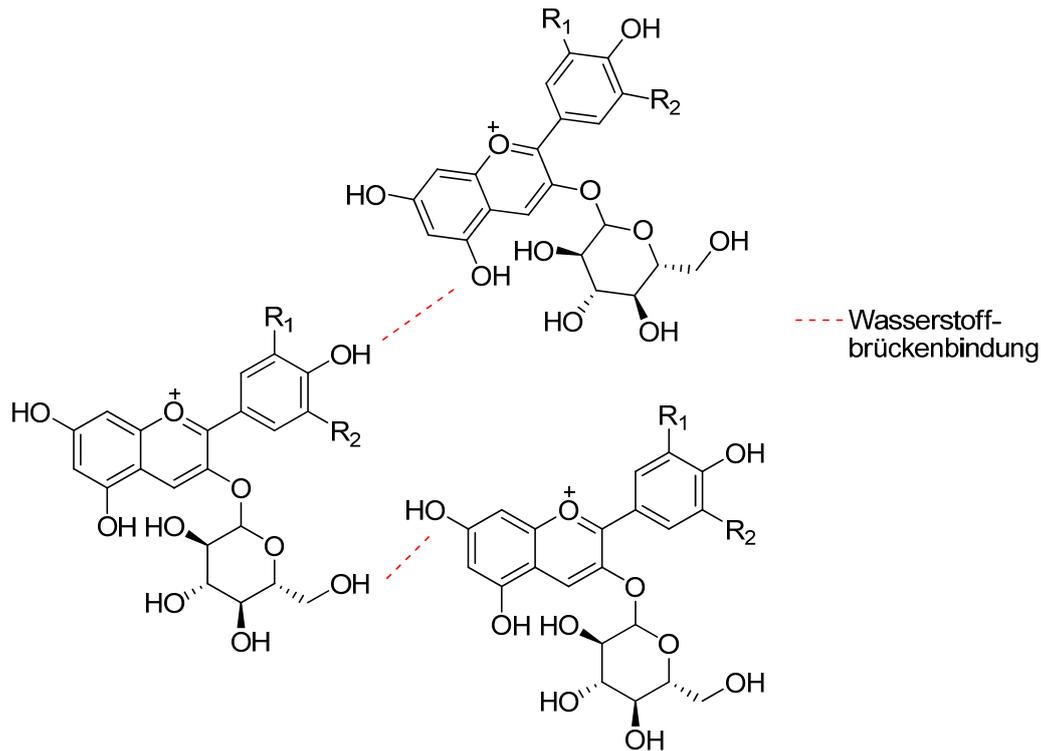
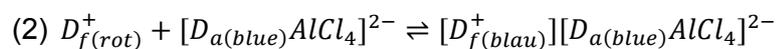
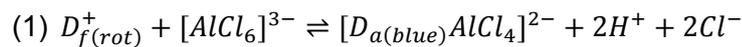


Abb. 2.7: Selbstassoziation der Anthocyane (je nach Anthocyan  $R_1$ : H, OH,  $OCH_3$ ;  $R_2$ : H, OH,  $OCH_3$ ) (modifiziert nach [Castaneda-Ovando et al., 2009]).

### 2.7.3 Bildung von Metallkomplexen

Die Vielfalt an Blütenfarben resultiert oft aus der Bildung von Metall-Anthocyan-Komplexen [Goto et al., 1991]. Jedoch sind nicht alle Anthocyane bzw. Anthocyanidine zu dieser Komplexbildung fähig, da als Voraussetzung zwei Hydroxygruppen in ortho-Stellung am B-Ring benötigt werden. Aus diesem Grund sind nur Cyanidin, Delphinidin und Petunidin zur Komplexbildung mit Metallen wie Zinn, Kupfer, Eisen, Aluminium und Magnesium in der Lage [Cavalcanti et al., 2011].

In einer aktuellen Studie wurde der Mechanismus der Komplexbildung von Aluminium ( $Al^{3+}$ ) mit Delphinidin untersucht. Der Mechanismus kann in zwei Bildungsschritte unterteilt werden. Im ersten Schritt (1) bildet die anionische Anhydrobase des Delphinidins mit  $Al^{3+}$  einen Komplex, der im zweiten Schritt (2) durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen eines zweiten Delphinidins (Flavyliumkation) stabilisiert wird. Dadurch entsteht ein bathochromer Effekt, welcher die Blaufärbung vertieft [Schreiber et al., 2010].



$D_f$ : Flavyliumkation des Delphinidin,  $D_a$ : Anionische Anhydrobase des Delphinidin, AlCl: Aluminiumchlorid.

### 2.7.4 Molkenproteine & Serumalbumin

Eine weitere Möglichkeit Anthocyane zu stabilisieren stellt die Zugabe von Proteinen (Molkenproteinen, Serumalbumin (HSA, engl. *human serum albumin*)) dar. In einer Studie von Viljanen *et al.* wurde eine Bindung von 20% Anthocyanen an Molkenproteine beobachtet. Wahrscheinlich beruht diese Bindung auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carbonylgruppen des Proteins und phenolischen Hydroxygruppen des Anthocyanins [Viljanen *et al.*, 2005]. Als Bindungsdomäne für Anthocyane an humanem Serumalbumin (HSA) wurde in einer Studie von Ackermann 2010 mittels „molecular modelling“ eine Bindungsstelle in unmittelbarer Nähe zur Warfarin-Bindungsstelle lokalisiert. Die wahrscheinlichsten Bindungsformen stellten hierbei die chinoiden und ionischen Strukturen der Anthocyane im basischen pH-Bereich dar [Ackermann, 2010].

## 2.8 Verkapselungstechniken und deren Bedeutung in der Lebensmittelindustrie

Die Verkapselung ist definiert als eine Technik, die dazu dienen kann feste, flüssige oder gasförmige Substanzen (z.B. Pflanzenextrakte oder bioaktive Komponenten) in Kapseln oder Matrices einzuschließen um dadurch...

- die Freisetzung der Substanzen aus den Kapseln zu verzögern bzw. zu steuern und dadurch die Konzentrationen am Wirkort zu erhöhen („triggered-“ oder „controlled release“)
- den Geschmack und Geruch von Substanzen zu maskieren
- flüssige Substanzen zu stabilen Pulvern zu verarbeiten
- die Substanzen vor Licht, Feuchtigkeit und Sauerstoff zu schützen
- die Substanzen vor Inaktivierung durch das pH-Milieu des Magens zu schützen
- bestimmte Abschnitte des GIT vor der verkapselten Substanz zu schützen
- flüchtige Substanzen vor dem Verdampfen zu bewahren
- die Toxizität der Substanzen zu reduzieren [Bansode *et al.*, 2010].

Die in der Lebensmitteltechnologie verwendeten Verkapselungstechniken (siehe Tab. 2.4) können mit dem pharmazeutischen Sektor in Verbindung gebracht werden, da dort schon seit einigen Jahrzehnten erfolgreiche Kapselsysteme im Einsatz sind, um Wirkstoffe direkt an ihren Wirkort (wie z.B. Dünndarm oder Dickdarm) zu befördern [Champagne *et al.*, 2007]. So können lokal sehr hohe Wirkkonzentrationen erreicht werden, ohne systemische Nebenwirkungen hervorzurufen. Jedoch nicht nur die pharmazeutische, auch die lebensmittelchemische Industrie hat den Nutzen von Kapseln bei der Lebensmittelherstellung erkannt. Der Unterschied von lebensmittel-tauglichen Kapseln zu pharmazeutischen Produkten besteht hauptsächlich in ihrer Größe, die sich im Mikrometerbereich (< 50 µm) befindet, wohingegen die Kapseln aus dem Pharmabereich meistens einen größeren Durchmesser (> 10 mm) aufweisen. Dadurch wird ermöglicht, dass sie beim

Verzehr der Lebensmittel nicht wahrgenommen werden können. Außerdem verbessert die Verkapselung oftmals auch Produkteigenschaften wie Dosierbarkeit, Lagerstabilität, Handhabung oder Fließeigenschaften von Pulver [Augustin et al., 2009; Champagne et al., 2007]. In einigen heute schon erhältlichen industriellen Produkten (Zahncremes, Pestizide, Shampoos, Badezusätze, Durchschlagpapiere, Erfrischungstücher, Reinigungsmittel und spezielle Hautreiniger) finden verkapselte Wirkstoffe ihre Verwendung [Sliwka, 1975].

Tab. 2.4: Auswahl literaturbekannter Verkapselungstechniken zur Stabilisierung anthocyanreicher Produkte im Bereich der Lebensmittelverarbeitung.

Verkapselungstechnik	verwendete Materialien	Referenz
Sprühtrocknung	Maltodextrin, Proteinisolate	[Robert et al., 2010], [Bakowska-Barczak et al., 2010]
Gefriertrocknung	Pullulan (E 1204)*	[Gradinaru et al., 2003]
Thermische Gelbildung	Glucan, Pektinat, Alginat, Molkenprotein, Curdlan (E 424) *	[Xiong et al., 2006], [Ferreira et al., 2009], [Betz et al., 2010]
Wasser/Öl/Wasser (W/O/W)-Doppelmulsionen	Wasser, Öl, Emulgator	[Frank et al., 2010], [Schuchmann et al., 2004]
Einschluss & Komplexierung	Cyclodextrine	[Lucas-Abellan et al., 2008]

\* Pullulan: Wasserlösliches Polysaccharid; Curdlan: Gelbildner.

Ziel der Verkapselung von bioaktiven Komponenten wie z.B. Anthocyanen ist es, deren Struktur zu stabilisieren und vor einem Abbau bzw. Zerfall zu schützen. Speziell bei Anthocyanen besteht dadurch die Möglichkeit die Farbe (Struktur ist pH-abhängig) zu erhalten (siehe Kap. 2.5.2). Des Weiteren soll durch Einbringen der Substanzen in feste oder flüssige Partikel eine kontrollierte Freisetzung in Abhängigkeit von bestimmten Umgebungsbedingungen (pH-Milieu, Enzymaktivität, Schwerkraft, Zeit) am Wirkort gewährleistet werden [Augustin et al., 2009].

Im Allgemeinen wird die Stabilität der Anthocyane gegenüber schädigender Einflüsse (siehe Kap. 2.5) unabhängig von der angewandten Verkapselungstechnik erhöht. Es wird jedoch vermutet, dass die Herstellungsparameter bei der Kapselproduktion einen zusätzlichen Einfluss auf die Anthocyanstabilität haben könnten [Cavalcanti et al., 2011].

Um die oben genannten Ziele zu erreichen, stehen den Forschungsgruppen und der Industrie eine Vielzahl unterschiedlichster Verkapselungstechniken wie beispielsweise Emulgation, Koazervation, Sprühtrocknung, Sprühkühlung und Extrusionstechnologien zur

Verfügung [Vos et al., 2010]. Je nachdem welche Materialien bei den einzelnen Verkapselungsprozessen verwendet werden, ändern sich die spezifischen Eigenschaften der produzierten Kapseln. Sollen die Kapseln in Lebensmittel direkt eingebracht werden, steht dem Produzenten nur eine begrenzte Auswahl an Materialien zur Verfügung. Diese sind durch eine E-Nummer gekennzeichnet und werden teilweise über die Zusatzstoffzulassungsverordnung (ZZuLV) geregelt [Beck-Texte, 2010]. Dazu zählen Polysaccharide (Pektine (E 440a/b), Alginat (E 401 - 405), Maltodextrine (E 1404), Lipide (Triglyceride, Fette, Wachse (E 900 - 907)), Proteine (Milkenproteine) oder Polymere (Schellack (E 904)) [Bansode et al., 2010].

Die beiden in der Lebensmitteltechnologie am häufigsten verwendeten Kapseltypen sind die Kern-Hülle- (A) und die Matrixkapsel (B). Bei Kern-Hülle Kapseln wird die Oberfläche des festen oder flüssigen Kerns durch eine dünne Hülle (Membran, Kapselwand) von der Umgebung getrennt, die nochmals von einer sogenannten zusätzlichen Schutzschicht („Coating-Schicht“) umgeben sein kann. Bei Matrixkapseln ist eine zusätzlich auf die Kapsel aufgebrachte Hüllschicht möglich (siehe Abb. 2.8). Diese beiden Schichten sind je nach Material und Dicke für die Spezifität der Kapseln verantwortlich, da aufgrund unterschiedlicher funktioneller Eigenschaften (mechanische, magnetische, lichtempfindliche oder elektrische) eine gezielte Steuerung oder Kontrolle der Freisetzung (am Wirkort) erreicht werden kann [Bansode et al., 2010; Singh et al., 2010; Vos et al., 2010].

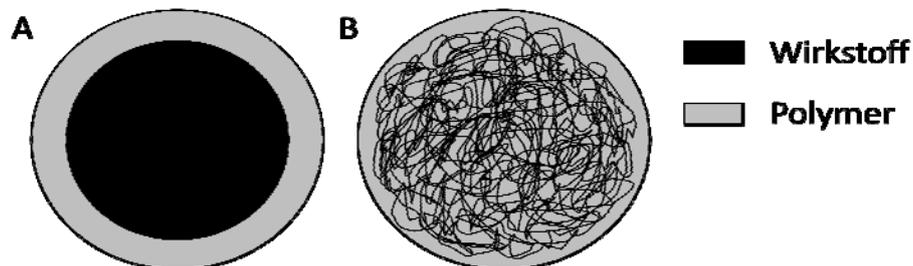


Abb. 2.8: Kern-Hülle Kapsel und Matrixkapsel im Vergleich: A) Kern-Hülle Kapsel aus Polymerhülle mit einem wirkstoffhaltigen Kern B) Matrixkapsel aus einem Polymer mit in das Polymergerüst eingebautem Wirkstoff nach [Singh et al., 2010].

Es gibt verschiedene Wege, wie der in eine Kapsel eingebrachte Wirkstoff freigesetzt werden kann: Ist der Wirkstoff gleichmäßig über den Kapselkern verteilt und dort direkt mit dem Wandmaterial verbunden, so kann die Freisetzungskinetik durch den Abbau des Materials bedingt sein oder diffusiv vor dem Abbau oder zeitgleich erfolgen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, die aktive Komponente mit einer zusätzlichen Membran zu umgeben, die eine verzögerte diffusive Freisetzung ermöglicht und somit nicht vom Abbau der Matrix beeinflusst wird. Zusätzlich zu diesen zwei Varianten kann eine Schutzschicht aus Coating-Materialien aufgebracht werden, die aufgrund unterschiedlicher Parameter (pH-Wert, enzymatische Aktivität) die Freisetzung erst ermöglicht [Bansode et al., 2010; Vos et al., 2010]. Ein Beispiel hierfür stellt die am häufigsten verwendete Coating-Substanz Schellack dar. Es ist ein natürliches Polymer, dass von der parasitären Lackschildlaus *Kerria Lacca* sekretiert wird [Penning, 1996]. Aufgrund der positiven Eigenschaften (Filmbildung, pH-Wert-abhängiges

Löseverhalten, Wasserunlöslichkeit) wird Schellack in der Pharmaindustrie häufig eingesetzt, um die unverändert Magenpassage bei Medikamenten zu gewährleisten und kontrolliert im Dünn- oder Dickdarm freizusetzen. Die Schutzwirkung bei niedrigen pH-Werten und das anschließende Auflösen der Schellack-Schicht im höheren pH-Bereich, ist ausführlich in Abb. 2.9 dargestellt [Bose et al., 2007; Buch et al., 2009; Leopold et al., 2011; Penning, 1996].

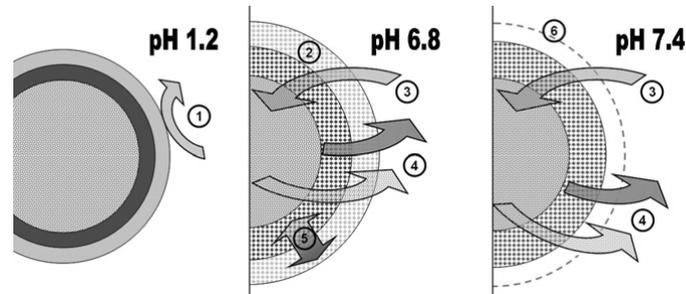


Abb. 2.9: Freisetzungsverhalten von Schellack-überzogenen Kapseln bei unterschiedlichen pH-Bedingungen: 1: Magenresistenz; 2: Aufquellen des Schellack-Überzugs; 3: Eindringen von Flüssigkeit in die Kapsel; 4: Lösen und Freisetzung der verkapselten Komponente; 5: Interaktionen zwischen dem Schellack-Überzug und der Kapsel; 6: Auflösung des Schellack-Überzugs [Leopold et al., 2011].

Der Einsatz von Verkapselungssystemen in der Lebensmittelchemie befindet sich jedoch immer noch am Anfang seiner Entwicklung, was durch die im Lebensmittelrecht verankerten, strengen Gesetze und Verordnungen bedingt ist [Champagne et al., 2007].

## 2.9 Pharmakokinetik

Die Methode der Pharmakokinetik beschreibt allgemein die Art und Weise wie Stoffe im Organismus resorbiert, verteilt, metabolisiert und ausgeschieden werden. Dieser Vorgang wird in der Wissenschaft oft als ADME-Prinzip (engl. *absorption, distribution, metabolism, excretion*) beschrieben und gilt auch für Anthocyane die aus anthocyanreichen Lebensmitteln aufgenommen werden. Damit eine korrekte Interpretation der Ergebnisse des ADME-Prinzips für Anthocyane und Anthocyanidine möglich ist, müssen zwei Punkte bei dem Nachweis der Anthocyane beachtet werden. Erstens müssen analytische Methoden so gewählt werden, dass Spezies berücksichtigt werden, die nicht im oberen Magen-Darm Trakt (GIT) absorbieren, sondern erst im Darm eine Metabolisierung oder ein Abbau zu kleineren Molekülen stattfindet [Aura et al., 2005]. Zweitens muss beachtet werden, dass bei vielen Methoden das Ansäuern der Proben, zur Stabilisierung, notwendig ist. Hierdurch kann es zu Fehlern in der Detektion der zu untersuchenden Substanzen kommen [McGhie et al., 2007]. In den weiteren Abschnitten 2.9.1 bis 2.9.4 soll nun näher auf das ADME-Konzept in Bezug auf Anthocyane eingegangen werden. In Abb. 2.10 ist der Verlauf des ADME-Prinzips für Anthocyane nochmals in einer Übersicht dargestellt.

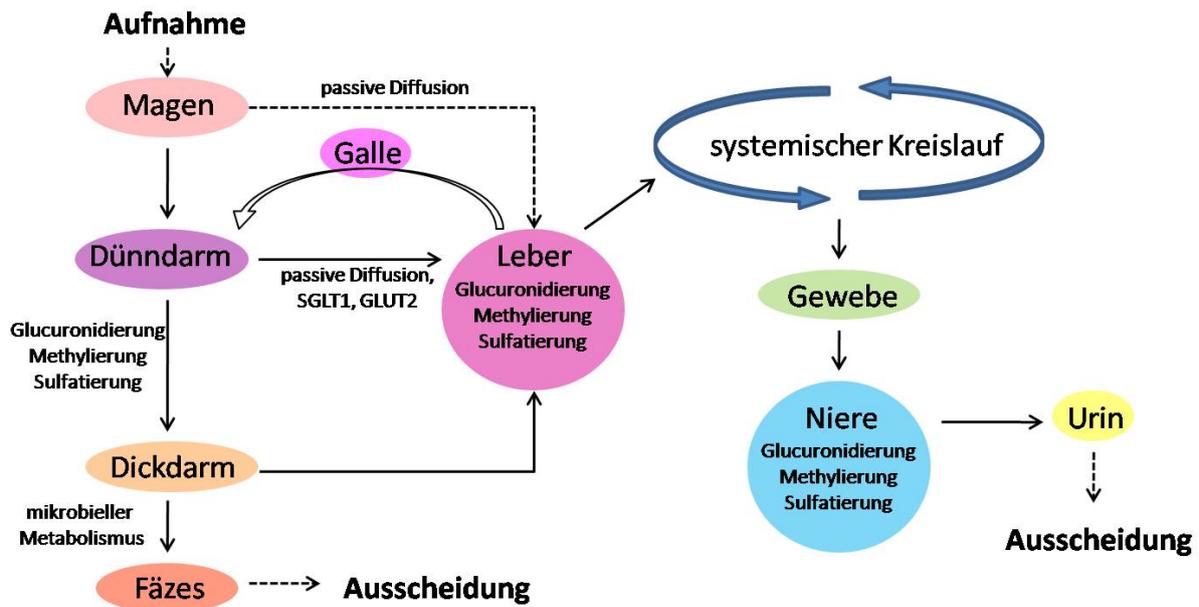


Abb. 2.10: Aufnahme-, Verteilungs-, Metabolisierungs- und Ausscheidungs-Wege der Anthocyane im Organismus (ADME-Prinzip) nach [He et al., 2010].

### 2.9.1 Aufnahme (engl. *absorption*)

Anthocyane liegen in der Nahrung hauptsächlich in glykosylierter Form vor und können durch Kauen aus der Nahrung freigesetzt werden. Nach der Freisetzung der Anthocyane kann deren Resorption schon im Magen erfolgen und über das Dünndarmepithel, welches als Hauptaufnahmeort gilt, fortgesetzt werden. Im Dünndarm können zwei Wege der Resorption stattfinden: Zum einen kann durch eine extrazelluläre Hydrolase (engl. *lactat phlorizin hydrolase*, LPH), die an der Bürstensaummembran lokalisiert ist, die Zuckerkomponente vom Anthocyan hydrolytisch abgespalten werden. Dadurch entsteht das kleinere und hydrophobe Anthocyanidin, welches durch passive Diffusion die biologische Membran (apikal nach basolateral) passieren kann. Andererseits können Anthocyane intakt über einen spezifischen Transporter SGLT1 (engl. *sodium-dependent glucose transporter*) vom Dünndarmepithel resorbiert werden [Kay, 2006; Walle, 2004]. In der Zelle werden Anthocyane entweder durch eine endogene  $\beta$ -Glukosidase gespalten oder direkt zur basolateralen Seite abgegeben (siehe Abb. 2.11) [Kay, 2006].

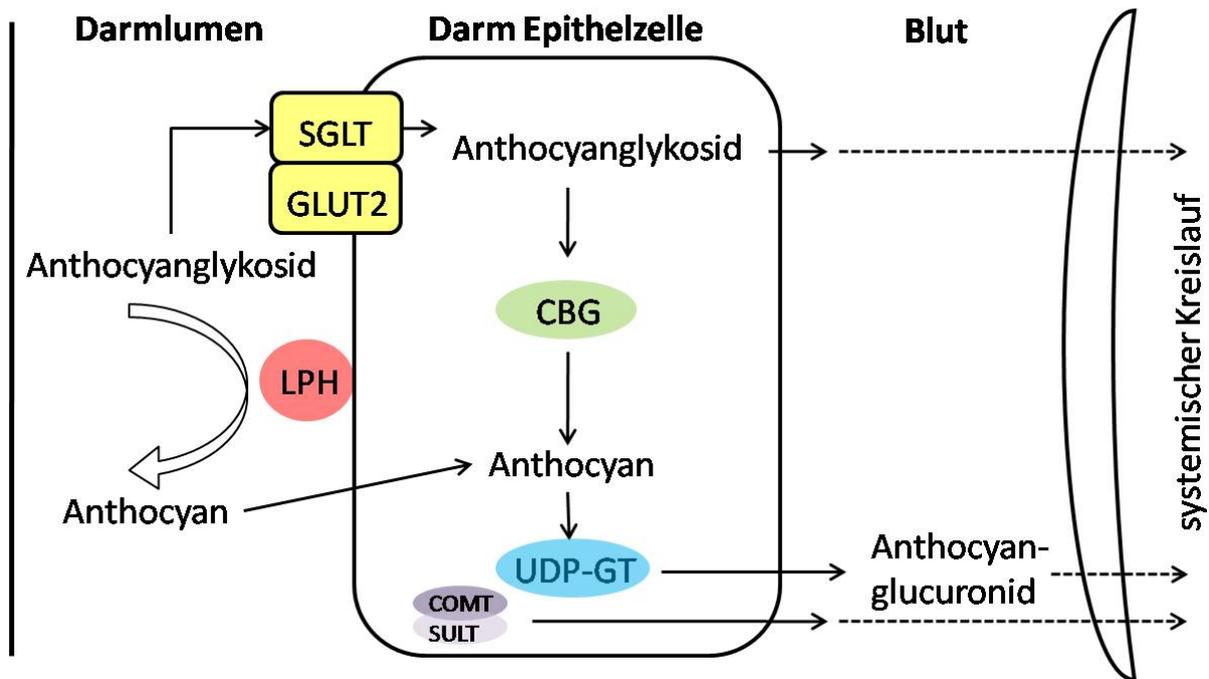


Abb. 2.11: Postulierter Mechanismus der Resorption von Anthocyanen. SGLT: Natrium abhängiger Glukosetransporter; LPH: Laktat Phlorizin Hydrolase; CBG: Zytosolische  $\beta$ -glukosidase; UDP-GT: UDP-glycuronosyltransferase; COMT: catechol-O-methyltransferase; SULT: sulfotransferase [Kay, 2006].

Es wird vermutet, dass die Resorption der Anthocyane in geringen Mengen bereits im Magen stattfindet. Um diesen Sachverhalt zu prüfen führten drei unterschiedliche Forschungsgruppen Experimente an Ratten durch. In einer Studie wurde den Ratten Heidelbeerextrakt (185  $\mu$ g) direkt in den Magen injiziert und nach 30 min der Mageninhalt und das Blut untersucht. Dabei zeigte sich, dass ca. 25% der Anthocyanmonoglykoside des Heidelbeerextrakts (hauptsächlich Glukoside und Galaktoside) vom Magen resorbiert wurden [Talavera et al., 2003]. Demgegenüber wurde nach Intubation des Magens von Ratten mit 2 mg Traubenextrakt und 36 min Inkubation im Mittel eine Konzentration von  $0.65 \pm 0.16 \mu$ M im Portal- (Gewinnung aus dem Blut der Pfortader) und  $0.23 \pm 0.08 \mu$ M im systemischen Plasma (Gewinnung aus dem Blut des Herzens) nachgewiesen [Passamonti et al., 2003]. In einer vergleichbaren Studie bei der ebenfalls Traubenextrakt (identische Konzentration) eingesetzt wurde, stellte sich aufgrund erhöhter Anthocyankonzentrationen in der Niere heraus, dass eine Isoform der Bilitranslokase an dem Transport von Anthocyanen in die Niere beteiligt sein könnte [Vanzo et al., 2008]. Bilitranslokasen sind hauptsächlich in Leberzellen und der Magenmukosa lokalisiert wo ihre Hauptaufgabe darin besteht organische Anionen zu transportieren. Es wird schon seit längerem vermutet, dass Anthocyane eine Affinität zu deren Bindungsdomäne besitzen und dadurch eine Resorption schon im Magen erfolgt [Passamonti et al., 2002].

Um *in vitro* den Transport von Anthocyanen durch das Darmepithel zu simulieren werden vorzugsweise Caco-2 Zellen verwendet. Diese wurden entweder auf Transwell-Platten oder in einer Ussing-Kammer mit anthocyanreichen Extrakten oder Reinsubstanzen inkubiert und der Transport bzw. die am Transport beteiligten Mechanismen untersucht [Steinert et al., 2008].

*Yi et al., 2006*]. In einer aktuellen Studie zeigte sich, dass nicht nur der SGLT1, sondern auch der GLUT2 (engl. *glucose transporter 2*) für den Transport der Anthocyane von der apikalen zur basolateralen Seite verantwortlich ist [*Faria et al., 2009*].

Mittels *in vivo* Experimenten (*in situ*-Perfusionsmodelle) wurde an Ratten die Resorptionsrate der Anthocyane durch die Magen- und Dünndarmmukosa bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass zwischen 10 und 22% der verabreichten Anthocyane im Dünndarm resorbiert wurden [*Talavera et al., 2004*]. Diese hohe Resorptionsrate wurde in Untersuchungen mit einem vergleichbaren *in situ*-Perfusionsmodell (Aufnahme ca. 20% Magen und 7% Dünndarm) bestätigt [*Felgines et al., 2006*]. Durch ein aktuelles Experiment an Ratten wurde nach Gabe eines anthocyanreichen Himbeerextrakts per Magensonde eine Absorption von 7.5% der Anthocyane ins Dünndarmepithel beobachtet [*He et al., 2009*]. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass ca. 10% der verabreichten Anthocyane insgesamt (Magen und Dünndarm) resorbiert werden.

### **2.9.2 Verteilung (engl. *distribution*)**

Da im vorhergehenden Kapitel die Resorption der Anthocyane durch das Magen- und Darmepithel beschrieben wurde, steht in diesem Abschnitt die Frage nach der Verteilung der resorbierten Anthocyane im Körper im Vordergrund. Dieses Wissen über Anthocyankonzentrationen in unterschiedlichen Geweben des Organismus ist wichtig, um spezifische Wirkmechanismen, die möglicherweise auf Anthocyane zurückzuführen sind, erklären zu können. In Tab. 2.5 sind unterschiedliche *in vivo* Studien (Ratte, Maus, Schwein) zur Verteilung der Anthocyane im Organismus und die erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst dargestellt.

Nach der Resorption durch den Magen oder das Darmepithel gelangen die Anthocyane in den systemischen Kreislauf (Blutkreislauf) über den eine Verteilung im Organismus stattfindet. In einer Studie von Sakakibara *et al.* (siehe Tab. 2.5) wurde eine Anthocyankonzentration im Blut von ca. 2% der aufgenommenen Menge nachgewiesen [*Sakakibara et al., 2009*]. Des Weiteren wurde in dieser Studie gezeigt, dass eine Verteilung der Anthocyane in unterschiedliche Organe (Leber, Niere, Lunge und Hoden) stattfand. Dabei wurden die höchsten Anthocyangehalte (> 50% der resorbierten Menge) in der Leber nachgewiesen [*Sakakibara et al., 2009*]. In anderen Studien wurden geringere Konzentrationen an Anthocyanen sowohl im Herzen und den Hoden als auch im Gehirn der Versuchstiere wiedergefunden [*Felgines et al., 2009; Talavera et al., 2005*].

Tab. 2.5: Verteilung der Anthocyane im Organismus im Rahmen von Tierstudien.

Produkt	Gesamtanthocyan- gehalt	Modell	Organ [pmol/g Gewebe]	Referenz
Heidelbeer- extrakt	5 g/kg Nahrung (14 Tage)	Maus	Leber (605), Niere (207), Lunge (149), Hoden (116)	[Sakakibara <i>et al.</i> , 2009]
Heidelbeer- extrakt	5 mg/kg KG (intravenös)	Ratte	Niere (474), Galle (13), Leber (138)	[Ichianagi <i>et al.</i> , 2006]
Brombeer- extrakt	0.4 g pro Tag (15 Tage)	Ratte	Magen (68), Jejunum (605), Leber (3.3), Niere (0.4), Gehirn (0.3)	[Talavera <i>et al.</i> , 2005]
Heidelbeer- extrakt	4% der tägl. Nahrung (ad libitum, 28 Tage)	Schwein	Leber (1.3), Augen (1.6), Crotex (0.9), Zerebellum (0.7)	[Kalt <i>et al.</i> , 2008]
Brombeer- extrakt	0.5 g pro Tag (12 Tage)	Ratte	Blase (2.4), Prostata (0.3), Hoden (0.1), Herz (0.1)	[Felgines <i>et al.</i> , 2009]

Um diese Ergebnisse aus den genannten Tierstudien zu überprüfen, wurde eine aktuelle Studie an Mäusen durchgeführt, die  $^{14}\text{C}$ -markiertes (alle C-Atome des B-Rings) Cyanidin-3-O-glukopyranosid (6.8 mg/ml) per Magenintubation (0.7 ml entsprechen 100%) verabreicht bekamen. Nach 3 h wurden bis zu 92% des markierten Cyanidin-3-O-glukopyranosid (mittels Radioaktivität berechnet) in unterschiedlichen Organen und Körperflüssigkeiten nachgewiesen (siehe Tab. 2.6), wobei der Hauptanteil von ca. 84% in gastrointestinalen Inhalten (Magen, Dünndarm, Blinddarm, Dickdarm) vorlag. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass nur ein geringer Teil der eingesetzten Anthocyanmenge von der Maus resorbiert wurde und im Plasma (0.044%) vorlag. Der resorbierte Anteil wurde über den gesamten Organismus verteilt, wobei auch in dieser Studie die höchste Anthocyanmenge (berechnet als Anteil gesamt Radioaktivität) in der Leber (0.27%) nachgewiesen wurde [Felgines *et al.*, 2010]. Durch die von Felgines *et al.* erzielten Ergebnisse konnten die in der Tab. 2.5 aufgeführten Studien bestätigt werden.

Tab. 2.6: Verteilung von  $^{14}\text{C}$ -markiertem (alle C-Atome des B-Rings) Cyanidin-3-O-glukopyranosid (6.8 mg/ml per Magenintubation (0.7 ml entspricht 100%)) in den Organen der Maus (3 h) nach [Felgines et al., 2010].

Organ	Anteil Gesamt-radioaktivität [%]	Organ	Anteil Gesamt-radioaktivität [%]
Urin (Blase)	0.469	Zerebellum	0.001
Urin (Käfig)	2.860	Augen	0.001
Plasma	0.044	Thymus	0.004
Erythrozyten	0.007	Gehirn	0.004
Leber	0.268	Muskeln	0.004
Galle	0.147	Milz	0.005
Niere	0.143	Magen (Gewebe)	1.67
Pankreas	0.037	Mageninhalt	9.90
Lunge	0.026	Dünndarminhalt	50.7
Blase	0.022	Blinddarm (Gewebe)	1.84
Körperfett	0.015	Blinddarminhalt	21.1
Hoden	0.013	Dickdarm (Gewebe)	0.42
Prostata	0.009	Dickdarminhalt	2.27
Herz	0.007		
Gesamt	4.068	Gesamt	87.919

### 2.9.3 Metabolismus (engl. *metabolism*)

Anthocyane werden durch die Enzyme (Pepsine) und den pH-Wert (1.2) des Magens nicht abgebaut und erreichen somit intakt den Dünndarm [Aura, 2008; Woodward et al., 2011]. Im Gegensatz dazu wurde während einer simulierten Magenpassage (30 min) ein Abbau von ca. 30% Anthocyanidin (Bsp. Cyanidin) beobachtet [Woodward et al., 2011]. Erreicht das einzelne Anthocyan unmetabolisiert den Dünndarm, so wird vermutet, dass dort eine extrazelluläre Dünndarm- $\beta$ -Glukosidase (LPH), die an der Bürstensaummembran lokalisiert ist, den Zucker abspaltet [Avila et al., 2009; He et al., 2005]. Die dadurch freigesetzten Anthocyanidine können sowohl durch die Mikroflora [Han et al., 2009] als auch aufgrund des basischen pH-Wertes (5.9 - 7.6, siehe Tab. 4.1) [Woodward et al., 2009] im Darm weiter abgebaut werden.

Bei *in vitro*-Inkubationen unter anaeroben Bedingungen mit humanem Fäzes zeigte sich, dass Cyanidin-3-O-glukopyranosid innerhalb von 2 Stunden komplett abgebaut wurde. Als Hauptabbauprodukt entstand hierbei Protocatechusäure [Aura et al., 2005]. In einer aktuelleren Studie von Han und Mitarbeitern konnte nach Inkubation mit humanem Fäzes das von Aura et al. erzielte Ergebnis verifiziert werden. Hierbei wurde neben der Bildung von Protocatechusäure noch die Bildung von Cyanidin beobachtet [Han et al., 2009]. Um diese Daten auf den Menschen beziehen zu können, wurde von Vitaglione et al. eine Humanstudie durchgeführt, bei der Probanden 1 l anthocyanreichen Blutorangensaft konsumierten. Hierbei stellte sich heraus, dass 73% des resorbierten Cyanidin-3-O-glukosids zu Protocatechusäure metabolisiert wurde [Vitaglione et al., 2007]. Bei einer Studie mit Ratten zeigte sich, dass nach einer Gabe von 24 mg Anthocyanen (als Heidelbeerextrakt) pro Tag über einen Zeitraum von 8 Wochen nicht nur Protocatechusäure als Abbauprodukt aus Anthocyanen entsteht. Es wurden fünf weitere Metabolisierungsprodukte (Gallus-, Syringa-, 4-Hydroxybenzoe-, Benzoe- und Hippursäure) nachgewiesen [Del Bo et al., 2010]. Weitere Abbauprodukte (3-O-Methylgallussäure und 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd) wurden bei anaeroben Inkubationen mit Schweinedickdarminhalt und Traubenextrakt (0.43 mg/ml) nach 6 h nachgewiesen [Forester et al., 2008]. Eine Zusammenstellung aller bisher identifizierten Phenolsäuren die aus Anthocyanen im Menschen gebildet wurden, ist in der Arbeit von Nurmi et al. zusammengefasst [Nurmi et al., 2009].

Nach Resorption der Anthocyane durch die Darmmukosa besteht die Möglichkeit, dass Anthocyane durch Enzyme, die meist in der Leber lokalisiert sind, metabolisiert werden. Hierzu zählen die Catechol-O-methyltransferase (COMT), die in unterschiedlichen Geweben lokalisiert ist, wobei die höchste Aktivität in der Leber vorliegt und für die Einführung einer Methylgruppe verantwortlich ist. Als Substrate für die COMT gelten hauptsächlich Substanzen die eine Catechol-Struktur besitzen [Weinberger et al., 2006]. Da das Anthocyanerüst, aufgrund des B-Rings diese strukturelle Eigenschaft besitzt, kann dort mittels COMT katalysiert eine Methylierung stattfinden. Für die 3'-OH oder 4'-OH Gruppe des Cyanidins [Felgines et al., 2006; Talavera et al., 2005; Wu et al., 2006b] und des Delphinidins [Ichianagi et al., 2004a; Ichianagi et al., 2004b] sind Methylierungsprodukte in der Literatur beschrieben [Prior et al., 2006]. Weiterhin ist die Uridindiphosphat-Glukuronosyltransferase

(UDP-GT) von Bedeutung, die bei der Glukuronidierung der Anthocyane als Katalysator fungiert und hauptsächlich in der Leber lokalisiert ist. Die am häufigsten detektierte Glukuronidierung findet bei Anthocyanen an der 3-OH Gruppe nach Abstraktion der Zuckerkomponente statt [Fleischhut et al., 2006; Prior et al., 2006; Talavera et al., 2005; Wu et al., 2006b]. Zuletzt ist die Sulfotransferase (SULT) zu erwähnen, die zu einer Gruppe von zytosolischen Enzymen gehört die im Körper weit verbreitet sind und bei der Biotransformation von endogenen Molekülen (Steroide, Catecholamine) eine bedeutende Rolle spielt. Es wird vermutet, dass die SULT bei der Sulfatierung der Anthocyane beteiligt ist [Felgines et al., 2003; Felgines et al., 2005; He et al., 2010; Kay, 2006]. Für das Wiederfinden von entstandenen Anthocyanokonjugaten in unterschiedlichen Organen, ist größtenteils das Zusammenspiel zwischen Darm, Leber und Galle („enterohepatischer Kreislauf“) verantwortlich. In einer Studie an Mäusen, die über eine Magensonde Anthocyane aus Brombeeren verabreicht bekamen, wurden methylierte, sulfatierte und glukuronidierte Anthocyane in der Darmmukosa, Leber, Niere, Lunge, Prostata und Herz nachgewiesen [Forester et al., 2008]. Der Nachweis dieser Anthocyanokonjugate wurde bereits in einer Vielzahl weiterer Studien erbracht, wobei zusätzlich beobachtet wurde, dass Anthocyane zu ca. 70% als Konjugate wie z.B. Glukuronide im Urin vorlagen [Cooke et al., 2006; Kay et al., 2005; Matsumoto et al., 2006; Tian et al., 2006; Wu et al., 2005].

#### **2.9.4 Ausscheidung (engl. *excretion*)**

Die mit der Nahrung aufgenommenen Anthocyane durchlaufen im Organismus eine Vielzahl unterschiedlichster Schritte der Resorption, Verteilung und Metabolisierung. Der nicht resorbierte Anteil der entstandenen Metabolite oder intakten Anthocyane wird über die Fäzes ausgeschieden. Aufgrund dessen, wurden in Fäzes sowohl intakte Anthocyane als auch deren Aglyka und Abbauprodukte (Phenolsäuren, Metabolite (methyliert)) wiedergefunden [He et al., 2005; McGhie et al., 2007]. Die fäkale Ausscheidungsgeschwindigkeit der Anthocyane bzw. der Gehalt an unterschiedlichen Anthocyanglykosiden kann vom Lebensmittel und dessen Matrix abhängig sein [Walton et al., 2009].

Ein Großteil der resorbierten Anthocyane gelangt über die Leber (Metabolisierung) zur Niere und wird dort über den Urin ausgeschieden. Ein geringer Anteil wird jedoch direkt von der Leber über den enterohepatischen Kreislauf in den Dünndarm zurücktransportiert. Nach Verzehr anthocyanreicher Lebensmittel wurden im Urin bisher intakte Anthocyane, Anthocyanidine und deren Glukuronidierungs-, Methylierungs- und Sulfatierungsprodukte nachgewiesen [Kay et al., 2004; McGhie et al., 2007]. Aus einer aktuellen Studie ist bekannt, dass noch weitere Anthocyanmetabolite gebildet werden, deren Charakterisierung bislang noch nicht gelang [Nurmi et al., 2009]. Anzumerken ist, dass die Ausscheidung über den Urin, signifikant von der aufgenommenen Menge an Anthocyanen abhängig und dabei im Mittel 2% der aufgenommenen Menge ausmacht [Carkeet et al., 2008; Hollands et al., 2008].

Zusammenfassend lässt sich über die Pharmakokinetik der Anthocyane sagen, dass einige umfassende und auch neuere Daten vorliegen. Diese sind jedoch noch sehr limitiert [He *et al.*, 2010; Kay, 2006; McGhie *et al.*, 2007].

## 2.10 Verfügbarkeit im Darm

Der Begriff „Bioverfügbarkeit“ ist sehr schwer zu definieren. Ursprünglich wurde es in der Pharmakologie und Toxikologie entwickelt, um die systemische Verfügbarkeit von Xenobiotika nach oraler Gabe im Vergleich zu i.v. Gabe zu beschreiben. Heutzutage gibt es viele Definitionen und Auslegungen des Wortes „Bioverfügbarkeit“ [Naidu *et al.*, 2008]. Im Hinblick auf die vorliegende Dissertation beschreibt die „Bioverfügbarkeit“ den Anteil an Anthocyanen und deren Metabolisierungsprodukten, die in den Kompartimenten des Körpers nachweisbar sind.

Da Anthocyane im Magen aufgrund des pH-Wertes (pH 1 - 3) nicht abgebaut und nur zu geringen Mengen resorbiert werden (siehe Kap. 2.9.1), ist die Verfügbarkeit im Darm entscheidend. Das Darmepithel gilt als Hauptresorptionsort der Anthocyane [Kay, 2006]. Aus diesem Grund wurde für die Arbeiten dieser Dissertation ein *ex vivo* Modellsystem verwendet, mit dessen Hilfe es möglich war, die unterschiedlichen Abschnitte des Darms zu untersuchen. Das Modellsystem basierte auf Patienten die einen künstlichen Darmausgang (terminales Ileum, 3. Abschnitt des Dünndarms) besaßen. Dadurch bestand die Möglichkeit eine Aussage über die Verfügbarkeit der eingesetzten Substanzen am Ende des Dünndarms bzw. am Anfang des Dickdarms zu treffen. Zahlreiche Humanstudien mit dem Ziel, die Bioverfügbarkeit von Substanzen mittels Ileostomapatienten am Ende des Dünndarms zu ermitteln, sind in der Literatur beschrieben [Hagl *et al.*, 2011; Kahle *et al.*, 2005; Marks *et al.*, 2009]. Da Studien zur Bioverfügbarkeit von Anthocyanen im GIT sehr limitiert sind, stellt das *ex vivo* Ileostomamodell eine gute Möglichkeit dar, den Gehalt an Anthocyanen am Ende des Dünndarm zu untersuchen.

In einer Studie an Ileostomapatienten wurde nach Verzehr von 300 g Heidelbeeren abhängig von der Glykosylierung des Anthocyanins zwischen 28 und 85% im Ileostomabeutel wiedergefunden. Dies spricht dafür, dass Anthocyane unmetabolisiert den Dickdarm erreichen und dort von der Mikroflora abgebaut werden können [Kahle *et al.*, 2006]. Ein vergleichbares Ergebnis wurde in einer aktuellen Humanstudie von Gonzalez-Barrio *et al.* nach dem Verzehr von 300 g Himbeeren erzielt. Es zeigte sich, dass ca. 40% der aufgenommenen Menge an Anthocyanen im Ileostomabeutel wiedergefunden wurde. Im Urin konnten weniger als 0.1% der aufgenommenen Menge detektiert werden, während sich die Anthocyankonzentration im Plasma unter der Nachweisgrenze befand [Gonzalez-Barrio *et al.*, 2010]. Eine Zusammenfassung ausgewählter *in vivo* Studien zur Bioverfügbarkeit von Anthocyanen sind in Tab. 2.7 dargestellt.

Tab. 2.7: Ausgewählte Modellstudien zur Bioverfügbarkeit von Anthocyanen in vivo.

Produkt	Gesamt-anthocyan-gehalt	Modell	GIT*	Blut/ Plasma*	Urin*	Referenz
Heidelbeer-extrakt	100 mg/kg KG	Maus	k. A.	1.7 %	~2%	[Sakakibara et al., 2009]
Himbeer-saft	918 nmol (2.77 ml pro Tier)	Ratte	Ileum: 48%	<LOD	0.2%	[Borges et al., 2007]
Himbeer-extrakt	50 mg/kg KG	Schwein	Darm: ca. 42%	k. A.	<0.1%	[Wu et al., 2006b]
Heidelbeer-früchte	7.8 g/kg (300 g)	Mensch	Ileostoma: bis zu 85%	k. A.	k. A.	[Kahle et al., 2006]
Himbeer-früchte	204 µmol (300 g)	Mensch	Ileostoma: ca. 40%	<LOD	<0.1%	[Gonzalez-Barrio et al., 2010]

\* Ermittelte Menge an Anthocyanen in % bezogen auf den eingesetzten Gesamtanthocyanengehalt. GIT: Gastrointestinaltrakt, k. A.: keine Angaben.

## 2.11 Biologische Eigenschaften

Das Interesse an einer ausgewogenen Ernährung in Bezug auf die menschliche Gesundheit stieg in den letzten Jahren immer mehr an. Dadurch gewann anthocyanreiches Obst und Gemüse aufgrund eines möglichen gesundheitsfördernden Potentials stetig an Bedeutung. Insbesondere rote Beeren und daraus hergestellte Extrakte sind reich an Anthocyanen und anderen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen wie Tanninen oder Phenolsäuren. Wie epidemiologische Studien zeigten, besteht vermutlich ein Zusammenhang zwischen dem Konsum von anthocyanreichen Früchten und einer präventiven Wirkung auf chronische Krankheiten (z.B. Herz-Kreislaufkrankungen) deren Pathogenese mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht wird. Aus diesem Grund nahm die Bedeutung an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und speziell an Anthocyanen in der Forschung stark zu, was sich in den letzten Jahren in einer Vielzahl von *in vitro*- und *in vivo* Studien widerspiegelt [Crozier *et al.*, 2009; Paredes-Lopez *et al.*, 2010].

Heutzutage wird jedoch angenommen, dass nicht nur einzelne Substanzen, sondern ein Zusammenspiel verschiedener sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe zu dieser potenten (antioxidativen, antiproliferativen, etc.) Wirksamkeit führt. In den Folgenden Kapiteln 2.11.1 bis 2.11.5 soll nun näher auf die biologischen Wirkungen im Zusammenhang mit Anthocyanen und anthocyanhaltigen Lebensmitteln eingegangen werden.

### 2.11.1 Antioxidative Wirksamkeit

Anthocyane sind aufgrund ihres geringen Redoxpotentials (0.23 V) in der Lage, freie Radikale (siehe Kap. 3) wie Superoxidradikalanionen, Hydroxylradikale, Alkoxyradikale und Peroxylradikale mit Redoxpotentialen in einem höheren Bereich von 2.13 - 1.0 V, durch Abgabe eines Elektrons oder eines Wasserstoffatoms abzufangen [Pietta, 2000]. Diese Eigenschaft kann auf zwei spezifische Strukturmerkmale der Anthocyane (siehe Abb. 2.12 rot markiert) zurückgeführt werden. Zum einen befindet sich eine *o*-Dihydroxystruktur am B-Ring (Catechol-Struktur), zum anderen zwei Hydroxygruppen an den Positionen 3 und 5, welche für die Radikal-inaktivierenden Wirkungen verantwortlich sind [Terao, 2009]. Mindestens eines der beiden Strukturmerkmale ist für das Inaktivieren von Radikalen Voraussetzung. Besitzt das Anthocyan sowohl die Catechol-Struktur als auch die zwei Hydroxygruppen an den Positionen 3 und 5, so kann dies zu einer Erhöhung der antioxidativen Wirksamkeit führen [Terao, 2009].

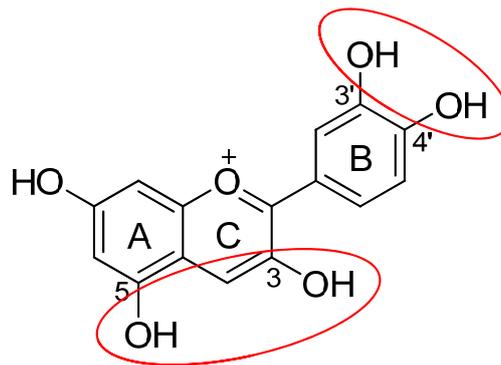


Abb. 2.12: Strukturelle Merkmale die für die Radikal-inaktivierenden Eigenschaften der Anthocyane verantwortlich sind (modifiziert nach [Terao, 2009]).

Am Beispiel der Catechol-Struktur des B-Rings wird in Abb. 2.13 das Inaktivieren von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, siehe Kap. 3.1) näher erläutert. Hierbei kommt es im ersten Schritt durch Abgabe eines Protons zur Bildung des instabilen Semichinon-Radikals, das in einer weiteren Reaktion mit ROS die chinoiden Struktur ausbildet [Pietta, 2000]. Daraus lässt sich schließen, dass alle Anthocyane eine potentielle antioxidative Wirksamkeit gegenüber ROS besitzen, wobei die Wirksamkeit abhängig von den strukturellen Eigenschaften der einzelnen Anthocyane ist [Pascual-Teresa et al., 2008].

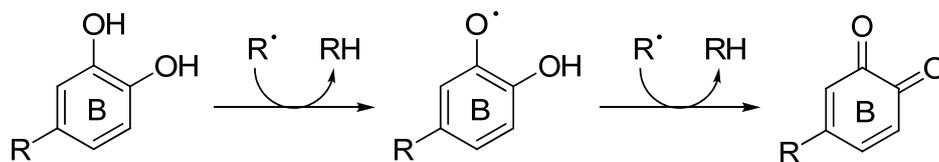


Abb. 2.13: Inaktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) über ein Semichinon-Radikal bis zur Bildung des stabilen Chinons (modifiziert nach [Pietta, 2000]).

Wird aufgrund dieser Eigenschaften ein Vergleich zwischen antioxidativer Wirksamkeit und Catechol-Struktur der Anthocyane durchgeführt, so zeigt sich, dass Cyanidin, Delphinidin und Petunidin potenter als Peonidin und Malvidin sind [Fleschhut et al., 2006].

Bei einem Vergleich der Aktivitätsverläufe mit dem Anthocyanprofil der Heidelbeere - 33 ± 7% Cyanidinglykoside, 33 ± 6% Delphinidinglykoside, 14 ± 2% Petuninglykoside, 7 ± 3% Peonidinglykoside und 13 ± 3% Malvidinglykoside - stellte sich heraus, dass ein Anteil von 80 ± 15% antioxidativ wirksamer Anthocyane bestand [Latti et al., 2008]. Dieses Ergebnis erklärt, warum die Heidelbeerfrüchte, Heidelbeerextrakt und Heidelbeersaft sowie die daraus gewonnenen Anthocyane in zahlreichen *in vitro*- und *in vivo* Studien als antioxidativ wirksame Komponente identifiziert wurden.

Um die antioxidative Kapazität der Anthocyane im zellfreien Medium zu charakterisieren, können unterschiedliche Testsysteme verwendet werden. Die am weitesten verbreitete Methode stellt der ORAC (engl. *oxygen radical scavenging antioxidant capacity*) Assay dar. Dieser beruht auf der Oxidation eines fluoreszierenden Indikatormoleküls (Fluorescein) durch induzierte Radikale, die durch Antioxidantien verhindert werden kann. Dadurch wird die

Abnahme der Fluoreszenz zeitlich verzögert. Das erhaltene Ergebnis wird auf eine Standardgerade (Trolox) bezogen, wodurch eine Aussage über die Wirksamkeit der eingesetzten Substanz gegenüber Trolox getroffen werden kann. Trolox dient dabei als Referenz bei der Bestimmung antioxidativer Kapazität einer Probe, wodurch eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen gewährleistet wird [Prior *et al.*, 2005].

Werden Anthocyane als Reinsubstanzen oder in komplexen Extrakten enthalten in neutralem Medium inkubiert und die antioxidative Wirksamkeit gegenüber Trolox im ORAC-Assay bestimmt, so ergibt sich folgender Aktivitätsverlauf: Cyanidinglykoside > Delphinidinglykoside > Petuninglykoside  $\approx$  Malvidinglykoside  $\approx$  Peonidinglykoside. Diese unterschiedliche antioxidative Kapazität der einzelnen Anthocyane konnte auf deren Molekülstruktur zurückgeführt werden [Wang *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 2003]. Eine so potente radikal-inaktivierende Wirksamkeit in zellfreien *in vitro* Systemen lässt vermuten, dass Anthocyane im biologischen System eine vergleichbare Wirkung zeigen. In einer *in vitro* Studie an oxidativ gestressten Caco-2 Zellen zeigte sich im Dichlorfluorescein (DCF) Assay, dass ein anthocyanreicher Brombeerextrakt im Konzentrationsbereich von 3.1 - 50  $\mu\text{g/ml}$  in der Lage war, intrazelluläre ROS signifikant zu reduzieren [Elisia *et al.*, 2008]. Ein vergleichbares Ergebnis konnte bei Inkubationen von HT-29 Zellen mit verschiedenen Rotfruchtsäften im DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) Assay beobachtet werden [Kulisic-Bilusic *et al.*, 2009].

Um die aus der Literatur bekannten positiven Wirkungen der *in vitro* Studien *in vivo* zu bestätigen, wurden in der Vergangenheit nicht nur Tier-, sondern auch Humanstudien durchgeführt. In einer Humanstudie, bei der gesunde Probanden einen roten Mehrfruchtsaft konsumierten (700 ml pro Tag über einen Zeitraum von 4 Wochen), wurde eine Verringerung der oxidativen DNA-Schäden und eine signifikante Erhöhung des GSH-Status im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt [Weisel *et al.*, 2006]. Bei Hämodialysepatienten wurde nach Gabe von 200 ml pro Tag, eines polyphenolreichen roten Mehrfruchtsaftes (Anthocyanengehalt 301 mg/l) über einen Zeitraum von 4 Wochen eine signifikante Erniedrigung der oxidativen DNA-Schäden, von Malondialdehyd (MDA, wird als Marker für die Lipidperoxidation verwendet) und eine Erhöhung des GSH-Status beobachtet [Spormann *et al.*, 2008]. Eine Auswahl aktueller Studien und die dabei erzielten Ergebnisse (Modulation unterschiedlichster Biomarker) sind in Tab. 2.8 dargestellt.

Tab. 2.8: *In vivo* Studien zur Wirksamkeit anthocyanreicher Früchte und Fruchtextrakte auf die Modulation unterschiedlichster Biomarker des oxidativen Stresses und die dabei erzielten Ergebnisse.

Produkt	Gesamtanthocyan- gehalt	Modell	Biomarker	Referenz
Heidelbeer- extrakt	50 - 200 mg pro kg KG (5 Tage)	Maus	SOD ↑, GP <sub>x</sub> ↑, GSH ↑, MDA ↓	[Yao et al., 2010]
Heidelbeer- extrakt	1.6 g pro Tag (10 Tage)	Maus	MDA ↓	[Jakesevic et al., 2011]
Heidelbeere	100 mg pro g Nahrung (21 Tage)	Ratte	DNA-Schäden ↓, LPO ↔	[Dulebohn et al., 2008]
Brombeere	4 mg Cyanidin Äquiv. pro kg KG (35 Tage)	Ratte	SOD ↑, GP <sub>x</sub> ↑, GSH ↑	[Hassimoto et al., 2011]
Hibiskus	50 - 200 mg pro kg KG (4 Tage)	Ratte	LDH ↓, MDA ↓, GSH ↑	[Wang et al., 2000]
Erdbeeren	250 g pro Tag (21 Tage)	Mensch	DNA-Schäden ↓, LDL und GST ↔	[Henning et al., 2010]
Fruchtsaft*	200 ml pro Tag (28 Tage)	Mensch (Hämodialyse patient)	MDA ↓, GSH ↑, DNA-Schäden ↓	[Spormann et al., 2008]
Fruchtsaft*	700 ml pro Tag (28 Tage)	Mensch	MDA ↓, GSH ↑, DNA-Schäden ↓	[Weisel et al., 2006]

Abkürzungen: SOD: Superoxiddismutase; GP<sub>x</sub>: Glutathionperoxidase; GSH: Glutathion; MDA: Malondialdehyd; LPO: Lipidperoxidation; LDH: Lactat-Dehydrogenase; LDL: low density lipoprotein; GST: Glutathion-S-Transferase.

\* Fruchtsaft: rote Trauben (57%), Brombeeren (18%), Sauerkirschen (9%), Johannisbeeren (9%), Aroniabeeren (Apfelbeere) (7%).

### 2.11.2 Antiproliferative & antikarzinogene Wirksamkeit

Basierend auf den Ergebnissen zahlreicher *in vitro* Studien wird vermutet, dass Anthocyane antiproliferative Wirkungen besitzen. Bei Inkubationen unterschiedlicher Krebszelllinien (HT-29 (Dickdarm), MCF-7 (Brust), HCT116 (Dickdarm)) mit anthocyanreichen Fruchtexttrakten (Himbeer-, roter/schwarzer Brombeer-, Heidelbeer-, Cranberry- und Erdbeerextrakt; im Konzentrationsbereich von 0 - 200 µg/ml Extrakt) wurde eine konzentrationsabhängige (25 - 200 µg/ml Extrakt) Inhibierung der Zellproliferation beobachtet [Seeram *et al.*, 2006]. Vergleichbare Ergebnisse mit Heidelbeerextrakten wurden von Yi und Mitarbeitern publiziert. Hierbei wurde die Zellproliferation von HT-29 als auch Caco-2 (Dickdarmkrebszellen) Zellen durch Heidelbeeranthocyane im Konzentrationsbereich von 15 - 50 µg/ml gehemmt [Yi *et al.*, 2005]. In einer aktuellen Studie in der ein Granatapfelextrakt (0 - 600 µg/ml) eingesetzt wurde konnte eine antiproliferative Wirkung auf die MCF-7 Zelllinie bestätigt werden [Jayakumar *et al.*, 2011]. Weitere Untersuchungen an HT-29 Zellen, die mit einem anthocyanreichen Heidelbeerextrakt im Konzentrationsbereich von 25 – 200 µg/ml inkubiert wurden zeigten im Sulforhodamin B (SRB) Assay, dass nach 72 h eine Wachstumshemmung um bis zu 50% stattfand [Zhao *et al.*, 2004]. In einer aktuellen Studie von Esselen *et al.* wurden HT-29 Zellen in Anwesenheit von Katalase (siehe Kap. 3.2.1.2) mit Heidelbeer- und Traubenextrakt (0 - 500 µg/ml) inkubiert. Dabei wurde lediglich in der höchsten eingesetzten Konzentration (500 µg/ml) eine Wachstumshemmung mittels SRB Assay beobachtet [Esselen *et al.*, 2011a].

Um eine weitere Aussage über die Wirkung *in vitro* treffen zu können, spielen nicht nur Untersuchungen zur Zellproliferation, sondern auch zur Zellviabilität eine wichtige Rolle (siehe hierzu Tab. 2.9). Durch Erdbeer-, Johannisbeer und Himbeerextrakte konnte eine Abnahme der Zellviabilität sowohl in Caco-2 als auch in HeLa (Gebärmutterhalskrebszellen) Zellen bei einer Konzentration von 50 µg/ml ermittelt werden. Des Weiteren wurden in dieser Studie Heidelbeer- und Granatapfelextrakt (50 µg/ml) untersucht, wobei keine Effekte auf die Viabilität nachgewiesen wurden [McDougall *et al.*, 2008]. Ein zusätzliches Beispiel dafür, dass anthocyanhaltige Heidelbeer-, Himbeer- und Johannisbeerextrakte nicht immer eine inhibierende Wirkung auf das Zellwachstum haben, zeigte sich in einer aktuellen Studie mit humanen Brustkrebszellen (MDA-468), in welcher keine Effekte auf die Viabilität über den verwendeten Konzentrationsbereich von 50 - 200 µg/ml nachgewiesen wurden [Hogan *et al.*, 2010]. Weitere *in vitro* Untersuchungen zu den antiproliferativen Eigenschaften der Anthocyane und die dabei erzielten Ergebnisse sind in Tab. 2.9 aufgeführt.

Tab. 2.9: Auswahl aktueller *in vitro* Studien zu den antiproliferativen Eigenschaften der Anthocyane in unterschiedlichen Zell-/Testsystemen und die dabei erzielten Ergebnisse.

Produkt	Konzentration [µg/ml]	Zellmodell	Biomarker	Referenz
Heidelbeerextrakt	25	HT-29	Zellwachstum (SRB, 72 h) ↓	[Zhao et al., 2004]
Granatapfel-, Himbeer-, Heidelbeerextrakt	25 - 200	HT-29, MCF-7, HCT116	Zellwachstum (CellTiter-Glo, 48 h) ↓	[Jayakumar et al., 2011; Seeram et al., 2006]
Heidelbeerextrakt	15 - 50	HT-29, Caco-2	Zellwachstum (MTT Assay, 48 h) ↓	[Yi et al., 2005]
Granatapfel-, Heidelbeereextrakt	25 - 75	Caco-2, HeLa	Viabilität (CCK-8 Assay Kit) ↓	[McDougall et al., 2008]
Acaiextrakt	50 - 200	MDA-468	Zellwachstum (MTT Assay, 24 – 72 h) ↔	[Hogan et al., 2010]
Heidelbeerextrakt	50 - 250	DLD-1, COLO205	Zellwachstum (WST Assay) ↓	[Zu et al., 2010]
Heidelbeerextrakt	250	MCF-7	Zellwachstum (SRB, 24 h) ↓	[Faria et al., 2010]
Del-3-O-glc, Cy-3-O-glc	12,5 - 100	MCF-7	Zellwachstum (SRB, 48 h) ↓	[Fernandes et al., 2010]

Abkürzungen: Del-3-O-glc: Delphinidin-3-O-glukopyranosid, Cy-3-O-glc: Cyanidin-3-O-glukopyranosid, SRB: Sulforhodamin B Assay. WST Assay: water soluble tetrazolium salt Assay. CCK-8 Assay: Cell counting kit 8. CellTiter-Glo: Zellwachstums Assay (basierend auf Lumineszenz).

Wurden anstatt komplexer Fruchtextakte die isolierten Anthocyanreinsubstanzen der Erdbeere (Cyanidin-3-O-glukopyranosid, Pelargonidin-3-O-glukopyranosid) untersucht, so konnte ebenfalls eine Abnahme der Zellviabilität (HT-29, Dickdarmkrebszellen) in einer Konzentration von 100 µg/ml Cyanidin-3-O-glukopyranosid um 60% und Pelargonidin-3-O-glukopyranosid um 20% beobachtet werden. [Zhang et al., 2008]. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es möglich, eine Aussage über die Wirksamkeit der einzelnen Anthocyane zu treffen. Zum

einen können die unterschiedlich stark antiproliferativen Effekte der einzelnen Anthocyane auf die individuelle Struktur (Hydroxylierungsgrad am B-Ring), zum anderen auf deren Glykosylierungs- und Acylierungsgrad zurückgeführt werden. [Fernandes et al., 2010; Jing et al., 2008]. Es wird weiterhin vermutet, dass die positive Wirkung der Anthocyane durch die Kombination mit anderen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen erhöht werden kann. Dieser Effekt konnte von Seeram und Mitarbeitern bei kombinierten Inkubationen unterschiedlicher Cranberry-Fractionen (Anthocyanfraktion, Polymerfraktion, Zucker und organische Säuren) in HT-29 Zellen beobachtet werden. Dabei stellte sich heraus, dass der ursprüngliche Cranberryextrakt (nicht fraktioniert) den potentesten Effekt zeigte [Seeram et al., 2004].

Die antiproliferative Wirkung der Anthocyane ist jedoch nicht nur auf wachstumshemmende Eigenschaften an Karzinomzelllinien zurückzuführen, sondern beruht auch auf einer Vielzahl weiterer Mechanismen, die mit der Krebsentstehung assoziiert sind. Beispielsweise sind Anthocyane in der Lage, Phase II-Enzyme [Hwang et al., 2011; Shih et al., 2007] und Apoptose [Yun et al., 2009] zu induzieren, DNA-Schäden zu reduzieren [Coates et al., 2007; Murapa et al., 2011] und den Zellzyklus in der G1-Phase zu arretieren [Liu et al., 2010; Yun et al., 2009]. Des Weiteren werden den Anthocyanen antimutagene, antiinflammatorische und antiangiogenetische Effekte zugeschrieben [Wang et al., 2008].

Um die potente antiproliferative Wirksamkeit der Anthocyane aus *in vitro* Untersuchungen *in vivo* zu verifizieren, wurden unterschiedliche Tierstudien durchgeführt. Es existieren zahlreiche Tierstudien, in denen Anthocyane und anthocyanreiche Extrakte auf die Prävention von Brust-, Haut-, Ösophagus-, Lungen-, Mund-, Magen und Darmkrebs untersucht wurden [He et al., 2010]. Ein beliebtes Modell für die intestinale Tumorbildung im Darm stellt das APC<sup>min/+</sup>-Maus-Modell dar. In einer aktuellen Untersuchung wurde nach Gabe von Traubenextrakt über 6 Wochen (0.5% der täglichen Nahrung) eine Inhibierung intestinaler Marker (COX-2, iNOS, cyclin D1), die zur Tumoprävention im Dünndarm beitragen können, beobachtet [Velmurugan et al., 2010]. Von Cai und Mitarbeitern wurde ebenfalls im APC<sup>min/+</sup>-Maus-Modell nach Gabe eines Traubenextrakts (22% w/w Anthocyane) über 16 Wochen eine signifikante Erniedrigung des Proliferationsindex (bestimmt über Ki-67) von Darmkrebszellen um 9% gemessen [Cai et al., 2010]. Dieses Ergebnis ist mit früheren Studien, in denen anthocyanreiche Extrakte zum einen Heidelbeerextrakt (Mirtoselect) mit 40% Anthocyanen und zum anderen Sauerkirschextrakt mit 50% Anthocyanen zur Tumoprävention im APC<sup>min/+</sup>-Maus-Modell eingesetzt wurden, vergleichbar [Bobe et al., 2006; Cooke et al., 2006]. Dabei wurde gezeigt, dass die Anzahl der neugebildeten Adenome konzentrationsabhängig (0.03 - 0.3% Heidelbeerextrakt der täglichen Nahrung) signifikant erniedrigt wurde [Cooke et al., 2006]. In einer aktuelleren Patientenstudie wurde nach Gabe eines anthocyanreichen Heidelbeerextrakts (Myrtocyan®, 1.4 - 5.6 g Extrakt; Anthocyanengehalt 0.5 – 2 g) über einen Zeitraum von 7 Tagen der Proliferationsindex des Tumorgewebes, gemessen über Ki-67, um 7% gegenüber den Anfangswerten erniedrigt [Thomasset et al., 2009].

### 2.11.3 Antiinflammatorische Wirksamkeit

Eine Entzündung (Inflammation) ist eine komplexe biologische Antwort auf den Reiz von geschädigtem Gewebe, wodurch eine Ausschüttung der für die Zellkommunikation notwendigen Zytokine stattfindet. Dadurch entsteht an der Schadstelle ein Milieu, bei dem vermutet wird, dass es günstig für die Tumorentstehung sein könnte [Pascual-Teresa et al., 2010]. Dieses Zusammenspiel zwischen Zytokinen und der Tumorentstehung wurde schon in einigen Untersuchungen erfasst. Beispielsweise wurde an Ratten, denen durch Dimethylnitrosamin eine Leberentzündung induziert wurde, nach Gabe von 50 - 200 mg/kg KG eines anthocyanreichen Extrakts aus violetten Süßkartoffeln, die Expression antioxidativer Enzyme (GST) und gleichzeitig eine Reduktion inflammatorischer Mediatoren (Cyclooxygenase (COX) II) beobachtet [Hwang et al., 2011]. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei einer Studie an Mäusen erzielt, bei denen eine chronische Darmentzündung mit DSS (engl. *dextran sodium sulfate*) induziert wurde. Hierbei wurde durch Beimischen von 10% Himbeerextrakt zur täglichen Nahrung, über einen Zeitraum von 7 Tagen, die Expression proinflammatorischer Zytokine unterdrückt und der Cyclooxygenase (COX) II-Gehalt signifikant gesenkt [Montrose et al., 2011]. Wird die chronische Darmentzündung der Mäuse durch Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) ausgelöst und anstatt Himbeerextrakt ein Heidelbeerextrakt im Konzentrationsbereich von 10 - 14 mg pro kg Körpergewicht oral verabreicht, so zeigt sich ebenfalls ein Einfluss auf die Expression proinflammatorischer Zytokine [Wu et al., 2011].

### 2.11.4 Antimikrobielle Wirksamkeit

Es ist bekannt, dass Beeren, die reich an Anthocyanen sind, eine positive Wirkung auf bakterielle Infektionen haben. So zeigte sich in unterschiedlichsten Studien ein antimikrobieller Einfluss sowohl auf gram-negative [Burdulis et al., 2009; Puupponen-Pimia et al., 2001], als auch auf gram-positive Bakterien (*E. coli*, *C. freundii*, *E. faecalis*, ...) [Burdulis et al., 2009; Heinonen, 2007; Puupponen-Pimia et al., 2001]. Diese positiven Effekte der Anthocyane werden deren Möglichkeit zugeschrieben, Lipopolysaccharide aus der äußeren Membran von Bakterien aufzuspalten und dadurch die Viabilität zu beeinflussen [Wu et al., 2010].

### 2.11.5 Prooxidative Wirksamkeit

Neben den antioxidativen Eigenschaften wird vermutet, dass Anthocyane in der Lage sind, die Expression antioxidativ wirksamer Enzyme (SOD, GST), die durch das sog. ARE (engl. *antioxidant responsive element*) Element geregelt werden, zu beeinflussen. Dieser Mechanismus basiert auf einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren (Nrf2, engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) welche wiederum durch Kinasen (ERK, engl. *extracellular regulated kinase*) geregelt werden. In einer Studie von Fritz und Mitarbeitern wurde gezeigt, dass das Anthocyanidin Malvidin in einer Konzentration von 5 µM sowohl die ERK1 als auch die ERK2 signifikant hemmt [Fritz et al., 2006].

Eine weitere Möglichkeit den zellulären Redox-Signalweg über das ARE-Element zu beeinflussen, stellt die Bildung von Wasserstoffperoxid durch die zu untersuchende Substanz dar. Der zugrunde liegende Mechanismus der ROS-Produktion (prooxidativer Effekt) beruht vermutlich auf einer autokatalytischen Oxidation oder einer Peroxidase-Reaktion der Catecholgruppe zum Semichinon-Radikal, welches in einem weiteren Schritt, bei dem Elektronen übertragen werden zum hoch reaktiven Chinon umgewandelt wird [Halliwell, 2008]. Die so generierten ROS (Wasserstoffperoxide) können an der Bildung oxidativer Zellschäden beteiligt sein (siehe Abb. 2.14). Um die Bildung von ROS durch Anthocyane zu untersuchen wurde Delphinidin (Konzentration 1 - 75  $\mu\text{M}$ ) in Zellkulturmedium inkubiert und die Zunahme an Wasserstoffperoxid bestimmt. Es wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Wasserstoffperoxidkonzentration im Zellkulturmedium nachgewiesen [Fritz et al., 2008]. In weiteren Inkubationen wurde festgestellt, dass durch Zugabe von Katalase (100 U/ml) die Bildung von Wasserstoffperoxid durch Anthocyane komplett unterdrückt werden konnte [Esselen et al., 2011b; Fritz et al., 2008; Kern et al., 2007].

Diese prooxidativen Effekte der Anthocyane beruhen jedoch ausschließlich auf *in vitro* Ergebnissen und konnten bisher *in vivo* nicht bestätigt werden [Halliwell, 2008]. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass Katalase ubiquitär im Körper vorhanden ist, wobei die höchste Aktivität in der Leber mit 1500 Units pro mg Protein vorliegt [Halliwell et al., 2008].

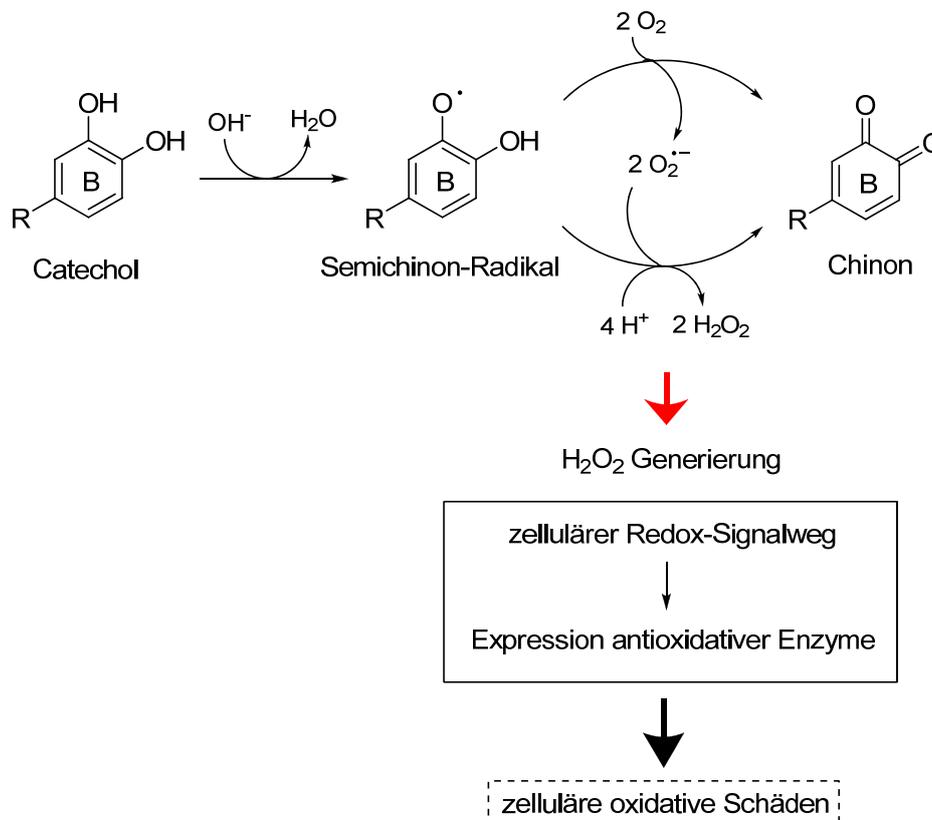


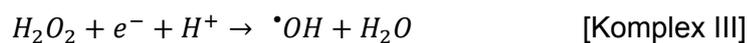
Abb. 2.14: Möglicher Mechanismus der prooxidativen Eigenschaft der Anthocyane [Bellion et al., 2009; Terao, 2009].

### 3 Oxidativer Stress

Unter oxidativem Stress wird ein Ungleichgewicht in der Bildung und der Inaktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, engl. *reactive oxygen species*) in Organismen verstanden. ROS besitzen ein hohes Potential, Gewebe und Zellbestandteile (DNA, Proteine) zu schädigen und werden aufgrund dessen mit der Entstehung verschiedener Krankheiten, wie Arteriosklerose, Diabetes mellitus und neurogenerativen Erkrankungen, in Verbindung gebracht. Ist der Unterschied zwischen Bildung und Abbau der ROS gering, so ist der Organismus in der Lage, durch antioxidative Abwehrmechanismen und Reparatursysteme einzugreifen und beschädigte DNA-Moleküle zu erkennen und entfernen [Ha et al., 2010; Kelly et al., 1998]. Durch die potente Wirkung der ROS ist oxidativer Stress und seine Entstehung in den Fokus zahlreicher Forschungsaktivitäten gerückt.

#### 3.1 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

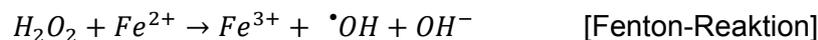
Sauerstoff ist eine sehr reaktive Substanz, die einerseits die Grundlage für zahlreiche metabolische Prozesse in aerob lebenden Organismen und andererseits eine ständige Gefahrenquelle bei der Beeinflussung der Integrität zellulärer Strukturen darstellt. Da in Zellen eine Vielzahl von Elektronentransportvorgängen stattfinden, ist es unvermeidlich, dass durch Reduktion von molekularem Sauerstoff ROS gebildet werden. Ein solcher Vorgang stellt die zelluläre Atmungskette, die in den Mitochondrien lokalisiert ist und Sauerstoff über vier ein-Elektronenschritte zu Wasser reduziert, dar (siehe Komplex I-IV). Hierbei wird im Komplex I ca. 95% des vorhandenen Sauerstoffs, durch Aufnahme eines zusätzlichen Elektrons, zum hoch reaktiven Superoxidradikalanion reduziert. Die Addition eines weiteren Elektrons (Komplex II) führt zur Bildung von Wasserstoffperoxid, welches in einem weiteren Ein-Elektronenschritt zu einem Hydroxylradikal und Wasser reduziert wird (Komplex III). Im letzten Reduktionsschritt (Komplex IV) der Atmungskette wird das Hydroxylradikal durch Aufnahme eines Elektrons zu Wasser umgewandelt [Apel et al., 2004; Halliwell et al., 2008; Valko et al., 2007].



Da die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser in den Mitochondrien in mehrere Komplexe unterteilt ist, können ROS freigesetzt werden, die Strukturen der Zellen schädigen können. Sehr reaktive Radikale ( $\cdot O_2^-$ ) schädigen aufgrund der kurzen Halbwertszeit ( $10^{-6}$  Sekunden)

unmittelbar das Gewebe, während weniger reaktive Radikale ( $H_2O_2$ , Peroxylradikale) geringere Schäden verursachen können [Halliwell *et al.*, 2008].

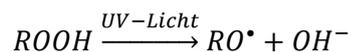
Die Fenton-Reaktion stellt eine weitere Möglichkeit dar, wie hoch reaktive Hydroxylradikale in Anwesenheit von zweiwertigen Eisenionen in den Zellen des Organismus entstehen können. Begrenzt wird dieser Mechanismus durch die Verfügbarkeit an freien  $Fe^{2+}$ -Ionen. Die dabei entstehenden Hydroxylradikale besitzen eine Halbwertszeit von nur  $10^{-9}$  sec, wodurch nur geringe Diffusionswege möglich sind. Größtenteils verbleiben die Radikale am Ort der Entstehung und reagieren mit DNA-Molekülen in ihrer Umgebung. Das Hydroxylradikal ist weiterhin als wichtiger Initiator der Lipidperoxidation (LPO) von Membranlipiden beschrieben [Halliwell *et al.*, 2008].



Durch einen vorgeschalteten Redoxprozess, wie der Haber-Weiss-Reaktion, können  $Fe^{2+}$ -Ionen generiert werden, die dann der Fenton-Reaktion als Äquivalente zur Verfügung stehen [Apel *et al.*, 2004].



Die UV-Licht-katalysierte Bildung von Alkoxyradikalen in den Zellen findet durch die Übertragung eines Elektrons auf ein Nicht-Radikal statt. Dadurch wird die kovalente Bindung gespalten und es entsteht ein Alkoxyradikal und ein Hydroxylion [Valko *et al.*, 2006].



Als weitere Quelle der Bildung von ROS kommen Enzyme, wie NAD(P)H-Oxidase, Xanthinoxidase, NOS (engl. *nitric oxide synthase*) in Frage. Diese katalysieren intrazelluläre radikalbildende Prozesse, wodurch eine Vielzahl unterschiedlichster ROS, wie  $H_2O_2$  und  $\cdot O_2^-$ , entstehen können [Halliwell *et al.*, 2008]. Die Xanthinoxidase (XO) beispielsweise gehört zur Gruppe der Molybdänhydroxylasen, welche befähigt sind Purine abzubauen. Im speziellen katalysiert die XO den Abbau von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zur Harnsäure. In beiden Schritten wird molekularer Sauerstoff reduziert wodurch im ersten Schritt das Superoxidradikalanion und im zweiten Wasserstoffperoxid entsteht [Valko *et al.*, 2006].

Die am häufigsten im Organismus vorkommenden radikalischen und nicht-radikalischen ROS sind in Tab. 3.1 aufgelistet.

Tab. 3.1: Beispiele für radiakalische und nicht-radikalische ROS [Halliwell et al., 2008].

radikalische ROS	nicht-radikalische ROS
Superoxidradikalanionen ( $O_2^{\cdot-}$ )	Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ )
Hydroxylradikal ( $OH^{\cdot}$ )	Ozon ( $O_3$ )
Alkoxyradikal ( $RO^{\cdot}$ )	organische Peroxide ( $ROOR$ )
Peroxyradikal ( $RO_2^{\cdot}$ )	Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ )

ROS können wie schon beschrieben auf unterschiedlichen Wegen entstehen. Es wird vermutet, dass menschliche Zellen pro Tag  $1.5 \times 10^5$  Angriffen durch ROS ausgesetzt sind, wodurch unterschiedliche Strukturen, wie DNA, Lipide und Proteine geschädigt werden. Der Grad der Schädigung, ist abhängig vom Bildungsort der ROS, dem Reaktionspartner sowie den zur Verfügung stehenden Reparaturmechanismen. Unterliegen diese zellulären Strukturen einer permanenten Modifikation durch oxidative Schäden, so entstehen Vorstufen, welche bei der Karzinogenese, Mutagenese und Alterungsprozessen beteiligt sein können [Halliwell et al., 2008].

Zu den ROS induzierten DNA-Schäden zählen Einzel- und Doppelstrangbrüche, Purin-, Pyrimidin-, Deoxyribose-Modifikationen und DNA cross-links. Als eines der reaktivsten Radikale, welches mit allen Komponenten der DNA, sowohl Purin- als auch Pyrimidin-Basen und deren Deoxyribose-Rückgrat reagiert, gilt das Hydroxylradikal. Es reagiert mit der Doppelbindung der DNA-Base, wodurch wie in Abb. 3.1 beispielhaft gezeigt, ein 8-Hydroxyguanin (8-OH-G) gebildet werden kann. Diese oxidierte DNA-Base ist aufgrund ihres starken mutagenen und karzinogen Potentials von großer Bedeutung. Sie wird im Organismus relativ leicht gebildet und dient schon seit Jahren als Biomarker für oxidativen Stress [Apel et al., 2004; Halliwell et al., 2008].

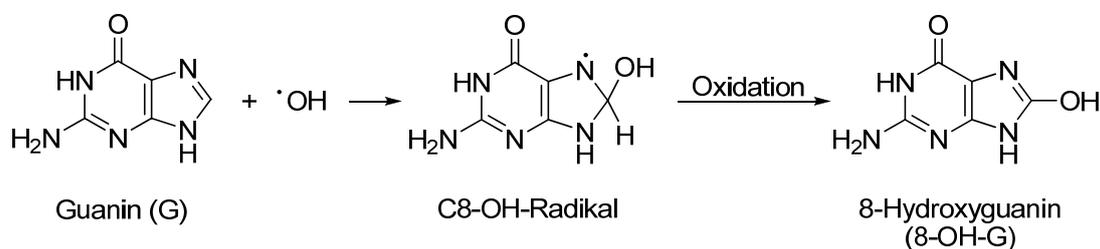


Abb. 3.1: Postulierte Reaktion von Guanin mit Hydroxylradikalen zum 8-Hydroxyguanin (8-OH-G).

Es ist bekannt, dass ROS nicht nur die DNA, sondern auch andere zelluläre Strukturen, wie Lipide, schädigen können. Als Bestandteil von Membranen kann die Schädigung von Lipiden zum Verlust der Membranfunktionen führen. Dieser Prozess gliedert sich in drei Hauptabschnitte und wird als Lipidperoxidation (LPO) bezeichnet. Im ersten Schritt

(Initiation) wird mittels ROS ein H-Atom abgespalten und es entstehen hoch reaktive Lipidradikale. Diese sind wiederum in der Lage, mit weiteren Biomolekülen zu reagieren und so einen kaskadenförmigen Kettenmechanismus einzuleiten (Propagation). Die Termination (Beendigung der Reaktion) tritt dann ein, wenn zwei Radikale miteinander reagieren und damit ein nicht-radikalisches Endprodukt bilden. Eines der bekanntesten Produkte der LPO ist die Verbindung Malondialdehyd (MDA), welche aufgrund ihrer Struktur gut mit DNA und Proteinen reagieren kann und dadurch toxisches Potential besitzt [Gutteridge *et al.*, 1990; Halliwell *et al.*, 1993].

Der Oxidationsmechanismus von Proteinen durch unterschiedliche ROS wurde erstmals ausführlich von Stadtman im Jahre 2004 beschrieben [Stadtman, 2004]. Dabei wurde gezeigt, dass Hydroxylradikale in der Lage sind, ein Wasserstoffatom vom Polypeptidrückgrat zu abstrahieren. Das entstandene Radikal kann mit Sauerstoff reagieren und so ein Peroxylradikal bilden, welches in einer weiteren Radikalreaktion zu einer Spaltung der Peptidkette oder zu Quervernetzungen führen kann. Aufgrund dieser Mechanismen sind ROS befähigt, die Struktur der Proteine derart zu verändern, dass deren physiologische Funktion beeinflusst wird, was möglicherweise zu einem Verlust der Funktionsweise führt [Halliwell *et al.*, 2008; Stadtman, 2004].

### 3.1.1 Verwendete ROS Induktoren

Da es in Zellsystemen fast unmöglich ist, präventive Effekte durch Antioxidantien zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Dissertation eine *in vitro* Methode nach Schäfer *et al.* angewandt [Schaefer *et al.*, 2006a]. Dieses Inkubationsprotokoll beruht auf einer Vorinkubation mit der zu untersuchenden Substanz oder Extrakten und einer nachfolgenden Induktion von oxidativem Stress durch selektive Oxidantien (Md: Menadion, TBH: *tert*-Butylhydroperoxid) [Schaefer *et al.*, 2006a; Schaefer *et al.*, 2006b].

#### 3.1.1.1 Menadion

Menadion (2-Methyl-1,4-naphthochinon) ist ein synthetisches Vitamin K Analogon, das der Gruppe der Chinone zugeordnet wird. Chinone sind redoxaktive Substanzen, die aufgrund struktureller Eigenschaften in der Lage sind, ROS kontinuierlich zu generieren. Im ersten Schritt entstehen durch Übertragung eines freien Elektrons auf Sauerstoff ein Superoxidradikalanion und das Semichinon-Radikal, welches in einem weiteren Schritt zum Hydrochinon reduziert wird. Katalysiert wird dieser reversible Prozess („Redoxcycling“) zum einen durch Peroxidasen (Bildung von Radikalen), zum anderen durch Chinon-Reduktasen. Um die gebildeten Chinone zu detoxifizieren, besitzt die Zelle die Möglichkeit, in einer Zwei-Elektronen-Reduktion Hydrochinone direkt zu generieren (siehe Abb. 3.2) [Criddle *et al.*, 2006].

Menadion ist aufgrund des Redoxcycling-Prozesses (kontinuierliche ROS Generierung) eine geeignete Substanz zur Erzeugung von moderatem oxidativem Stress in Zellen [Bellion *et al.*, 2008; Bellion *et al.*, 2009; Bellion *et al.*, 2010; Schaefer *et al.*, 2006b]. Darüber hinaus können

Chinone als Michael-Akzeptoren fungieren, die kovalent an zelluläre Nucleophile (GSH, DNA-Basen) binden. Dadurch kann die antioxidative Kapazität der Zelle beeinflusst werden (GSH-Depletion) und die Zelle wird anfälliger für oxidative Schäden (DNA-Strangbrüche) [Halliwell *et al.*, 2008].

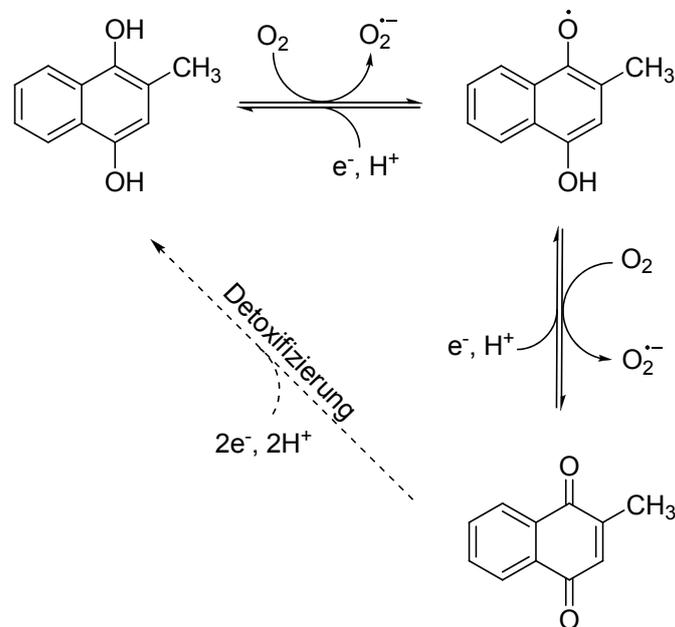
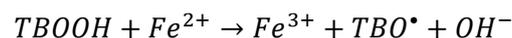


Abb. 3.2: Prinzip des Redoxcycling-Prozesses von Chinonen am Beispiel von Menadion nach [Criddle *et al.*, 2006].

### 3.1.1.2 Tert.-Butylhydroperoxid (TBH)

Das *tert*-Butylhydroperoxid (siehe Abb. 3.3) ist ein synthetisch hergestelltes organisches Hydroperoxid, das schon in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien als ROS-Induktor eingesetzt wurde [Bellion *et al.*, 2008; Bellion *et al.*, 2009; Bellion *et al.*, 2010; Schaefer *et al.*, 2006b; Wang *et al.*, 2000]. Die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies erfolgt über die Bildung von Peroxyl- und Alkoxyradikalen, welche bei der Lipidperoxidation eine große Rolle spielen. Ein Zerfall des TBH (TBOOH) kann, analog zur Fenton-Reaktion, durch Metallionen beschleunigt werden. Dadurch entsteht ein sehr reaktives  $TBO^{\cdot}$ -Radikal, welches zelluläre Strukturen (DNA) direkt schädigen kann.



TBH dringt zum einen schnell in die Zelle ein, wofür lange Inkubationszeiten unnötig sind, zum anderen stellt TBH kein Substrat für den Abbau durch in Zellsystemen enthaltene Katalase dar [Halliwell *et al.*, 2008].

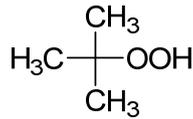


Abb. 3.3: Struktur von tert-Butylhydroperoxid (TBH)

## 3.2 Schutzmechanismen des Organismus gegen ROS

Da reaktive Sauerstoffspezies durch unterschiedliche Reaktionswege (siehe Kap. 3.1) in allen aeroben Organismen gebildet werden, waren diese gezwungen eine Reihe von Abwehrmechanismen zu entwickeln. Diese Systeme zum Schutz vor oxidativem Stress beinhalten sowohl DNA-Reparaturmechanismen, als auch physikalische und antioxidative Abwehrsysteme. Die enzymatischen Abwehrmechanismen unterteilen sich dabei in Superoxiddismutase (SOD), Glutathionperoxidase (GP<sub>x</sub>) und Katalase. Demgegenüber stehen nicht-enzymatische Abwehrmechanismen wie Ascorbinsäure (Vit. C) und Tocopherole (Vit.E) die mit der Nahrung aufgenommen werden müssen und Glutathion (GSH) [Valko *et al.*, 2007].

### 3.2.1 Enzymatische Abwehrmechanismen

#### 3.2.1.1 Superoxiddismutase (SOD)

Die Superoxiddismutase (SOD) stellt eine Sammelbezeichnung für in Aerobiern vorkommende Oxidoreduktasen mit Metallionen im katalytischen Zentrum dar, die in der Lage sind, intrazelluläre Superoxidradikalanionen in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umzuwandeln. Dieser sog. „Ping-Pong“-Mechanismus beruht im ersten Schritt auf Reduktion und im zweiten Schritt auf der Re-oxidation der prosthetischen Gruppe (Metallion) der SOD [Eisenbrand *et al.*, 2006; Valko *et al.*, 2006].



Es existieren viele verschiedene Isoformen der SOD, die sich aufgrund des Metalls im aktiven Zentrums, der Aminosäuren oder anderen Faktoren unterscheiden. Im menschlichen Körper existieren lediglich eine zytosolische Cu, Zn-SOD, eine mitochondriale Mn-SOD und eine extrazelluläre EC (extracellular)-(Cu, Zn)-SOD [Valko *et al.*, 2006].

#### 3.2.1.2 Katalase

Die Katalase gehört ebenfalls zur Klasse der Oxidoreduktasen, die in aeroben Organismen weit verbreitet, dort aber in den Peroxisomen lokalisiert sind. In den Peroxisomen dienen diese Enzyme hauptsächlich dazu, den Abbau von Wasserstoffperoxid zu Wasser und

Sauerstoff zu katalysieren. Die Katalase ist eines der effektivsten Enzyme mit einer Abbaurate von ~6 Millionen Wasserstoffperoxidmolekülen pro Minute [Valko *et al.*, 2006].



Neben dieser physiologischen Funktion dient das Enzym in Organellen einerseits als Peroxidase, andererseits schützen Katalase und GP<sub>x</sub> gemeinsam Hämoglobin und andere Proteine vor oxidativer Schädigung [Eisenbrand *et al.*, 2006].

### 3.2.1.3 Glutathionperoxidase (GP<sub>x</sub>)

Die Glutathionperoxidasen (GP<sub>x</sub>) gehören zur Enzymfamilie der Selen-GP<sub>x</sub> bei denen das Selenocystein im aktiven Zentrum enthalten ist. Dadurch sind diese Enzyme in der Lage, die Reaktion organischer Peroxide und Wasserstoffperoxid zu den entsprechenden Hydroxyverbindungen und Wasser zu katalysieren [Valko *et al.*, 2006].



Als Katalysator, der Reduktionsäquivalente zur Verfügung stellt, dient in den meisten Fällen GSH, welches zu GSSG oxidiert wird. Regeneriert wird das entstandene GSSG über eine NADPH-abhängige Reaktion durch Glutathionreduktase (GSR) [Valko *et al.*, 2006].

Bis heute sind vier GP<sub>x</sub> (zytosolische GP<sub>x</sub>1, gastrointestinale GP<sub>x</sub>2, Plasma GP<sub>x</sub>3, Phospholipid-Hydroperoxid GP<sub>x</sub>4) näher charakterisiert worden [Halliwell *et al.*, 2008].

### 3.2.1.4 Glykosylasen & Endonukleasen (Bedeutung bei der DNA-Reparatur)

Die DNA-Reparatur ist essentiell, um Mutationen in aerob lebenden Organismen zu verhindern bzw. zu limitieren. Der Organismus kann dabei auf unterschiedliche Mechanismen (Basen-Exzisions-Reparatur (BER), Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER), Mismatch-Reparatur (MMR), Direkt- und Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatur) der DNA-Reparatur zurückgreifen. Unter den Mechanismen nimmt die BER eine besondere Stellung ein, da fast alle oxidativen DNA-Schäden über diesen Mechanismus behoben werden können (siehe Abb. 3.4). Hierbei wird die geschädigte Base durch eine spezifische Glykosylase erkannt und durch Hydrolyse der glykosidischen Bindung entfernt. Man unterscheidet zwischen Typ I Glykosylasen (entfernen die geschädigte Base und es entsteht eine apurine (AP)-Stelle) und Typ II Glykosylasen (entfernen die geschädigte Base und spalten die AP-Stelle durch 3'-Endonukleaseaktivität, unter Bildung eines Einzelstrangbruchs). Bei den Typ I Glykosylasen wird neben der entstandene AP-Stelle das Ribosephosphat-Rückgrat mittels AP-Endonuklease (AP-Lyase) entfernt, durch eine DNA-Polymerase wird ein unbeschädigtes Nukleotid eingefügt und zuletzt der reparierte DNA-Strang durch eine Ligase geschlossen [Christmann *et al.*, 2003; Halliwell *et al.*, 2008].

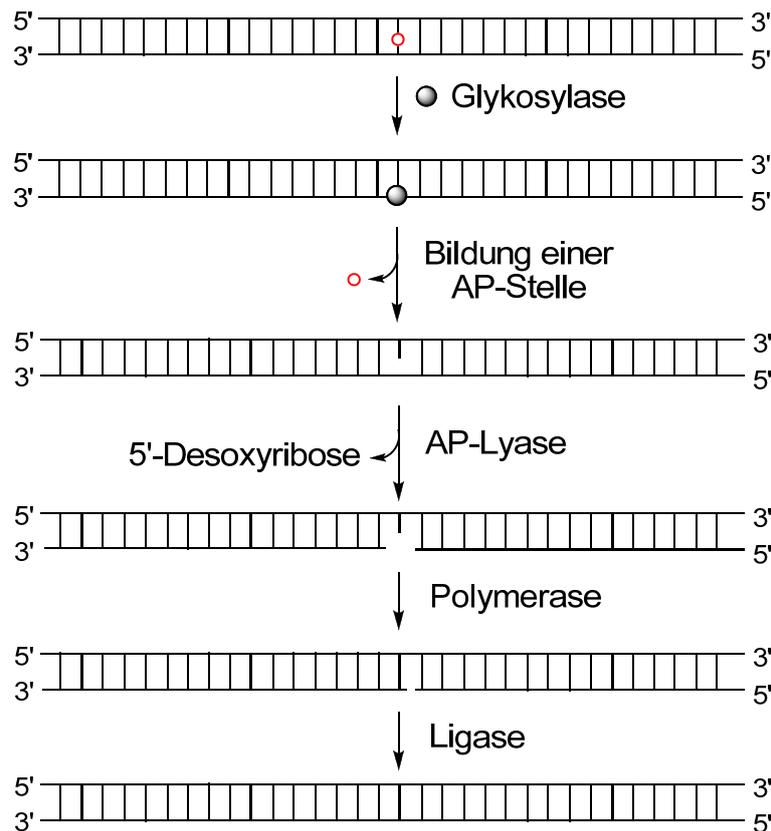


Abb. 3.4: Mechanismus der Basen-Exzisions-Reparatur (BER) zur Reparatur von oxidativen Schäden an der DNA. AP-Stelle: apurine Stelle nach [Christmann et al., 2003].

Für die DNA-Reparatur sind im Allg. zwei Enzymfamilien verantwortlich: Einmal die Glykosylasen, welche geschädigte Basen erkennen und entfernen, zum anderen Endonukleasen, die in der Lage sind, das Ribosephosphat Rückgrat an der AP-Stelle zu spalten und somit den Einbau intakter Nucleotide zu ermöglichen.

Ein bedeutendes Enzym ist die Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG), da diese alle oxidierten DNA-Basen erkennt und aus dem DNA-Strang entfernt, wodurch zusätzliche Einzelstrangbrüche entstehen [Halliwell et al., 2008; Maynard et al., 2009].

### 3.2.2 Nicht-enzymatische Abwehrmechanismen

Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien, die zum Teil im Organismus gebildet oder durch die Nahrung zugeführt werden, zählen neben Ascorbinsäure und Glutathion auch Tocopherole (Vitamin E), Carotinoide, Alkaloide und Flavonoide (Anthocyane). In den nächsten beiden Abschnitten soll beispielhaft auf den wichtigsten intrazellulären Vertreter das Glutathion eingegangen werden [Apel et al., 2004].

#### 3.2.2.1 Glutathion

Glutathion (L- $\gamma$ -Glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH) ist ein Tripeptid, das ubiquitär im Zytoplasma von menschlichen und tierischen Zellen vorkommt. Es wird in der Leber durch zwei ATP-

abhängige enzymatische Schritte, aus L-Glutamat, L-Cystein und L-Glycin gebildet. Im ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, katalysiert das Enzym  $\gamma$ -Glutamylcysteinylgase ( $\gamma$ -GCL), auch als  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase bekannt, die Verknüpfung von L-Glutamat und L-Cystein. An das entstandene  $\gamma$ -Glutamyl-L-Cystein-Molekül wird in einer weiteren Reaktion die Kondensation von L-Glycin durch die Glutathionsynthetase (GS) katalysiert [Apel *et al.*, 2004; Eisenbrand *et al.*, 2006]. In Abb. 3.5 ist sowohl die Struktur des reduzierten als auch des oxidierten GSH in einer Gleichgewichtsreaktion dargestellt.

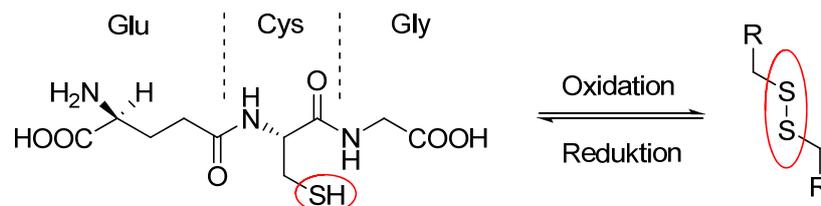


Abb. 3.5: Struktur des reduzierten Glutathions (GSH, links) und dessen oxidierten Form (GSSG, rechts). R:  $\gamma$ -Glutamyl-L-cysteinglycin

Der Glutathion-Spiegel im Menschen variiert sehr stark, wobei insbesondere in der Leber, Niere und dem Blut sehr hohe Konzentrationen im mM-Bereich messbar sind. Im Allgemeinen beruht der antioxidative Charakter von GSH auf der Möglichkeit, in einer  $GP_x$ -katalysierten Reaktion GSSG zu bilden und dadurch Radikale (Hydroperoxide) abzufangen. Die Rückreaktion verläuft über eine NADPH/ $H^+$ -abhängige GSR, wodurch wieder GSH gebildet wird. Diese Reversibilität stellt ein enormes Redoxpotential für die Zelle dar (Redoxreaktionen siehe Abb. 3.6) [Halliwell *et al.*, 2008].

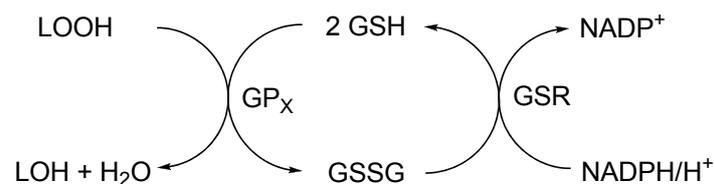


Abb. 3.6: Reversible Oxidation von GSH in das Disulfid GSSG, die dabei benötigten Enzyme (Glutathionperoxidase:  $GP_x$ , Glutathionreduktase: GSR) und NADPH/ $H^+$ .

Des Weiteren kann Glutathion im Organismus als Cofaktor für detoxifizierende Enzyme (Glutathiontransferase) dienen, Radikale (Hydroxylradikale) und Wasserstoffperoxid direkt abfangen und Antioxidantien wie Vitamin C und E regenerieren [Valko *et al.*, 2006].

## 4 Der Magen-Darm-Trakt

### 4.1 Abschnitte & Funktionen

Der Magen-Darm-Trakt lässt sich in die Abschnitte Mund-Rachen-Raum, Speiseröhre, Magen, Dünn- und Dickdarm unterteilen. Seine Hauptaufgabe besteht in der Überführung des Speisebreis (Chymus) in resorbierbare Bestandteile und deren anschließende Aufnahme in den Körper (Verweilzeiten des Chymus und Flüssigkeitsvolumina der einzelnen Darmabschnitte siehe Abb. 4.1). Diese Aufgabe wird durch eine Abfolge unterschiedlicher Schritte erreicht, die untereinander variieren können. Im allgemeinen finden zuerst die mechanischen Prozesse (Nahrungsaufnahme, Zerkleinerung, Durchmischung und Transport) statt, darauf folgen die Verdauungssäfte, die der hydrolytischen Spaltung von Kohlenhydraten, Fetten und Eiweißen dienen, und am Ende erfolgt die Resorption der entstanden Endprodukte aus dem Darmlumen. Es ist jedoch möglich, dass die Resorption einzelner Verbindungen schon im Mund oder Magen stattfindet [Mutschler *et al.*, 2007; Silbernagl *et al.*, 2007].

#### 4.1.1 Mund-Rachen-Raum, Speiseröhre

In der Mundhöhle wird durch Kauen und Zugabe von Speichel, der Enzyme (Amylase, Zungengrundlipase) und R-Proteine enthält, die Nahrung zerkleinert und teilweise können auch erste Spaltungen (z.B. Stärke) auftreten. Dadurch wird die Nahrung in einen gleitfähiger Zustand überführt und durch Schlucken über die Speiseröhre zum Magen befördert [Mutschler *et al.*, 2007].

#### 4.1.2 Magen

Der Magen besitzt im Körper eine Reservoirfunktion, was bedeutet, dass dort die geschluckten Speisen gespeichert, zerkleinert und homogenisiert werden. Zusätzlich sezerniert die Magenmukosa Magensaft (führt zu einer Erniedrigung des pH-Wertes auf ca. 1 - 3) [Fallingborg *et al.*, 1989; Fallingborg, 1999], dessen wesentliche Bestandteile Salzsäure (zur Desinfektion), Intrinsic-Faktor (IF), Pepsinogene, Muzin und Bicarbonate sind. Pepsinogene sind Enzyme die im niedrigen pH-Bereich des Magens (< 4) zu Pepsin aktiviert werden und somit zu dem Verdau von Proteinen führen können. Nach einer Verweildauer von 1 bis 6 Stunden erfolgt die geregelte Entleerung des Chymus ins Duodenum [Mutschler *et al.*, 2007; Silbernagl *et al.*, 2007].

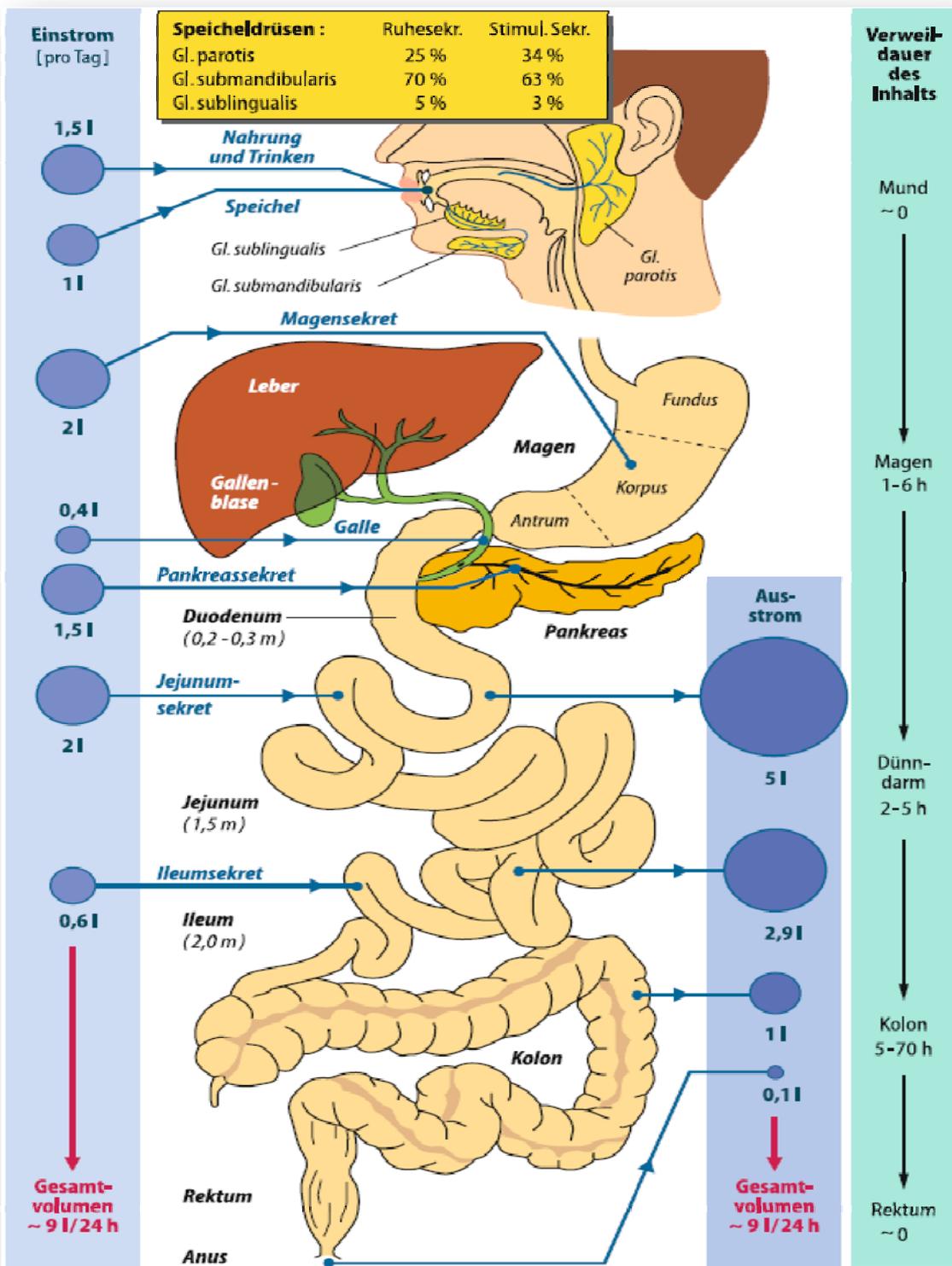


Abb. 4.1: Übersicht des Gastrointestinaltrakts (GIT), der an der Verdauung beteiligten Flüssigkeitsbilanzen und der jeweiligen Verweildauer in den einzelnen Abschnitten aus [Mutschler et al., 2007] Kapitel 38 „Funktionen des Magen-Darm-Trakts“, Seite 839 .

### 4.1.3 Dünndarm

Im Dünndarm finden weitere Verdauungsvorgänge durch zusätzliche Sekretionen unterschiedlicher Enzyme statt. Zum einen wird Pankreassaft über die Bauchspeicheldrüse und zum anderen Gallensaft über die Galle dem Chymus beigemischt. Die darin enthaltenen Enzyme führen zur Spaltung von Nähr- und Fremdstoffen. Die dabei entstehenden niedermolekularen Spaltprodukte werden zum überwiegenden Teil resorbiert, bevor der Chymus zum Dickdarm weitertransportiert wird. Der Dünndarm gliedert sich in drei Abschnitte:

1. Das Duodenum (Zwölffingerdarm) mit einer Länge von 20 bis 30 cm. Hier findet die Neutralisation des aus dem Magen kommenden Chymus auf einen pH-Wert zwischen 6.2 und 6.5 statt. Dazu tragen zum einen die in der Darmwand verankerten Kryptenzellen und Brunner-Drüsen, die ein alkalisches, bicarbonatreiches Sekret (pH-Wert zwischen 8 und 9) produzieren und zum anderen der Pankreassaft der Bauchspeicheldrüse bei. [Fallingborg et al., 1994; Fallingborg, 1999].
2. Das am Treitz-Band beginnende Jejunum (Leerdarm) mit einer Länge von 1.5 m. Hier befinden sich im Darmepithel Becherzellen und Lieberkühn-Krypten, die Muzine produzieren und somit zu pH-Wert Senkungen beitragen. Weiterhin kommt es durch Rückresorption des Bicarbonates zu einer Ansäuerung des Chymus (pH-Wert zwischen 5.9 und 6.8) [Fallingborg, 1999; Turnberg et al., 1970].
3. Das Ileum mit einer Länge von 2 m. Aufgrund einer zunehmenden Sekretion von Bicarbonat durch das Darmepithel und einer gleichzeitigen Absorption von Gallensäure kommt es zu einer pH-Wert Erhöhung auf 7.4 bis 7.6 [Evans et al., 1988; Fallingborg, 1999]. Ein weiterer Grund für diesen pH-Anstieg stellt die Fermentation nicht aufgenommener Kohlenhydrate durch Darmbakterien dar [Fallingborg, 1999].

Während der Magen und der obere Dünndarmbereich keimarm (Bakterienzahl  $10^3$ /ml Chymus) sind, nimmt die Besiedelung von Bakterien von proximal nach distal hin zu. Es kommen hauptsächlich die beiden Spezies *Enterococcus* und *Lactobacillus*, die zu den fakultativen Anaerobiern zählen, vor. Die Bakterienzahl beträgt  $10^6$  -  $10^9$ /ml Chymus im Ileum [Mutschler et al., 2007].

### 4.1.4 Dickdarm

Den letzten Abschnitt des Magen-Darm-Trakts bildet der Dickdarm. Er unterteilt sich in drei Abschnitte: Caecum (Blinddarm) mit dem Wurmfortsatz, Kolon (Grimmdarm) und Rektum (Mastdarm). Im Kolon (Gesamtlänge von 1.2 m), dem Hauptteil des Dickdarms, unterscheidet man einen aufsteigenden, einen querverlaufenden, einen absteigenden und einen S-förmigen Abschnitt. Anschließend beginnt das 25 bis 20 cm lange Rektum welches in den Anus endet.

Im Dickdarm werden durch Eindicken des Darminhalts (Resorption von Wasser und Elektrolyten) und durch Sekretion von Schleim die Fäzes gebildet. Der Dickdarm ist aufgrund seines für Bakterien günstigen pH-Wertes (5.7 bis 6.8) dicht besiedelt [Evans *et al.*, 1988; Fallingborg *et al.*, 1989; Fallingborg, 1999]. Die Bakterienzahl steigt sprunghaft beim Übergang von Ileum zum Dickdarm an und beträgt  $10^{11}$  bis  $10^{12}$ /ml Chymus. Die Mehrzahl dieser Kolonbakterien sind obligate und fakultative Anaerobier, die zu den Familien *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *E. coli*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Ruminococcus* und *Roseburia* gehören. Sie wandeln unverdauliche Nahrungsbestandteile zu Gasen und kurzkettigen Fettsäuren um [Fallingborg, 1999; Mutschler *et al.*, 2007].

Tab. 4.1: pH-Werte in den einzelnen Abschnitten des Magen-Darm-Trakts nach [Fallingborg, 1999].

Organ	Magen	Dünndarm			Dickdarm
		Duodenum	Jejunum	Ileum	
pH-Wert	1 - 3	6.2 - 6.5	5.9 - 6.8	7.4 - 7.6	5.7 - 6.8

## 4.2 Ileostomie (Stoma des terminalen Ileums)

Das Wort Stoma bedeutet im griech.: Mund bzw. Öffnung und wird im Volksmund als „künstlicher Darmausgang“ bezeichnet. Die Ileostomie ist eine Stomaart bei der aufgrund einer Erkrankung des Darms, der gesamte Dickdarm operativ entfernt werden musste. Dies kann notwendig werden, wenn die natürliche Darmpassage behindert ist (z.B. tumorbedingt), eine entzündliche Darmerkrankung (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) besteht oder eine Darmanastomose geschützt werden muss.

Dabei wird das Ende des Dünndarms (endständiges Ileostoma) meist auf der rechten Seite der Bauchdecke ausgeleitet. Der so künstlich geschaffene Darmausgang hat einen Durchmesser von 2 bis 3 cm und steht ca. 2 cm über das Hautniveau hinaus, um ein gutes Abfließen des dünnflüssigen Stuhls in einen daran angeklebten Beutel zu ermöglichen (siehe Abb. 4.2). Da der Dünndarm keine physiologische Funktion der Speicherung, Wasser- und Elektrolytresorption besitzt, wird der Darminhalt kaum eingedickt, was dazu führt, dass der Ausfluss eine überwiegend flüssig bis breiige Konsistenz besitzt und über den ganzen Tag verteilt ausgeschieden wird [Stern *et al.*, 1999].

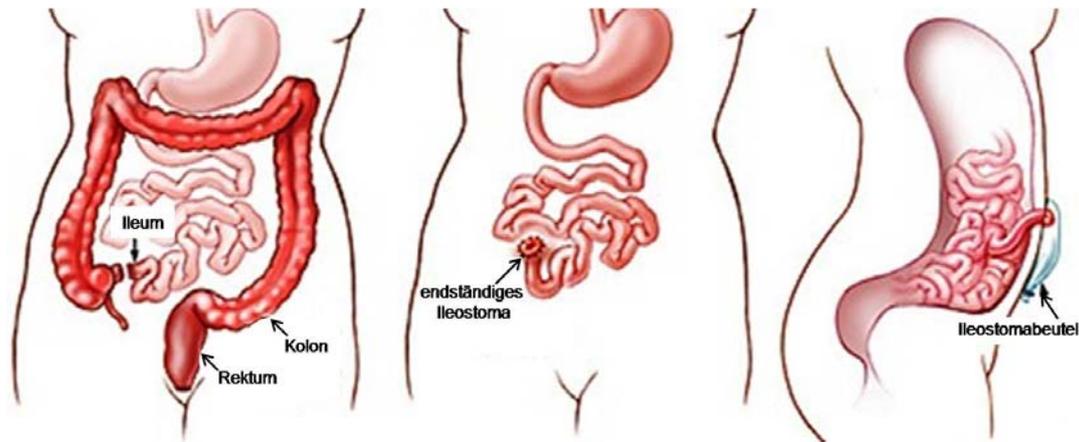


Abb. 4.2: Lage des Dün- und Dickdarms im GIT (links), endständiges Ileostoma nach Entfernung des Dickdarms (mitte), Außenansicht und Lage des Ileostomabeutels (rechts) [modifiziert nach [www.medlist.ro](http://www.medlist.ro)].

Bei einer Ileostomie gehen die wesentlichen Aufgaben des Dickdarms verloren, was zu Veränderungen des Stuhl- und Urinvolumens gegenüber gesunden Menschen führt. Ursächlich für die erhöhte Exkretion ist die mit dem Dickdarm verlorengegangene Rückresorption von Natriumionen, wodurch sich das Verhältnis zur Kaliumkonzentration praktisch umkehrt [Okamoto *et al.*, 1995; Santavirta *et al.*, 1991b]. Ein weiterer Unterschied besteht in der Dichte der Besiedelung mit Keimen, wobei terminale Ileostomata Keimzahlen aufweisen die den physiologischen Verhältnissen ähneln. Zusammenfassend gilt, so lange der Dünndarm nach einem operativen Eingriff in gesamter Länge vorhanden und ohne sonstige Erkrankung ist, wirkt sich der Verlust des Dickdarms nicht auf die allgemeine Versorgung mit Nährstoffen, sondern lediglich auf die Wasserresorption aus [Santavirta *et al.*, 1991a; Stern *et al.*, 1999].

## 5 Problemstellung

### 5.1 Vorstellung des Clusterprojektes

Um die Ziele dieser Arbeit plausibel darstellen zu können, ist es notwendig, den Grundgedanken des Clusterprojektes („*Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen: Untersuchungen zum Einfluss der Mikrostruktur und der molekularen Zusammensetzung auf die Stabilisierung und kontrollierte Freisetzung von sekundären Pflanzenstoffen und deren Auswirkung auf biologische Signalparameter*“), in dessen Rahmen diese Arbeit entstanden ist, näher zu erläutern.

Die Struktur des Clusters bestand aus drei Hauptbereichen (Inhaltsstoffe/Molekulare Strukturen, Formulierung/Verkapselung, biologische Wirkung & Freisetzung), die von unterschiedlichen Forschungsgruppen bzw. Teilprojekten bearbeitet wurden (siehe Abb. 5.1).

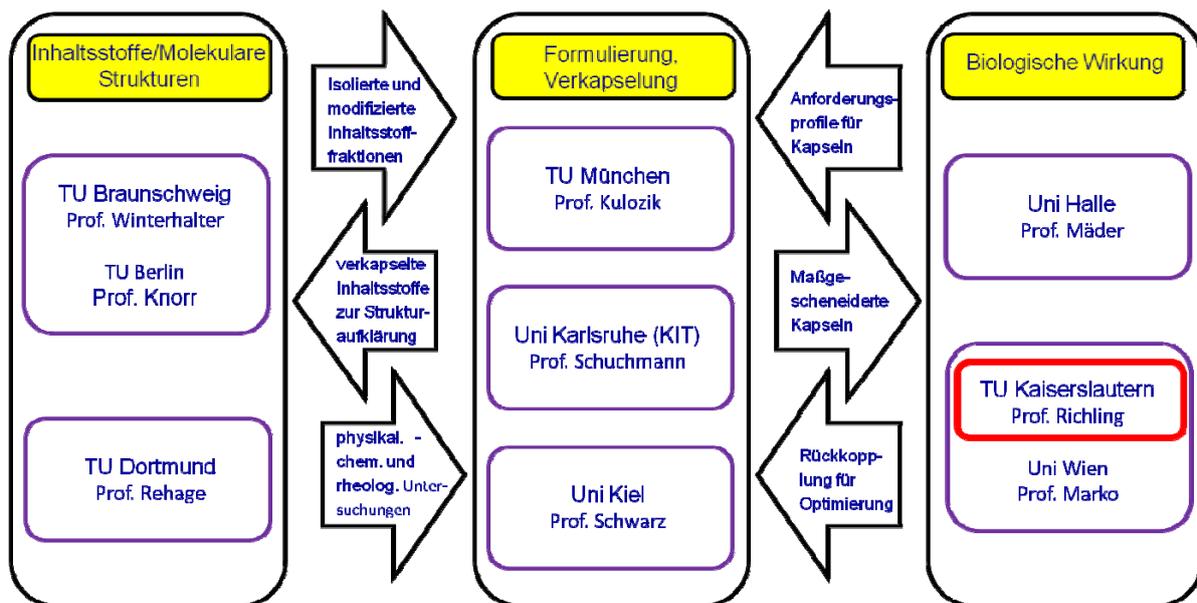


Abb. 5.1: Unterteilung des Clusterprojektes in drei Hauptbereiche (gelb unterlegt) (Inhaltsstoffe/ Molekulare Strukturen, Formulierung/ Verkapselung, biologische Wirkung & Freisetzung, die dabei beteiligten Forschungsgruppen und deren Vernetzung und Informationsaustausch untereinander. Die vorliegende Arbeit wurde als Teil des Clusterprojektes an der TU Kaiserslautern (rot eingekreist) durchgeführt.

In dem zugrundeliegenden Clusterprojekt sollte an den Hauptinhaltsstoffen der Heidelbeere, den Anthocyanen untersucht werden, inwieweit die Stabilität und Freisetzung unter den Milieubedingungen des GIT durch unterschiedliche Verkapselungssysteme beeinflusst wird. Zu Projektbeginn wurde davon ausgegangen, dass nicht nur die Stabilität und Freisetzung durch die Verkapselung, sondern auch die biologische Wirkung aufgrund molekularer Einflussgrößen (Molekülstruktur, Wechselwirkung) moduliert wird. Aus diesem Grund sollten

Verkapselungstechniken etabliert werden, die es ermöglichen, diese Einflussfaktoren gezielt zu beeinflussen und damit die Freisetzung und biologische Wirkung der Anthocyane zu steuern.

#### **5.1.1.1 Inhaltsstoffe/ Molekulare Strukturen**

- Teilprojekt 1 (TP 1):
  - Forschungsstelle 1: Charakterisierung und Fraktionierung eines anthocyanreichen Heidelbeerextrakts (AG Winterhalter).
  - Forschungsstelle 2: Optimierung der technologischen Prozessschritte zur Gewinnung bioaktiver Inhaltsstoffe aus Heidelbeeren (AG Knorr).
- Teilprojekt 2 (TP 2): Bestimmung kinetischer/rheologischer Eigenschaften und den daraus resultierenden strukturellen Eigenschaften von biofunktionalen Hüllschichten und Mikrokapseln (AG Rehage).

#### **5.1.1.2 Formulierung/ Verkapselung**

- Teilprojekt 3 (TP 3): Herstellung von Milchproteinhydrogelen als Trägerstoffe zur Stabilisierung und kontrollierten Freisetzung von Anthocyanen aus Heidelbeeren (AG Kulozik).
- Teilprojekt 4 (TP 4): Herstellung mikrostrukturierter, multidisperser Hüllkapseln als Träger von Anthocyanen: Modulation der Stabilität und Freisetzung (AG Schuchmann).
- Teilprojekt 5 (TP 5): Herstellung von Mikrokapseln mittels Sprühtrocknungsverfahren zur Stabilisierung und kontrollierten Freisetzung von Anthocyanen aus Heidelbeeren (AG Schwarz).

#### **5.1.1.3 Biologische Wirkung & Freisetzung**

- Teilprojekt 6 (TP 6): Untersuchungen zur Stabilität und Freisetzung der Anthocyane des Heidelbeerextrakts und den daraus hergestellten Kapselsystemen *in vitro* (Magen-Dünndarmpassage) (AG Mäder).
- Teilprojekt 7 (TP 7):
  - Forschungsstelle 1: Untersuchungen zur chemopräventiven Wirkung (Beeinflussung von Rezeptortyrosinkinasen) von Anthocyanen des Heidelbeerextrakts und den daraus hergestellten Kapselsystemen am Modell von Kolonkarzinomzellen (AG Marko).
  - Forschungsstelle 2 (TU Kaiserslautern): Auf die Ziele in diesem Teilprojekt soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Die Ziele des Teilprojektes (TP 7) bzw. der Forschungsstelle 2 des TP 7 unterteilten sich wiederum in zwei Hauptbereiche:

1. Untersuchungen zur gastrointestinalen Stabilität und Freisetzung
  - a. *In vitro* Simulation der Magenpassage (In Kooperation mit TP 6)
  - b. *In vitro* Simulation der Dünndarmpassage (In Kooperation mit TP 6)
  - c. *Ex vivo* Modell mit humanem Dünndarminhalt
  
2. Untersuchungen zur biologischen Wirksamkeit *in vitro*
  - a. Testung auf Zellvitalität (Alamar Blue Assay)
  - b. Testung auf (oxidative) DNA-Schäden (Comet Assay)
  - c. Bestimmung des Glutathiongehalts
  - d. Bestimmung intrazellulärer ROS (DCF Assay)

## 5.2 Ziele der vorliegenden Arbeit

Wie in Kap. 5.1 beschrieben, entstand die vorliegende Arbeit im Rahmen eines Clusterprojektes das zum Ziel hatte, Kapselsysteme zu entwickeln, die eine Stabilisierung und kontrollierte Freisetzung von Anthocyanen eines HBE (*Vaccinium myrtillus* L.) gewährleisten. Zusätzlich sollte die Auswirkung auf biologische Parameter untersucht werden.

Anthocyane sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe die in vielen Obst und Gemüsesorten in großen Mengen enthalten sind [Clifford, 2000]. Insbesondere zeichnet sich die Heidelbeere, durch ein Spektrum von 15 verschiedenen Anthocyanen aus [Latti et al., 2009]. Es wird vermutet, dass Anthocyane aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften in der Lage sind, Radikale abzufangen und dadurch oxidativem Stress entgegen zu wirken. Diese potente Wirksamkeit der Anthocyane im Organismus wird jedoch zum einen durch deren Pharmakokinetik (Bioverfügbarkeit, Metabolismus, Ausscheidung) und zum anderen durch ihre limitierte Stabilität beeinflusst [McGhie et al., 2007]. So liegen Anthocyane lediglich bei einem pH-Wert von 1 - 3 als stabilisierte Flavylium-Kationen vor [Pascual-Teresa et al., 2008].

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Stabilität und Freisetzung von Anthocyanen aus HBE (*Vaccinium myrtillus* L.) unter den Milieubedingungen des Gastrointestinaltrakts (GIT) zu charakterisieren. Des Weiteren sollte untersucht werden, inwieweit unterschiedliche HBE-beladene Kapselsysteme der Projektpartner TP 2, 3 und 5 eine kontrollierte Freisetzung gewährleisten bzw. die Stabilität der Anthocyane erhöhen.

Zur Charakterisierung und Identifizierung der Anthocyane wurde eine HPLC-Methode etabliert, die eine Trennung der 15 im HBE enthaltenen Anthocyane erlaubte. Die Stabilität und Freisetzung der Anthocyane aus HBE und HBE-beladenen Kapselsystemen wurde sowohl während der Magen- als auch der Dünndarmpassage untersucht. Hierfür wurden in Kooperation mit Projektpartner TP 6 (AG Mäder) *in vitro* Simulationen unter den

Bedingungen des jeweiligen Milieus etabliert. Zusätzlich erfolgten weitere Inkubationen mit humanem Dünndarminhalt. Diese unterschiedlichen Stabilitäts- und Freisetzungsversuche erlaubten zum einen eine umfassende Beurteilung des HBE und zum anderen konnte der Einfluss der Verkapselung hinsichtlich Stabilität und Freisetzung im GIT bewertet werden.

Das zweite Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin die Modulation unterschiedlicher Biomarker *in vitro* an Kolonkarzinomzelllinien (Caco-2 und HT-29) zu untersuchen. Um diese Modulation korrekt bewerten zu können, ist die Kenntnis der Stabilität der Anthocyane, aus dem HBE unter Zellkulturbedingungen essentiell. Daher wurde mittels HPLC-UV/VIS-Analytik die Stabilität und Freisetzung der Anthocyane aus dem HBE im Zellkulturmedium untersucht.

Für die Untersuchungen zur biologischen Wirksamkeit wurden Biomarker ausgewählt, die in direktem Zusammenhang mit oxidativen Zellschäden stehen. Anhand dieser Biomarker sollte geprüft werden, ob die unterschiedlichen Verkapselungstechniken und die bei der Herstellung verwendeten Materialien einen Einfluss auf die biologische Wirksamkeit der Anthocyane besitzen. Des Weiteren wurden HBE und HBE-beladene Kapselsysteme vergleichend untersucht. Zusätzlich sollte geprüft werden, welche HBE-Subfraktion (von Projektpartner TP 1 zur Verfügung gestellt) des HBE für dessen mögliche biologische Wirksamkeit verantwortlich ist.

Bei den ausgewählten Biomarkern handelte es sich um, die Reduzierung (oxidativer) DNA-Schäden mittels Comet Assay, die Modulation der Glutathiongehalte und die Reduktion intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im Caco-2 und HT-29 Zellsystem. Da ein Einfluss auf die Basisschäden (sehr gering) der Zellen nicht quantifizierbar war, wurde sich einer zusätzlichen Inkubation mit Oxidantien zur Induktion von moderatem oxidativem Stress bedient [Schaefer et al., 2006a; Schaefer et al., 2006b]. Zur Untersuchung möglicher zytotoxischer Effekte des HBE, HBE-Subfraktionen und HBE-beladenen Kapselsystemen wurde ein Farbreaktionstest (Alamar Blue Assay) durchgeführt.

## 6 Material & Methoden

In diesem Abschnitt wird auf die während der Dissertation verwendeten Materialien (Chemikalien, Geräte, Verbrauchsmaterialien) und die verwendeten Methoden eingegangen.

### 6.1 Materialien

#### 6.1.1 Geräte

Anaerobkammer	Eigenbau, Werkstatt der Universität Würzburg, D
Anaerobiertopf	HanaCobi, Blacktown, AUS
Bidest.-Wasser-Anlage	Büchi, Essen, D
Biofreezer (-86 °C)	Sanyo, München, D
Brutschrank	Binder, Tuttlingen, D
Brutschrank	Heraeus, Hanau, D
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, D
Gefrierschrank (-24 °C)	Liebherr, Ochsenhausen, D
Gefriertrocknungsanlage	Christ, Osterode am Harz, D
Kühlschrank (+4 °C)	Liebherr, Ochsenhausen, D
Magnetrührer	IKA, Staufen, D
Mikroskop, (Auflicht)	Zeiss, Heidelberg, D
Mikroskop, (Fluoreszenz)	Zeiss, Heidelberg, D
Software (Comet Assay IV)	Perceptive Instruments, Suffolk, GB
Multipette Stepmate	Abimed, Langenfeld, D
Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, D
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Königshofen, D
Plattenreader	MWGt, Ebersberg, D
Software (Gen5)	BioTek Instruments, Bad Friedrichstal, D
pH-Meter	Hanna Instruments, Padova, I
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettierhilfe (Pipetus)	Hirschmann, Eberstadt, D
Rotationsverdampfer	Büchi, Essen, D
Sterilbank	Heraeus, Hanau, D
Trockenschrank	Binder, Tuttlingen, D
Ultraschallbad	Bandelin, Berlin, D
Ultrazentrifuge	Optima TL Beckman, USA
Vortexer	IKA, Staufen, D
Wasserbad	Julabo, Seelbach, D
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, D

Zwölfkanalpipette

Eppendorf AG, Hamburg, D

### 6.1.2 Verbrauchsmaterialien

Anaerocult®

Merck, Darmstadt, D

Combitips (steril, 10 ml und 25 ml)

Eppendorf, Hamburg, D

Deckgläser

Menzel, Kuchen, D

Einmalspritzen

Buddeberg, Mannheim, D

HPLC-Gläschen, Deckel, inserts

Buddeberg, Mannheim, D

Inkubationsröhrchen (15 ml)

Sarstedt, Nümbrecht, D

Kanülen (steril, 0.8 x 22 mm)

Braun, Melsungen, D

Mikrotiterplatten

96 well (steril, schwarz)

Corning, New York, USA

96 well (steril/unsteril, klar)

Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

24 well (steril)

Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

Objektträger (26 x 76 x 10 mm)

Menzel, Kuchen, D

Petrischalen (steril)

Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

Pipettenspitzen

Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

Spritzenvorsatzfilter (PVDF)

Buddeberg, Mannheim, D

Reaktionsgefäße (1.5 ml und 2 ml)

Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

Reaktionsgefäße (15 ml und 50 ml)

Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup> und 175 cm<sup>2</sup>)

Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

Zellschaber

Corning, New York, USA

### 6.1.3 Chemikalien

Acetonitril (HPLC grade)

J. T. Baker, Deventer, NL

Ameisensäure p.a.

Merck, Darmstadt, D

Anthocyane

Cyanidin-3-O-glukopyranosid

Extrasynthese, Genay Cedex, F

Cyanidin-3-O-galaktopyranosid

Polyphenols Laboratories, Hanaveien, N

Cyanidin-3-O-arabinofuranosid

Polyphenols Laboratories, Hanaveien, N

Delphinidin-3,5-di-O-glukopyranosid

Extrasynthese, Genay Cedex, F

Delphinidin-3-O-glukopyranosid

Polyphenols Laboratories, Hanaveien, N

Delphinidin-3-O-galaktopyranosid

Universität Würzburg, D

Delphinidin-3-O-arabinofuranosid

Universität Würzburg, D

Malvidin-3-O-glukopyranosid

Polyphenols Laboratories, Hanaveien, N

Malvidin-3-O-galaktopyranosid

Extrasynthese, Genay Cedex, F

Malvidin-3-O-arabinofuranosid

Universität Würzburg, D

Peonidin-3-O-glukopyranosid

Polyphenols Laboratories, Hanaveien, N

Peonidin-3-O-galaktopyranosid

Polyphenols Laboratories, Hanaveien, N

Peonidin-3-O-arabinofuranosid

Polyphenols Laboratories, Hanaveien, N

Petunidin-3-O-glukopyranosid	Polyphenols Laboratories, Hanaveien, N
Petunidin-3-O-galaktopyranosid	Universität Würzburg, D
Petunidin-3-O-arabinofuranosid	Universität Würzburg, D
Agarose, Schmelzpunkt 37 °C (LMA)	Bio Rad, München, D
Agarose, Schmelzpunkt 42 °C (NMA)	Bio Rad, München, D
BCA-Protein Kit Uptima	VWR, Darmstadt, D
Reagenz A: Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , NaHCO <sub>3</sub> , BCA (Bichinonic Acid), Na-Tartrat	
Reagenz B: CuSO <sub>4</sub>	
Bovine serum albumine (BSA)	Sigma Aldrich, München, D
Calciumchlorid-Hexahydrat p.a. (CaCl x 6 H <sub>2</sub> O)	Sigma Aldrich, München, D
Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat p.a. (CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt, D
Cysteinhydrochlorid-Monohydrat p.a.	Sigma Aldrich, München, D
2',7'-Dichlorfluorescein	Sigma Aldrich, München, D
2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat	Sigma Aldrich, München, D
Dimethylformamid (DMF)	Sigma Aldrich, München, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, D
2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoessäure (DTNB)	Sigma Aldrich, München, D
Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose + L-Glutamine (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Dulbecco's Modified Eagle Medium, Nutrition Mix F12 (1:1) + L-Glutamine + 15 Mm HEPES (DMEM/F12(1:1))	Invitrogen, Karlsruhe, D
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat p.a. (FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, München, D
Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase	Prof. Collins, Universität Oslo, N
Fötale Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Glutathion, reduzierte Form (GSH)	Sigma Aldrich, München, D
Glutathionreduktase (GSR)	Sigma Aldrich, München, D
Glycerin	Merck, Darmstadt, D
Harnstoff p.a.	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid p.a. (KCl)	Sigma Aldrich, München, D
Kaliumhydrogenphosphat p.a. (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, D
di-Kaliumhydrogenphosphat p.a. (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, D
Katalase	Sigma Aldrich, München, D
Kupfer(II)-chlorid-Pentahydrat p.a. (CuCl <sub>2</sub> x 5 H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt, D

Magnesiumchlorid-Hexahydrat p.a.	Sigma Aldrich, München, D
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat p.a. (MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt, D
Menadion	Sigma Aldrich, München, D
Methanol (HPLC grade)	J. T. Baker, Deventer, NL
Molybdän	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid p.a. (NaCl)	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat p.a. (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, D
di-Natriumhydrogenphosphat p.a. (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, D
Natriumsulfat wasserfrei (NaSO <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich, München, D
NADPH	Calbiochem, Darmstadt, D
Nickel(II)-chlorid (NiCl <sub>2</sub> )	Sigma Aldrich, München, D
Penicillin/Streptomycin (10 <sup>4</sup> U/ml, 10 <sup>4</sup> µg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Resazurin-Natrium-salz p.a.	Sigma Aldrich, München, D
5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat p.a. (SSA)	Sigma Aldrich, München, D
Salzsäure (HCl)	J. T. Baker, Deventer, NL
Tris	Sigma Aldrich, München, D
Triton-X	Roth, Karlsruhe, D
Trypsin-EDTA (0.5%)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Trypanblaulösung (0.4%)	Sigma Aldrich, München, D
Quercetin	Merck, Darmstadt, D
Zinksulfat-Heptahydrat p.a. (ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt, D

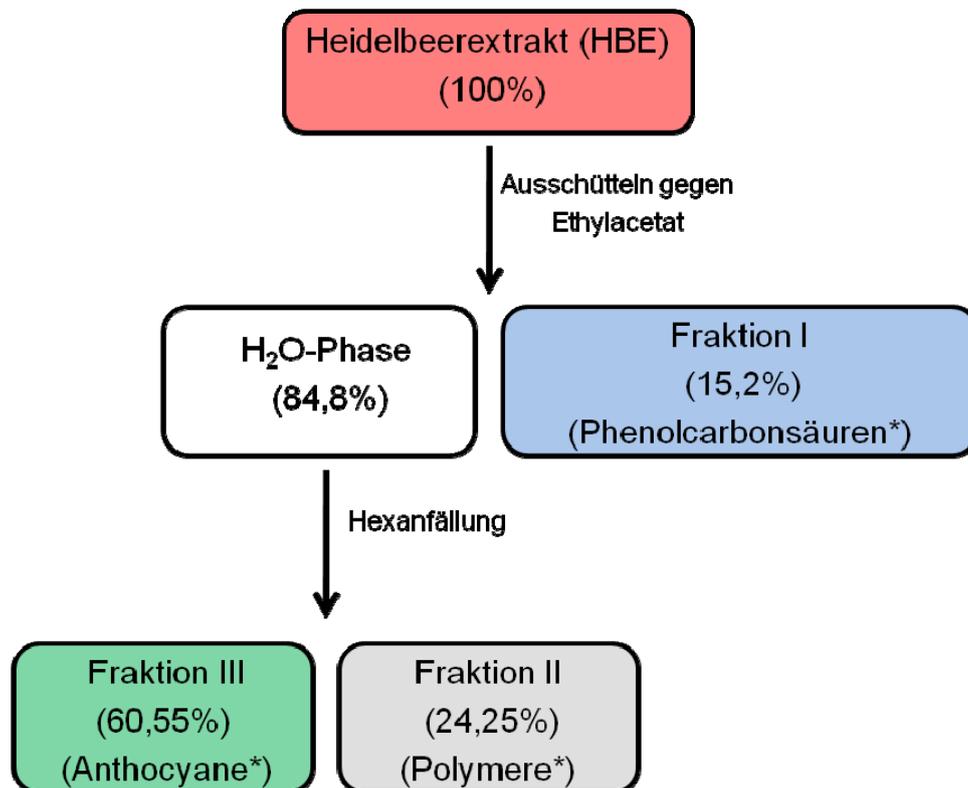
## 6.2 Herstellung und Charakterisierung des verwendeten Heidelbeerextrakts (HBE)

Der in dieser Arbeit verwendete Heidelbeerextrakt (HBE) (Kaden Biochemicals, Hamburg, D) ist unter der Produktnummer 600761 (bilberry extract 25%) erhältlich. Zur Herstellung des HBE wurde ein Trester (aus Saftgewinnung) der europäischen Heidelbeere (Wildsammlung, *Vaccinium myrtillus* L.) verwendet. Im ersten Schritt wurden durch hydroalkoholische Extraktion mit Methanol die polaren Bestandteile herausgelöst, wobei die sehr unpolaren Inhaltsstoffe im Trester verblieben. Anschließend wurde die erhaltene anthocyanreiche Fraktion mehreren Filtrationsschritten unterzogen. Danach wurde die anthocyanreiche Fraktion auf eine mit XAD-7-Material gefüllte Säule aufgetragen und mit Wasser gewaschen. Dadurch wurden die gut wasserlöslichen Substanzen wie Zucker und Säuren entfernt. Im Anschluss erfolgte die Elution aller auf der Säule zurückgehaltenen Substanzen mittels

organischer Lösemittel. Nach entfernen der organischen Lösemittelreste wurde die erhaltene anthocyanreiche Fraktion gefriergetrocknet.

Der HBE wurde auf einen Anthocyangehalt von 25% (bezogen auf die 5 Leitverbindungen Delphinidin, Cyanidin, Petunidin, Peonidin und Malvidin) eingestellt. Des Weiteren waren im Extrakt gemäß den Herstellerangaben noch Tannine, Gerbstoffe und andere Polyphenole enthalten. Der Kohlenhydratanteil betrug 1.55% (0.71% Glukose, 0.84% Fruktose) und der Ballaststoffanteil 28.8%. Der Restgehalt an Methanol lag bei 20 ppm. Die spezifische Analyse des Anthocyanprofils des HBE wird in Tab. 6.1 dargestellt. Der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu betrug 46%.

Eine Fraktionierung des HBE wurde an der TU Braunschweig im Rahmen des Cluster Projektes vorgenommen (TP 1, siehe Erläuterungen Kap. 5). Dabei wurde gezeigt, dass der HBE aufgrund der Hauptkomponenten in drei Fraktionen unterteilt werden kann: Fraktion I Phenolcarbonsäurefraktion (15.2%), Fraktion II Polymerfraktion (24.2%) und Fraktion III Anthocyanfraktion (60.6%) (siehe Abb. 6.1) [pers. Mitteilung Andreas Juadjur].



\* Fraktion I: Hauptkomponenten sind Phenolcarbonsäuren

Fraktion II: Hauptkomponenten sind Polymere

Fraktion III: Hauptkomponenten sind Anthocyane

Abb. 6.1: Prozentualer Anteil der Fraktionen des Heidelbeerextrakts [pers. Mitteilung Andreas Juadjur].

Eine nähere Charakterisierung der in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Verbindungen wurde ebenfalls von TP 1 (TU Braunschweig) durchgeführt. Die Anthocyanfraktion enthielt durch Anreicherung 41% der ursprünglich im Heidelbeerextrakt vorkommenden Anthocyane

(siehe Kap. 1) (Anthocyanprofil der einzelnen Anthocyane entsprach dem des ursprünglichen HBE, siehe Tab. 6.1). Weitere Komponenten dieser Fraktion wurden nicht identifiziert. Eine nähere Charakterisierung der Polymerfraktion wurde nicht durchgeführt. Es ist jedoch aus der Literatur bekannt, dass sowohl Polymere (Proanthocyanidine) als auch Copigmente (siehe Kap. 2.7.1) angereichert wurden [Castaneda-Ovando *et al.*, 2009; Paredes-Lopez *et al.*, 2010]. In der Phenolcarbonsäurefraktion wurden 20 Hauptverbindungen (Quercetin, Myricetin, *p*-Cumarsäure, Phloroglucinolaldehyd, Kaffeesäure, Protokatechusäure, 5-Hydroxyvanillinsäure, Quercetin-rhamnosid, Quercetin-arabinsid, Gallussäure, Epicatechin, Catechin, Cumarsäure-Derivate, Depsid, Quercetin-glukuronid, Quercetin-galaktosid, Chlorogensäure, Cumaroyl-Iridoid, Myricetin-glukosid, Myricetin-galaktosid) nachgewiesen. Auf weitere Komponenten die enthalten waren wurde nicht eingegangen [*pers. Mitteilung Andreas Juadjur*].

Tab. 6.1: Anthocyanprofil und prozentualer Anteil der Anthocyane im HBE (nach abnehmenden prozentualen Anteilen geordnet).

Anthocyan*	Anteil Anthocyan [%]
Del-3-O-glc	4.68 ± 0.03
Cy-3-O-glc	4.62 ± 0.03
Del-3-O-ara	3.71 ± 0.01
Cy-3-O-gal	2.78 ± 0.01
Del-3-O-gal	2.72 ± 0.07
Pet-3-O-glc	1.86 ± 0.02
Cy-3-O-ara	1.82 ± 0.01
Mal-3-O-glc	1.45 ± 0.02
Pet-3-O-gal	0.97 ± 0.03
Pet-3-O-ara	0.86 ± 0.02
Peo-3-O-glc	0.80 ± 0.01
Mal-3-O-ara	0.59 ± 0.01
Mal-3-O-gal	0.50 ± 0.02
Peo-3-O-gal	0.16 ± 0.01
Peo-3-O-ara	0.09 ± 0.01

\* Abkürzungen: Del-3-O-glc: Delphinidin-3-O-glukosid, Cy-3-O-glc: Cyanidin-3-O-glukosid, Del-3-O-ara: Delphinidin-3-O-arabinsid, Cy-3-O-gal: Cyanidin-3-O-galaktosid, Del-3-O-gal: Delphinidin-3-O-galaktosid, Pet-3-O-glc: Petunidin-3-O-glukosid, Cy-3-O-ara: Cyanidin-3-O-arabinsid, Mal-3-O-glc: Malvidin-3-O-glukosid, Pet-3-O-gal: Petunidin-3-O-galaktosid, Pet-3-O-ara: Petunidin-3-O-arabinsid, Peo-3-O-glc: Peonidin-3-O-glukosid, Mal-3-O-ara: Malvidin-3-O-arabinsid, Mal-3-O-gal: Malvidin-3-O-galaktosid, Peo-3-O-gal: Peonidin-3-O-galaktosid, Peo-3-O-ara: Peonidin-3-O-arabinsid.

## 6.3 Herstellung der unterschiedlichen Kapselsysteme

Im Rahmen des Clusterprojektes „*Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen: Untersuchungen zum Einfluss der Mikrostruktur und der molekularen Zusammensetzung auf die Stabilisierung und kontrollierte Freisetzung von sekundären Pflanzenstoffen und deren Auswirkung auf biologische Signalparameter*“ sollten unterschiedliche Verkapselungstechnologien angewendet bzw. entwickelt werden, die eine Stabilisierung und kontrollierte Freisetzung der Anthocyane eines Heidelbeerextrakts im menschlichen Darm ermöglichen (siehe Kap. 5). Die Herstellungsweise der Kapseln bei den beteiligten Forschungsstellen soll in den weiteren Abschnitten kurz dargestellt und näher erläutert werden.

### 6.3.1 Pektinamidhohlkapseln

Da Alginat und Pektine als Zusatzstoffe für Lebensmittel generell zugelassen sind, wurden ausschließlich diese Substanzen für die Herstellung von Kapselhüllen des Hohlkapseltyps verwendet. Die Synthese dieser Kapseln basiert auf Coulomb'sche Wechselwirkungen zwischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und Pektin/Alginat. An einer Dreifachkapillare, die das Herzstück einer Spinning-Drop-Apparatur darstellte, wurde zunächst ein innerer Tropfen gebildet, der gelösten HBE bei einem pH von 1.5 enthielt. Die mittlere Kapillare diente der Bildung des Pektinattropfens. Die Tropfengröße wurde mit Hilfe des Luftstroms in der äußeren Kapillare geregelt. Sobald der Tropfen in Kontakt mit der Calciumchlorid-Lösung kam, diffundierten die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Pektinatschicht und bewirkten dort eine Vernetzung der einzelnen Pektinmoleküle untereinander (Herstellung siehe Abb. 6.2). Die Dicke der Kapselwand wurde über die Polymerisationszeit (Inkubationszeit in der Calciumchlorid-Lösung) reguliert [Dickinson et al., 1999; Schneeweiss et al., 2005].

#### 6.3.1.1 Kapselherstellung [pers. Mitteilung Sabine Leick, TU Dortmund]

- \* Pektinlösung wurde mittels Spinning-Drop-Apparatur über eine Schlauchpumpe zum Düsenkopf befördert
- \* wässrige HBE Lösung (pH 1.5) wurde über einen Filter mittels Mikrozahnpumpe zum Düsenkopf transportiert
- \* durch Regulation der Einstellungen (Luftstrom, Fließgeschwindigkeit, etc.) der Dreifachdüse wurden gleichmäßige HBE-Pektintröpfchen erzeugt
- \* nach einer Reaktionszeit von ca. 3 min bildeten sich, die Pektinamidhohlkapseln. Die Kapseln bestanden aus einer sehr festen äußeren Hülle und einem gelartigen, weicheren Kern.

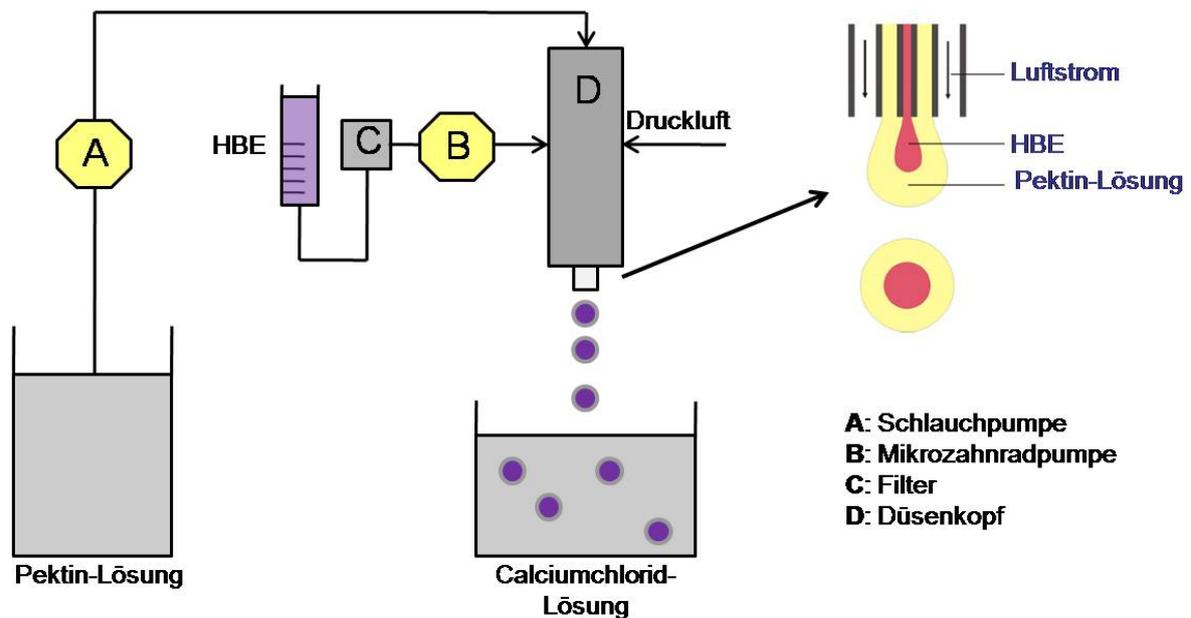


Abb. 6.2: Herstellung der Pektinamidhohlkapseln mittels Spinning-Drop-Apparatur [Abbildung von Sabine Leick zur Verfügung gestellt, TU Dortmund].

Um Diffusionsprozesse der Anthocyane durch das Pektinnetzwerk (Maschen zu groß um Anthocyane zurückzuhalten; möglicher Schutz würde ein zusätzliches Coating bewirken) zu unterbinden, fand die Lagerung und der Transport in einer HBE-Lösung (gleiche HBE Konzentration wie die HBE-beladenen Kapseln) statt. Analog zu den HBE beladenen Pektinamidhohlkapseln, die einen HBE-Anteil von 10% enthielten, wurden unbeladene Referenzkapseln (ohne HBE-Beladung) hergestellt.

### 6.3.2 Molkenproteinkapseln

Molkenproteine ( $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin) werden seit einigen Jahren als Carrier-matrices für die Verkapselung von bioaktiven Komponenten untersucht [Chen *et al.*, 2006; Elzoghby *et al.*, 2011]. Sie besitzen neben ihrer gesundheitlichen Unbedenklichkeit ideale technologische Eigenschaften, wie eine hohe Löslichkeit bei gleichzeitig geringer Viskosität, neutralem Geschmack und guten Emulgierereigenschaften. Dadurch ergibt sich, eine hervorragende Eignung als Hüllmaterial für die Mikroverkapselung aktiver Inhaltsstoffe [Baranauskiene *et al.*, 2006]. Besonders das  $\beta$ -Lactoglobulin bildet nach thermischer Behandlung, auch bei niedrigen pH-Werten, ein stabiles wasserunlösliches Hydrogel. Dieser Vorgang ist nicht reversibel. Diese Gele können aufgrund der pH-Sensitivität eingesetzt werden, um eine kontrollierte Freisetzung biologisch aktiver Substanzen am Wirkort, wie dem Dünndarm, zu ermöglichen [Chen *et al.*, 2006; Gunasekaran *et al.*, 2007].

### 6.3.2.1 Kapselherstellung [pers. Mitteilung Michael Betz, TU München]

- \* wässrige HBE Lösung (pH 1.5) wurde in einer Molkenproteinlösung zu einer Matrixlösung dispergiert
- \* Matrixlösung in Pflanzenöl emulgieren (Wasser-in-Öl-Emulsion - W-Phase: Molkenproteine und HBE, O-Phase: Pflanzenöl)
- \* fein verteilte Matrixlösungströpfchen wurden durch Induktion der Gelbildung (thermische Behandlung, 10 min, 80 °C) in einen festen Gelzustand überführt, wodurch sich gelartige Molkenproteinkapseln bildeten
- \* Abtrennen der Molkenproteinkapseln (20 bis 200 µm) von der Ölphase durch Zentrifugation

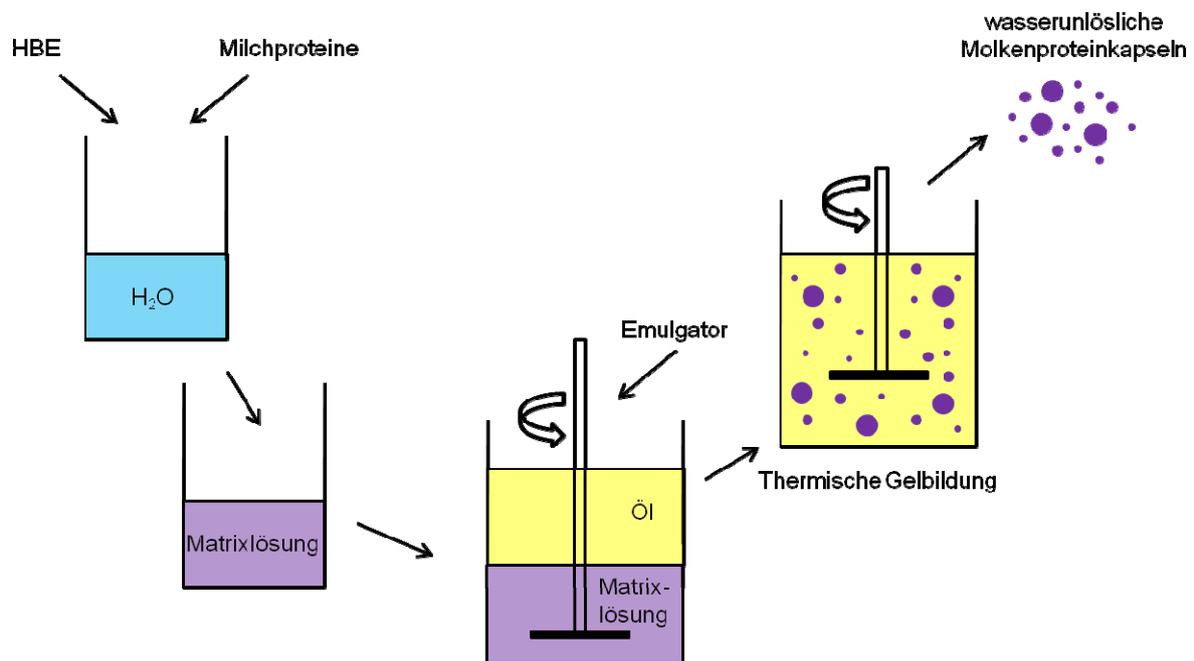


Abb. 6.3: Schematische Darstellung des Verkapselungsprozesses mit Molkenprotein [Abbildung von Michael Betz zur Verfügung gestellt, TU München].

Die Molkenproteinkapseln enthielten bei einem mittleren Durchmesser von 110 µm und 20% Milchprotein (pH 1.5) einen 10%-igen HBE-Anteil. Als Referenzkapseln wurden unbeladene (ohne HBE-Beladung) Kapseln hergestellt. Um eine vorzeitige Diffusion der Anthocyane des verkapselten HBE zu verhindern wurden die Molkenproteinkapseln in Pflanzenöl suspendiert und gelagert.

### 6.3.3 Apfelpektinkapseln

Sprühtrocknung stellt ein weiteres Verfahren zum Einschluss von bioaktiven Inhaltsstoffen in Mikropartikel dar. Hierbei bietet sich die Möglichkeit, einen gelösten HBE mit geeigneten Materialien (Pektine, Maltodextrine) zu homogenisieren und direkt zu versprühen [Bansode et al., 2010; Cai et al., 2000]. Ein großer Vorteil dieser Methode ist die direkte Verwendung von Pflanzenextrakten, was dazu führt, dass in den Endprodukten (wie z.B. für die vorliegende

wissenschaftliche Arbeit) eine sehr hohe Anthocyankonzentration erreicht wird. Die durch Sprühtrocknung gewonnenen Apfelpektinkapseln wurden, in einem weiteren Schritt mit Hydrokolloidlösungen in einer Wirbelschichtanlage mit Schellack (einer zusätzlichen Schutzschicht) überzogen („gecoated“). Dadurch wurde eine Schutzschicht erzeugt, die eine frühzeitige Freisetzung des HBE verhindern sollte. Das pulverförmige Endprodukt besaß eine hohe Lagerstabilität und konnte gut dosiert in alle Lebensmittel zugegeben werden [Gharsallaoui *et al.*, 2007].

### 6.3.3.1 Kapselherstellung [pers. Mitteilung Sonja Berg, Universität Kiel]

- \* wässrige HBE-Lösung (pH 3.0) (mit einem Zusatz von Wandmaterialien) wurde mittels Peristaltikpumpe zur Sprühdüse befördert
- \* durch heiße Druckluft (160 - 180 °C) am Ende der Sprühdüse wurde die HBE-Lösung zerstäubt
- \* die feinen Apfelpektinkapseln sanken im Sprühzylinder ab und wurden teilweise mittels Wirbelschichtcoating in einem nachfolgenden Schritt noch zusätzlich beschichtet

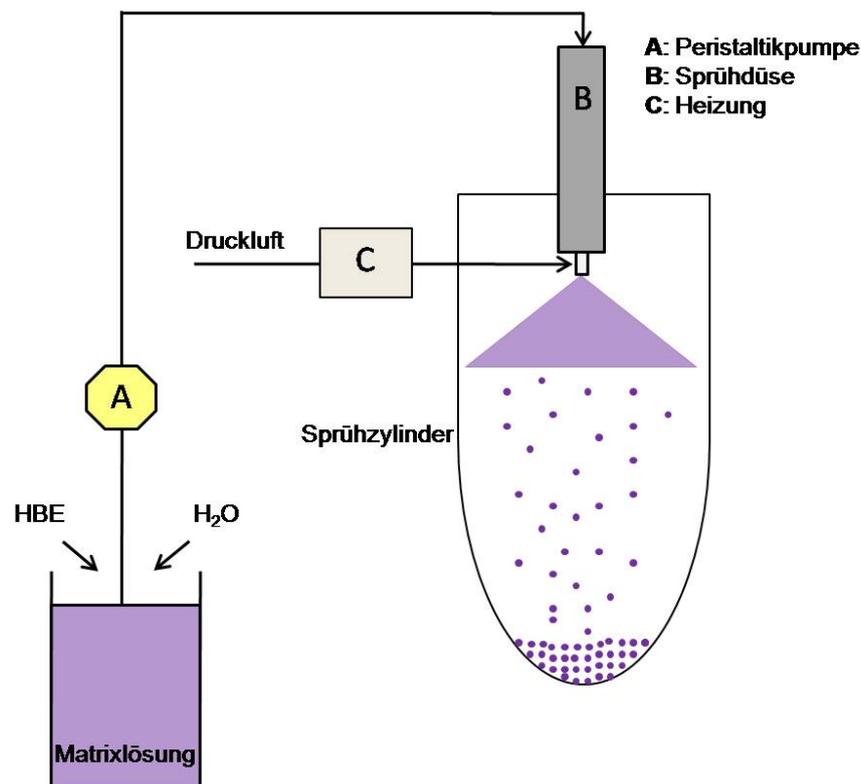


Abb. 6.4: Schematische Darstellung der Herstellung von Apfelpektinkapseln mittels Sprühtrocknung [Abbildung von Sonja Berg zur Verfügung gestellt, Universität Kiel].

### 6.3.4 Multidisperse Hüllkapseln

Eine weitere Möglichkeit der Verkapselung von bioaktiven Inhaltsstoffen sind Emulsionen, bei denen der Wirkstoff in mikrostrukturierte Kompartimente (Tropfen) eingebracht wird.

Diese unterschiedlichen Kompartimente bieten die Möglichkeit, gezielte Milieubedingungen zu schaffen, mehrere Diffusionsbarrieren zu erzeugen, und so die Freisetzung bzw. Stabilität von Wirkstoffen zu beeinflussen. Die einzelnen Hüllen werden von Emulgatormolekülen gebildet, die zur Stabilisierung der Tropfen dienen. Aufgrund von netzwerkartigen Strukturen und sehr starken Wechselwirkungen zwischen grenzflächenaktiven Molekülen bilden sich dünne Schutzfilme aus, die eine gezielte Beeinflussung der Tropfen im Hinblick auf Stabilität und Freisetzung ermöglichen [Ax *et al.*, 2003; Sliwka, 1975]. Um die Tropfengrößenverteilung bei der Herstellung steuern zu können, müssen Materialparameter (Viskosität) und Prozessparameter (Emulgiersystem, Leistungseintrag, Verweilzeit) optimiert werden [Schuchmann *et al.*, 2004]. Ein Vorteil der Emulsionen ist, dass ein dosiertes Einbringen in fast alle Lebensmittel möglich ist. Für die Verkapselung des HBE wurden hydrophile Kapselmaterialien benötigt. Hierfür eignen sich am besten multiple Emulsionen ( $W_1/O/W_2$ ), die besonders gut in flüssige Lebensmittel eingebracht werden können [Frank *et al.*, 2010; Muschiolik, 2007].

#### 6.3.4.1 Kapselherstellung [pers. Mitteilung Kerstin Frank, Universität Karlsruhe]

- \* Emulgieren einer wässrigen HBE-Lösung (pH 3.0) in Pflanzenöl
- \* Ausbildung kleiner Wassertropfen im Öl (Wasser-in-Öl-Emulsion;  $W_1/O$ -Emulsion)
- \* Einbringen der  $W_1/O$ -Emulsion in eine zweite Wasserphase ( $W_2$ )
- \* Erneutes Emulgieren und Ausbildung beladener multidisperser Hüllkapseln in Doppalemulsion ( $W_1/O/W_2$ -Emulsion)

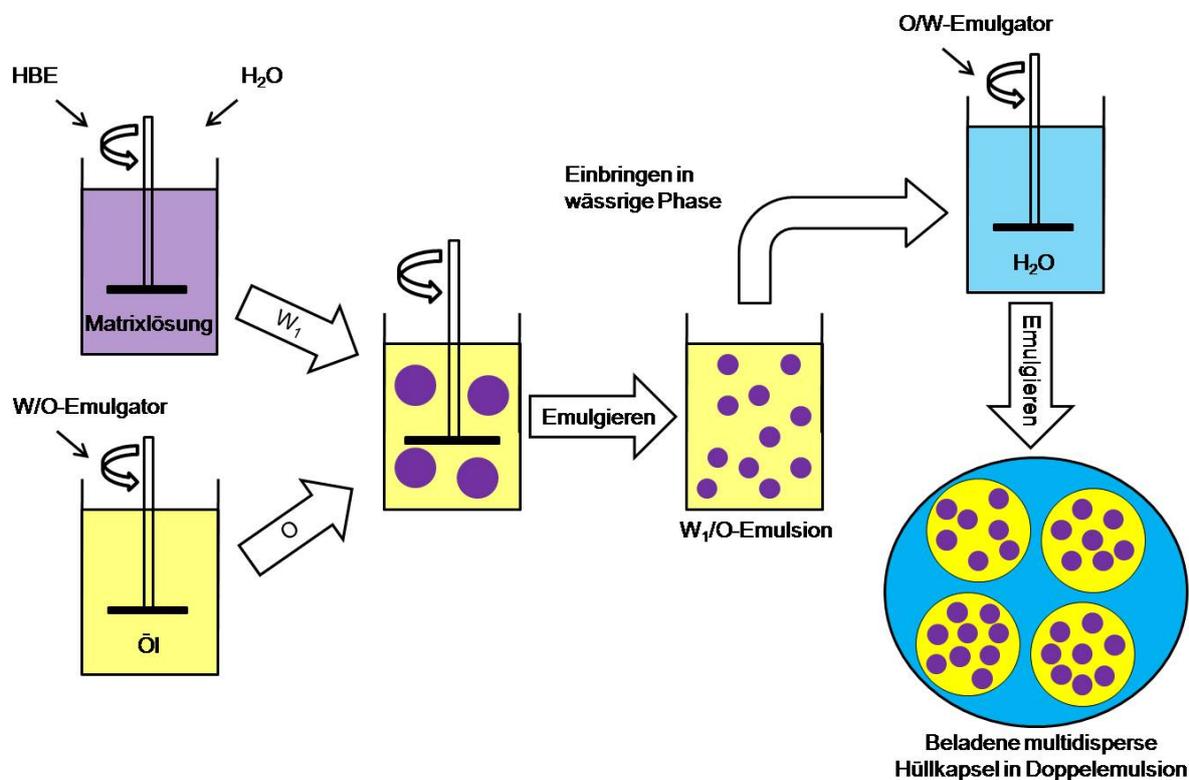


Abb. 6.5: Schematische Darstellung der Herstellung beladener multidisperser Hüllkapseln [Abbildung von Kerstin Frank zur Verfügung gestellt, Universität Karlsruhe].

### 6.3.5 Überblick über die verwendeten Kapselsysteme

Im Rahmen der durchgeführten Arbeit wurden zahlreiche Verkapselungsmethoden, zur Herstellung von HBE-beladenen Kapseln, verwendet. Zur Verdeutlichung wurden sowohl mikroskopische Aufnahmen als auch schematische Darstellungen der unterschiedlichen Kapseln in Abb. 6.6 abgebildet.

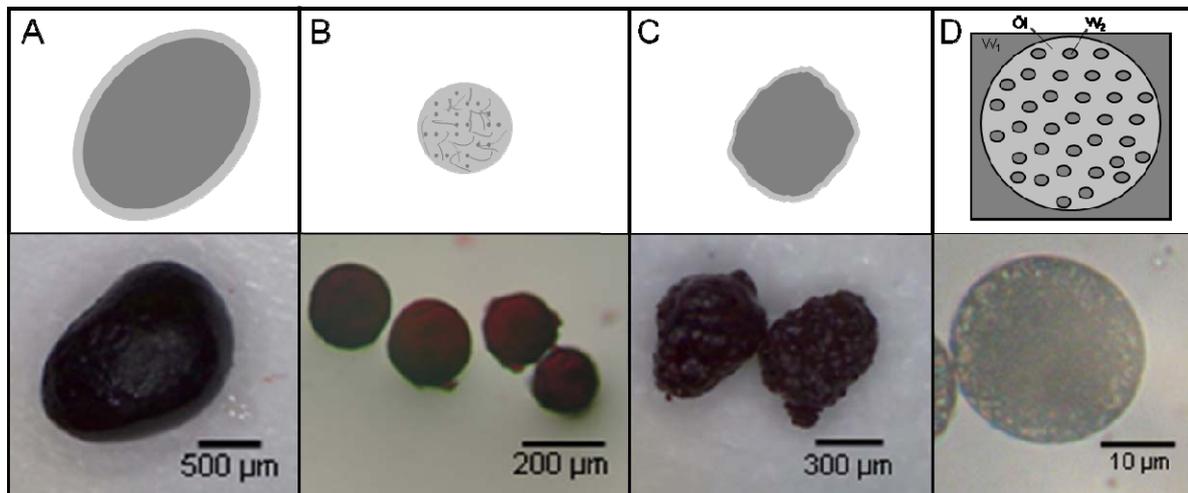


Abb. 6.6: Schematische Darstellung und mikroskopische Aufnahmen sowie Größenangaben der untersuchten HBE-beladenen Kapselsysteme; A: Pektinamidhohlkapsel, B: Molkenproteinkapsel, C: Apfelpektinkapsel (mit Schellack ummantelt), D: multidisperse Hüllkapsel [zur Verfügung gestellt von Johannes Oidtmann, Universität Halle].

Die Spezifikationen der unterschiedlichen Kapselsysteme sind in Tab. 6.2 noch einmal übersichtlich zusammengefasst.

Tab. 6.2: Zusammenfassung der Eigenschaften der von den Projektpartnern (TP 2, 3, 4 und 5) zur Verfügung gestellten HBE-beladenen Kapselsysteme.

Kapselsystem	Typ	Wandmaterialien	HBE [%]	Größe [ $\mu\text{m}$ ]	pH Wert
Pektinamid– hohlkapsel	Hüllkapsel	Pektinamid <sup>a</sup> , CaCl <sub>2</sub> , Glycerin	10 (w/w)	1500	1 - 3
Molkenprotein– kapsel	Matrix	Molkenproteinisolat	10 (w/w)	180	1.5
Apfelpektin– kapsel	Matrix	Pektinamid <sup>b</sup> , Zitronensäure, Maltodextrin, (teilweise mit Schellack)	20 (w/w)	250 - 500	2
multidisperse Hüllkapsel	W <sub>1</sub> /O/W <sub>2</sub> Doppel– emulsion	Pektinamid <sup>c</sup> , Pflanzenöl, PGPR 90 <sup>+</sup> , Molkenproteinisolat	0.12 (w/w)	25	3.5

<sup>a</sup> Veresterungsgrad: 31.9%, Amidierungsgrad: 21.1%

<sup>b</sup> Veresterungsgrad: 29.0%, Amidierungsgrad: 21.0%

<sup>c</sup> Veresterungsgrad: 23-27%, Amidierungsgrad: 23-25%

### 6.3.6 Bestimmung der Anthocyankonzentrationen in den unterschiedlichen HBE-beladenen Kapselsystemen

Bestimmungsmethoden zur Ermittlung des Anthocyangehalts der HBE-beladenen Kapselsysteme wurde für jedes System individuell etabliert. Dies war notwendig, um die Anthocyankonzentrationen während der Kapselherstellung und Lagerung zu untersuchen.

Die Molkenprotein-, Pektinamid- und Apfelpektinkapseln wurden wie in Abb. 6.7 dargestellt eingewogen, Extraktionsmittel (entspricht Fließmittel A, siehe Kap. 6.8) zugegeben, aufgeschlossen (Ultra Turrax), zentrifugiert, filtriert und mittels HPLC-UV/VIS die Anthocyankonzentration bestimmt. Einzige Ausnahme bildete die Bestimmung der Konzentration in multidispersen Hüllkapseln, die durch mechanischen Aufschluss nicht zerstört und in denen kein HBE-Anteil bestimmt werden konnte. Es wurden mehrere

unterschiedliche Extraktions- und Isolierungsmethoden durchgeführt, aber keine lieferte das gewünschte Ergebnis einer reproduzierbaren und vollständigen Konzentrationsbestimmung. Aus diesem Grund wurde die Konzentrationsangabe von 0.12 Gew.-% HBE vom Projektpartner (TP 4, AG Schuchmann) übernommen [pers. Mitteilung Kerstin Frank].

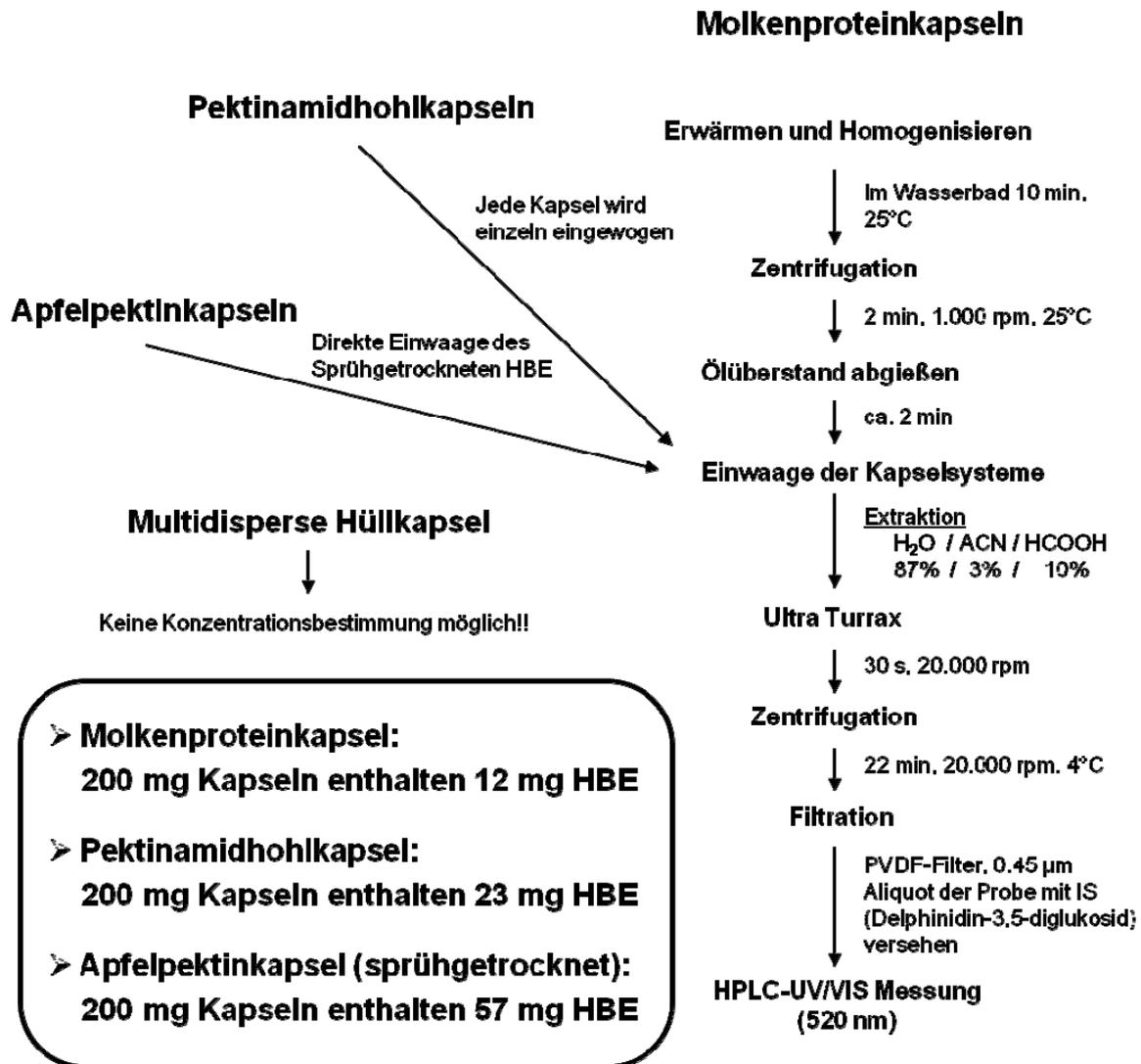


Abb. 6.7: Aufbereitung der unterschiedlichen Kapselsysteme für die Bestimmung der Anthocyan-gehalte. HBE: Heidelbeerextrakt.

## 6.4 Zellkultivierung

Um an Zellen über eine längere Zeitperiode mit konstant bleibenden Eigenschaften forschen zu können, bedient man sich Zelllinien, die eine hohe Proliferationsrate besitzen. Zusätzlich ist wichtig, dass Zelllinien über einen längeren Zeitraum tiefgefroren werden können ohne dass ihre Vitalität davon beeinflusst wird. Meist wurden solche Zellen aus Tumoren oder durch Virusinfektionen immortalisiert und isoliert [Klinke *et al.*, 1996].

Zelllinien eignen sich gut, um bestimmte Fragestellungen zu klären und Erkenntnisse der Zellfunktionen zu gewinnen. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse muss jedoch geprüft werden, da die Gesamtheit der Eigenschaften von Zelllinien voneinander abweichen können [Klinke *et al.*, 1996].

Alle Arbeitsschritte im Zusammenhang mit der Zellkultivierung wurden unter einer Reinraumwerkbank durchgeführt, da eine sterile Arbeitsweise unbedingt erforderlich war.

### 6.4.1 Verwendete Zelllinien

#### 6.4.1.1 HT-29 Zellen

Bei der HT-29 Zelllinie handelt es sich um eine humane Zelllinie eines Kolonadenomakarzinom, die im Jahre 1964 aus einem Kolonkarzinom einer 44 Jahre alten, kaukasischen Frau isoliert und etabliert wurde [DSMZ, 2004]. Es ist eine adhärent wachsende Zelllinie mit einer Verdopplungszeit von 40 bis 60 h. Werden die Zellen unter Standardbedingungen kultiviert, so formen sie einen Multilayer undifferenzierter Zellen, welcher sich durch einen hohen Glukoseverbrauch auszeichnet [Cohen *et al.*, 1999]. Durch Veränderungen des Kulturmediums kann ein Ausdifferenzieren der Zellen und die Bildung eines Bürstensaums erreicht werden. Aus diesem Grund eignen sich HT-29 Zellen ebenfalls zur Aufklärung molekularer Mechanismen des Darms und deren Modulation [Chantret *et al.*, 1988; Rousset, 1986].

#### 6.4.1.2 Caco-2 Zellen

Ursprung der Caco-2 Zelllinie ist ein Kolonadenomakarzinom eines 72-jährigen kaukasischen Mannes im Jahre 1974. Bei Caco-2 Zellen handelt es sich um eine adhärent wachsende Zelllinie mit einer Verdopplungszeit von ca. 80 h [DSMZ, 2004]. Eine Besonderheit der Zelllinie beruht darauf, dass sich nach 2 - 3 Wochen ein ausdifferenzierter Monolayer polarisierter Zellen ausbildet, welcher typische Charakteristika der humanen Darmmukosa aufweist. Sie exprimieren typische intestinale Transporter (SGLT und GLUT) und verschiedene fremdstoffmetabolisierende Enzyme (Cytochrom P450 Isoformen, Glutathion-S-Transferasen) [Meunier *et al.*, 1995]. Aufgrund dieser Eigenschaften stellen die Caco-2 Zellen ein geeignetes *in vitro* Modell für Untersuchungen des intestinalen Transports und Metabolismus dar [Sambruy *et al.*, 2001]. Im Vergleich zu HT-29 Zellen, zeigen Caco-2 Zellen eine fehlende Aktivität des Enzyms NQO1 (NAD(P)H-abhängige Chinon-

Oxidoreduktase) was zur Folge hat, dass sie eine stärkere Empfindlichkeit gegenüber Menadion-induziertem oxidativem Stress aufweisen [Karczewski et al., 1999].

## 6.4.2 Kultivierung der Caco-2/ HT-29 Zellen

Zelllinien, wie die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Caco-2/ HT-29 Zellen, die als Monolayerkulturen in Petrischalen, Mikrotiterplatten oder Kulturflaschen wachsen, benötigen zu ihrem Wachstum und zur Vitalitätserhaltung regelmäßigen Mediumwechsel, da bestimmte Bestandteile des Kulturmediums einschließlich aller Zusätze entweder verstoffwechselt werden oder bei 37 °C im Laufe der Zeit zerfallen. In Abhängigkeit von Metabolismus und Wachstumsgeschwindigkeit variieren die Intervalle der Subkultivierung und Mediumerneuerung [Lindl, 2002].

Die Kultivierung von Caco-2/ HT-29 Zellen erfolgte in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in einem Brutschrank bei 37 °C, 95% relativer Feuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>-Sättigung. Die unterschiedlichen Zusammensetzungen der verwendeten Zellkulturmedien für Caco-2/ HT-29 Zellen sind in Tab. 6.3 aufgeführt.

Tab. 6.3: Verwendete Medien bei der Zellkultivierung nach [DSMZ, 2004].

Zelllinie	Nährmedium (N-Med)	Inkubationsmedium (I-Med)	Serumfreies Medium (S-Med)
<b>Caco-2</b>	500 ml DMEM/F12 + 100 ml FKS + 5 ml Pen/Strep	500 ml DMEM/F12 + 50 ml FKS + 5 ml Pen/Strep	500 ml DMEM/F12 + 5 ml Pen/Strep
<b>HT-29</b>	500 ml DMEM + 50 ml FKS + 5 ml Pen/Strep	500 ml DMEM + 25 ml FKS + 5 ml Pen/Strep	500 ml DMEM + 5 ml Pen/Strep

Abkürzungen: DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium, FKS: Fötale Kälberserum, Pen/Strep: Penicillin/Streptomycin.

### 6.4.2.1 Mediumwechsel

Da Nährstoffe des Mediums im Laufe der Zeit von den Zellen metabolisiert werden, war es notwendig in regelmäßigen Abständen einen Mediumwechsel (alle 2 bis 3 Tage) durchzuführen. Erkennbar wurde dieser Nährstoffverbrauch durch den Farbumschlag des im Mediums enthaltenen Indikator (Phenolrot) von rot nach hellrot bis gelb. Dieser Farbwechsel erfolgt durch die gebildeten Stoffwechselprodukte und die dadurch hervorgerufene Erniedrigung des pH-Wertes. Befanden sich die Zellen in einer subkonfluenten Wachstumsphase, so wurde das verbrauchte Medium mittels einer Pasteurpipette abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und durch ca. 40 ml frisches N-Med ersetzt [Lindl, 2002].

### **6.4.2.2 Passagieren (Subkultivierung) von Zellen**

Um eine Kontaktinhibition und ein damit verbundenes Absterben der Monolayerkultur zu vermeiden, wurde im wöchentlichen Rhythmus bei ca. 80% Konfluenz eine Verringerung der Zellzahl durch Passagieren (Subkultivierung) vorgenommen.

#### Durchführung

- \* Abnehmen des vorhandenen Mediums mittels steriler Pasteurpipette
- \* Waschen der Zellen mit 10 ml PBS
- \* Zugabe von 6 ml Trypsin-EDTA (0.5%)
- \* Inkubation für 5 - 10 min im Brutschrank bei 37 °C  
(Vorsicht: Bei längeren Einwirkzeiten ist eine irreversible Schädigung der Zellen möglich)
- \* Ablösen der Zellen vom Boden durch leichtes Klopfen am Flaschenrand
- \* Abstoppen der „Trypsinierung“ durch Zugabe von 14 ml N-Med
- \* Vereinzeln der Zellen durch mehrmaliges resuspendieren

Eine definierte Menge an Zellsuspension wurde mit 40 ml frischen N-Med versetzt und weiterkultiviert. Nach dreimaligem Passagieren wurden die Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Grundsätzlich ist zu beachten, dass die Zellen bei fortschreitender Kultivierung ihre physiologischen Eigenschaften verändern können [Arturssona *et al.*, 1996]. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit die Zellen nur maximal 40x passagiert.

### **6.4.2.3 Einfrieren und Lagerung von Zellen**

Zur Vorratshaltung von Zellen können diese über längere Zeit in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert werden. Eine Lagerung bei -80 °C kann ebenfalls durchgeführt werden, wobei die Zellen aufgrund ihrer begrenzten Lebenszeit in regelmäßigen Abständen in Kultur gebracht werden müssen [Lindl, 2002].

#### Durchführung

- \* Nach dem Vereinzeln der Zellen (siehe Passagieren von Zellen) wurden Kryoröhrchen wie folgt befüllt:
  - 150 µl FKS
  - 150 µl DMSO (verhindert die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle)
  - ca. 1.200 µl Zellsuspension (mind. 1 Mio. Zellen)
- \* Sofortiges Einfrieren der Kryos für 24 h bei -20 °C
- \* Einlagerung zur Vorratshaltung am folgenden Tag bei -80 °C oder in flüssigem Stickstoff

#### **6.4.2.4 Auftauen von Zellen**

Um beim Prozess des Auftauens eine schädliche Wirkung des zugesetzten DMSO zu vermeiden, war es wichtig die Zellen schnell aufzutauen.

##### Durchführung

- \* Tiefgefrorener Zellstock im Wasserbad bei 37 °C auftauen
- \* Überführen der Zellsuspension in 10 ml vorgewärmtes N-Med
- \* Zentrifugation: 2.000 rpm, 2 min, RT
- \* Verwerfen des Überstands und resuspendieren des Zellpellets in 2 bis 3 ml N-Med
- \* Aussäen in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche und Zugabe von 7 ml N-Med

Nach 2 Tagen Ruhe erfolgte der erste Mediumwechsel um abgestorbene oder geschädigte Zellen zu entfernen. Kultiviert wurde bis zum Erreichen der Maximaldichte der Zellen (100% Konfluenz).

##### Reagenzien und Lösungen

###### PBS-Stammlösung (10x)

- 100 g NaCl
- 14 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 2.5 g KCl
- 2.5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 1 l auffüllen

pH-Wert auf 7.4 einstellen

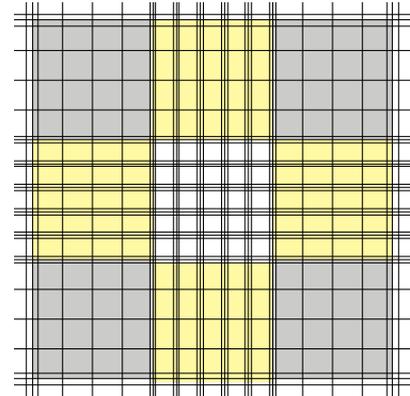
Lagerung bei 4 °C

###### PBS-Gebrauchslösung

- PBS-Stammlösung mit H<sub>2</sub>O bidest. 1:10 verdünnen
- Autoklavieren bei 121 °C für 20 min
- Lagerung bei 4 °C

### 6.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer (Hämocytometer) verwendet. Die Kammer bestand aus neun großen Quadraten, wobei jedes Quadrat eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> und eine Tiefe von 0.1 mm aufweist, woraus sich ein Volumen von 0.1 µl ergibt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert und die Zellen in den vier grau eingefärbten Eckquadraten mit Hilfe eines Mikroskops ausgezählt. Für die Berechnung der Zellzahl wurde der Mittelwert aus den ausgezählten Zellen der vier Eckquadrate mit 10<sup>4</sup> multipliziert [Lindl, 2002].



#### 6.4.3.1 Bestimmung der Zellvitalität (Trypanblau Test)

Um die Vitalität von Zellen zu untersuchen, wurde die Trypanblaufärbung gewählt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der in lebende Zellen nicht eindringen kann, während sich das Zytoplasma von toten Zellen anfärbt [Farah et al., 2008]. Lebende Zellen erscheinen weiß, tote blau [Lindl, 2002].

#### Durchführung

- \* Passagierte Zellen (siehe Passagieren), 30 µl Zellsuspension, wurde mit 30 µl Trypanblau Lösung resuspendiert
- \* Angefärbte Zellen wurden auf die Zählkammer (unter das Deckglas) aufgebracht
- \* Bestimmung der Anzahl lebender (weißer) und toter (blauer) Zellen
- \* Berechnung mittels folgender Formel:

$$\text{Vitalität \%} = \frac{\text{lebende Zellen}}{\text{lebende Zellen} + \text{tote Zellen}} \times 100$$

### 6.4.4 Testung auf Mykoplasmen

Mykoplasmen sind mit einem Durchmesser von 0.3 bis 0.8 µm die kleinsten und einfachsten Prokaryonten. Aufgrund ihrer geringen Größe sind sie in der Lage, Sterilfilter zu passieren und so in die Zellkultur zu gelangen. Durch eine Kontamination mit Mykoplasmen wird der Stoffwechsel der Zellen verändert, dass Versuchsergebnisse beeinträchtigt werden könnten. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Zellkultur regelmäßig auf Mykoplasmenkontamination zu untersuchen [Rottem et al., 1993].

### Durchführung

- \* Passagierte Zellen (siehe Passagieren; 200 µl Zellsuspension) wurden auf einen sterilen Objektträger, der in einer Petrischale lag und mit 9 ml N-Med gefüllt war, ausgestreut
- \* Inkubation für 24 h im Brutschrank bei 37 °C
- \* Absaugen des Mediums und Fixierung mit eiskaltem Methanol für 30 min bei -20 °C
- \* Anfärben der Zellen mit 40 µl DAPI/Sulforhodamin 101-Lösung

Der Nachweis von Mykoplasmen erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie bei einer Anregung von 365 nm. Dabei erschienen Zytoplasma rot. Zellkern und die DNA sind blau gefärbt. Aufgrund des hohen DNA-Anteils erschienen Mykoplasmen als dunkelblaue Punkte in oder auf der Zelle [Lindl, 2002].

Alle *in vitro* Versuche dieser Dissertation wurden mit mykoplasmenfreien Zellen durchgeführt.

### 6.4.5 Aussäen von Zellen

Für die unterschiedlichen Testsysteme wurde eine definierte Anzahl an Zellen (siehe Tab. 6.4) in die entsprechenden Gefäße ausgestreut und für 24 h im Brutschrank bei 37 °C kultiviert.

Tab. 6.4: Bedingungen zur Durchführung der einzelnen *in vitro* Testsysteme.

Versuch	Gefäß	Zellzahl (pro Well)		Medium
		HT-29	Caco-2	
<i>Alamar Blue Assay</i>	48 Well-Platte	60.000	55.000	500 µl
<i>DCF Assay</i>	96 Well-Platte	40.000 (1 h)* 32.000 (24 h)*	20.000	100 µl
<i>GSH Bestimmung</i>	Petrischale Ø 6 cm	1 Mio (24 h)* 1.5 Mio (1 h)*		6 ml
	Petrischale Ø 9 cm		1 Mio (24 h)* 1.4 Mio (1 h)*	9 ml
<i>Comet Assay</i>	Petrischale Ø 6 cm	1 Mio (24 h)* 1.5 Mio (1 h)*		6 ml
	Petrischale Ø 9 cm		1 Mio. (24 h)* 1.4 Mio (1 h)*	9 ml

\* Inkubationszeit mit den zu untersuchenden Substanzen

### 6.4.6 Substanzinkubation und Zellernte

Der HBE bzw. die zu untersuchenden HBE-beladenen Kapselsysteme wurden in I-Med gelöst und entsprechend der gewünschten Konzentrationen weiter verdünnt. Um eine gleichbleibende Menge an Kapselmaterial in den Inkubationsansätzen zu gewährleisten wurden Kapseln sowohl mit HBE-Beladung als auch ohne HBE-Beladung in einer definierten Menge homogenisiert. Somit war es möglich durch die Variation der Kapseln (mit bzw. ohne HBE-Beladung) die gewünschten HBE Konzentrationen herzustellen und gleichzeitig die Menge an Kapseln (Sediment) in den Inkubationsansätzen konstant zu halten. Mögliche Matrixeffekte der Kapselmaterialien auf die Zellen konnten dadurch ausgeschlossen werden (siehe Tab. 6.5). Die eingesetzte Menge an HBE-beladenen Kapseln entsprach genau der Menge, die an HBE verwendet wurde. Errechnet wurde diese Menge anhand der ermittelten HBE Konzentrationen in den unterschiedlichen Kapselsystemen (siehe Kap. 6.3.6). Zur Inkubation wurde das Medium (N-Med) aus den Inkubationsgefäßen abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Substanzinkubation mit den Testsubstanzen im Brutschrank über 1 h (Kurzzeitinkubation) bzw. 24 h (Langzeitinkubation). Des Weiteren wurde dem I-Med Katalase zugesetzt, um einer möglichen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Akkumulation zu reduzieren (siehe Kap. 2.11.5).

Um Reste der Testsubstanzen nach erfolgter Inkubation aus den Inkubationsgefäßen zu entfernen, wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Oxidantien bzw. Farbstoffe (je nach Testsystem unterschiedlich siehe Kap. 6.5) wurden in S-Med gelöst zugegeben und im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und die Zellen mit 0.5 ml Trypsin-EDTA Lösung vom Boden der Petrischalen abgelöst. Zum Abstoppen der „Trypsinierung“ wurde 1 ml N-Med zugegeben und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Die so erhaltene Zellsuspension wurde mit einer Pipette resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

Tab. 6.5: Eingesetzte HBE-Konzentrationen der unterschiedlichen Kapselsysteme (mit und ohne HBE-Beladung).

Kapselsystem	HBE <sup>+</sup> [µg/ml]	Kapsel mit HBE [mg/ml]	Kapsel ohne HBE [mg/ml]	Sediment [mg/ml]
Pektinamidhohlkapseln	500	4.30	-	4.30
	250	2.15	2.15	4.30
	100	0.86	3.44	4.30
	50	0.43	3.87	4.30
	10	0.09	4.21	4.30
	0	-	4.30	4.30
Molkenproteinkapseln	500	8.30	-	8.30
	250	4.15	4.15	8.30
	100	1.70	6.60	8.30
	50	0.83	7.47	8.30
	10	0.17	8.13	8.30
	0	-	8.30	8.30
multidisperse Hüllkapseln <sup>#</sup>	500	417.00	-	417.00
	250	208.50	208.50	417.00
	100	83.40	333.60	417.00
	50	41.70	375.30	417.00
	10	8.34	408.66	417.00
	0	-	417.00	417.00
Apfelpektinkapseln <sup>*</sup>	500	1.75	-	1.75
	250	0.88	-	0.88
	100	0.35	-	0.35
	50	0.18	-	0.18
	10	0.04	-	0.04
	0	-	-	-

<sup>#</sup> Die verkapselte HBE Konzentration wurde von der Forschungsstelle Karlsruhe mit 0.12 Gew.-% angegeben (siehe Kap. 6.3.6)

<sup>\*</sup> Apfelpektinkapseln ohne HBE-Beladung wurden von der Forschungsstelle Kiel nicht zur Verfügung gestellt.

<sup>+</sup> entsprechende HBE Konzentrationen

## 6.5 Verwendete *in vitro*-Testsysteme

Im folgenden Abschnitt werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *in vitro* Testsysteme vorgestellt und deren Durchführung erläutert.

### 6.5.1 Alamar Blue Assay

Der Alamar Blue Assay ist ein Farbreaktionstest, der auf dem Redoxstatus der Zelle beruht. Die Reduktion von Resazurin zu Resorufin steht gemäß Literatur in direktem Verhältnis zu metabolischen Intermediaten wie NADPH, NADH, FADH und FMNH die in proliferierenden Zellen im Gegensatz zu nicht proliferierenden Zellen erhöht sind [O'Brien *et al.*, 2000]. Durch

diese Intermediate kommt es zu einer Reduktion von Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin (siehe Abb. 6.8). Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm vermessen [O'Brien et al., 2000].

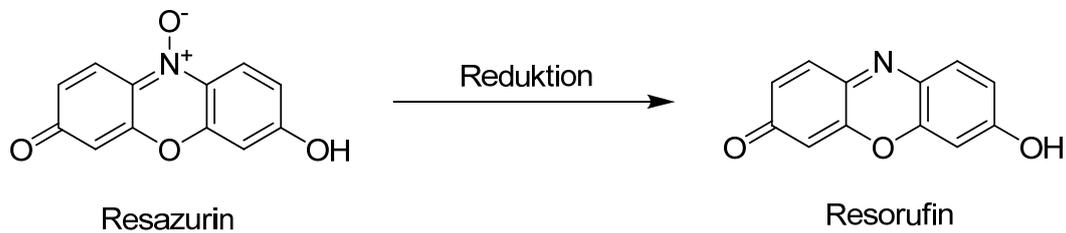


Abb. 6.8: Reduktionsreaktion von Resazurin zu Resorufin zur Bestimmung metabolischer Intermediate wie NADPH, FADH in vitalen Zellen [O'Brien et al., 2000].

### Durchführung

#### **Inkubation der Zellen**

- \* HT-29 und Caco-2 Zellen wurden wie in Kapitel 3.2.4 erläutert in 48 Well-Platten ausgestreut und kultiviert
- \* nach 24 h Kultivierung wurden die Zellen mit 0.5 ml PBS gewaschen
- \* die Substanzinkubation (1 h bzw. 24 h) erfolgte pro Well in 0.5 ml I-Med
- \* als Positivkontrolle für zytotoxische Wirkung diente eine Behandlung mit 0.1%iger Saponinlösung, als Negativkontrolle wurde I-Med eingesetzt
- \* nach der Inkubation (siehe Kap. 3.2.5) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 300  $\mu$ l PBS gewaschen
- \* 500  $\mu$ l frisch hergestellte Resazurin-Inkubationslösung (Resazurin-Arbeitslösung 1:10 verdünnt mit S-Med) wurde pro Well auf die Zellen gegeben
- \* nach 1 h Inkubation im Brutschrank wurde die 48 Well-Platte am Plattenlesegerät bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm vermessen

### Reagenzien und Lösungen

#### Resazurin-Stammlösung

- 110.5 mg Resazurin in 1 ml Dimethylformamid lösen
- Lagerung bei 4 °C

#### Resazurin-Arbeitslösung

- 100  $\mu$ l Resazurin-Stammlösung
- 14.4 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 900 mg NaCl
- 52.8 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- Mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. auf 100 ml auffüllen
- Lagerung bei 4 °C

## 6.5.2 Bestimmung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies ROS (DCF Assay)

Der Dichlorfluorescein (DCF) Assay ermöglicht die Detektion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die bei oxidativem Stress in der Zelle gebildet werden. Er beruht auf einem relativen Fluoreszenzanstieg durch Oxidation des Fluoreszenzfarbstoffs Dichlorfluorescein-Diacetat (DCFH-DA) zu Dichlorfluorescein (DCF; siehe Abb. 6.9) [Wang *et al.*, 1999].

Erstmals verwendet wurde diese Methode zur Bestimmung von Wasserstoffperoxid [Keston *et al.*, 1965]. Im Laufe der Jahre wurde die Methode weiter optimiert und wird seitdem zur Detektion intrazellulärer ROS angewandt [Wang *et al.*, 1999]. Auch wenn die Spezifität des Assays nicht geklärt ist, stellt dieses Testsystem eine Screening-Methode dar, die in Verbindung mit anderen Markern eine Aussage über das Ausmaß oxidativer Zellschädigung und deren Modulation durch Antioxidantien zulässt [Frank *et al.*, 2000].

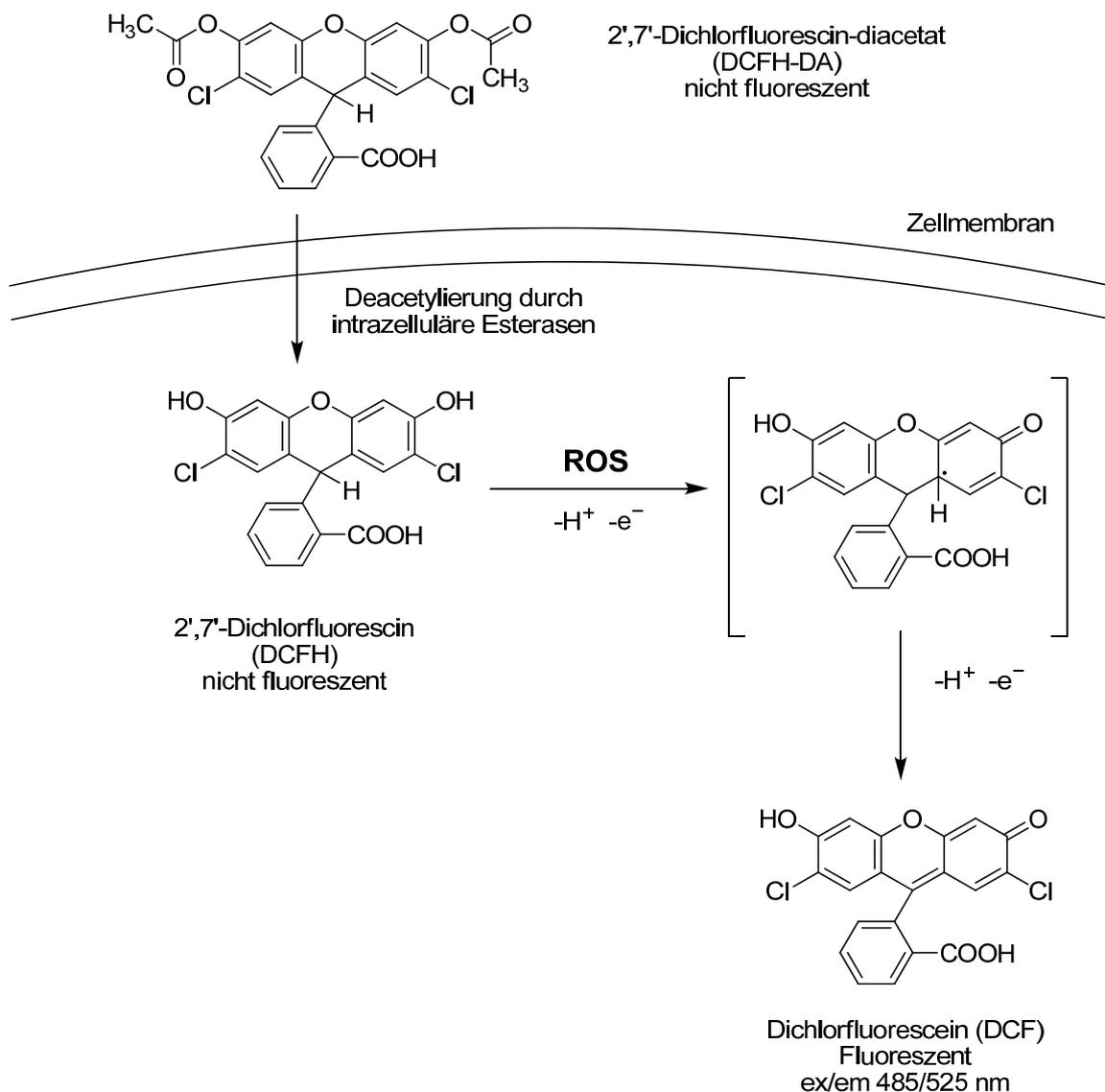


Abb. 6.9: Mechanismus der Reaktion von DCFH-DA zum fluoreszierenden DCF [LeBel *et al.*, 1992].

Da die geringe Spezifität der Methode seit einiger Zeit diskutiert wird und einige ROS identifiziert wurden, die in der Lage sind DCFH zu oxidieren, kann dieser Assay nur herangezogen werden um eine Aussage über das Ausmaß an oxidativem Stress in der Zelle zu erfassen. Es ist nicht möglich, die ROS näher zu spezifizieren [Crow, 1997; LeBel et al., 1992; Wang et al., 1999]. In der vorliegenden Arbeit wurde der DCF Assay (modifiziert) angewandt, um eine Abnahme (Prävention) von TBH-induzierten ROS in den Zellsystemen zu detektieren.

Dichlorfluorescein-Diacetat (DCFH-DA) ist eine lipophile, nicht fluoreszierende Substanz, die durch die Zellmembran in die Zelle diffundieren kann. Dort findet durch intrazelluläre Esterasen eine Deacetylierung zu dem nicht fluoreszierenden Dichlorfluorescein (DCFH) statt. Aufgrund seiner höheren Polarität kann der Farbstoff nicht zurückdiffundieren und verbleibt in der Zelle. In Gegenwart von zellulären ROS wird das DCFH schnell zu dem stark fluoreszierenden Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert. Der Farbstoff wird bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die emittierte Fluoreszenz bei 525 nm gemessen.

### Durchführung

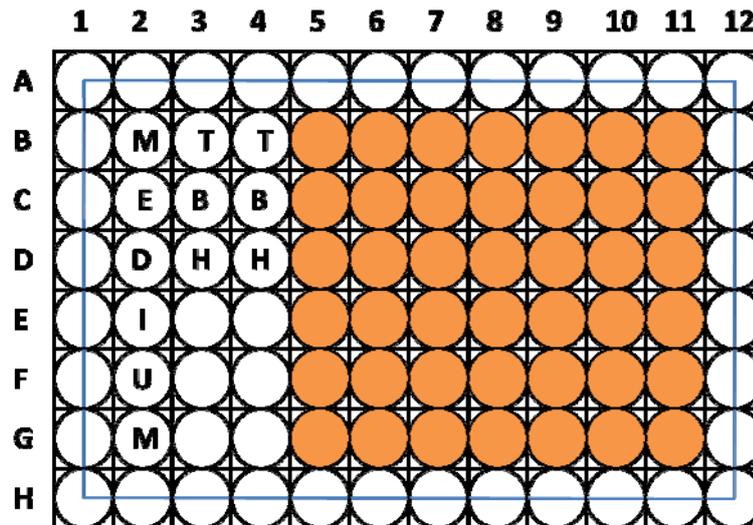
#### **Inkubation der Zellen**

- \* HT-29 und Caco-2 Zellen wurden wie in Kapitel 3.2.4 erläutert in schwarzen 96 Well-Platten mit klarem Boden ausgestreut und kultiviert
- \* nach 24 h Kultivierung wurden die Zellen mit 100 µl warmem PBS gewaschen und die äußeren Wells mit 100 µl PBS gefüllt
- \* die Substanzinkubation erfolgte pro Well in 100 µl I-Med
- \* nach der Inkubation (siehe Kap. 3.2.5) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 100 µl PBS gewaschen

Alle weiteren Arbeiten erfolgten aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Farbstoffes im Dunkeln.

#### **Arbeiten bei Rotlicht**

- \* 100 µl frisch hergestellte DCFH-DA Inkubationslösung (Endkonzentration 50 µM) gelöst in PBS (pH 7.0) wurde pro Well auf die Zellen gegeben
- \* nach 30 min Inkubation wurde die DCFH-DA Inkubationslösung abgesaugt und die Zellen mit 100 µl PBS (pH 7.4) gewaschen
- \* danach wurden 100 µl TBH Lösung pro Well zugegeben
- \* die 96 Well-Platte wurde danach sofort in das Plattenlesegerät gestellt und die erste Messung (t = 0 min) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm durchgeführt
- \* weitere Messzeitpunkte der Reaktionskinetik sind 10, 20, 30 und 40 min



blaue Linie: äußeren Wells sind mit PBS gefüllt

Medium: Mediumkontrolle

TBH: Positivkontrolle (ohne Substanzbehandlung)

orange: Substanzbehandlung im Medium mit anschließender TBH-Behandlung

### Messparameter

- Messmodus: Fluoreszenz
- Temperatur: 37 °C
- Anregungswellenlänge: 485 nm
- Emissionswellenlänge: 525 nm
- Lesemodus: Bottom
- Sensitivität: 70

### Auswertung

Die Zunahme der Fluoreszenzintensität (FI in %) pro Well wurde nach der modifizierten Rechnung von Wang *et al.* wie folgt berechnet [Wang *et al.*, 1999]:

$$FI \% = \frac{F_{30 \text{ min}} - F_{0 \text{ min}}}{F_{0 \text{ min}}} \times 100$$

$F_{0 \text{ min}}$  = Fluoreszenzintensität zu Beginn der Inkubation (0 min)

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

Aus den Meßergebnissen der einzelnen Wells wurde der Mittelwert berechnet und bezogen auf die TBH Kontrolle (100%) als relativer Fluoreszenzanstieg graphisch aufgetragen.

## Reagenzien und Lösungen

### DCFH-DA Lösung

- 4.1 mg DCFH-DA  
In 842  $\mu\text{l}$  DMSO lösen (unter Lichtausschluss in einem schwarzen Reaktionsgefäß)  
davon 100  $\mu\text{l}$  in 20 ml PBS (pH 7.0)  
→ für jeden Versuch frisch ansetzen  
Lagerung bei 4 °C

### PBS-Gebrauchslösung

- siehe Abschnitt 3.2.1 (pH 7.4)
- PBS pH 7.4 mit HCl auf PBS 7.0 einstellen

### TBH-Stammlösung

- 20  $\mu\text{l}$  TBH  
In 125  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O bidest. geben
- davon 25  $\mu\text{l}$   
In 75  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O bidest. geben (250 mM TBH)  
→ für jeden Versuch frisch ansetzen  
Lagerung bei 4 °C

### TBH-Stammlösung

- 20  $\mu\text{l}$  Stammlösung  
In 20 ml PBS 7.4 geben  
→ für jeden Versuch frisch ansetzen  
Lagerung bei 4 °C

### 6.5.3 Testung auf (oxidative) DNA-Schäden (Comet Assay)

Zur Untersuchung von DNA-Strangbrüchen wurde die alkalische Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) modifiziert nach Collins *et al.* und Singh *et al.* herangezogen [Collins *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 1988]. Die zellulären DNA-Schäden können auf unterschiedliche Weise, wie z.B. Modifikationen durch Substanzen oder UV-Strahlung, entstehen.

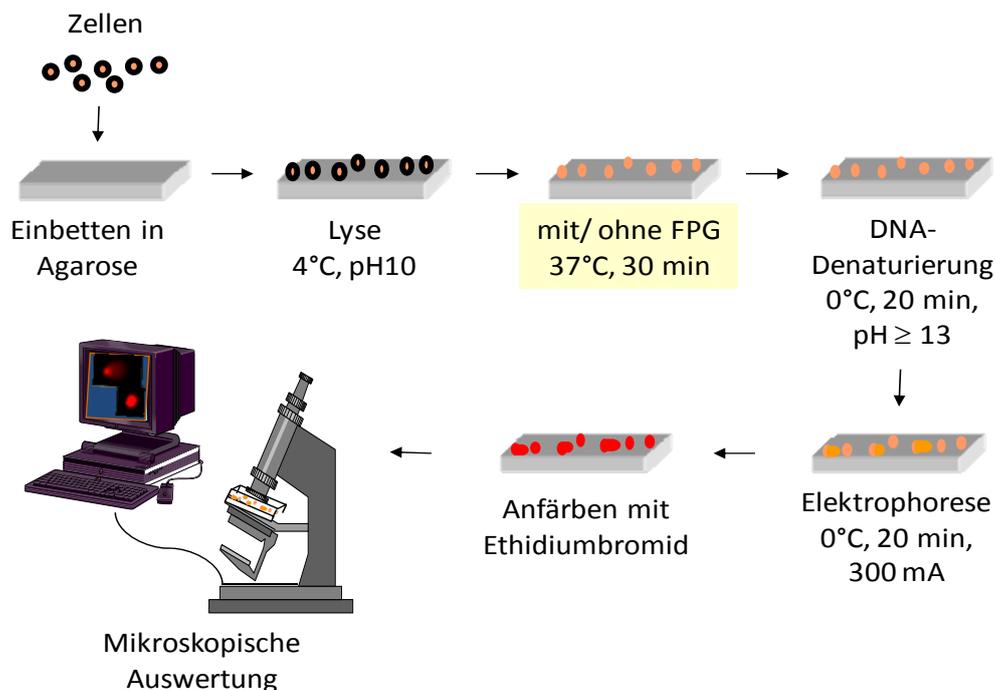


Abb. 6.10: Schematische Darstellung zur Durchführung des Comet Assays.

Zur Durchführung des Comet Assays (siehe Abb. 6.10) wurden die zu untersuchenden Zellen in Agarosegel auf Objektträger aufgetragen und die Zellmembran aufgelöst (lysiert). Um zusätzlich eine Aussage über das Ausmaß oxidativer DNA-Schäden zu erhalten, war es möglich, die Zellen nach der Lyse mit dem Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) zu behandeln. Bei FPG handelt es sich um ein bifunktionelles Enzym, das aus *E.coli* isoliert wird. Durch Glykosylaseaktivität (siehe Kap. 3.2.1.4) ist es in der Lage, oxidative DNA-Modifikationen zu erkennen und zu entfernen, wobei eine Lücke verbleibt. Mit Hilfe der AP-Lyaseaktivität wird diese Lücke erkannt und das Deoxyribosephosphat entfernt, woraus ein zusätzlicher Strangbruch resultiert und die Anzahl nachweisbarer DNA-Schäden erhöht wird [Laval, 1996].

Nach der Enzymbehandlung folgte in der Elektrophoresekammer unter stark alkalischen Bedingungen ( $\text{pH} \geq 13$ ) die DNA-Entwindung. Bei dieser alkalischen Variante des Comet Assays werden neben Doppelstrangbrüchen noch Einzelstrangbrüche und alkalilabile Stellen erfasst [Fairbairn *et al.*, 1995]. Während der darauf folgenden Elektrophorese wandern entstandene DNA-Fragmente im Gel. Die charakteristische Form geschädigter DNA (Komet) entsteht, da kleinere Fragmente im elektrischen Feld weiter wandern als intakte,

hochmolekulare DNA, die als runder Punkt im Mikroskop erscheint (siehe Abb. 6.11 und Abb. 6.12). Nach Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid wird mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops ausgewertet. Die Größe des Kometenschweifes ist ein Maß für die Anzahl induzierter Strangbrüche und wird als sog. „tail intensity“ erfasst.

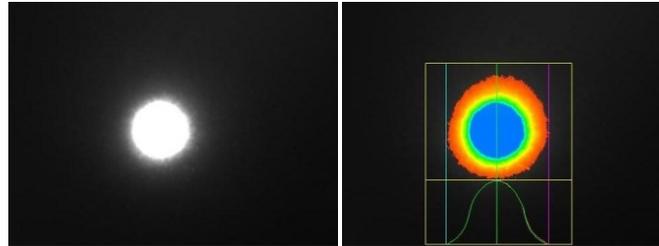


Abb. 6.11: Beispiel für einen Kometen mit geringer Schädigung der DNA (ca. 2% tail intensity).

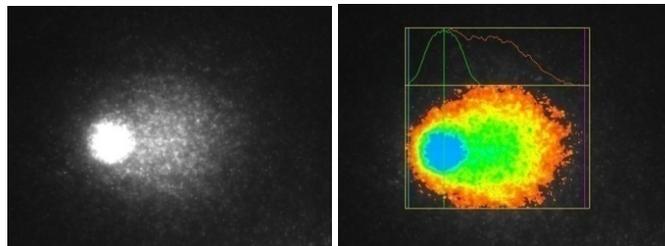


Abb. 6.12: Beispiel für einen Kometen mit starker Schädigung der DNA (ca. 40% tail intensity).

## Durchführung

### **Vorbereiten der Objektträger**

- \* 0.5% NMA (engl. *normal melting agarose*) wurde in der Mikrowelle erhitzt und aufgekocht
- \* Objektträger wurden codiert
- \* 40 µl NMA wurde auf den Objektträger pipettiert und mit einem Spatel gleichmäßig verteilt
- \* nachdem die NMA-Schicht getrocknet war wurden zweimal 65 µl NMA darauf gegeben und sofort mit je einem Deckglas bedeckt
- \* die Lagerung war bei 4 °C über 5 Tage in einer feuchten Objektträger Box möglich

### Inkubation der Zellen

- \* HT-29 und Caco-2 Zellen wurden wie in Kapitel 3.2.4 erläutert in Petrischalen ausgestreut und kultiviert
- \* nach 24 h Kultivierung wurden die Zellen mit 500 µl warmem PBS gewaschen
- \* die Substanzinkubation erfolgte pro Petrischale in 6 bzw. 9 ml I-Med
- \* nach der Inkubation (siehe Kap. 3.2.5) wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 0.5 ml Trypsin vom Boden der Petrischale abgelöst
- \* zum Abstoppen der „Trypsinierung“ wurde 1 ml N-Med zugegeben und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers geerntet
- \* die Zellsuspension wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt
- \* anschließend wurde die Viabilität und die Zellzahl in jeder Probe bestimmt (siehe Kap. 3.2.2). Die Viabilität sollte über 80% liegen, da bei geringeren Viabilitäten zelltodbedingte DNA-Schäden nicht ausgeschlossen werden können

### Einbetten der Zellen in Agarose

- \* von jeder Probe wurden 4 Aliquots mit 50.000 Zellen entnommen und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt
- \* Zentrifugation bei 4 °C, 2.000 rpm, 10 min
- \* 0.7 % LMA (engl. *low melting agarose*) wurde in der Mikrowelle erhitzt und aufgeköcht
- \* der Überstand wurde abgegossen und das Zellpelett mit 65 µl LMA resuspendiert
- \* von den vorbereiteten Objektträgern wurden die Deckgläser entfernt und die Zellsuspensionen auf die Gelkissen pipettiert
- \* die Gelkissen wurden sofort mit einem Deckglas abgedeckt und auf einer eisgekühlten Unterlage aushärten gelassen
- \* Deckgläser wurden entfernt und Objektträger über Nacht (bei 4 °C) in eine Färbekammer mit eiskaltem Lysepuffer gestellt

### Enzyminkubation, Elektrophorese und Auswertung

- \* Lysepuffer wurde entfernt und die Objektträger in der Färbekammer dreimal für 5 min mit ca. 100 ml eiskaltem Enzympuffer gewaschen
- \* auf jedes Gelkissen wurden entweder 50 µl Enzympuffer mit FPG oder ohne FPG gegeben und mit einem Deckglas bedeckt
- \* anschließend erfolgte für 30 min eine Inkubation im Wasserbad bei 37 °C
- \* nach der Inkubation wurden die Deckgläser entfernt und die Objektträger, mit der Gelschicht nach oben in eine Eis gekühlte Elektrophoresekammer gelegt
- \* die Kammer wurde mit eiskaltem Elektrophorespuffer aufgefüllt bis die Objektträger etwa 3 mm mit Puffer bedeckt waren
- \* die Denaturierung der DNA erfolgte bei geschlossener Kammer (abgedunkelt) für 20 min

- \* nach 20 min begann die Elektrophorese bei 25 Volt und 300 mA für weitere 20 min Die Voltzahl blieb konstant, wobei die richtige Stromstärke durch Zugabe und Entnahme von Pufferlösung eingestellt wurde
- \* danach wurden die Objektträger aus der Kammer in eine Färbekammer gestellt und dreimal für 5 min mit eiskaltem Neutralisationspuffer gespült
- \* die Gelkissen wurden mit 40 µl Ethidiumbromidlösung angefärbt und mit einem Deckglas bedeckt

### **Auswertung**

Pro Deckglas wurden am Fluoreszenzmikroskop 50 einzelne, sich nicht überlagernde Zellen ausgewertet. Zur Quantifizierung der DNA-Schäden wurde die sog. „tail intensity“ verwendet. Die „tail intensity“ erfasst das Verhältnis zwischen der Intensität des Kometenschweifes und der Intensität des Kometenkopfes der gleichen Zelle in Prozent.

### Reagenzien und Lösungen

NMA (engl. *normal melting agarose*)

0.5% in PBS

LMA (engl. *low melting agarose*)

0.7% in PBS

Elektrophorespuffer Stammlösung

- 200 g NaOH mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 500 ml auffüllen
- 14.9 g EDTA mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 200 ml auffüllen

Elektrophorespuffer Gebrauchslösung

- 30 ml NaOH Lösung
  - 5 ml EDTA Lösung
- mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 1 l auffüllen  
Lagerung bei 4 °C

Enzypuffer Stammlösung (10x)

- 9.5 g HEPES
  - 7.46 g KCl
  - 0.146 g EDTA
  - 0.2 g BSA
- mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 1 l auffüllen  
mit KOH auf pH 8.0 einstellen  
Aliquotiert auf 35 ml  
Lagerung bei -20 °C

#### Enzypuffer Gebrauchslösung

- 35 ml Enzypuffer Stammlösung
- 315 ml H<sub>2</sub>O bidest.

#### Ethidiumbromid Stammlösung

- 10 mg Ethidiumbromid in 50 ml H<sub>2</sub>O bidest.

#### Ethidiumbromid Gebrauchslösung

- Stammlösung 1:10 (v/v) in H<sub>2</sub>O bidest.

#### FPG-Enzym Stammlösung

- 200 µl Enzypuffer
- 200 µl Glycerin  
mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 2 ml auffüllen  
davon 990 µl + 10 µl FPG-Enzym (Verdünnung 1:1000)  
Aliquotiert auf 30 µl  
Lagerung bei -80 °C

#### FPG-Enzym Gebrauchslösung

- 30 µl FPG-Enzym Stammlösung
- 870 µl Enzypuffer (Gesamtverdünnung 1:3000)

#### Lysepuffer Stammlösung

- 146.1 g NaCl
- 37.2 g Na<sub>2</sub>-EDTA
- 1.2 g Tris  
in 1 l H<sub>2</sub>O bidest. lösen  
mit NaOH auf pH 10 einstellen
- + 10 g N-Laurylsarcosin-Na-Salz

#### Lysepuffer Gebrauchslösung

- 89 ml Lysepuffer Stammlösung
- 10 ml DMSO
- 1 ml Triton X-100

#### Neutralisationspuffer

- 48.5 g Tris
- mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 1 l auffüllen
- mit HCl auf pH 7.5 einstellen  
Lagerung bei 4 °C

### 6.5.4 Bestimmung des Glutathiongehalts

Die Glutathiongehalte der Zellen wurden mit einer nach Gallagher *et al.* modifizierten Methode bestimmt [Gallagher *et al.*, 1994]. Hierbei wird in einer NADPH-abhängigen Reaktion über eine Glutathionreduktase (GSR) GSH zu GSSG und 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) kontinuierlich zu 5-Thio-2-nitrobenzoat (TNB) reduziert. (siehe Abb. 6.13).

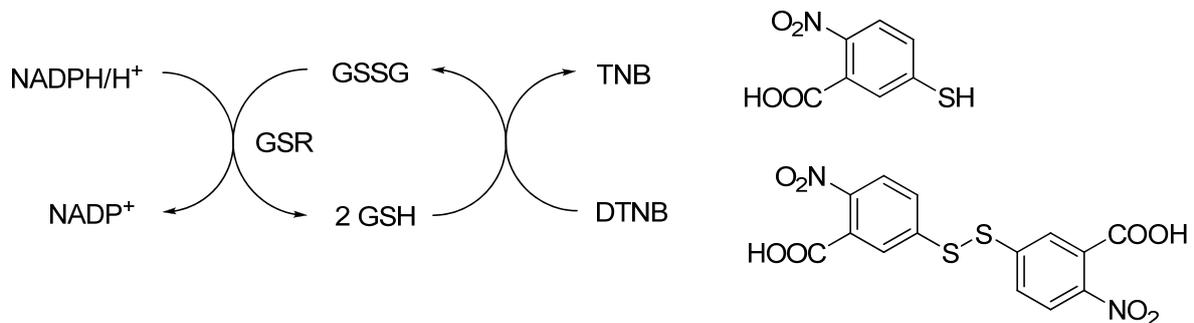


Abb. 6.13: Darstellung der farbgebenden Reaktion von Glutathion (GSH) und 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB). Reduktionsäquivalent: NADPH, GSR: Glutathionreduktase, GSSG: Glutathion (oxidierte Form) [Gallagher *et al.*, 1994].

Prinzip der Methode ist, dass die Geschwindigkeit der TNB-Bildung proportional zur Gesamtglutathion (GSH)-Konzentration ist, da alle anderen Reaktionspartner (NADPH, GSR, DTNB) im Überschuss vorhanden sind. Die Zunahme der Extinktion (TNB-Anstieg) kann bei 412 nm zeitlich verfolgt werden. Die Berechnung der GSH Konzentration erfolgte durch Vergleich mit GSH Standardgeraden. Die erhaltenen Messergebnisse wurden dann auf den Proteingehalt der Probe [nmol GSH/mg Protein] bezogen.

#### Durchführung

##### Inkubation und Aufbereitung der Zellen

- \* HT-29 und Caco-2 Zellen wurden wie in Kapitel 3.2.4 erläutert in Petrischalen ausgestreut und kultiviert
- \* nach 24 h Kultivierung wurden die Zellen mit 500 µl warmem PBS gewaschen
- \* die Substanzinkubation erfolgte pro Petrischale in 6 bzw. 9 ml I-Med
- \* nach der Inkubation (siehe Kap. 3.2.5) wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 0.5 ml Trypsin vom Boden der Petrischale abgelöst
- \* zum Abstoppen der „Trypsinierung“ wurde 1 ml N-Med zugegeben und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers geerntet
- \* die Zellsuspension wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt
- \* Zentrifugation bei 4 °C, 1.000 rpm, 10 min
- \* nach Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet dreimal mit 300 µl Puffer AB Gebrauchslösung gewaschen und bei 4 °C, 2.000 rpm, 10 min abzentrifugiert
- \* erneut wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 370 µl Puffer AB Gebrauchslösung aufgenommen

- \* zweimal 10 µl dieser Zellsuspension wurden zur Proteinbestimmung (BCA Assay, siehe Kap. 6.5.5) in 1.5 ml Reaktionsgefäße gegeben und bei -80 °C eingefroren
- \* lysiert wurden die Zellen durch Zugabe von 350 µl 10% 5-Sulfosalicylsäure (SSA)
- \* Zentrifugiert wurde bei 4 °C, 13.000 rpm, 15 min
- \* bestimmt wurde der GSH Gehalt aus dem erhaltenen Überstand

### **Bestimmung des GSH Gehalts**

- \* Standardgerade:
  - Auftauen des GSH Standards (1 mM)
  - Erstellt wurden die Standardlösungen (5 - 160 µM) durch verdünnen des GSH Standards mit 5% SSA
  - Blindwert entsprach 5% SSA
- \* Reagenzienmix: (pro Well)
  - 164 µl Puffer AB Gebrauchslösung
  - 20 µl DTNB (6 mM)
  - 4 µl NADPH (20 mM)
  - 2 µl GSR (50 U/ml)
- \* alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt, d.h. es wurden zweimal 10 µl Lösungsmittelkontrolle, Standard und Probe in eine 96 Well-Platte pipettiert
- \* Zugabe von 190 µl des Reagenzienmixes pro Well
- \* die Platte wurde sofort in das Plattenlesegerät gestellt und bei einer Absorption von 412 nm vermessen (t = 0 min und t = 10 min).

### **Auswertung**

Berechnet wurde die Differenz der Extinktionen bei t = 0 min und t = 10 min. Anschließend wurde der Mittelwert aus den Doppelbestimmungen errechnet und anhand der Standardlösungen eine Standardgerade erstellt. Mit der nach linearer Regression erhaltenen Geradengleichung konnte der GSH Gehalt bestimmt werden. Das Ergebnis wurde dann auf den Proteingehalt der Probe [nmol GSH/mg Protein] bezogen, welcher mittels BCA Assay bestimmt wurde.

### Reagenzien und Lösungen

#### DTNB-Lösung (6 mM)

- 12 mg DTNB  
in 5 ml Puffer AB Gebrauchslösung lösen  
→ für jeden Versuch frisch ansetzen

## Glutathionreduktase (GSR)

- 50 U GSR  
mit 1 ml Puffer AB Gebrauchslösung verdünnen (Endkonzentration 50 U/ml)

## GSH-Standard (1 mM)

- 30.73 mg GSH  
in 1 ml H<sub>2</sub>O bidest. lösen (100 mM)
- 200 µl der 100 mM Lösung  
mit 19.8 ml 5% SSA verdünnen (1 mM)  
Aliquotiert auf 500 µl  
Lagerung bei -80 °C

## NADPH-Lösung (20 mM)

- 16.7 mg NADPH  
in 1 ml 0.5% NaHCO<sub>3</sub>-Lösung lösen

NaHCO<sub>3</sub>-Lösung 0.5 %

- 125 mg NaHCO<sub>3</sub>  
in 25 ml H<sub>2</sub>O bidest. lösen  
Lagerung bei 4 °C

## Puffer A

- 1.7 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 234 mg Na<sub>2</sub>-EDTA  
in 100 ml H<sub>2</sub>O bidest. lösen  
Lagerung bei 4 °C

## Puffer B

- 2.175 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 234 mg Na<sub>2</sub>-EDTA  
in 100 ml H<sub>2</sub>O bidest. lösen  
Lagerung bei 4 °C

## Puffer AB Gebrauchslösung

- 15 ml Puffer A
- 85 ml Puffer B  
→ für jeden Versuch frisch ansetzen

## 5-Sulfosalicylsäure (SSA)

- 25 g SSA  
in 500 ml H<sub>2</sub>O bidest. lösen (5%)
- 50 g SSA  
in 500 ml H<sub>2</sub>O bidest. lösen (10%)

### 6.5.5 Bestimmung des Proteingehalts (BCA Assay)

In dieser Arbeit wurde zur Proteinquantifizierung der Bicinchoninsäure (BCA) Assay verwendet, welcher Mitte der 80er Jahre von Smith *et al.* entwickelt wurde [Smith *et al.*, 1985]. Der Assay beruht auf einer Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  durch Proteine. Das entstandene  $\text{Cu}^+$  komplexiert das farblose BCA, was zu einer Purpurfärbung der Probenlösung führt und photometrisch bei 562 nm vermessen werden kann. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte durch Vergleich mit einer Protein-Standardgeraden. In Abb. 6.14 ist der Mechanismus der Reaktion schematisch dargestellt.

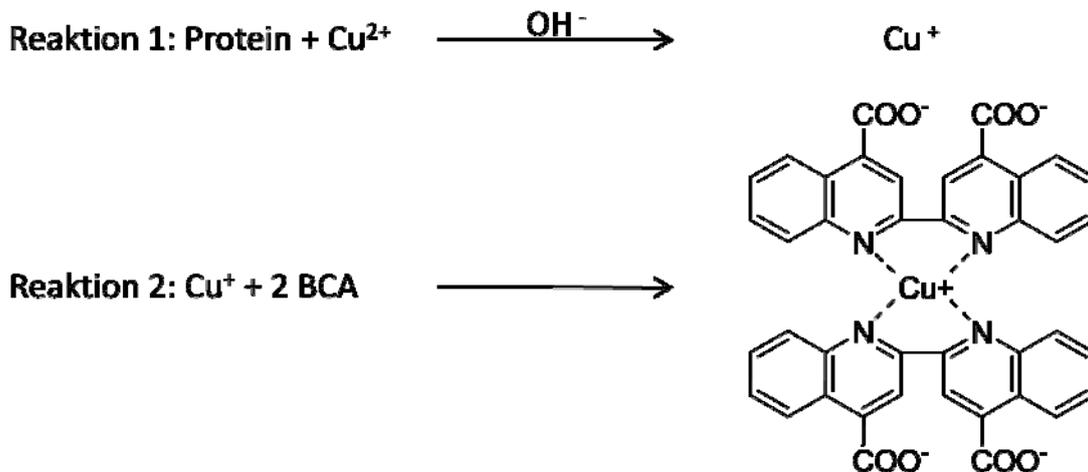


Abb. 6.14: Bildung des purpurnen, vierzähligen (BCA)<sub>2</sub>-Cu<sup>+</sup>-Komplex durch Reaktion von Cu<sup>+</sup> mit Bicinchoninsäure (BCA) nach [Smith *et al.*, 1985].

#### Durchführung

Analog des BCA-Protein Kit Protokolls; Uptima (UP40840), Interchim, F

#### Erstellung der Protein-Standardgeraden

- \* BSA Stammlösung (2 mg/ml)
- \* mit H<sub>2</sub>O bidest. auf folgende Konzentrationen 2.0, 1.6, 1.0, 0.8, 0.4, 0.2 mg/ml BSA verdünnen
- \* als Blindwert wurde H<sub>2</sub>O bidest. verwendet

#### Bestimmung des Proteingehalts

- \* Mischen von Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis 50:1
- \* Zweimal (Doppelbestimmung) 10 µl Probe oder Blindwert oder Standard in 1.5 ml Reaktionsgefäße geben und mit 500 µl Reagenz AB versetzen
- \* Inkubation im Schüttelwasserbad bei 37 °C für 30 min
- \* Abstoppen der Reaktion durch Abkühlen auf Eis
- \* Jeweils 200 µl Probe pro Well der 96 Well-Platte
- \* die Platte wurde im Plattenlesegerät bei einer Absorption von 562 nm vermessen

## Auswertung

Mit Hilfe der BSA-Standardlösungen wurde eine Standardgerade erstellt und mit der nach linearer Regression erhaltenen Geradengleichung die Proteinkonzentration ermittelt.

## Reagenzien und Lösungen

BCA-Protein Kit Uptima

- Reagenz A: Na<sub>2</sub>CO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>4</sub>, BCA, Na-Tartrat
- Reagenz B: CuSO<sub>4</sub>
- Proteinstandard: BSA (2 mg/ml)

## 6.6 Stabilität & Polymerbildung der Anthocyane im Zellkulturmedium

Um Bioaktivitätsstudien korrekt bewerten zu können, sind die Kenntnisse über die Abbaukinetik der Anthocyane unter Zellkulturbedingungen essentiell. Aus diesem Grund wurde die Stabilität der Anthocyane des HBE, dessen Anthocyanfraktion und ausgewählter Reinsubstanzen in vergleichenden Inkubationen in Zellkulturmedium (DMEM/F12 (1:1)) untersucht.

### 6.6.1.1 Inkubation

Als Ausgangskonzentration wurde für den HBE 500 µg/ml HBE, für die Anthocyanfraktion 302,75 µg/ml und für die beiden Reinsubstanzen Cy-3-glc<sup>1</sup> und Cy-3-gal<sup>1</sup> 55 µg/ml und 92 µg/ml eingesetzt. Die Proben wurden in DMEM/F12 Zellkulturmedium gelöst und anschließend bei 37 °C im Brutschrank 24 h inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte zu den Zeitpunkten (0, 15, 30, 45, 60 min) und später zu den Zeitpunkten (2, 3, 4, 6, 24 h). Jedes entnommene Aliquot von 270 µl wurde zum Ansäuern mit 30 µl Ameisensäure (100%ig) versetzt und direkt in flüssigem Stickstoff bei -196 °C tiefgefroren. Zur Aufbereitung wurden die Proben aufgetaut, mit internem Standard (IS) versetzt und mittels HPLC-UV/VIS vermessen.

### 6.6.1.2 Bestimmung des neu gebildeten Feststoffes

In der Literatur ist eine mögliche Bildung brauner Anthocyanpolymere aus der chinoiden Form von Cyanidin-Molekülen beschrieben [Fleschhut *et al.*, 2006]. Nach den durchgeführten Inkubationen im Zellkulturmedium wurde ebenfalls eine Bildung fester Partikel beobachtet. Aus diesem Grund wurde nach Ablauf der 24 h Inkubation der Ansatz mittels Ultrazentrifuge (45.000 rpm, 1 h, 21 °C) zentrifugiert. Der erhaltene Rückstand wurde mit H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen und nochmals unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der so gewonnene Rückstand wurde anschließend mittels Gefriertrocknung vollständig getrocknet und das

---

<sup>1</sup> Aufgrund des geringen Anteils der Reinsubstanzen am HBE wurde eine 4-fach höhere Konzentration gewählt.

Gewicht der Polymere ausgewogen. Dieses wurde aus der Differenz des Gewichtes des Reaktionsgefäßes mit Rückstand und dem Leergewicht des Reaktionsgefäßes berechnet.

## 6.7 Modelle zur Simulation des Magen-Darm-Trakts

Es ist wichtig Stabilitäts-, Freisetzungs- und Metabolisierungsversuche unter Laborbedingungen durchzuführen, mit denen die Veränderung von Stoffgruppen während der Dünndarmpassage im Modell untersucht werden kann. Aufgrund dessen wurden unterschiedliche *in vitro* Modelle, in Zusammenarbeit mit dem TP 6 (AG Mäder) und ein *ex vivo* Modell, modifiziert nach *Knaup et al.* und *Keppler et al.* etabliert [*Keppler et al., 2005; Knaup et al., 2008*]. Mit Hilfe dieser Modellsysteme war es möglich, die Stabilität bzw. den Abbau der Anthocyane und deren Freisetzung aus den HBE-beladenen Kapselpräparationen unter den unterschiedlichen Milieubedingungen des GIT zu erfassen.

Um die dabei erhaltenen Ergebnisse auf die *in vivo* Situation beziehen bzw. mit vorhandenen Daten vergleichen zu können, müssen Parameter wie anaerobe Umgebung, Temperatur und pH-Wert angepasst werden.

### 6.7.1 End-Over-End-Apparatur

Die Durchführung der Inkubationen mit der End-Over-End Apparatur fand aufgrund deren langjähriger Expertise in Kooperation mit TP 6 (AG Mäder) statt. Die Arbeitsgruppe besaß Erfahrungen mit *in vitro* Systemen, die zur Simulation der Magen- und Dünndarmpassage angewendet werden [*Abdalla et al., 2008; Jantratid et al., 2008; Rube et al., 2006*]. Aus diesem Grund wurden alle Inkubationen zur Magen- und Dünndarmpassage von der AG Mäder durchgeführt. Die Probenaufbereitung sowie die HPLC-Analytik und die Auswertung der Chromatogramme der Inkubationsproben wurde an der TU Kaiserslautern durchgeführt.

Im folgenden Kapitel wird auf die Durchführung und die wichtigsten Parameter des von der AG Mäder verwendeten Systems eingegangen.



Abb. 6.15: End-Over-End Apparatur von außen (links) und innen (rechts) [Abbildung von Johannes Oidtmann zur Verfügung gestellt, Universität Halle].

Um die Magen- und Dünndarmpassage *in vitro* zu simulieren, wurde eine End-Over-End Apparatur (siehe Abb. 6.15) verwendet, mit der eine permanente Rotation der Freisetzungsmedien um die eigene horizontale Achse (10 rpm) bei konstanter Temperatur (37 °C) ermöglicht wurde. Als Freisetzungsmedium wurden zwei unterschiedliche Systeme bei unterschiedlichen Inkubationszeiten (Magen- und Dünndarmsimulation; 120 und 150 min) gewählt [Abdalla et al., 2008; Porter et al., 2007].

#### **6.7.1.1 Herstellung der Freisetzungsmedien**

Die Freisetzungsmedien für die Magensaft- und die Dünndarmsimulation wurden wie folgt hergestellt [Abdalla et al., 2008].

##### Durchführung

#### **Herstellung des Mediums für die Magensaftsimulation (SGF)**

- \* H<sub>2</sub>O bidest. mit HCl auf einen pH von 1.2 einstellen (USP 2008 – ohne Enzym)
- \* Zugabe von 34 mM NaCl

#### **Herstellung des Mediums für die Dünndarmsimulation (FeSSIF)**

- \* H<sub>2</sub>O bidest. auf einen pH von 6.8 einstellen
  - o 53.4% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - o 46.6% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O
- \* Zugabe:
  - o 15 mM Gallensalze
  - o 3.75 mM Phospholipide
  - o 150 mM NaCl
  - o 5 mM CaCl<sub>2</sub>
  - o 450 U/ml Pankreatin

#### **6.7.1.2 Inkubation und Aufarbeitung (Inkubation erfolgte durch TP 6)**

##### **Inkubation**

Jeweils 15 ml des frisch hergestellten Mediums, entweder zur Simulation des Magensaftes oder des Dünndarminhaltes wurde mit den zu untersuchenden Präparaten vermischt und in der End-Over-End Apparatur inkubiert. Die Zeitpunkte der Probenentnahme waren bei der Magensaft-Simulation 0, 10, 20, 30, 45, 60, 120 min und bei der Dünndarm-Simulation 0, 10, 20, 30, 60, 120, 150 min. Um die Inkubation nach Beendigung der Inkubationszeit abzubrechen und alle enzymatischen Reaktionen abzustoppen wurde die Probe mit einer Lösung HCOOH/MeOH/H<sub>2</sub>O (10:50:40) versetzt. Anschließend wurden die Proben zur weiteren Bearbeitung nach Kaiserslautern gesendet.

## Aufarbeitung

Dort wurden die Proben zentrifugiert (20 min, 4 °C, 20.000 rpm), filtriert, mit internem Standard (IS) versetzt und mittels HPLC-UV/VIS vermessen (Geräteparameter siehe Kapitel 6.8).

### 6.7.2 *Ex vivo* Modell zur Simulation der Dünndarmpassage

Um die *in vivo* Situation im Vergleich zu den *in vitro* Inkubationen noch näher zu simulieren, wurden Versuche mit humanem Dünndarminhalt, der von Patienten freiwillig zur Verfügung gestellt wurde, durchgeführt.

#### 6.7.2.1 Probanden

Die bei dieser Arbeit verwendeten Dünndarminhalte (die im weiteren Verlauf der Arbeit als Ileostomabeutelinhalte bezeichnet werden) wurden von zwei Patienten (männlich, 65 Jahre und weiblich, 58 Jahre) die ein Stoma des terminalen Ileums (Ileostoma) hatten, zur Verfügung gestellt. Keiner der Probanden wurde bis zu drei Wochen vor der Beutelabnahme mit Antibiotika behandelt.

Das Studiendesign sah vor, dass beide Probanden die zwei vorangegangenen Tage bis zur Abnahme des Beutels auf polyphenol- und anthocyanhaltige Kost verzichteten (Ethikvotum der Landesärztekammer Mainz nr. 837.242.07 (5777)).

Die zur Verfügung gestellten Ileostomabeutel wurden unmittelbar nach der Abnahme in einen Anaerobiertopf eingebracht, mittels Anaerocult® unter Zugabe von 35 ml Wasser in ein anaerobes Milieu überführt, verschlossen und in sauerstofffreier Atmosphäre zügig ins Labor der Universität transportiert.

*Anmerkung:* Anaerocult® enthält Komponenten, die Sauerstoff innerhalb kürzester Zeit chemisch vollständig binden und O<sub>2</sub>-freies Milieu einschließlich CO<sub>2</sub>-Atmosphäre erzeugen.

#### 6.7.2.2 Herstellung des Carbonat-Phosphat-Puffers

Als Puffermedium für die Inkubationsversuche mit Ileostomabeutelinhalt sowie für die Stabilitätsuntersuchung wurde ein Carbonat-Phosphat-Puffer nach Lebet *et al.* verwendet [Lebet *et al.*, 1998]. Das Puffermedium wurde wie folgt hergestellt:

#### Durchführung

##### Herstellung der Spurenelementlösung

- \* genaues Einwiegen der Substanzen (siehe Tab. 6.6) in einen 100 ml Messkolben
- \* mit H<sub>2</sub>O bidest. vollständig in Lösung bringen
- \* Auffüllen mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 100 ml

Tab. 6.6: Zusammensetzung der Spurenelementlösung.

Bestandteile	Einwaage
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	368.0 mg
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	115.9 mg
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	44.0 mg
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	12.0 mg
NiCl <sub>2</sub>	10.0 mg
CuCl <sub>2</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	9.8 mg
Mo <sub>7</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1.7 mg
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 100 ml

### Herstellung des Carbonat-Phosphat-Puffers

- \* Einwiegen der Substanzen (siehe Tab. 6.7) in einen 1000 ml Messkolben
- \* mit H<sub>2</sub>O bidest. vollständig in Lösung bringen
- \* Zugabe von 10 ml Spurenelementlösung
- \* Einstellen des pH-Wertes mit HCl (1 M) auf 6.3
- \* Zugabe von 1 ml Resazurin-Lösung
- \* Auffüllen mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 1000 ml
- \* zur Entgasung wurde der Puffer für 30 min im Wasserbad auf 80 °C erhitzt
- \* nach dem Abkühlen wurden 5 ml Cysteinhydrochloridlösung (0.1 g/ml) zugegeben
- \* Begasung mit Helium (ca. 3 h, um dem Puffer den Sauerstoff zu entziehen) bis ein Farbumschlag von blau zu schwach rosa zu beobachten war

Tab. 6.7: Zusammensetzung des Reduktionspuffers (Carbonat-Phosphat-Puffer).

Bestandteile	Einwaage
NaHCO <sub>3</sub>	9.240 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.125 g
NaCl	0.470 g
KCl	0.450 g
Harnstoff	0.400 g
CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0.108 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> trocken	0.100 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0.100 g
Spurenelementlösung	10 ml
Resazurin (1 mg/ml)	1 ml
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1000 ml

### 6.7.2.3 Inkubation und Aufarbeitung

#### Inkubation

Der frische Ileostomabeutelinhalt wurde im Anaerobiertopf in die vorbereitete Anaerobkammer (siehe Abb. 6.16) überführt, die Kammer geschlossen und kontinuierlich mit einem Gasgemisch (80% Stickstoff, 20% Kohlendioxid; Aligal, Drumm, D) begast. Nachdem ein anaerobes Milieu vorlag, wurde der Ileostomabeutelinhalt in ein Becherglas gegeben und im Volumenverhältnis 1:1 mit Carbonat-Phosphat-Puffer (Herstellung siehe Kap. 6.7.2.2) vermischt, um das Inokulum zu erhalten.

Je 1 ml des Inokulums wurde in die verschiedenen Reaktionsgefäße, die mit den zu untersuchenden Substanzen bzw. Kapselpräparationen befüllt waren, gegeben, homogenisiert und über acht unterschiedliche Zeitpunkte (0, ½, 1, 2, 4, 6, 8 und 24 h) inkubiert. Um den Abbau der Anthocyane im Carbonat-Phosphat-Puffer von dem Abbau durch Enzym- und mikrobielle Aktivitäten des Ileostomabeutelinhalts zu unterscheiden, wurden parallel Inkubationen der zu untersuchenden Substanzen bzw. Kapselpräparationen im Puffer mitgeführt. Zur weiteren Kontrolle wurden sog. Blindansätze, in denen nur Inokulum enthalten war, angefertigt.

Um die Inkubation zu beenden und alle enzymatischen Reaktionen abzustoppen, wurden die Reaktionsgefäße in flüssigem Stickstoff bei -196 °C tiefgefroren. Nach Öffnen der Kammer wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Der restliche Ileostomabeutelinhalt wurde nach dem Öffnen der Kammer für die Bestimmung des pH-Wertes verwendet (siehe Kap. 6.7.2.6).



Abb. 6.16: Links: verwendete Anaerobkammer. Rechts: Innenansicht der Anaerobkammer mit den verwendeten Materialien.

### Aufarbeitung

Die auf  $-80\text{ °C}$  tiefgefroren Proben wurden aus dem Gefriergerät entnommen und innerhalb von 2 min bei  $37\text{ °C}$  im Wasserbad aufgetaut. Danach wurden die Proben bei  $4\text{ °C}$  für 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand vom Pellet (Rückstand) getrennt. Nach Keppler und Mitarbeitern wurde als Extraktionsmittel (enthält Ameisensäure um den pH-Wert zu senken und dadurch die Anthocyane zu stabilisieren) für den Überstand MeOH/HCOOH; 90:10 und für den Rückstand  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{HCOOH}$ ; 87:3:10 verwendet [Keppler *et al.*, 2005]. Nach der Zerkleinerung des Rückstands mittels Ultra-Turrax (30 s bei 20.000 rpm) wurde sowohl der Überstand als auch der aufbereitete Rückstand erneut zentrifugiert (22 min,  $4\text{ °C}$ , 20.000 g). Zur Abtrennung kleinerer Bestandteile wurde filtriert (PVDF-Filter,  $0.45\text{ }\mu\text{m}$ ) und vom erhaltenen Filtrat wurden  $180\text{ }\mu\text{l}$  mit  $20\text{ }\mu\text{l}$  internem Standard (Delphinidin-3,5-di-O-glukosid) versetzt. Die Quantifizierung der Anthocyane erfolgte mittels HPLC-DAD und HPLC-UV/VIS (Geräteparameter siehe Kapitel 6.8).

Zur Verdeutlichung der Inkubations- und Aufarbeitungsbedingungen siehe Abb. 6.17.

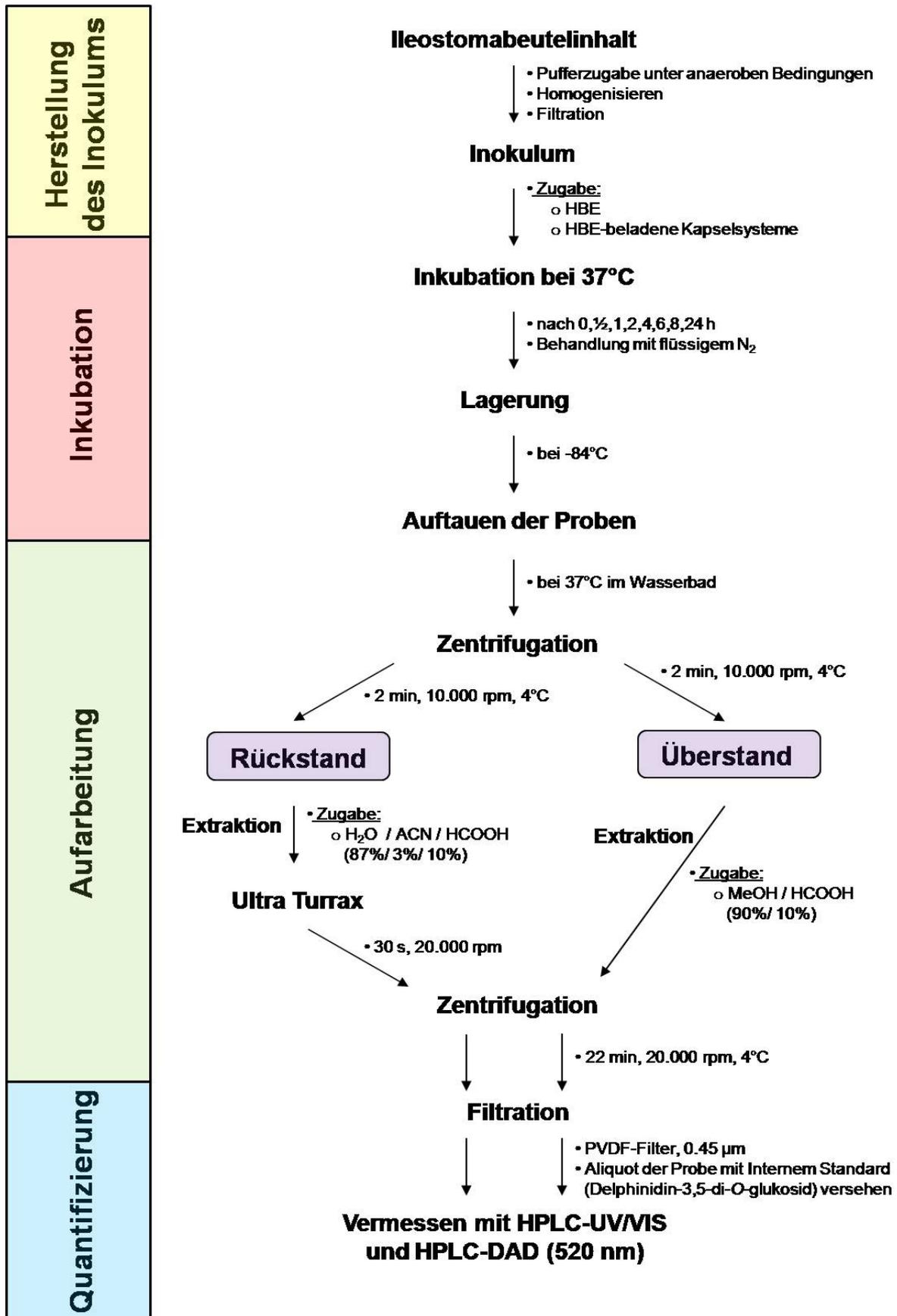


Abb. 6.17: Schema der Durchführung von Inkubationen mit Ileostomabeutelinhalten mit HBE und HBE-beladenen Kapselpäparaten.

#### 6.7.2.4 Wiederfindung nach der Probenaufarbeitung

Um die Wiederfindung der einzelnen Anthocyane nach der Probenaufarbeitung zu bestimmen, wurde anthocyanfreier Ileostomabeutelinhalt ( $n = 3$ ) mit einer definierten Menge an HBE versetzt und anschließend analog der Inkubationen aufgearbeitet (siehe Abb. 6.17). Die erhaltenen Wiederfindungsraten lagen im Bereich von 78% bis 100% (siehe Tab. 6.8)

Tab. 6.8: Wiederfindung der Anthocyane des HBE aus Ileostomabeutelinhalt nach Probenaufarbeitung.

Anthocyan*	Wiederfindung [%]
Del-3-O-gal	87 ± 4.5
Del-3-O-glc	82 ± 2.1
Cy-3-O-gal	78 ± 0.6
Del-3-O-ara	97 ± 2.5
Cy-3-O-glc	91 ± 1.9
Pet-3-O-gal	92 ± 9.6
Cy-3-O-ara	85 ± 6.1
Pet-3-O-glc	87 ± 4.7
Peo-3-O-gal	100 ± 10.9
Pet-3-O-ara	85 ± 2.9
Peo-3-O-glc	88 ± 4.6
Mal-3-O-gal	99 ± 4.7
Peo-3-O-ara	104 ± 2.1
Mal-3-O-glc	93 ± 5.4
Mal-3-O-ara	100 ± 5.8

\* Abkürzungen: Del-3-O-glc: Delphinidin-3-O-glukosid, Cy-3-O-glc: Cyanidin-3-O-glukosid, Del-3-O-ara: Delphinidin-3-O-arabinosid, Cy-3-O-gal: Cyanidin-3-O-galaktosid, Del-3-O-gal: Delphinidin-3-O-galaktosid, Pet-3-O-glc: Petunidin-3-O-glukosid, Cy-3-O-ara: Cyanidin-3-O-arabinosid, Mal-3-O-glc: Malvidin-3-O-glukosid, Pet-3-O-gal: Petunidin-3-O-galaktosid, Pet-3-O-ara: Petunidin-3-O-arabinosid, Peo-3-O-glc: Peonidin-3-O-glukosid, Mal-3-O-ara: Malvidin-3-O-arabinosid, Mal-3-O-gal: Malvidin-3-O-galaktosid, Peo-3-O-gal: Peonidin-3-O-galaktosid, Peo-3-O-ara: Peonidin-3-O-arabinosid.

#### 6.7.2.5 Bestimmung der Glukosidaseaktivität

Es wird vermutet, dass die im Dünndarm lokalisierte extrazelluläre  $\beta$ -Glukosidase (LPH) bei der Abspaltung des Zuckerrestes vom Anthocyanidin beteiligt ist (siehe Kap. 2.9.3). Aus diesem Grund wurde als Enzymparameter für die Ileostomabeutelinhalte der beiden Probanden die Glukosidaseaktivität modifiziert nach Knaup *et al.* mittels *p*-Nitrophenol-Glukosid (*p*-NP-glc) bestimmt [Knaup *et al.*, 2007]. Dadurch ist es möglich eine Aussage

über die Vergleichbarkeit der einzelnen Ileostomabeutelinhalte beider Patienten miteinander zu treffen.

### Durchführung

#### **Erstellung der *p*-NP-Standardgeraden**

- \* *p*-NP Stammlösung (1 mM)
- \* mit H<sub>2</sub>O bidest. auf folgende Konzentrationen 15, 7.5, 3.7, 1.9, 0.9, 0.4, 0.2 µM verdünnen
- \* als Blindwert wird H<sub>2</sub>O bidest. verwendet

#### **Bestimmung der Glukosidaseaktivität**

- \* Aufarbeitung des Ileostomabeutelinhaltes
- \* Zugabe von *p*-NP-glc in 1 ml Inokulum
- \* Inkubation über die acht genannten Zeiträume (siehe Abb. 6.17)
- \* wegfrieren bei -80 °C im Biofreezer
- \* auftauen bei 37 °C im Wasserbad
- \* Zentrifugation bei 4 °C, 15.000 rpm, 20 min
- \* jeweils 200 µl Probe oder Standardlösung pro Well der 96 Well-Platte pipettieren (als Blindwert wurde ein 0 h Inokulum Inkubation ohne Substanz mitgeführt)
- \* die Platte wurde im Plattenlesegerät bei einer Absorption von 405 nm vermessen

#### **Auswertung**

Mit Hilfe von Standardlösungen wurde eine Standardgerade erstellt und mit der nach linearer Regression erhaltenen Geradengleichung die *p*-NP Konzentration ermittelt.

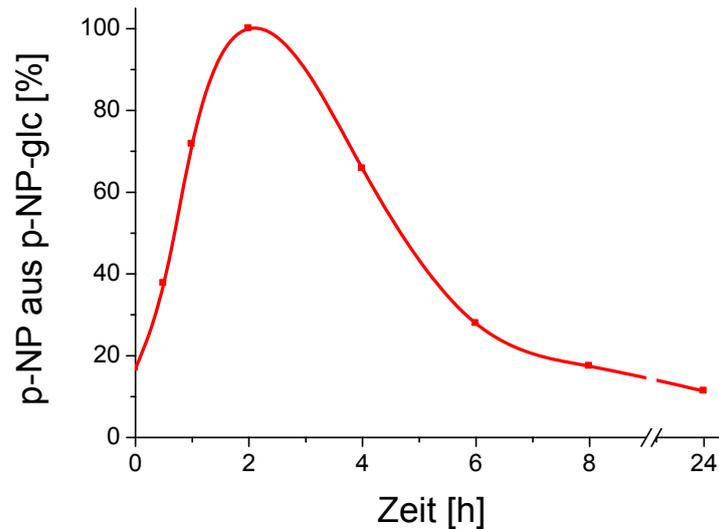


Abb. 6.18: Exemplarische Darstellung eines p-NP Konzentration-Zeitverlaufes [%] während einer anaeroben Inkubation (100% entspricht einer kompletten Umsetzung von p-NP-glc zu p-NP) von Ileostomabeutelinhalt mit p-NP-glc.

Aufgrund der Tatsache, dass alle Konzentrations-Zeitverläufe ähnlich wie in Abb. 6.18 verliefen und somit alle untersuchten Ileostomabeutelinhalte vergleichbare Aktivitäten aufwiesen, wurde auf eine detaillierte Darstellung aller einzelnen Kurven verzichtet.

#### 6.7.2.6 Bestimmung des pH-Wertes

Die Messung des pH-Wertes wurde am Ende der Inkubation mit dem verbleibendem Ileostomabeutelinhalt mittels digitalem pH-Meter durchgeführt. Die Elektrode wurde vor jeder Messung mit Standardlösungen (pH 4.0, pH 7.0, pH 10.0) kalibriert.

Die ermittelten pH-Werte der Ileostomabeutelinhalte der beiden Probanden lagen bei allen durchgeführten Inkubationen zwischen 5.9 und 6.0.

## 6.8 HPLC-Systeme und Bedingungen

### 6.8.1 HPLC-Diodenarray (DAD)

- \* Kompaktsystem: Photodiodenarray Hewlett Packard 1090 Serie
- \* Entgaser: Helium-Online-Entgasung
- \* Software: HP ChemStation for LC
- \* Säulenofen: Temperatur: 40 °C
- \* Säule: Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2) 100A (250 x 4.60 mm)

### 6.8.2 HPLC-UV/VIS

- \* Entgaser: DG-2080-53 3-Line Degasser, Jasco, Groß-Umstadt, D
- \* Pumpe: PU-2080 Intelligent HPLC-Pump, Jasco, Groß-Umstadt, D
- \* Autosampler: AS-2055/2057 Intelligent Autosampler, Jasco, Groß-Umstadt, D
- \* Injektor: AS-2055 Plus intelligent Sampler, Jasco, Groß-Umstadt, D
- \* Detektor: UV-2075 Plus Intelligent UV/VIS Detektor. Jasco, Groß-Umstadt, D
- \* Software: ChromPass Chromatography Data System
- \* Säule: Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2) 100A (250 x 4.60 mm)

### 6.8.3 Allgemeine Bedingungen

#### Fließmittel:

- \* Fließmittel A: H<sub>2</sub>O/ACN/HCOOH (87/3/10)
- \* Fließmittel B: H<sub>2</sub>O/ACN/HCOOH (40/50/10)
- \* Fließmittel C: H<sub>2</sub>O/ACN (40/60)
- \* Fließmittel D: H<sub>2</sub>O/ACN/HCOOH (10/80/10)

Das Fließmittel C wurde verwendet um die Säule nach der Sequenz zu spülen (entfernen der Ameisensäure aus dem System).

Mit Fließmittel D wurde nach jeder Injektion die Spritze gespült.

#### Methode

- \* Injektionsvolumen: 20  $\mu$ l
- \* Wellenlänge: 520 nm

### 6.8.3.1 Messmethode

Als optimale Methode hat sich ein Gradientenprofil herausgestellt, welches durch die Fließmittel A und B reguliert wurde und eine optimale Trennung der Anthocyane und des internen Standards (IS) Delphinidin-3,5-O-diglukosid gewährleistete (siehe Tab. 6.9).

Tab. 6.9: optimierter Fließmittelgradient.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]	Fluss [ml/min]
0	98	2	0.5
20	86	14	0.5
25	86	14	0.5
33	86	14	0.3
40	86	14	0.3
50	85	15	0.5
55	81	19	0.5
65	80	20	0.5
65.1	1	99	0.5
70	1	99	0.5
70.1	98	2	0.5
75	98	2	0.5

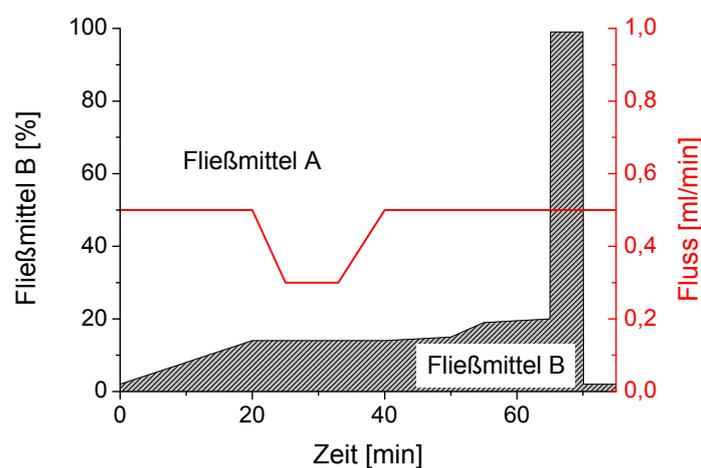


Abb. 6.19: Graphische Darstellung des Gradientenverlaufs (Fließmittel A und B, Zeit und Fluss).

### 6.8.3.2 Chromatogramm

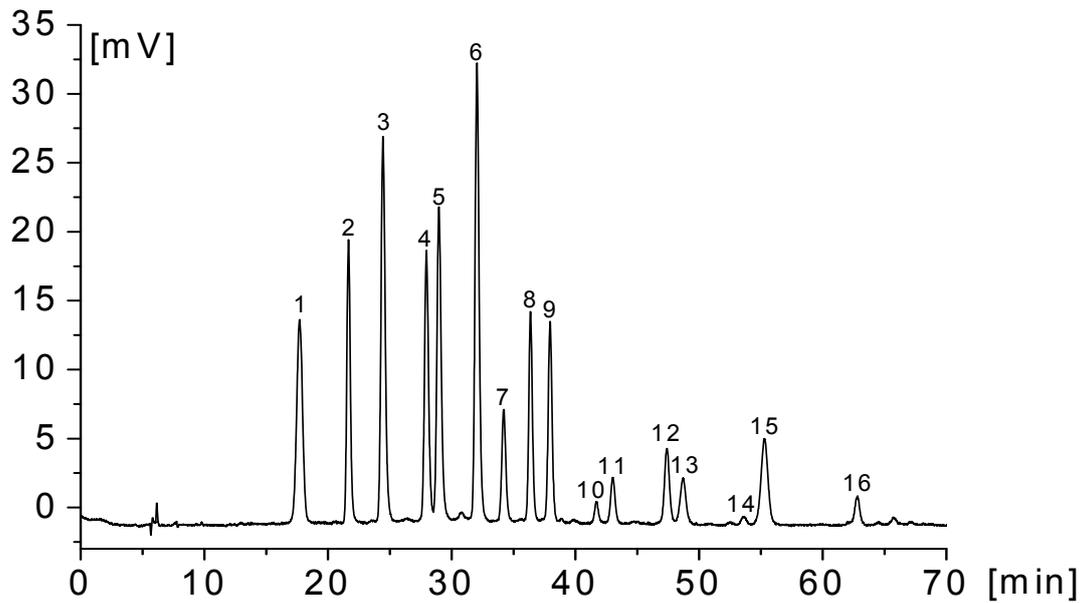


Abb. 6.20: HPLC-UV/VIS-Chromatogramm des HBE (100 µg/ml; 520 nm). (interner Standard (IS): Delphinidin-3,5-O-diglukosid (1)), Del-3-O-gal (2), Del-3-O-glc (3), Cy-3-O-gal (4), Del-3-O-ara (5), Cy-3-O-glc (6), Pet-3-O-gal (7), Cy-3-O-ara (8), Pet-3-O-glc (9), Peo-3-O-gal (10), Pet-3-O-ara (11), Peo-3-O-glc (12), Mal-3-O-gal (13), Peo-3-O-ara (14), Mal-3-O-glc (15), Mal-3-O-ara (16).

### 6.8.3.3 Retentionszeiten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Retentionszeit ist die Zeit, die der Analyt für das Passieren der Säule benötigt (Zeit zwischen Injektion und Detektion des Analyten).

Das Limit of Quantification (LOQ) beschreibt die Grenze, an der es noch möglich ist, eine Substanz sowohl zu qualifizieren als auch zu quantifizieren. Unterhalb dieser Grenze ist die Quantifizierung einer Substanz nicht mehr durchführbar. Das LOQ ergibt sich durch die Multiplikation der Basislinie mit dem Faktor 10 [MacDougal *et al.*, 1980].

Das Limit of Detection (LOD) beschreibt die Grenze, an der eine Substanz gerade noch detektiert werden kann und ist definiert als die dreifache Basislinienhöhe [MacDougal *et al.*, 1980].

Die LOD und LOQ Werte die in Tab. 6.10 aufgeführt sind, wurden durch Bestimmung mittels Standardsubstanzen ermittelt.

Tab. 6.10: Retentionszeit [min], Limit of Detection [ $\mu\text{g/ml}$ ] und Limit of Quantification [ $\mu\text{g/ml}$ ] der untersuchten Anthocyane.

Anthocyan*	Retentionszeit [min]	LOD [ $\mu\text{g/ml}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Del-3-O-gal	23.4	0.105	0.262
Del-3-O-glc	26.9	0.262	0.655
Cy-3-O-gal	30.1	0.042	0.105
Del-3-O-ara	31.4	0.105	0.262
Cy-3-O-glc	34.0	0.122	0.244
Pet-3-O-gal	36.2	0.262	0.655
Cy-3-O-ara	38.0	0.262	0.655
Pet-3-O-glc	39.7	0.262	0.655
Peo-3-O-gal	43.8	0.262	0.655
Pet-3-O-ara	45.7	0.655	1.638
Peo-3-O-glc	49.8	0.262	0.655
Mal-3-O-gal	51.8	0.262	0.655
Peo-3-O-ara	57.0	0.105	0.262
Mal-3-O-glc	58.7	0.262	0.655
Mal-3-O-ara	65.5	0.655	1.638

\* Abkürzungen: Del-3-O-glc: Delphinidin-3-O-glukosid, Cy-3-O-glc: Cyanidin-3-O-glukosid, Del-3-O-ara: Delphinidin-3-O-arabinosid, Cy-3-O-gal: Cyanidin-3-O-galaktosid, Del-3-O-gal: Delphinidin-3-O-galaktosid, Pet-3-O-glc: Petunidin-3-O-glukosid, Cy-3-O-ara: Cyanidin-3-O-arabinosid, Mal-3-O-glc: Malvidin-3-O-glukosid, Pet-3-O-gal: Petunidin-3-O-galaktosid, Pet-3-O-ara: Petunidin-3-O-arabinosid, Peo-3-O-glc: Peonidin-3-O-glukosid, Mal-3-O-ara: Malvidin-3-O-arabinosid, Mal-3-O-gal: Malvidin-3-O-galaktosid, Peo-3-O-gal: Peonidin-3-O-galaktosid, Peo-3-O-ara: Peonidin-3-O-arabinosid.

### 6.8.3.4 Absorptionsmaxima der Anthocyane

Die UV-Spektren der 15 im HBE enthaltenen Anthocyane liegen im sichtbaren Bereich zwischen 510 und 530 nm (siehe Abb. 6.21).

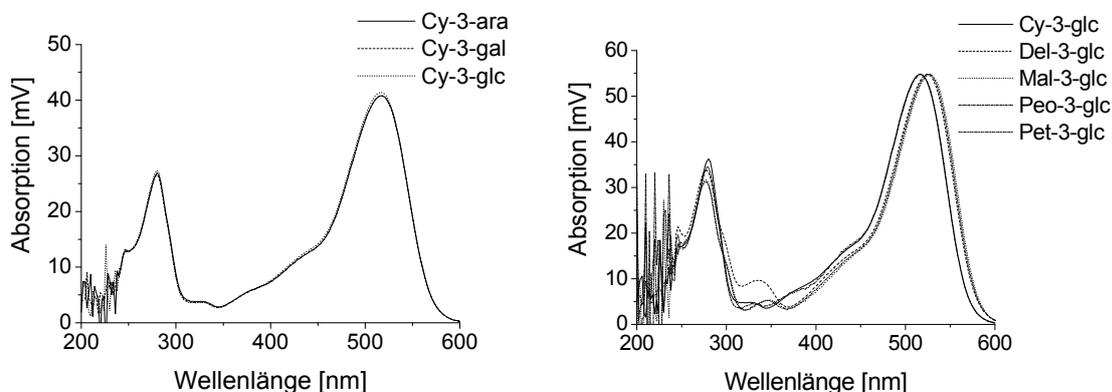


Abb. 6.21: UV-Spektren der verwendeten Cyanidinglykoside (links) und der verwendeten Anthocyan Glukoside (rechts).

### 6.8.3.5 Interner Standard

Als interner Standard wurde Delphinidin-3,5-O-diglukosid (Delphin) verwendet, da die Substanz zur Gruppe der Anthocyane gehört, jedoch nicht im HBE vorkommt und ebenfalls ein Maximum im UV-Spektrum bei 520 nm aufweist. Ein weiterer Vorteil des Diglukosids war die aufgrund des zweiten Zuckers bedingte kurze Retentionszeit, wodurch eine Überlagerung mit anderen Anthocyanen des HBE ausgeschlossen werden kann. Als Stammlösung wurde eine 0,8 mg/ml Delphinidin-3,5-O-diglukosid Lösung in Fließmittel A hergestellt und in einem Verhältnis von 1:10 zur Probe zugegeben.

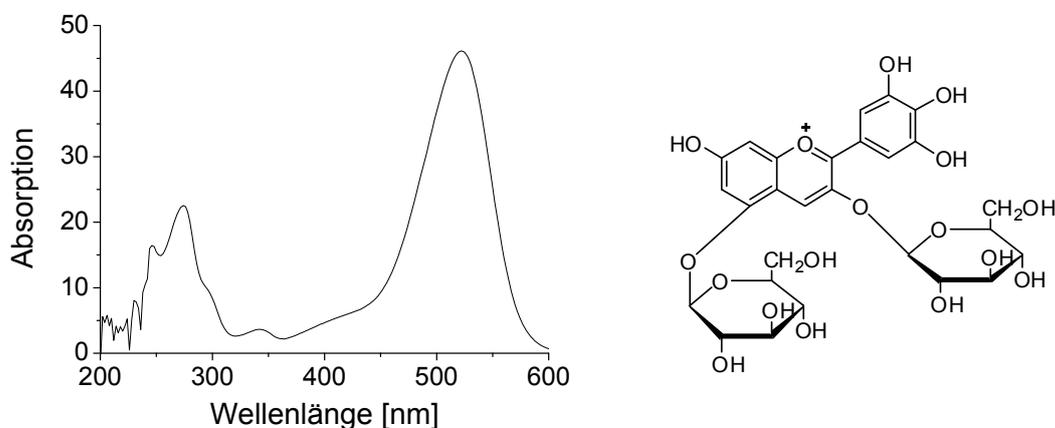


Abb. 6.22: UV-Spektrum und Strukturformel des internen Standards Delphinidin-3,5-O-diglukosid.

### 6.8.3.6 Kalibrierungen

Zur Erstellung der Kalibriergeraden mit Cy-3-glc wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 g/l in Fließmittel A hergestellt. Ausgehend von dieser Stammlösung wurden in ½ Schritten 12 weitere Verdünnungen in Fließmittel A hergestellt (250, 125, 62.5, 31.25, 15.6, 7.81, 3.91, 1.95, 0.977, 0.488, 0.244, 0.122 mg/l). Danach wurden jeweils 180 µl der Verdünnung mit je 20 µl internem Standard (IS), der Konzentration 0.8 mg/ml versetzt und an der HPLC-UV/VIS vermessen. Nach Integration der erhaltenen Peakflächen von Cy-3-glc und IS bei 520 nm wurde der Quotient gebildet und gegen den Quotienten der Konzentration aufgetragen. Durch lineare Regression mit dem Programm Origin 8.1 Professional wurde die Kalibriergerade erstellt (siehe Abb. 6.23).

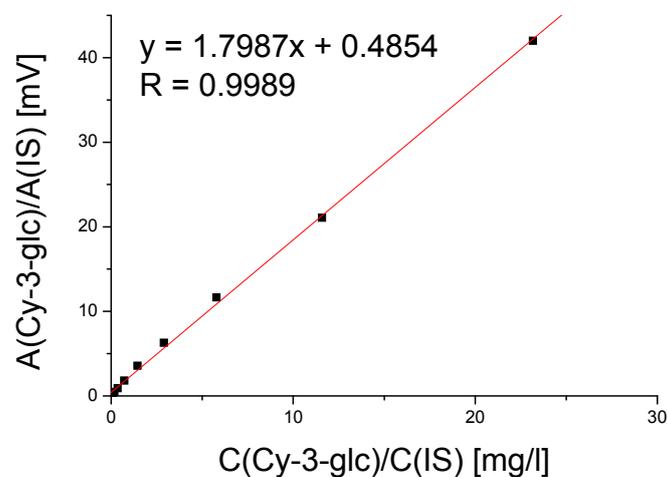


Abb. 6.23: Kalibriergerade zur Bestimmung der Anthocyane im Konzentrationsbereich von 0.488 mg/l bis 250 mg/l. IS = Interner Standard (Delphinidin-3,5-O-diglukosid).

### 6.8.3.7 Statistik

Für die statistische Auswertung wurden die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Versuchen gemittelt und die Standardabweichungen bestimmt. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit einem einseitigen student's t-test unabhängiger Stichproben mit dem Programm Origin 8.1 Professional.

\*: statistisch signifikant ( $p \leq 0.05$ ); \*\*\*: statistisch hoch signifikant ( $p \leq 0.001$ )

## 7 Ergebnisse & erste Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Stabilität und Freisetzung von Anthocyanen aus HBE (*Vaccinium myrtillus* L.) unter den Milieubedingungen des Gastrointestinaltrakts (GIT) untersucht. Des Weiteren wurde geprüft, in wieweit unterschiedliche HBE-beladene Kapselsysteme hergestellt von Projektpartnern TP 2, 3 und 5, eine kontrollierte Freisetzung gewährleisten bzw. die Stabilität der Anthocyane beeinflussen. Zur Charakterisierung und Identifizierung der Anthocyane wurde eine geeignete HPLC-Methode etabliert.

Des Weiteren wurde die antioxidative Wirksamkeit des HBE und der HBE-beladenen Kapseln vergleichend *in vitro* untersucht. Ein geeignetes Modell für intestinale Epithelzellen stellten die Kolonkarzinomzelllinien Caco-2 und HT-29 dar. Um die erhaltenen Effekte korrekt bewerten zu können, ist die Kenntnis der Stabilität der Anthocyane aus dem HBE unter Zellkulturbedingungen essentiell. Daher wurde mittels HPLC-UV/VIS die Stabilität und Freisetzung der Anthocyane aus dem HBE in dem Zellkulturmedium untersucht.

### 7.1 Etablierung einer geeigneten HPLC-Methode

Die Etablierung einer geeigneten HPLC-Methode zur Charakterisierung und Quantifizierung der Anthocyane des Heidelbeerextrakts (HBE) wurde mit dem TP 1 (AG Winterhalter) und allen anderen TP's in enger Zusammenarbeit realisiert. Diese Kooperation unter den Forschungsstellen bzw. Teilprojekten zur Methodenoptimierung war nötig, damit die erzielten Ergebnisse, d.h. die Quantifizierung der Anthocyane unter den Projektpartnern vergleichbar war.

Da das Hauptaugenmerk der Analytik auf den 15 Anthocyanen des HBE lag, wurde aufgrund deren Polarität ein Fließmittelgemisch aus Acetonitril, Wasser und Ameisensäure in einem optimierten Verhältnis (Fließmittel A: H<sub>2</sub>O/ ACN/ HCOOH (87/3/10), Fließmittel B: H<sub>2</sub>O/ ACN/ HCOOH (40/50/10) angewandt. Der sehr hohe Ameisensäureanteil im Fließmittel ist Voraussetzung für die Stabilität der Anthocyane während der Chromatographie [Woodward *et al.*, 2009]. Aufgrund der optimalen Trennung der einzelnen Anthocyane stellte sich die Phenomenex Luna 3 $\mu$  C18 (2) 100A, 250 x 4.60 mm als geeignetste Trennsäule mit einem optimierten Gradientenverlauf (siehe Abb. 6.19) heraus. Die optimierte Methode zur Quantifizierung und Charakterisierung der Anthocyane lieferte folgendes HPLC-Chromatogramm (siehe Abb. 7.1).

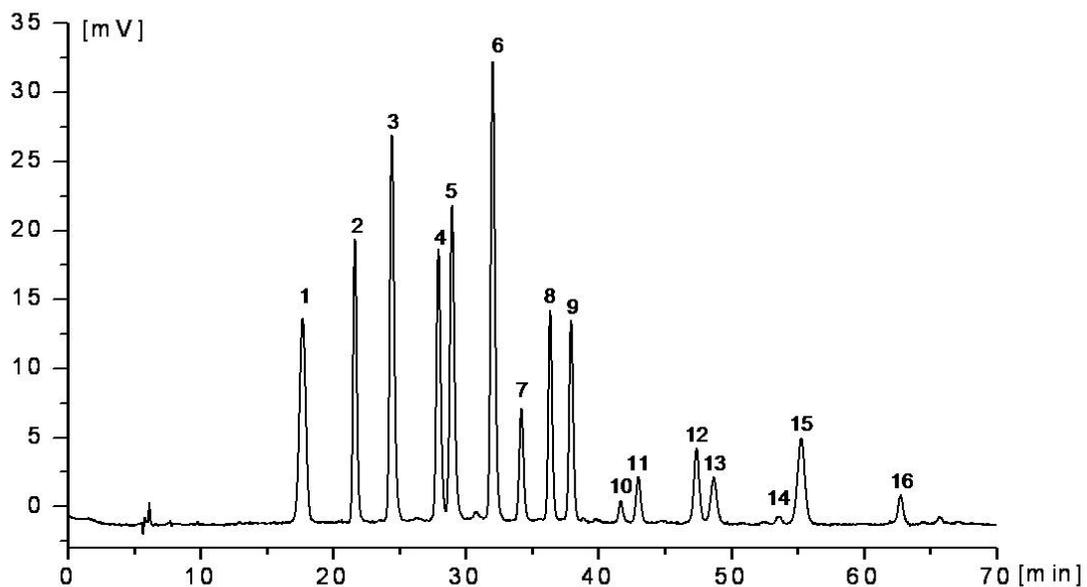


Abb. 7.1: HPLC-UV/VIS-Chromatogramm der 15 im HBE (100 µg/ml) enthaltenen Anthocyane und des internen Standards (IS: Delphinidin-3,5-O-diglukosid (1)), Del-3-O-gal (2), Del-3-O-glc (3), Cy-3-O-gal (4), Del-3-O-ara (5), Cy-3-O-glc (6), Pet-3-O-gal (7), Cy-3-O-ara (8), Pet-3-O-glc (9), Peo-3-O-gal (10), Pet-3-O-ara (11), Peo-3-O-glc (12), Mal-3-O-gal (13), Peo-3-O-ara (14), Mal-3-O-glc (15), Mal-3-O-ara (16).

Um die Genauigkeit (run-to-run) und Reproduzierbarkeit (day-to-day) der HPLC-Methode zu überprüfen, wurde eine Probenlösung mit einer definierten Anthocyankonzentration (500 µg/ml HBE) sechs Mal injiziert. Dabei wurde  $100\% \pm 1.5\%$  der Ausgangskonzentration wiedergefunden. Das erzielte Ergebnis am Tag 1 wurde  $100\%$  gesetzt. Die gleiche Lösung wurde sowohl an Tag 2 als auch an Tag 3 dreimal injiziert, was zu einer Wiederfindung von  $96.1\% \pm 0.4\%$  und  $96\% \pm 1\%$  führte (siehe Abb. 7.2).

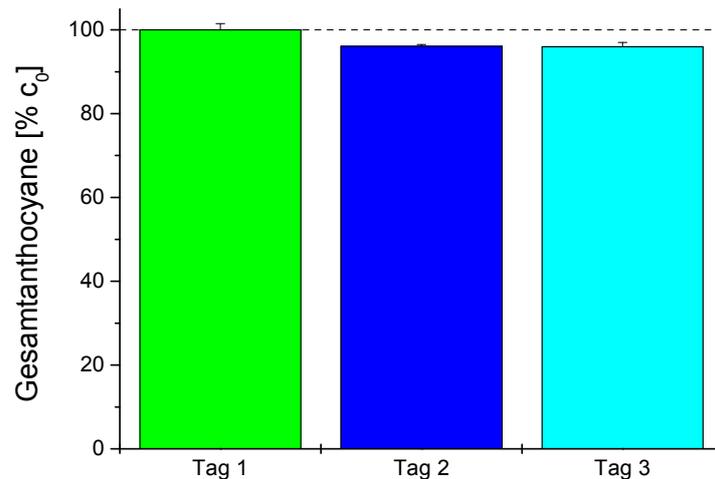


Abb. 7.2: Genauigkeit (run-to-run) und Reproduzierbarkeit (day-to-day) der HPLC-Methode für die Anthocyananalytik (500 µg/ml HBE; Methode siehe Kap. 6.8.3.1)

Nach der Methodvalidierung wurde im ersten Schritt die Wiederfindung der Anthocyane des HBE nach der Probenaufbereitung überprüft. Aufgrund unterschiedlicher Probenmatrices (*in vitro* Inkubationsmedien, Ileostomabeutelinhalt) war es notwendig, die Extraktionsmethoden zu optimieren. Für die Proben der Freisetzungsversuche, die in Kooperation mit TP 6 durchgeführt wurden, stellte sich eine Probenaufbereitung mittels Zentrifugation wie in Kap. 6.7.1.2 beschrieben als optimal heraus. Die Aufarbeitung der mit humanem Dünndarminhalt inkubierten Proben erwies sich als schwieriger, wobei am Ende die Methode mittels zweimaliger Zentrifugation und anschließender Filtration wie in Kap. 6.7.2.3 beschrieben verwendet wurde. Die Wiederfindungsraten für die Extraktion aus Inkubation mit humanem Dünndarminhalt, der einzelnen Anthocyane lagen im Bereich von 78% - 100% (siehe Tab. 6.8, Kap. 6.7.2.4).

## 7.2 *In vitro* Untersuchungen zur Stabilität und Freisetzung der Anthocyane des HBE im Vergleich zu den HBE-beladenen Kapselpräparaten

In Kooperation mit TP 6 (AG Mäder) wurde die gastrointestinale Freisetzung und Stabilität der Anthocyane des HBE mit denen der HBE-beladenen Kapselsysteme (siehe Kap. 6.3) vergleichend untersucht. Hierfür wurden *in vitro* (kontinuierliche Durchmischung bei 37 °C) köpermimetische Lösungen (Magensaft ohne Enzym: simulated gastric fluid (SGF) und Dünndarmsaft mit Enzym: fed state simulated intestinal fluid (FeSSIF)) eingesetzt und sowohl der HBE als auch die HBE-beladenen Kapselpräparate damit inkubiert (siehe Kap.

6.7). Nach der Probenaufbereitung und Zugabe von internem Standard erfolgte die Analytik der Proben mittels HPLC-UV/VIS bei 520 nm.

### 7.2.1 Magensimulation

Für die Simulation der Magenpassage wurde, aufgrund einer mittleren Verweildauer der Nahrung im Magen von 2 h [Fallingborg *et al.*, 1989], ein Zeitraum von 120 min gewählt. Bei Inkubationen mit HBE (A) in einer Konzentration von 2.5 mg/ml HBE (entspricht 100% Gesamtanthocyane) wurde beobachtet, dass die Anthocyane während der Magensimulation über den gesamten Inkubationszeitraum (120 min; SGF, pH 1.5) stabil waren (siehe Abb. 7.3). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden als Summe der 15 im HBE enthaltenen Anthocyane bezogen auf die eingesetzte Konzentration von 2.5 mg/ml HBE (100% Gesamtanthocyane) angegeben.

Im Vergleich zum HBE wurden die HBE-beladenen Kapselsysteme Pektinamidhohlkapsel TP 2 (AG Rehage), die Molkenproteinkapsel TP 3 (AG Kulozik) und die Apfelpektinkapsel mit Schellackbeschichtung TP 5 (AG Schwarz) eingesetzt (siehe Kap. 6.3). Die genauen Charakteristika wie Größe, Zusammensetzung und HBE-Beladung sind in Tab. 6.2 (Kap. 6.3.5) dargestellt. Die multidispersen Hüllkapseln eigneten sich aufgrund ihrer geringen HBE-Beladung nicht für die Freisetzungsversuche (siehe Abb. 6.7).

Nachdem zu Beginn der Inkubation mit Pektinamidhohlkapseln (B) ca. 20% der enthaltenen Anthocyane frei im Medium vorlagen, fand eine komplette Freisetzung der noch in den Kapseln verfügbaren Anthocyane innerhalb von 20 min statt. Im weiteren Verlauf von 110 min war keine Abnahme der Konzentration zu detektieren. Ein ähnlicher Konzentrations-Zeit-Verlauf zeigte sich bei den Inkubationen mit Molkenproteinkapseln (C), wobei zu Beginn der Inkubation schon 60% der Anthocyane frei vorlagen. Dieses Phänomen (direkte Freisetzung von Anthocyanen) könnte möglicherweise auf die Kapselgröße zurückgeführt werden, da im Vergleich der beiden Kapselsysteme deutlich wird, dass die Molkenproteinkapseln wesentlich kleiner sind und dadurch eine größere Oberfläche besitzen, die mit dem umgebenden Medium in Kontakt steht (siehe Abb. 6.6). Bei den Apfelpektinkapseln, die durch ein zusätzlich aufgebrachtes Schellackcoating beschichtet wurden (D), lagen ebenfalls zu Beginn ca. 20% der enthaltenen Anthocyane frei vor. Nach einer schnellen Freisetzung innerhalb der ersten 10 min konnte im weiteren Verlauf der Inkubation ein stetiger Anstieg der Anthocyankonzentration beobachtet werden.

Die Stabilität der aus den Kapselsystemen (unabhängig vom Kapseltyp) freigesetzten Anthocyane wird durch den pH-Wert des Magens (pH 1.5) begründet, da hier die Anthocyane als stabilisierte Flavylum-Kationen vorliegen und somit ein Abbau bzw. eine Strukturänderung verhindert wird [McGhie *et al.*, 2007; Woodward *et al.*, 2009] (siehe Abb. 7.3).

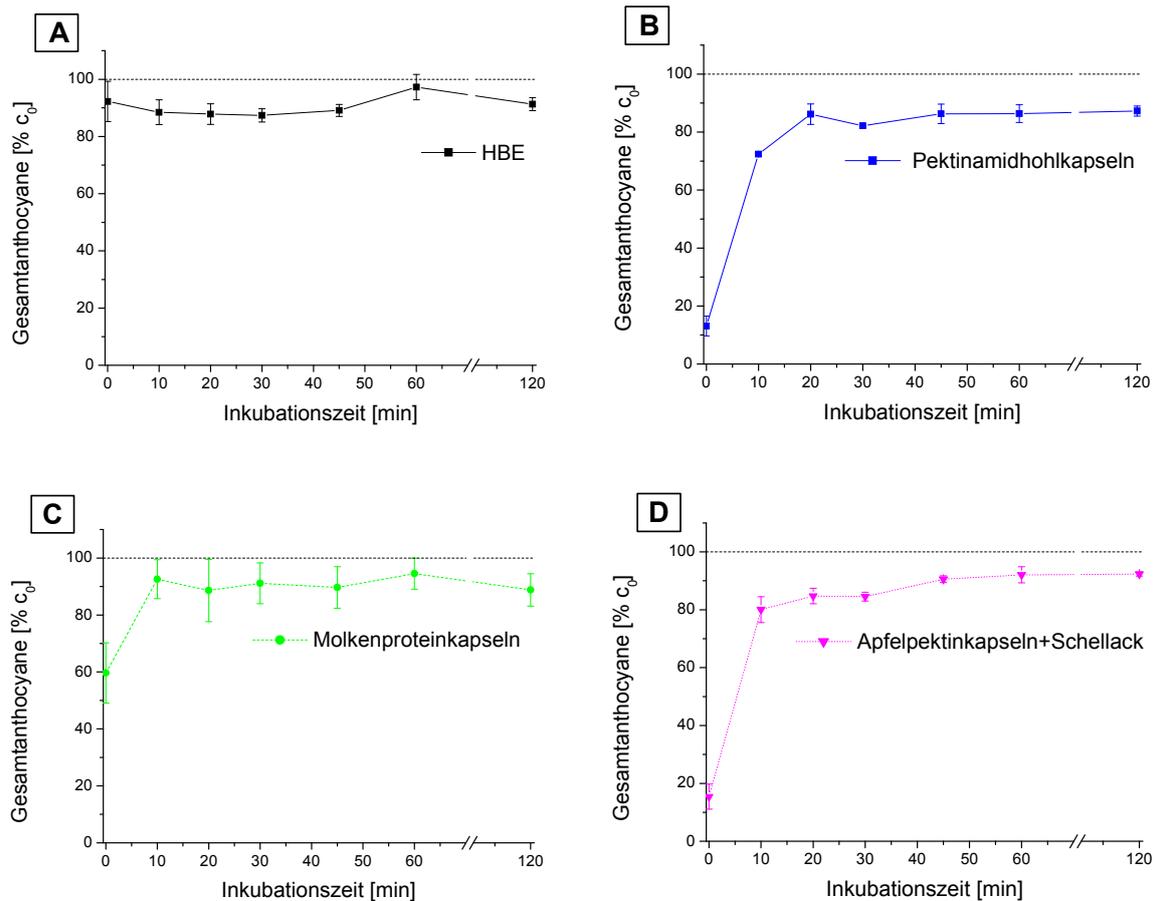


Abb. 7.3: Kontrollierte gastrointestinale Freisetzung und Stabilität der Anthocyane [%] (in vitro) in simuliertem Magensaft (SGF) mit HBE (A) und HBE-beladenen Kapselsystemen (B: Pektinamidhohl-, C: Molkenprotein-, D: Apfelpektinkapseln + Schellack; c<sub>0</sub>: 2.5 mg/ml HBE; als 100% Gesamtanthocyane angegeben). Erfassung der Gesamtanthocyankonzentration mittels HPLC-UV/VIS (520 nm; n = 3, mean ± SD).

## 7.2.2 Dünndarmsimulation

Im Gegensatz zur Magensimulation wurde während der Dünndarmsimulation ein Medium (FeSSIF) mit einem pH-Wert von 6.8 und Zusatz von Enzymen verwendet. In diesem Medium wurden sowohl der HBE als auch die unterschiedlichen HBE-beladenen Kapselsysteme (Pektinamidhohl-, Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln mit Schellackbeschichtung) über einen Zeitraum von 150 min inkubiert. Dabei wurde sowohl eine Abnahme der Anthocyane aus dem HBE als auch aus den HBE-beladenen Kapselpräparaten unabhängig vom Kapseltyp (Pektinamidhohl-, Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln mit Schellackbeschichtung) beobachtet (siehe Abb. 7.4 und Abb. 7.5).

Bei Inkubationen mit HBE erfolgte innerhalb der ersten Minuten (Homogenisieren des simulierten Dünndarmmediums mit dem HBE und Einspannen der Probe in die Apparatur) ein 40%iger Verlust der enthaltenen Anthocyane (siehe Abb. 7.4 (A)). Dies könnte zum einen auf den pH-Wert des Mediums (pH 6.8), zum anderen auf die Zeit, die zur Vorbereitung

benötigt wurde, zurückgeführt werden. Im weiteren Verlauf der Inkubation (150 min) nahm die Anthocyankonzentration stetig ab, was am Ende zu einer Gesamtabnahme von bis zu 80% führte. Die hohen Anthocyanabnahmen können auf den pH-Wert und die Zeit zurückgeführt werden, da aus der Literatur bekannt ist, dass die Stabilität der Anthocyane von diesen Faktoren beeinflusst wird. Es kommt zu einer pH-abhängigen Strukturänderung des Anthocyanmoleküls (chinoiden Base und Chalkon), was dazu führt, dass über die Zeit ein Zerfall zu Phenolsäuren stattfindet [Cavalcanti *et al.*, 2011].

Um eine Aussage über eine mögliche Protein-Anthocyan-Bindung treffen zu können, wurden Untersuchungen mit der für die Molkenproteinkapselherstellung verwendeten Proteinlösung und HBE in FeSSIF durchgeführt. Dazu wurde der HBE mit einer Proteinlösung, die in TP 3 (AG Kulozik) zur Herstellung der Molkenproteinkapseln verwendet wurde, zusammengefügt und anschließend inkubiert. Es zeigte sich, dass eine Stabilisierung der Anthocyane durch Proteine stattfand. Solche Stabilisierungseffekte durch Molkenproteine wurden schon von Viljanen und Mitarbeitern in der Literatur beschrieben [Viljanen *et al.*, 2005]. Sowohl zu Beginn als auch über den gesamten Zeitraum der Inkubation von 150 min wurde im Vergleich zum HBE eine um 30% höhere Anthocyankonzentration ermittelt (siehe Abb. 7.4 (B)).

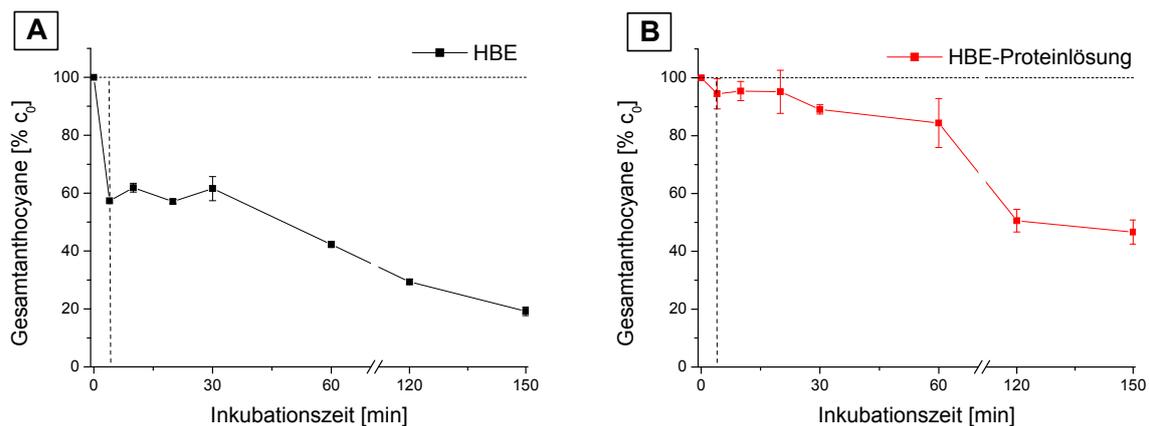


Abb. 7.4: Gastrointestinale Freisetzung und Abnahme der Anthocyane [%] (in vitro) in simuliertem Dünndarminhalt (FeSSIF) mit HBE (A) und HBE-Proteinlösung (B; TP 3) ( $c_0$ : 2.5 mg/ml HBE; als 100% Gesamtanthocyane angegeben). Erfassung der Gesamtanthocyankonzentration mittels HPLC-UV/VIS (520 nm;  $n = 3$ , mean  $\pm$  SD). Die horizontal gestrichelte Linie stellt die Zeit dar, die benötigt wurde, um den HBE bzw. die HBE-Proteinlösung mit FeSSIF zu homogenisieren und anschließend die Probe in die Apparatur einzuspannen.

Bei Studien zur Freisetzung der Anthocyane im simulierten Dünndarminhalt erfolgte innerhalb von 20 min eine schnelle Freisetzung der Anthocyane aus den unterschiedlichen HBE-beladenen Kapselpräparaten (Pektinamidhohl-, Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln mit Schellackcoating) unabhängig vom Kapseltyp (siehe Abb. 7.5). Über den weiteren Zeitraum von 130 min konnte im Vergleich zum HBE eine höhere Konzentration erfasst werden. Auch hier zeigte sich, dass zu Beginn der Inkubation (nach Homogenisieren des simulierten Dünndarmmediums mit den HBE-beladenen Kapselsystemen und Einspannen der Proben in die Apparatur; gestrichelte Linie) schon ca. 20% der eingesetzten Anthocyane

frei vorlagen. Nach 20 min betrug die freigesetzte Anthocyankonzentration aus Pektinamidhohlkapseln 60% und aus Apfelpektinkapseln mit Schellackcoating über 80%. Der Konzentrations-Zeit-Verlauf der Abnahme der Anthocyane im Bezug auf die eingesetzte Konzentration (2.5 mg/ml HBE) aus Molkenproteinkapseln (D) verlief ähnlich, wobei zu Beginn der Inkubation schon fast 60% der Gesamtanthocyane im Medium vorlagen. Am Ende der Inkubationszeit (150 min) lagen im Vergleich der HBE-beladenen Kapselsysteme mit HBE bei gleicher Anfangskonzentration unabhängig vom Kapseltyp 30% mehr Anthocyane vor. Dieser Unterschied könnte durch eine zeitlich verzögerte Freisetzung und einer damit verbundenen Kompensation des Abbaus der Anthocyane erklärt werden.

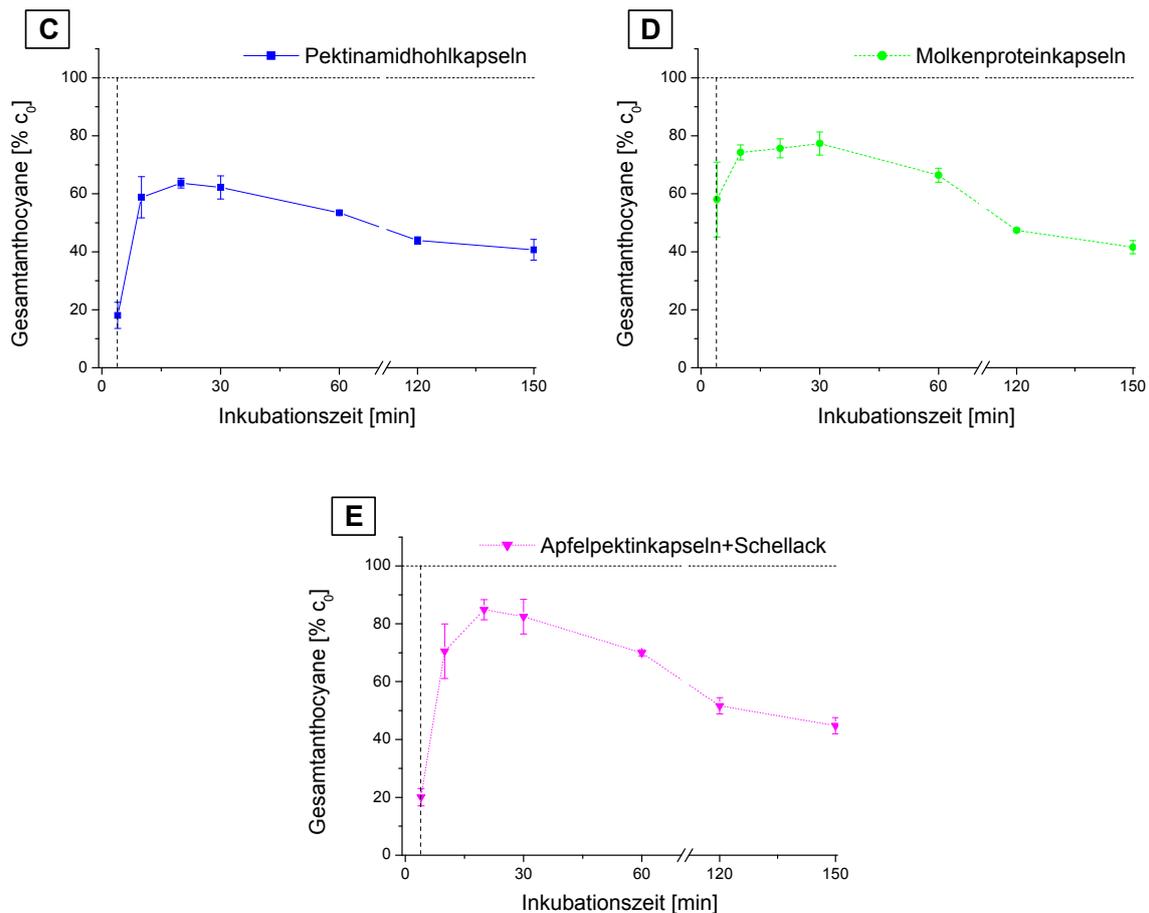


Abb. 7.5: Kontrollierte gastrointestinale Freisetzung und Abnahme der Anthocyane [%] (in vitro) in simuliertem Dünndarminhalt (FeSSIF) mit HBE-beladenen Kapselsystemen (C: Pektinamidhohl-, D: Molkenprotein-, E: Apfelpektinkapseln + Schellack;  $c_0$ : 2.5 mg/ml HBE; als 100% Gesamtanthocyane angegeben). Erfassung der Gesamtanthocyankonzentration mittels HPLC-UV/VIS (520 nm;  $n = 3$ , mean  $\pm$  SD). Die horizontal gestrichelte Linie stellt die Zeit dar, die benötigt wurde, um die HBE-beladenen Kapselsysteme mit FeSSIF zu homogenisieren und anschließend die Probe in die Apparatur einzuspannen.

### 7.2.3 *Ex vivo* Modell (humaner Dünndarminhalt)

Die Verwendung von humanem Dünndarminhalt in einem *ex vivo* Modell stellt eine weitere Möglichkeit dar, Kenntnisse darüber zu gewinnen, inwieweit durch Verkapselungstechniken von Anthocyanen deren Stabilität und Freisetzung im GIT moduliert werden könnten. Dies erfolgte mit humanem Dünndarminhalt, wodurch die *in vivo* Situation im Vergleich zu den simulierten Verdauungsmedien (siehe Kap.6.7.1) näher simuliert wurde. Der Dünndarminhalt wurde von freiwilligen Probanden mit einem künstlichen Dünndarmausgang (terminales Ileum, 3. Abschnitt des Dünndarms, sog. Ileostoma) zur Verfügung gestellt, die sich zuvor für 24 h polyphenolfrei ernährten. Die Dünndarminhalte (Ileostomabeutelinhalte) wurden unter anaeroben Bedingungen in einem Verhältnis von 1:1 mit einem sauerstofffreien Carbonat-Phosphat-Puffer (Begasung mit Helium) vermengt. Dem so erhaltenen Inokulum wurden HBE und HBE-beladene Kapselsysteme zugegeben, über einen Zeitraum von 24 h inkubiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -20 °C gelagert (Durchführung siehe Kap. 6.7.2). Die Analytik der Proben erfolgte mittels HPLC-UV/VIS bzw. HPLC-DAD bei 520 nm (siehe Kap. 6.8).

Aus der Literatur ist bekannt, dass nicht nur der pH-Wert, sondern auch die Anthocyankonzentration einen Einfluss (Selbstassoziation) auf die Stabilität der Anthocyane besitzt (siehe Kap. 2.5) [Castaneda-Ovando et al., 2009; McGhie et al., 2007; Pascual-Teresa et al., 2008]. Daher wurden vergleichende Inkubationen sowohl in Carbonat-Phosphat-Puffer (pH 6.3) als auch mit humanem Dünndarminhalt (pH-Wert 6.3) in unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen an HBE (6, 0.6, 0.06 mg/ml) durchgeführt und unter den für dieses Modell spezifischen Bedingungen inkubiert (siehe Kap. 6.7.2). Für die graphische Auswertung wurde die eingesetzte Ausgangskonzentration an HBE als 100% Gesamtanthocyane (Summe der 15 im HBE enthaltenen Anthocyane) angegeben (siehe Abb. 7.6 bis Abb. 7.8).

Die erhaltenen Ergebnisse der in Carbonat-Phosphat-Puffer durchgeführten Inkubationen sind in Abb. 7.6 dargestellt. Es fällt auf, dass bei allen eingesetzten Konzentrationen (6 (A), 0.6 (B), 0.06 (C) mg/ml HBE) ein kontinuierlicher Anthocyanabbau über die Zeit stattfand. Vergleicht man jedoch die einzelnen Konzentrations-Zeit-Verläufe der Abnahme der Anthocyane im Bezug auf die eingesetzte Konzentration, so zeigt sich, dass in niedriger HBE-Konzentration die Anthocyane wesentlich schneller abgebaut wurden als in höheren HBE-Konzentrationen. In der niedrigsten HBE-Konzentration von 0.06 mg/ml (C) wurde nach 24 h Inkubation im Mittel noch ca. 10% der Ausgangskonzentration erfasst, während in der höchsten eingesetzten Konzentration (6 mg/ml HBE (A)) im Mittel nach 24 h noch ca. 60% nachgewiesen wurde. Für die Konzentration von 0.6 mg/ml HBE (B) wurde ein Ergebnis erzielt, dass mit der Inkubation von 6 mg/ml HBE vergleichbar war; am Ende der Inkubation konnte im Mittel noch ca. 40% erfasst werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die Konzentration der Anthocyane deren Stabilität beeinflusst und somit deren Abbau verzögert werden kann. Je höher die Anthocyankonzentration war, desto mehr HBE wurde eingesetzt und um so wahrscheinlicher ist es, dass Wechselwirkungen der Anthocyane untereinander (Selbstassoziation) oder mit Extraktbestandteilen (Copigmentierungseffekte) auftraten

[Castaneda-Ovando *et al.*, 2009]. Diese Wechselwirkungen könnten dazu führen, dass eine Stabilisierung im höheren Konzentrationsbereich nachgewiesen wurde.

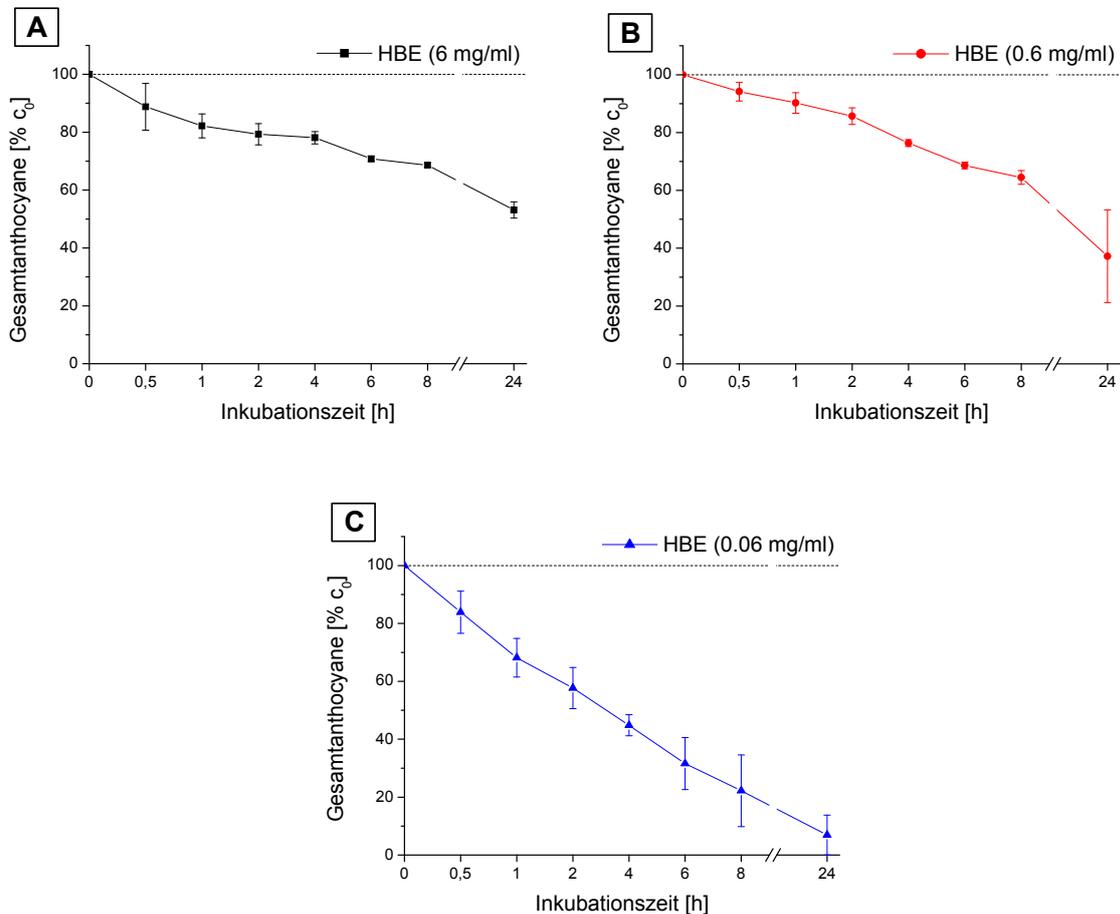


Abb. 7.6: Abnahme der Gesamtmenge an Anthocyane [%] des HBE in unterschiedlichen Konzentrationen ( $c_0$ : 6 mg/ml (A), 0.6 mg/ml (B), 0.06 mg/ml (C) HBE; die jeweilige Ausgangskonzentration wurde als 100% Gesamtanthocyane angegeben, Carbonat-Phosphat-Puffer, 24 h, 37 °C, anaerobe Bedingungen; Zusammensetzung siehe Kap. 6.7.2.2. Erfassung der Gesamtanthocyankonzentration mittels HPLC-DAD (520 nm;  $n = 2$ ,  $\text{mean} \pm \text{Range}$ ).

Die Konzentrations-Zeit-Verläufe der Anthocyane des HBE (6 (D), 0.6 (E), 0.06 (F) mg/ml HBE) in humanem Dünndarminhalt sind in Abb. 7.7 gezeigt. Es wird deutlich, dass auch bei diesen Studien eine stetige Abnahme der Anthocyankonzentration zu beobachten war. Dabei zeigte sich, dass bei der höchsten eingesetzten Konzentration (6 mg/ml HBE (D)) am Ende der Inkubation nach 24 h noch ca. 30% und bei den Inkubationen mit den Konzentrationen (0.6 (E) und 0.06 (F) mg/ml HBE) weniger als 10% nachgewiesen wurden. Ein Vergleich dieser Kurvenverläufe mit den in Carbonat-Phosphat-Puffer (siehe Abb. 7.6) durchgeführten Inkubationen zeigte, dass bei allen Konzentrationen eine schnellere Abnahme der Gesamtanthocyankonzentration im System stattfand. Dadurch ergaben sich Hinweise, dass ein anaerober Abbau der Anthocyane durch intestinale Enzyme oder mikrobielle Enzymaktivität zusätzliche Auswirkungen auf deren Stabilität im Dünndarm haben könnten. In zahlreichen

Studien wurde beobachtet, dass die Mikroflora des Dünndarms in der Lage ist, Anthocyane abzubauen oder zu metabolisieren [Kay, 2006; Keppler et al., 2005; McGhie et al., 2007].

Die mit humanem Dünndarminhalt durchgeführten Inkubationen mit HBE in unterschiedlichen Konzentrationen erlauben weder eine Aussage zum Ausmaß der Resorption durch die Darmmukosa noch zum Einfluss des oberen Verdauungstrakts auf die Verfügbarkeit der Heidelbeeranthocyane.

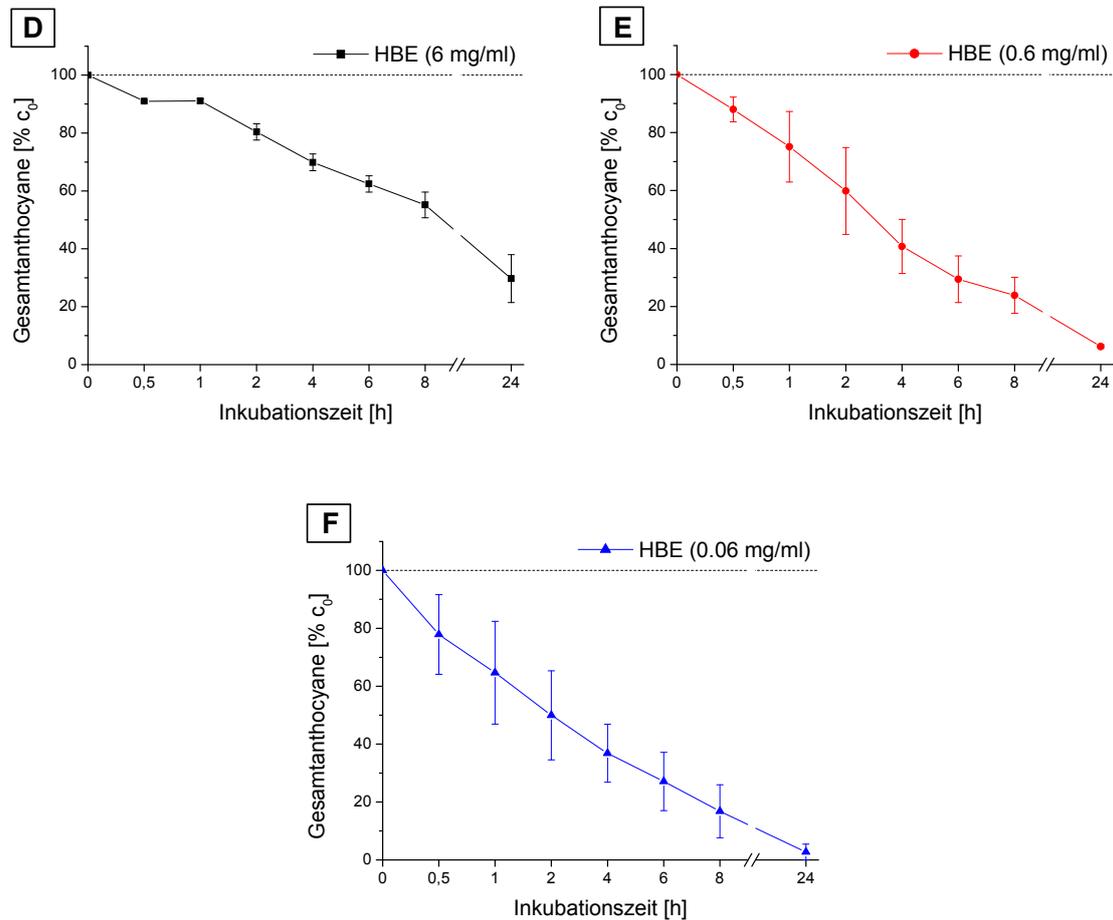


Abb. 7.7: Abnahme der Anthocyane des HBE in unterschiedlichen Konzentrationen ( $c_0$ : 6 mg/ml (D), 0.6 mg/ml (E), 0.06 mg/ml (F) HBE; die jeweilige Ausgangskonzentration wurde als 100% Gesamtanthocyane angegeben, humaner Dünndarminhalt, 24 h, 37 °C, anaerobe Bedingungen). Erfassung der Gesamtanthocyankonzentration mittels HPLC-DAD (520 nm;  $n = 2$ , mean  $\pm$  Range).

Im folgenden Abschnitt wird näher auf die Inkubationen mit unterschiedlichen HBE-beladenen Kapselsystemen (siehe Kap. 6.3) und humanem Dünndarminhalt bei einer Konzentration von 6 mg/ml HBE (als 100% Gesamtanthocyane angegeben) eingegangen. In den folgenden Abbildungen sind zum einen die Freisetzung der Anthocyane aus den Kapselsystemen mit Dünndarminhalt (Überstand, blau-schwarz) und zum anderen der Gehalt an Anthocyanen, der in der Kapsel verbleibt (Rückstand, rot) dargestellt. Weiterhin wurde die Summe der Anthocyane aus Überstand und Rückstand gebildet (grün). Diese spiegelt die Gesamtmenge an Anthocyanen im System wieder. Es zeigte sich, dass

unabhängig vom Kapseltyp (Pektinamidhohl- (G), Molkenprotein- (H) und Apfelpektinkapseln (I)), vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden. So wurde eine relativ konstante Konzentration im Überstand über einen Zeitraum von 8 h durch eine kontinuierliche Freisetzung der verkapselten Anthocyane bei allen Kapseltypen beobachtet. Aus diesem Grund (kontinuierliche Freisetzung der Anthocyane aus den Kapseln) nahm die Anthocyankonzentration im Rückstand (HBE-Beladung des Kapselsystems) über den gesamten Zeitraum (24 h) stetig ab (siehe Abb. 7.8). Dass unabhängig von der Verkapselung eine stetige Abnahme der Gesamtanthocyane im System stattfand, spiegelt die grün dargestellte Kurve wieder, welche bei Inkubationen mit Pektinamidhohl- (G) und Molkenproteinkapseln (H) am Ende der Inkubation (24 h) unter 10% der eingesetzten Ausgangsmenge lag. Im Gegensatz dazu wurde bei Inkubationen mit Apfelpektinkapseln (I) noch ca. 20% der Ausgangsmenge nachgewiesen.

Der Vergleich der drei eingesetzten, mit HBE-beladenen Kapselsystemen zeigte, dass die Freisetzung der Anthocyane aus Apfelpektinkapseln nach 2 h ein Maximum von 40% Gesamtanthocyane erreicht und erst im weiteren Verlauf der Inkubation eine Abnahme um 20% (24 h) erfolgte. Die Konzentrations-Zeit-Verläufe der HBE-beladenen Molkenprotein- und Pektinamidhohlkapseln verlaufen untereinander ähnlich, wobei nach 1 h eine Konzentration erreicht wurde, die 20% der Gesamtanthocyankonzentration in den eingesetzten Kapseln entsprach und über 7 h nahezu konstant blieb.

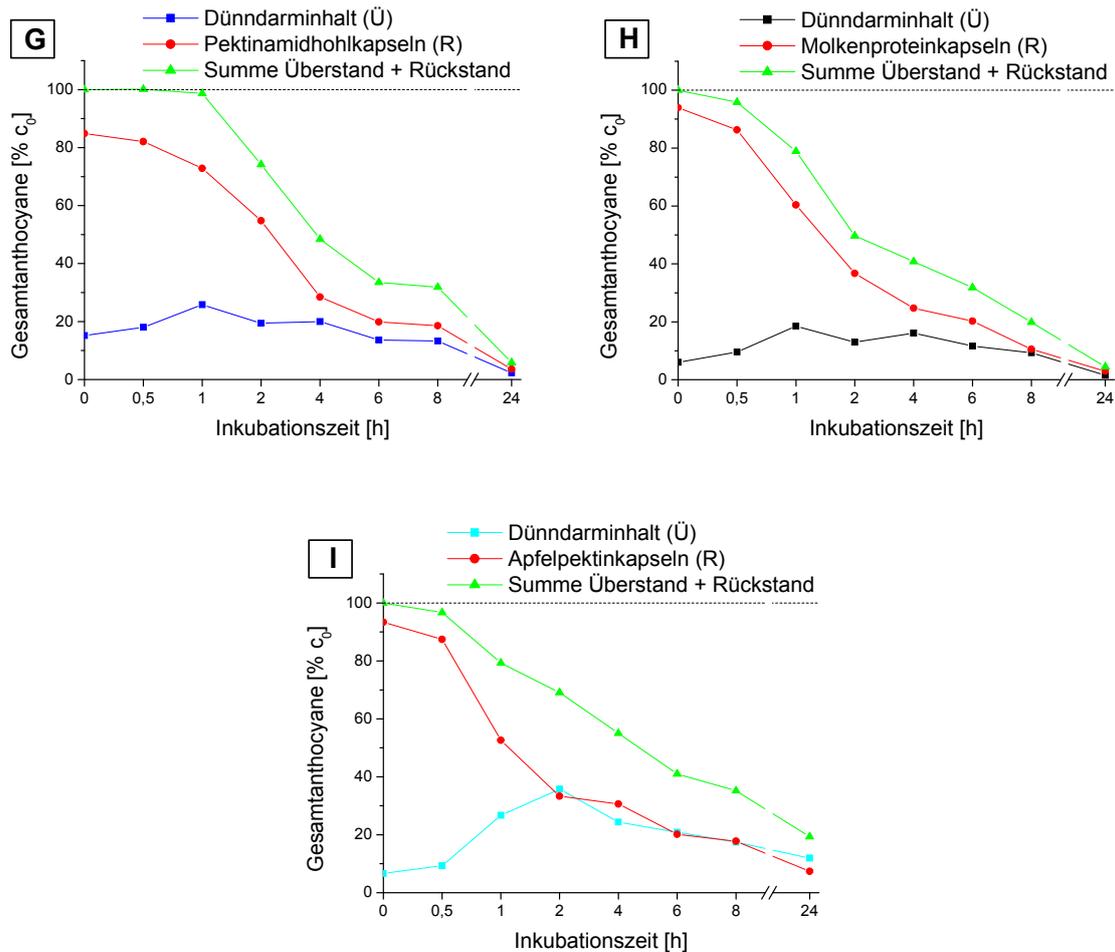


Abb. 7.8: Gesamtmenge der Anthocyane [%] aus Überstand und Kapselsystem (Rückstand) der Pektinamidhohl- (G), Molkenprotein- (H) und Apfelpektinkapseln (I) ( $c_0$ : 6 mg/ml; als 100% Gesamtanthocyane angegeben; humaner Dünndarminhalt, 24 h, 37 °C, anaerobe Bedingungen); Ü = Überstand, R = Rückstand. Erfassung der Gesamtanthocyankonzentration mittels HPLC-UV/VIS (520 nm;  $n = 2$ , mean  $\pm$  Range).

### 7.3 Stabilität der Anthocyane des HBE im Zellkulturmedium

Um die in Kap. 7.5 aufgeführten Bioaktivitätsstudien korrekt interpretieren zu können, war es wichtig, Kenntnisse über die Stabilität der Anthocyane unter Zellkulturbedingungen über einen Zeitraum von 24 h zu gewinnen. Aus diesem Grund wurde die Konzentrationsabnahme der Anthocyane aus HBE, die von TP 1 (AG Winterhalter) zur Verfügung gestellte Anthocyanfraktion (siehe Kap. 6.2) und ausgewählte Anthocyan-Reinsubstanzen vergleichend in Zellkulturmedium über 24 h inkubiert und mittels HPLC-UV/VIS quantifiziert (Methode siehe Kap. 6.6).

Im ersten Schritt wurde überprüft, in wieweit die verwendete Zelllinie Caco-2 einen Einfluss auf die Stabilität der Anthocyane des HBE im Zellkulturmedium hat. Hierfür wurde HBE in einer Konzentration von 500 µg/ml (als 100% Gesamtanthocyane angegeben) im Zellkulturmedium gelöst und mit bzw. ohne Zellen inkubiert (siehe Abb. 7.9 (A)(B)). Werden die beiden Abbaukurven miteinander verglichen, so zeigt sich, dass ein ähnlicher Verlauf bei der Inkubation mit und ohne Zellen beobachtet werden konnte. Ohne Zellen wurden nach 1 h 86% ± 6% und mit Zellen 85% ± 4% der eingesetzten Anthocyane wiedergefunden. Im weiteren Verlauf der Inkubation nahm die Gesamtanthocyankonzentration stark ab, wobei am Ende (24 h) ohne Zellen noch 4% ± 0.6% und mit Zellen noch 9% ± 0.4% nachgewiesen wurden. Der Konzentrationsanstieg nach 15 min kann dadurch erklärt werden, dass die eingesetzte Konzentration von 500 µg/ml HBE gleich 100% Gesamtanthocyane gesetzt wurde, ohne den Wert analytisch gemessen zu haben. Der relativ schnelle Abbau der Anthocyane in gepuffertem Medium (pH 7.4) innerhalb von 24 h steht im Einklang mit den Ergebnissen von [Woodward *et al.*, 2009].

Aufgrund der Tatsache, dass die Anwesenheit von Caco-2 Zellen die Stabilität der Anthocyane nicht beeinflusste, wurden alle weiteren Versuche (Abb. 7.9 (C) und Abb. 7.10 (D-G)) im zellfreien Milieu durchgeführt. Die sog. „Anthocyanfraktion“, die zu einem Anteil von 60.6% im HBE enthalten ist (siehe Kap. 6.2), wurde ebenfalls im Zellkulturmedium inkubiert. Dadurch sollte überprüft werden, inwieweit die Bestandteile des HBE im Vergleich zur Anthocyanfraktion einen Einfluss auf die Stabilität der Anthocyane besitzen. Es stellte sich heraus, dass nach 1 h noch 64% ± 6% und nach 24 h noch 1.3% ± 0.8 der eingesetzten Anthocyane nachgewiesen werden konnten. Im Vergleich zum HBE (86% ± 6%) fand in der ersten Stunde eine schnellere Abnahme der Anthocyane statt, wobei nach beendeter Inkubation (24 h) vergleichbare Ergebnisse zum HBE (4% ± 0.6%) erhalten wurden. Dies lässt den Schluss zu, dass Inhaltsstoffe des HBE dazu beitragen, die Anthocyane - zumindest innerhalb der ersten Stunde - zu stabilisieren bzw. vor einem frühzeitigen Abbau zu schützen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Copigmentierungseffekte zwischen Anthocyanen und im Extrakt enthaltenen Phenolsäuren hierbei eine größere Rolle spielen könnten als Wechselwirkungen der Anthocyane untereinander (Selbstassoziation) [Castaneda-Ovando *et al.*, 2009].

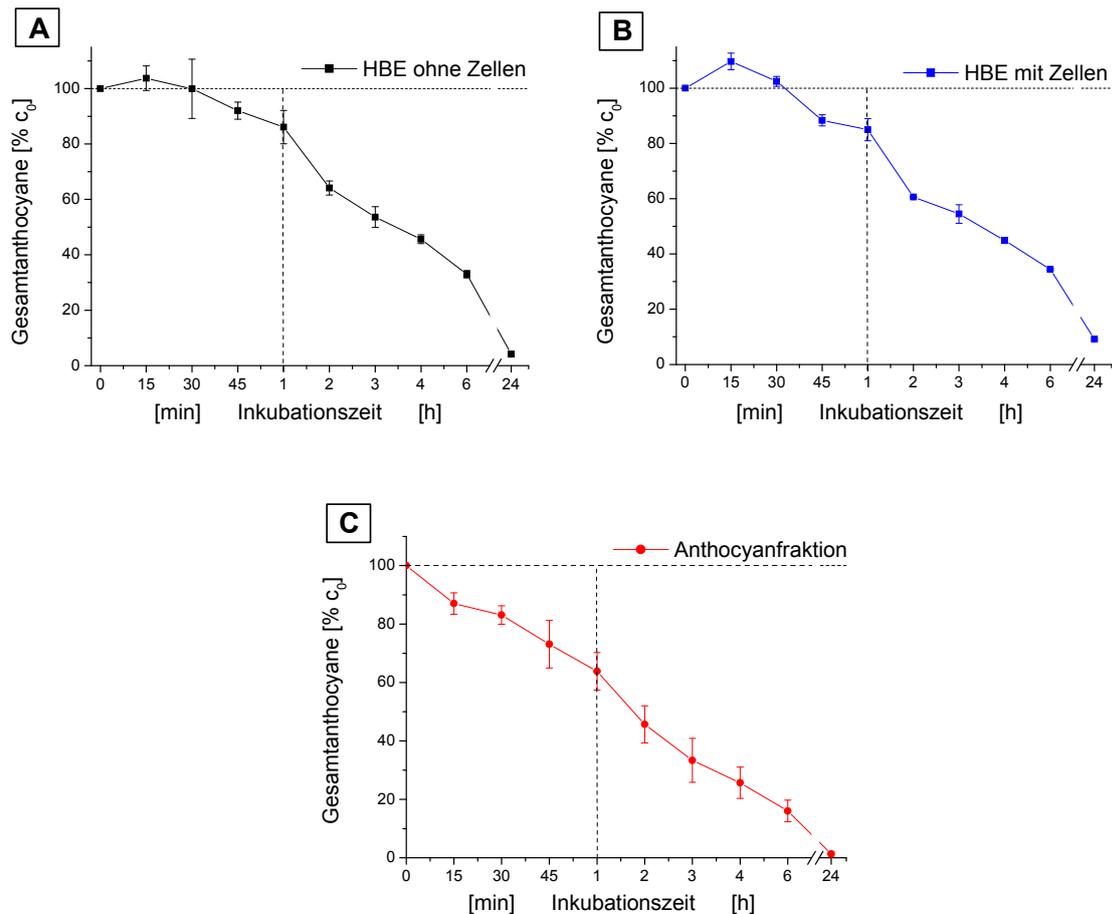


Abb. 7.9: Abnahme der Anthocyane des HBE ohne Zellen (A), mit Zellen (B) und der Anthocyanfraktion anteilmäßig am HBE (60.6 %) (C) in den Konzentrationen ( $c_0$ : 500  $\mu\text{g/ml}$  HBE, 303  $\mu\text{g/ml}$  Anthocyanfraktion; eingesetzte Konzentration wurde als 100% Gesamtanthocyane angegeben), Zellkulturmedium, 24 h, 37 °C, Zellkulturbedingungen). Erfassung der Gesamtanthocyankonzentration mittels HPLC-UV/VIS (520 nm;  $n = 2-3$ , mean  $\pm$  SD).

In dem folgenden Abschnitt wird auf die Stabilität einzelner Anthocyane (Cy-3-glc und Cy-3-gal) nach Inkubationen mit HBE (D, E) und mit Einzelsubstanzen (F, G) in Abb. 7.10 eingegangen. Es ist zu erkennen, dass sich der Abbau von Cy-3-glc und Cy-3-gal aus HBE nicht voneinander unterscheidet. Über einen Zeitraum von 1 h verblieben die Anthocyanmengen im Zellkulturmedium relativ stabil, wohingegen nach 24 h Inkubation unter 10% der eingesetzten Anthocyankonzentrationen wiedergefunden wurden (siehe Abb. 7.10 (D)(E)). Um mögliche Effekte von Inhaltsstoffen des HBE auf die Stabilität der Anthocyane im Zellkulturmedium ausschließen zu können, wurden weitere Inkubationen mit Anthocyan-Reinsubstanzen (4fach höhere Konzentration als im HBE) in Zellkulturmedium unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die erhaltenen Ergebnisse mit denen der Anthocyane aus HBE vergleichbar waren (siehe Abb. 7.10 (F)(G)). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei Inkubationen mit den Reinsubstanzen, aufgrund der 4fach höheren Ausgangskonzentration, Wechselwirkungen der Anthocyanmoleküle untereinander stattfanden. Demgegenüber könnten bei Inkubationen mit HBE

sowohl Wechselwirkungen der Anthocyane untereinander (Selbstassoziation) als auch mit anderen Inhaltsstoffen (Copigmentierungseffekt) stattgefunden haben [Castaneda-Ovando *et al.*, 2009]. Zusätzlich wurde durch die Inkubationen der Reinsubstanzen (Cy-3-glc und Cy-3-gal) gezeigt, dass die Art der Zuckerkonjugation (Glukosid oder Galaktosid) keinen Einfluss auf die Stabilität im Zellkulturmedium hatte.

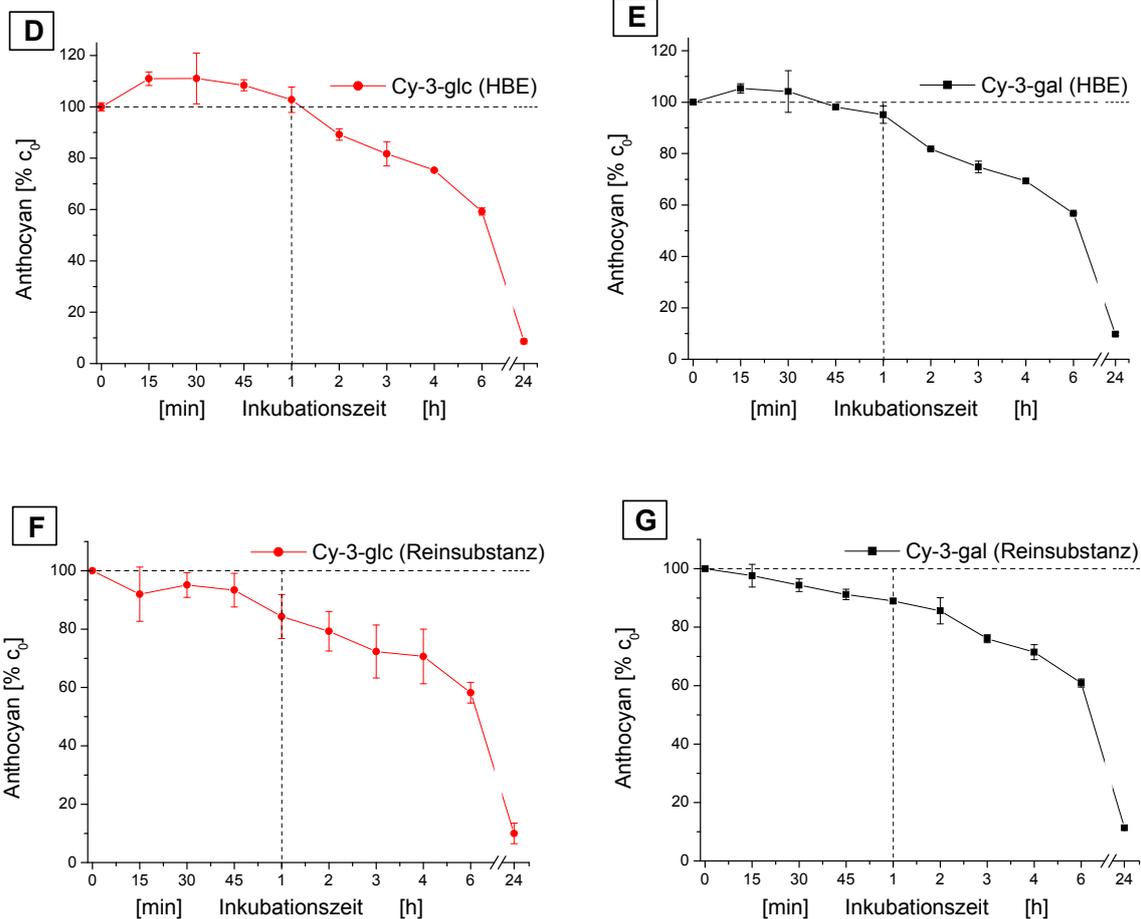


Abb. 7.10: Abnahme der Konzentration von Cy-3-glc und Cy-3-gal des HBE (D)(E) und der Reinsubstanzen (Anteil im HBE enthalten: Cy-3-glc: 4.62 %; Cy-3-gal: 2.78 %) (F)(G) in den Konzentrationen ( $c_0$ : 500  $\mu\text{g/ml}$  HBE, Cy-3-glc: 92<sup>2</sup>  $\mu\text{g/ml}$ ; Cy-3-gal: 55<sup>2</sup>  $\mu\text{g/ml}$  Reinsubstanz; eingesetzte Konzentration wurde als 100% Anthocyan angegeben), Zellkulturmedium, 24 h, 37 °C, Zellkulturbedingungen). Erfassung der Anthocyankonzentration mittels HPLC-UV/VIS (520 nm;  $n = 2-3$ , mean  $\pm$  SD).

Um einen besseren Vergleich zu gewährleisten, wurden in Abb. 7.11 alle Anthocyan-Glukoside, die im HBE enthalten waren (Del-3-glc: 4.68% (23.4  $\mu\text{g/ml}$ ); Cy-3-glc: 4.62% (23.1  $\mu\text{g/ml}$ ); Pet-3-glc: 1.86% (9.3  $\mu\text{g/ml}$ ); Peo-3-glc: 0.8% (4  $\mu\text{g/ml}$ ) und Mal-3-glc: 1.45% (7.25  $\mu\text{g/ml}$ )), aufgetragen. Hierzu wurde die entsprechende im HBE enthaltene Glukosidkonzentration für jedes Anthocyan gleich 100% gesetzt. Es wird deutlich, dass der Abbau bzw. die Abbaugeschwindigkeit vom Aglykon, aber nicht vom glykosidisch gebunden

<sup>2</sup> Die gewählte Einwaage entspricht der 4fachen Konzentration des jeweiligen Anthocyan im HBE, da am Ende der Inkubation noch eine gravimetrische Bestimmung des unlöslichen Rückstands stattfand.

Zucker (siehe obiger Abschnitt und Abb. 7.10), abhängig war. Nach 1 h Inkubation waren von Cy-3-glc, Peo-3-glc und Mal-3-glc noch ca. 100%, von Pet-3-glc 82% und von Del-3-glc lediglich 72% der eingesetzten Anthocyane vorhanden. Deutlicher wird der Unterschied, wenn die Konzentration nach 6 h Inkubation betrachtet wird. Zu diesem Zeitpunkt wurden für die zuerst genannten Anthocyane noch ca. 60% nachgewiesen, wohingegen für Pet-3-glc 20% und für Del-3-glc weniger als 5% detektiert wurden. Somit ergab sich folgende Reihenfolge der Konzentrationsabnahme für die unterschiedlichen Anthocyanoglukoside: Del > Pet > Mal > Peo > Cy. Ein Vergleich mit Literaturdaten zeigte, dass bei Inkubationen mit den Anthocyanidinen in Zellkulturmedium ein Abbau wie folgt stattfand: Del > Cy  $\approx$  Mal > Peo > Pet [Kern *et al.*, 2007].

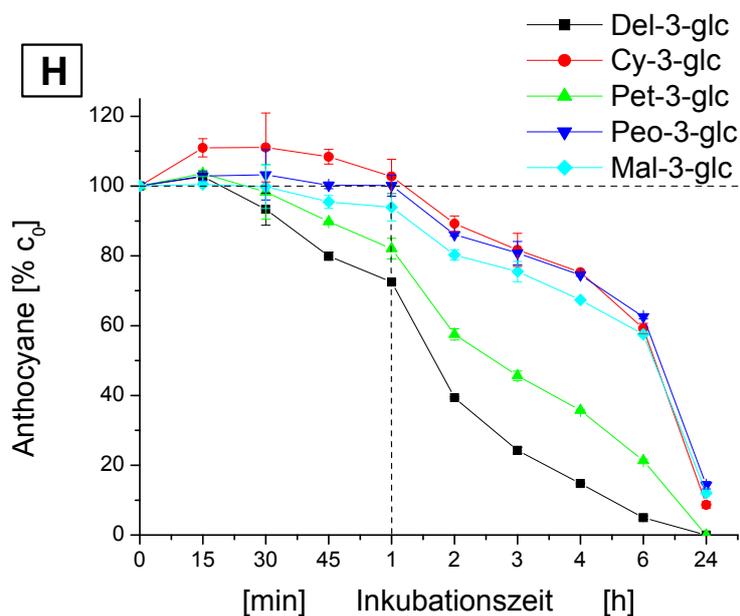


Abb. 7.11: Vergleich der Konzentrationsabnahmen aller im HBE (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) enthaltenen Anthocyanoglukoside (Del-3-glc: 4.68% (23.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); Cy-3-glc: 4.62% (23.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); Pet-3-glc: 1.86% (9.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); Peo-3-glc: 0.8% (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und Mal-3-glc: 1.45% (7.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); Für die Grafik wurde die im HBE enthaltene Glukosid Konzentration für jedes einzelne Anthocyan gleich 100% gesetzt (Zellkulturmedium, 24 h, 37 °C, Zellkulturbedingungen). Erfassung der Anthocyankonzentration mittels HPLC-UV/VIS (520 nm;  $n = 2-3$ , mean  $\pm$  SD).

## 7.4 Bestimmung des unlöslichen Rückstands

Wie in Kap. 7.3 dargestellt, unterliegen die Anthocyane des HBE, der Anthocyanfraktion und der Reinsubstanzen im Zellkulturmedium bei pH 7.4 innerhalb von 24 h einem Abbau (siehe Abb. 7.9 und Abb. 7.10). Diese Ergebnisse sind mit der Literatur vergleichbar, wobei in einigen *in vitro* Studien zusätzlich zu der Konzentrationsabnahme der Anthocyane noch die Abbauprodukte bestimmt wurden [Dai *et al.*, 2009; Woodward *et al.*, 2009]. Zum einen wurde die Bildung von Phloroglucinolaldehyd (identisch für alle Aglyka, aus dem A-Ring) und zum anderen die Bildung einer für das jeweilige Anthocyanidin korrespondierenden Carbonsäure (aus dem B-Ring) beobachtet [Fleschhut *et al.*, 2006]. Dabei wurde festgestellt, dass die neu entstandene Menge an Phenolsäuren lediglich einem geringen Anteil der Anthocyanverluste entsprach. Aus Cy-3-glc (100%) bildete sich im Verlauf von 24 h in gepuffertem Medium 9% Protocatechusäure und 3% Phloroglucinolaldehyd. Demgegenüber entstand aus Del-3-glc (100%) lediglich 2% Gallussäure und 0.6% Phloroglucinolaldehyd [Woodward *et al.*, 2009]. *In vivo* wird derzeit jedoch davon ausgegangen, dass 73% des eingesetzten Cy-3-glc (71 mg) sofort zu Protocatechusäure abgebaut wird. Um zu überprüfen, was außer Carbonsäuren *in vitro* aus den einzelnen Anthocyanen gebildet werden könnte, wurde eine gravimetrische Bestimmung des Rückstands nach einer Inkubationszeit von 24 h durchgeführt.

### 7.4.1 Bestimmung des unlöslichen Rückstands aus HBE und Anthocyanfraktion

Die Konzentrationsabnahme der Anthocyane des HBE (500 µg/ml) in Zellkulturmedium ist in Abb. 7.9 (A) dargestellt und wurde in Kap. 7.3 ausführlich erläutert. Es zeigte sich, dass innerhalb von 24 h 95.7 % der eingesetzten Anthocyane abgebaut wurden. Durch eine weitere Aufarbeitung der Inkubationsproben (laut Protokoll, siehe Kap. 6.6) konnte eine Neubildung von 8.4% eines unlöslichen Rückstands (Bezug zur Einwaage des HBE) durch gravimetrische Bestimmung des gefriergetrockneten Rückstands beobachtet (siehe Abb. 7.12 (A)). Bei Inkubationen mit der Anthocyanfraktion (dem Anteil am HBE (60.6%) entsprechend) wurde ebenfalls ein rascher Abbau innerhalb von 24 h um 98.7% der eingesetzten Anthocyane detektiert. Hierbei konnte eine Rückstandsmenge von 9.1% der eingesetzten Anthocyanmenge bestimmt werden (siehe Abb. 7.12 (B)). Ein Vergleich der Mengen aus HBE und Anthocyanfraktion zeigte, dass sich die Anteile, im Bezug zur Einwaage, nicht signifikant unterschieden.

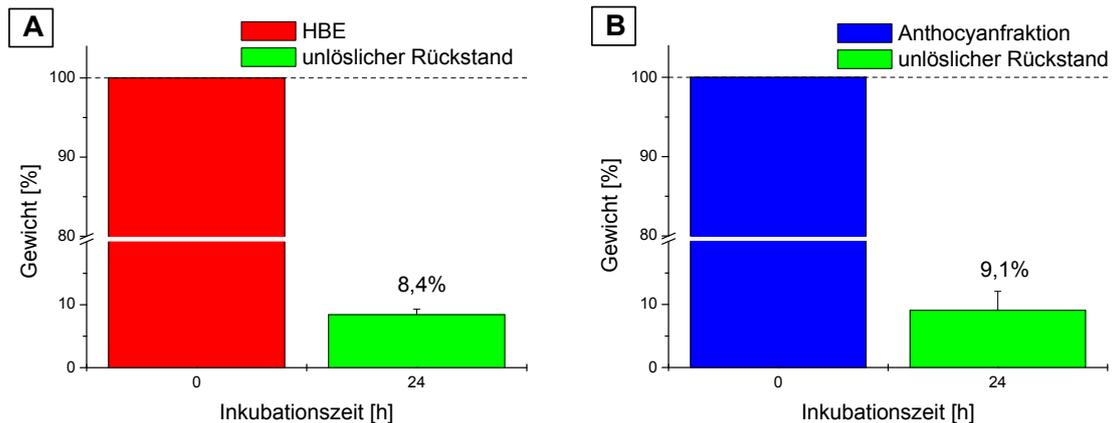


Abb. 7.12: Gewichtsprozente [%] eines unlöslichen Rückstands im Vergleich zum Ausgangsgewicht der Anthocyane aus HBE (A) und Anthocyanfraktion (B) nach 24 h Inkubation im Zellkulturmedium (pH 7.4);  $n = 3$ ,  $\text{mean} \pm \text{SD}$ .

## 7.4.2 Bestimmung des unlöslichen Rückstands aus Cy-3-glc und Cy-3-gal

In Abb. 7.13 ist die gravimetrische Bestimmung des unlöslichen Rückstands nach Inkubation mit den Reinsubstanzen Cy-3-glc (C) und Cy-3-gal (D) dargestellt. Im Bezug zur eingesetzten Menge wurde nach 24 h Inkubation 33.2% für Cy-3-glc und 30.1% für Cy-3-gal unlöslicher Rückstand nachgewiesen. Damit lag der Anteil des Rückstands von Cy-3-glc etwas höher im Vergleich zu Cy-3-gal. Wird zusätzlich ein Vergleich der noch intakten Anthocyan-Reinsubstanz angestellt so zeigt sich, dass nach 24 h Inkubation 90.1 % Cy-3-glc und 88.7 % Cy-3-gal abgebaut wurden (siehe Abb. 7.10 (F)(G)).

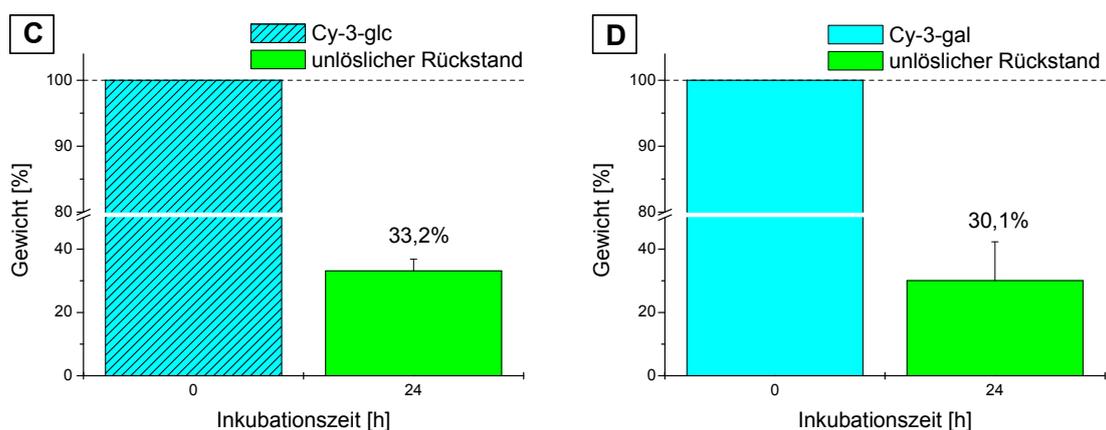


Abb. 7.13: Gewichtsprozente [%] eines unlöslichen Rückstands im Vergleich zur Ausgangsmenge an Cy-3-glc (C) und Cy-3-gal (D) nach 24 h Inkubation im Zellkulturmedium (pH 7.4);  $n = 3$ ,  $\text{mean} \pm \text{SD}$ .

## 7.5 Biologische Wirksamkeit des HBE und HBE-Subfraktionen im Vergleich zu HBE-beladenen Kapselpräparaten in der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2

Mittels *in vitro* Experimenten an humanen Darmzellen (Caco-2) sollte geprüft werden, ob Verkapselungstechniken und die dabei eingesetzten Materialien einen Einfluss auf die biologische Wirksamkeit der Anthocyane haben. Weiterhin wurde untersucht, welche einzelne Subfraktion des HBE für dessen biologische Wirksamkeit verantwortlich sein könnte. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse in den Untersuchungen zur Stabilität der Anthocyane des HBE im Zellkulturmedium wurden Inkubationszeitpunkte von 1 und 24 h gewählt. Der frühe Zeitpunkt wurde aufgrund der Tatsache gewählt, dass der Großteil der Anthocyane noch nicht abgebaut wurde (siehe Kap. 7.3 über 85% der eingesetzten Menge noch vorhanden), und der spätere Zeitpunkt, um die Langzeitwirkung bzw. die Wirkung der Abbauprodukte zu untersuchen.

Eine biologische Wirksamkeit der Anthocyane in biologischen Systemen wurde mittels folgender Assays charakterisiert:

- Alamar Blue Assay (Erfassung der mitochondrialen Aktivität der Zellen)
- DCF-Assay (Detektion intrazellulärer ROS)
- GSH-Status (Photometrische Messung der Menge an GSH in den Zellen)
- Comet Assay (Bestimmung oxidativer DNA-Schäden)

Um in den gewählten Testsystemen durch Anthocyane des HBE, der HBE-beladenen Kapselpräparationen und der HBE-Subfraktionen Effekte nachweisen zu können, wurde ein zweistufiges Inkubationsprotokoll (außer bei Testung im Alamar Blue Assay) verwendet:

1. Stufe: Behandlung der Zellen (Caco-2) mit den HBE-beladenen Kapselpräparaten, HBE-Extrakt oder HBE-Subfraktionen.

2. Stufe: Induktion von oxidativem Stress durch Oxidantien (Menadion: Md; tert-Butylhydroperoxid: TBH).

### 7.5.1 Testung auf Zellvitalität (Alamar Blue Assay)

Zur Erfassung der Zellproliferation und zytotoxischer Effekte wurde der Alamar Blue Assay verwendet. Es handelt sich hierbei um einen Farbreaktionstest, bei dem die Reduktion von Resazurin zu Resorufin in direktem Verhältnis zu metabolischen Intermediaten erfasst wurde. Diese Intermediate sind in proliferierenden Zellen im Gegensatz zu nicht proliferierenden Zellen erhöht. Somit war es möglich, durch eine Absorptionzunahme eine Aussage über die Vitalität der Zellen (Caco-2) zu treffen (siehe Kap. 6.5.1).

Bei allen durchgeführten Inkubationen wurde als Negativkontrolle das Zellkulturmedium und als Positivkontrolle 0.1% Saponin mitgeführt. Die Kontrollen dienten dazu, die Reproduzierbarkeit des Assays zu überprüfen (siehe 6.5.1).

#### **7.5.1.1 Testung des HBE und der HBE-Subfraktionen**

Bei der Erfassung zytotoxischer Effekte wurden nach 1 h Inkubationen mit HBE, über den kompletten Konzentrationsbereich von 10 - 500 µg/ml, keine Effekte auf die mitochondriale Aktivität (Zellvitalität) in Caco-2 Zellen nachgewiesen (siehe Abb. 7.14 (A)). Um mögliche Effekte der einzelnen Subfraktionen des HBE auf die Zellvitalität identifizieren zu können, wurden Anthocyan- (B), Phenolcarbonsäure- (C) und Polymerfraktion (D) (siehe Abb. 7.14) vom TP 1 (AG Winterhalter) zur Verfügung gestellt (siehe Kap. 6.2). Diese Untersuchungen mit HBE-Subfraktionen wurden durchgeführt, da sich ein Effekt der einzelnen Fraktion im Gesamtextrakt, aufgrund der komplexen Zusammensetzung und möglicher Wechselwirkungen der Fraktionen miteinander, auslöschen könnte. Des Weiteren sollte ein zytotoxischer Einfluss für die eingesetzten Zellen in den weiteren Testsystemen ausgeschlossen werden. Die drei Fraktionen wurden ihrem Anteil an HBE entsprechend mit Caco-2 Zellen inkubiert (siehe Tab. 6.5). Es zeigte sich, dass weder durch Inkubationen mit der Phenolcarbonsäure- und Anthocyanfraktion noch mit der Polymerfraktion über den getesteten Konzentrationsbereich (10 - 500 µg/ml HBE) zytotoxische Effekte auf Caco-2 Zellen beobachtet wurden. Somit erwiesen sich die HBE-Subfraktionen als nicht zytotoxisch im Caco-2 Zellmodell (siehe Abb. 7.14).

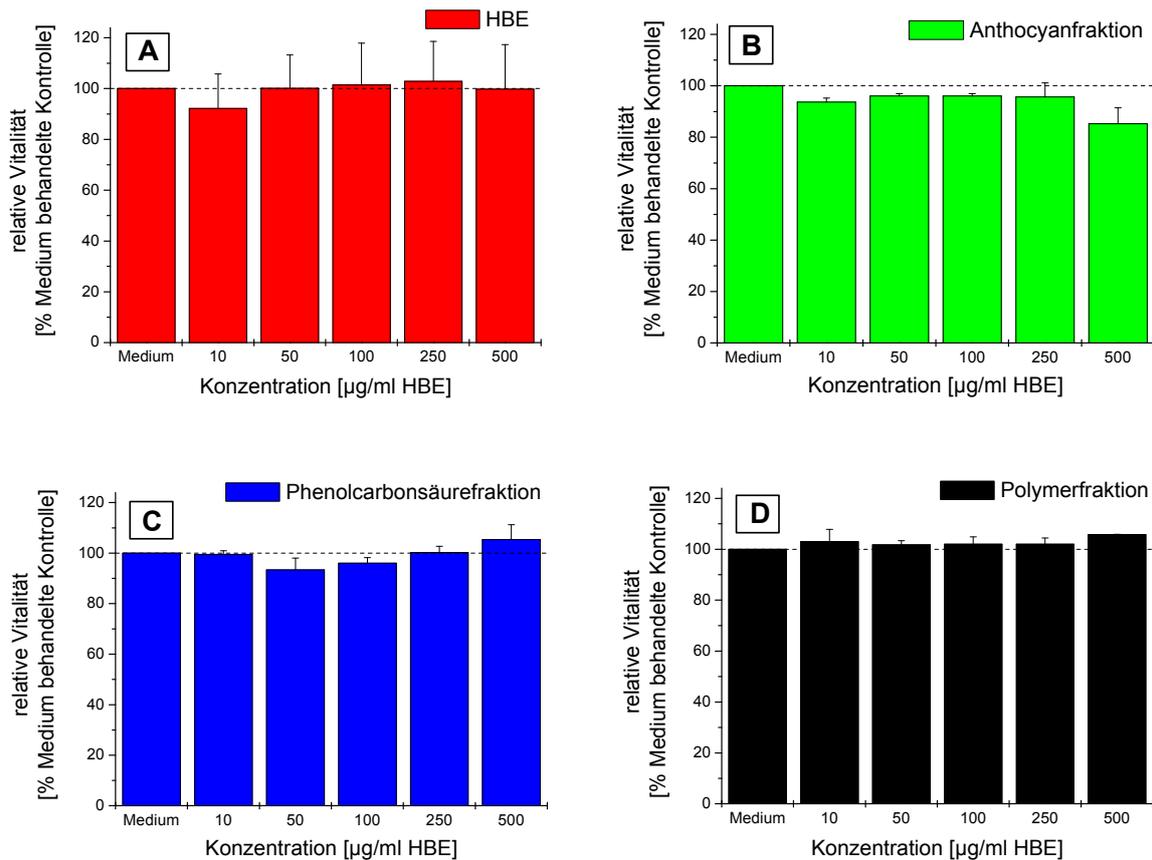


Abb. 7.14: Testung auf zytotoxische Effekte in Caco-2 Zellen nach 1 h Inkubation mit HBE (A) und den drei HBE-Subfraktionen (Anthocyan- (B), Phenolcarbonsäure- (C) und Polymerfraktion (D)) mittels Alamar Blue Assay ( $n = 3$ ;  $\text{mean} \pm \text{SD}$ ) im Vergleich zur Medium-behandelten Kontrolle.

Die Ergebnisse der Kurzzeitinkubation (1 h) wurden durch die Langzeitinkubationen (24 h) (siehe Abb. 7.15) bestätigt. Sowohl mit HBE (E) als auch mit den HBE-Subfraktionen (Anthocyan- (F), Phenolcarbonsäure- (G) und Polymerfraktion (G)) wurden über den gesamten Konzentrationsbereich (10 - 500 µg/ml) ebenfalls keine zytotoxischen Effekte auf Caco-2 Zellen beobachtet. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass weder der HBE noch die drei eingesetzten HBE-Subfraktionen die Zellvitalität von Caco-2 Zellen beeinflussten. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation der humanen Darmkrebszelle HT-29 mit HBE (500 µg/ml) zu einer signifikanten Abnahme der Zellvitalität auf 58% nach 24 h (Daten siehe Anhang; Abb. 10.2). Bei Inkubationen der HBE-Subfraktionen mit HT-29 Zellen wurden weder nach 1 h noch nach 24 h ein Einfluss auf die Zellvitalität beobachtet (siehe Abb. 10.1 und Abb. 10.2). Es wird ersichtlich, dass mögliche Effekte auch von der verwendeten Zelllinie abhängig sind, d.h. nicht jede Zelllinie eignet sich für die Untersuchung jedes Biomarkers bzw. Testsystems [Chantret et al., 1988].

Es stellte sich heraus, dass in Caco-2 Zellen keine zytotoxischen Effekte im getesteten Konzentrationsbereich nachzuweisen waren und somit die HBE-Konzentrationen zur Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften eingesetzt werden konnten.

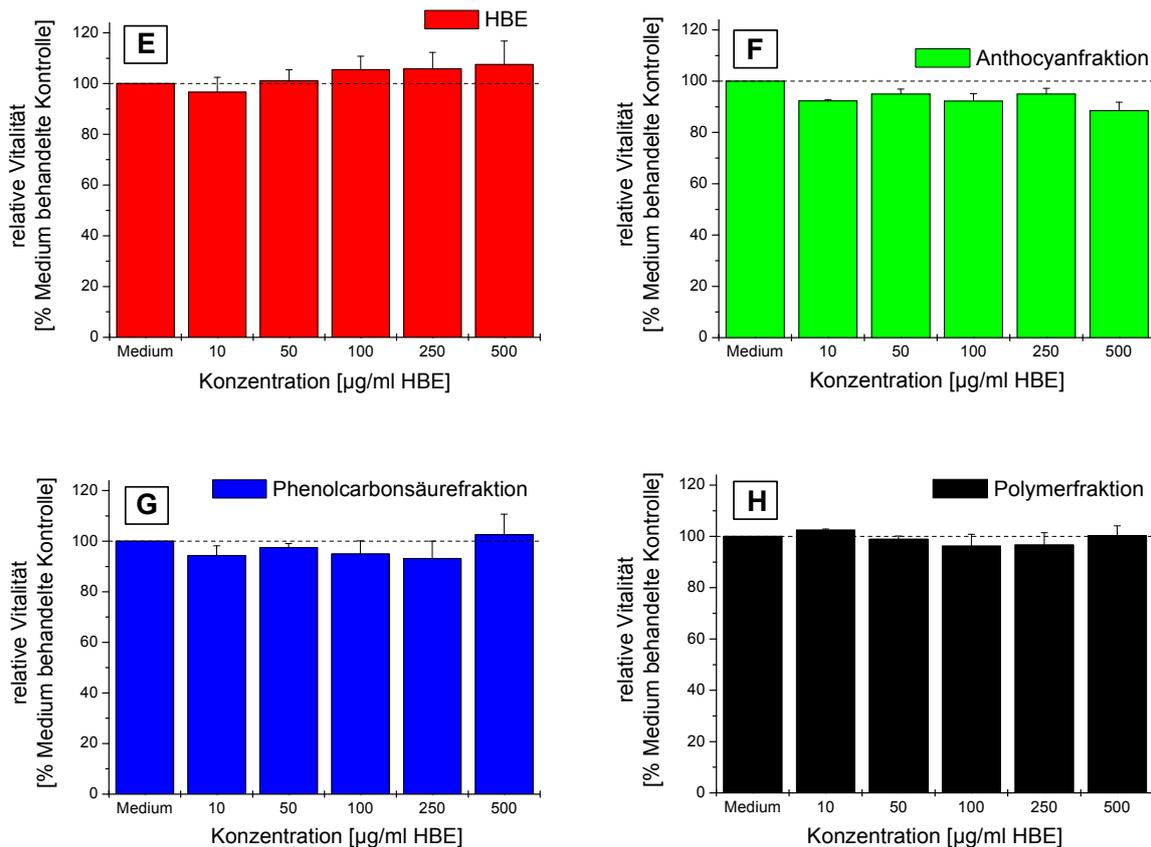


Abb. 7.15: Testung auf zytotoxische Effekte in Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit HBE (E) und den drei HBE-Subfraktionen (Anthocyan- (F), Phenolcarbonsäure- (G) und Polymerfraktion (H)) mittels Alamar Blue Assay ( $n = 3$ ; mean  $\pm$  SD) im Vergleich zur Medium-behandelten Kontrolle.

### 7.5.1.2 Testung der mit HBE-beladenen Kapselsysteme

Untersuchungen zur Zytotoxizität der mit HBE-beladenen Kapselsystemen (Pektinamidhohl- (I), multidisperse Hüll- (J), Molkenprotein- (K) und Apfelpektinkapseln (L)) an Caco-2 Zellen nach 1 h Inkubation sind vergleichend in Abb. 7.16 dargestellt. Die dabei verwendeten multidispersen Hüllkapseln unterscheiden sich durch ihre äußere Ölphase von den anderen Kapselsystemen (siehe Kap. 6.3.4).

Um eine Aussage über die Effekte des Kapselmaterials auf die Vitalität der Caco-2 Zellen treffen zu können, wurden Inkubationen mit Kapselmaterialien (ohne HBE-Beladung) durchgeführt. Dies war jedoch nicht für alle Systeme möglich, da von TP 5 (AG Schwarz) keine Apfelpektinkapseln ohne HBE-Beladung zur Verfügung standen. Nach 1 stündiger Inkubation von Caco-2 Zellen mit unterschiedlichen Kapselmaterialien waren keine zytotoxischen Effekte nachweisbar (siehe Abb. 7.16 (I) (J) (K)). Um mögliche zytotoxische Effekte, hervorgerufen durch unterschiedliche Mengen an Kapselmaterial während den Inkubationen zu vermeiden, wurden Kapseln mit HBE-Beladung und ohne HBE-Beladung so kombiniert, dass Konzentrationen von 10 - 500 µg/ml HBE erreicht wurden (siehe Tab. 6.5). Nach Inkubationen mit HBE-beladenen Pektinamidhohl- (I) und multidispersen Hüllkapseln

(J) zeigte sich, dass keine zytotoxischen Effekte detektierbar vorlagen. Im Gegensatz dazu wurde mit steigender HBE-Beladung (50 - 500  $\mu\text{g/ml}$  HBE) bei Inkubationen mit HBE-beladenen Molkenprotein- (K) und Apfelpektinkapseln (L) signifikante Effekte (1 h) auf die Zellvitalität beobachtet (siehe Abb. 7.16). Des Weiteren wurde mit diesen Systemen untersucht, inwieweit ein vor der Inkubation durchgeführter mechanischer Aufschluss der Kapseln die Wirksamkeit der Systeme veränderte. Dadurch musste der in den Kapselsystemen enthaltene HBE nicht erst aus den Kapseln freigesetzt werden, sondern lag direkt in einem homogenen Gemisch zusammen mit den Kapselmaterialien vor. Bei Inkubationen mit Caco-2 Zellen und derart aufgeschlossenen Kapseln zeigte sich, dass die Zellvitalität nicht beeinflusst wurde. Das bedeutet, dass die Ergebnisse von aufgeschlossenen Kapseln mit denen der intakten Kapseln vergleichbar waren. Ein zytotoxischer Einfluss der beiden Kapselsysteme (aufgeschlossen und intakt) könnte auf den niedrigen pH-Wert (pH 1.5) der Kapseln (siehe Kap. 6.3.5) zurückzuführen sein. Der Einsatz dieser Systeme in der Zellkultur hat zur Folge, dass die optimalen Kulturbedingungen für Caco-2 Zellen von pH 7.4 gestört werden und dadurch zytotoxische Effekte auftreten können.

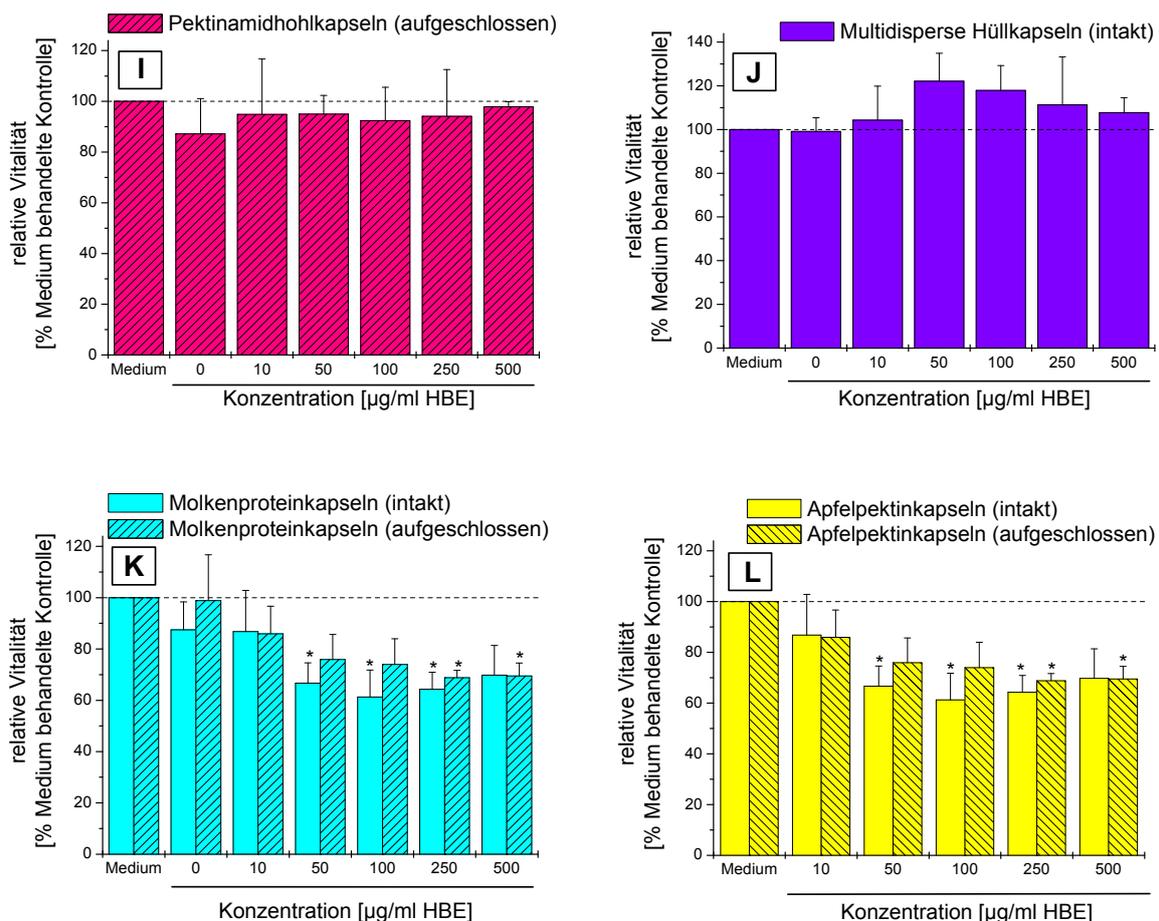


Abb. 7.16: Testung auf zytotoxische Effekte in Caco-2 Zellen nach 1 h Inkubation mit den unterschiedlichen HBE-beladenen Kapselpräparationen (Pektinamidhohl- (I), multidisperse Hüll- (J), Molkenprotein- (K), Apfelpektinkapseln (L); mechanisch aufgeschlossen bzw. intakt) mittels Alamar Blue Assay ( $n = 3$ ; mean  $\pm$  SD) im Vergleich

zur Medium-behandelten Kontrolle. Student's t-test: \* $p < 0.05$ . In der Graphik L konnte keine Untersuchung des Kapselmaterials (0  $\mu\text{g/ml}$  HBE) durchgeführt werden, da von TP 5 (AG Schwarz) keine Apfelpektinkapseln ohne HBE-Beladung zur Verfügung standen.

Die erhaltenen Ergebnisse der 1 h und 24 h Inkubationen waren miteinander vergleichbar. Es wurden weder bei Inkubationen mit unbeladenen Kapselmaterien (0  $\mu\text{g/ml}$  HBE) noch mit den Kapselsystemen (Pektinamidhohl- (M) und multidisperse Hüllkapseln (N) im getesteten Konzentrationsbereich (10 - 500  $\mu\text{g/ml}$  HBE) Effekte auf die Zellvitalität beobachtet (siehe Abb. 7.17 (M) (N)). Bei Inkubationen mit Molkenprotein- (O) und Apfelpektinkapseln (P) wurde nach einer Inkubationszeit von 24 h mit Caco-2 Zellen noch eine tendenzielle, aber keine signifikante Abnahme der Zellvitalität nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen in der Lage sind, den Abfall des pH-Wertes teilweise zu kompensieren.

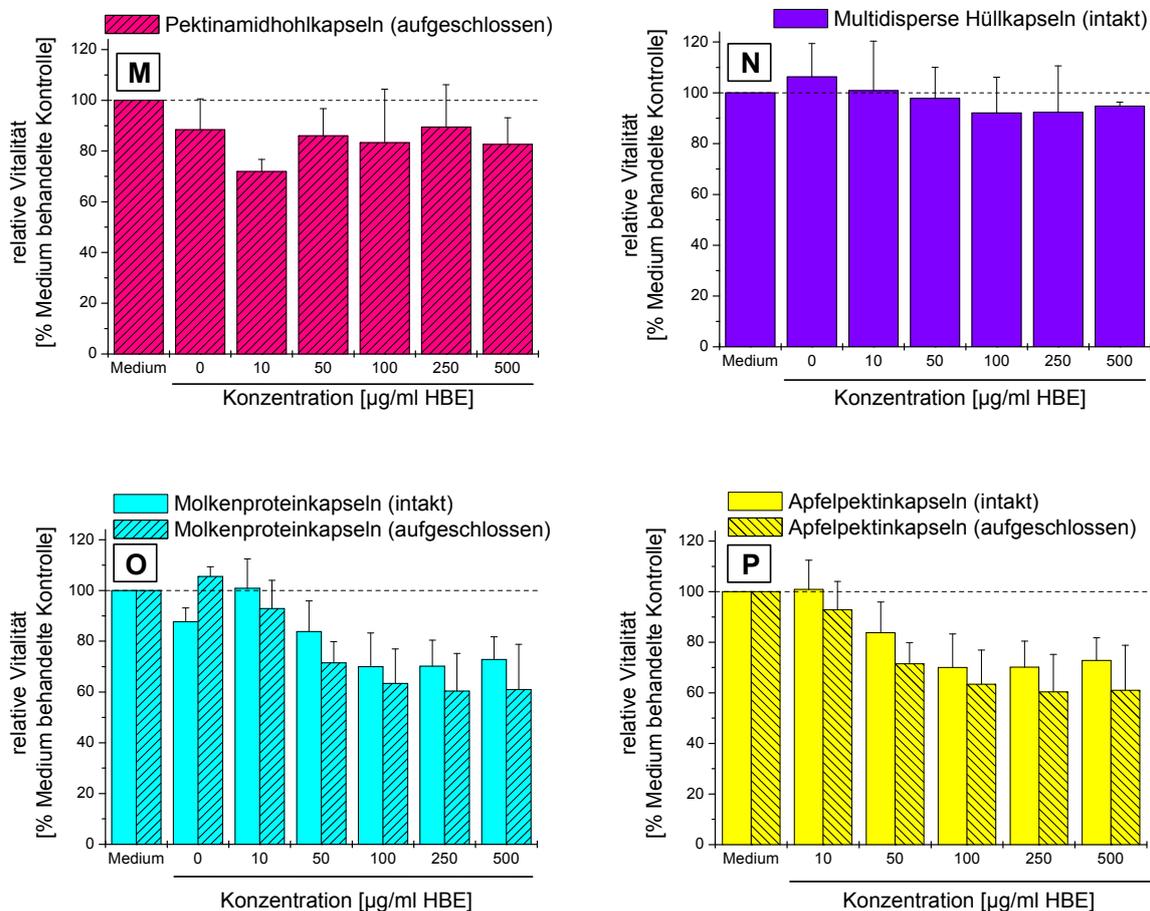


Abb. 7.17: Testung auf zytotoxische Effekte in Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit den unterschiedlichen HBE-beladenen Kapselpräparationen (Pektinamidhohl- (M), multidisperse Hüll- (N), Molkenprotein- (O), Apfelpektinkapseln (P); mechanisch aufgeschlossen bzw. intakt) mittels Alamar Blue Assay ( $n = 3$ ; mean  $\pm$  SD) im Vergleich zur Medium-behandelten Kontrolle. In der Graphik P konnte keine Untersuchung des Kapselmaterien (0  $\mu\text{g/ml}$  HBE) durchgeführt werden, da von TP 5 (AG Schwarz) keine Apfelpektinkapseln ohne HBE-Beladung zur Verfügung standen.

## 7.5.2 Testung auf (oxidative) DNA-Schäden (Comet Assay)

Zur Erfassung von (oxidativen) DNA-Schäden wurde die alkalische Einzelzellgelelektrophorese, der sog. Comet Assay modifiziert nach Collins *et al.* und Singh *et al.* herangezogen [Collins *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 1988].

Hierbei wurden die zu untersuchenden Zellen in Agarosegel auf Objektträger aufgetragen, die Zellmembran lysiert, mit dem Enzym (Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG)) behandelt (um eine Aussage über das Ausmaß oxidativer DNA-Schäden zu erhalten), die DNA entwunden und anschließend die Elektrophorese gestartet. Dabei wandern entstandenen DNA-Fragmente im Gel, die nach Anfärben mit Ethidiumbromid mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops ausgewertet werden können. Aufgrund der Größe des Kometenschweifes ist es möglich, eine Aussage über vorhandene und induzierte Strangbrüche zu treffen (siehe Kap. 6.5.3).

Zur Etablierung des Comet Assay war es notwendig, eine Menadion-Konzentration zu ermitteln, die signifikant reproduzierbare (oxidative) DNA-Schäden in Caco-2 und HT-29 Zellen (siehe Anhang; Abb. 10.3) induzierte. Aus der Literatur war zu dem bekannt, dass in vergleichbaren Konzentrationsbereichen sowohl in Caco-2 als auch in HT-29 Zellen (oxidative) DNA-Schäden durch Menadion induziert werden [Bellion *et al.*, 2008; Bellion *et al.*, 2009; Schaefer *et al.*, 2006b]. Nachdem Konzentrations-Wirkungsverläufe für beide Zelllinien erstellt wurden, zeigte sich, dass für Caco-2 Zellen eine Konzentration von 6 mM und für HT-29 Zellen 20 mM Menadion am besten geeignet war (Graphiken siehe Anhang Abb. 10.3). Um die Durchführung des Comet Assay auf seine Richtigkeit zu überprüfen, wurden bei allen Inkubationen eine Substanzpositivkontrolle (30  $\mu$ M Quercetin) und eine Negativkontrolle (Zellkulturmedium ohne Menadion-Behandlung) verwendet. Quercetin wurde gewählt, da die Wirksamkeit in diesem Konzentrationsbereich auf beide Zelllinien bereits aus der Literatur bekannt war [Bellion *et al.*, 2008; Bellion *et al.*, 2009; Schaefer *et al.*, 2006b]. Für die Substanzpositivkontrolle (Quercetin) wurde bei allen, während dieser Arbeit durchgeführten Inkubationen, sowohl in Caco-2 als auch in HT-29 Zellen, eine signifikante Abnahme (40% gegenüber der Positivkontrolle) induzierter DNA-Schäden beobachtet (nicht gezeigt). In den folgenden Abschnitten soll nur auf die Ergebnisse mit der Zelllinie Caco-2 mit nachfolgender FPG-Behandlung eingegangen werden, wobei die Daten zu den Caco-2 Zellen ohne FPG-Behandlung und alle Ergebnisse zu den HT-29 Zellen im Anhang gezeigt werden (siehe Abb. 10.6, Abb. 10.7, Abb. 10.8 und Abb. 10.9).

### 7.5.2.1 Testung des HBE und der HBE-Subfraktionen

In den nachfolgenden Abbildungen (siehe Abb. 7.18) ist das Ausmaß induzierter oxidativer DNA-Schäden mit FPG-Behandlung in Caco-2 Zellen (1 h Inkubation) nach Vorbehandlung mit HBE (A) und den drei Subfraktionen (Anthocyan- (B), Phenolcarbonsäure- (C) und Polymerfraktion (D)) vergleichend dargestellt. Wie in Kap. 6.4.6 erwähnt wurden die Subfraktionen ihrem Anteil am HBE entsprechend eingesetzt, um Rückschlüsse auf fraktionenspezifische Effekte zu schließen. Um das maximale Ausmaß an induzierten

(oxidativen) DNA-Schäden in Caco-2 Zellen durch Menadion-Behandlung (6  $\mu\text{M}$ ) zu quantifizieren, wurde als Positivkontrolle Zellkulturmedium mitgeführt. Das Ergebnis der Positivkontrolle wurde bei den einzelnen Inkubationen gleich 100% gesetzt (siehe Abb. 7.18). Nach 1 h Inkubation wurde eine Verringerung oxidativer DNA-Schäden durch HBE (A) im niedrigen Konzentrationsbereich (5 - 10  $\mu\text{g/ml}$  HBE) beobachtet (siehe Abb. 7.18 (A)). Diese positiven Effekte bestätigen die in der Literatur beschriebenen Wirkungen von Anthocyanen bei der Reduktion oxidativer DNA-Schäden in Kurzzeitinkubationen (1 h) [Weisel, 2006].

Ein Vergleich der Ergebnisse nach Inkubation mit den HBE-Subfraktionen zeigte, dass weder bei der Anthocyan- (B), noch bei der Polymerfraktion (D) über den Konzentrationsbereich (10 - 500  $\mu\text{g/ml}$  HBE) ein Einfluss auf oxidative DNA-Schäden detektierbar war. Anders verhielt es sich jedoch bei der Phenolcarbonsäurefraktion. Hierbei konnte bei einer Konzentration von 1.5  $\mu\text{g/ml}$  (entspricht dem Anteil in 10  $\mu\text{g/ml}$  HBE) eine signifikante Reduktion oxidativer DNA-Schäden beobachtet werden (siehe Abb. 7.18 (C)). Dieser positive Effekt der Phenolcarbonsäurefraktion könnte auf deren hohen Quercetingehalt zurückzuführen sein. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Wirksamkeit des HBE bei der Reduzierung von oxidativen DNA-Schäden nach 1 h Inkubation auf die Phenolcarbonsäurefraktion zurückgeführt werden kann.

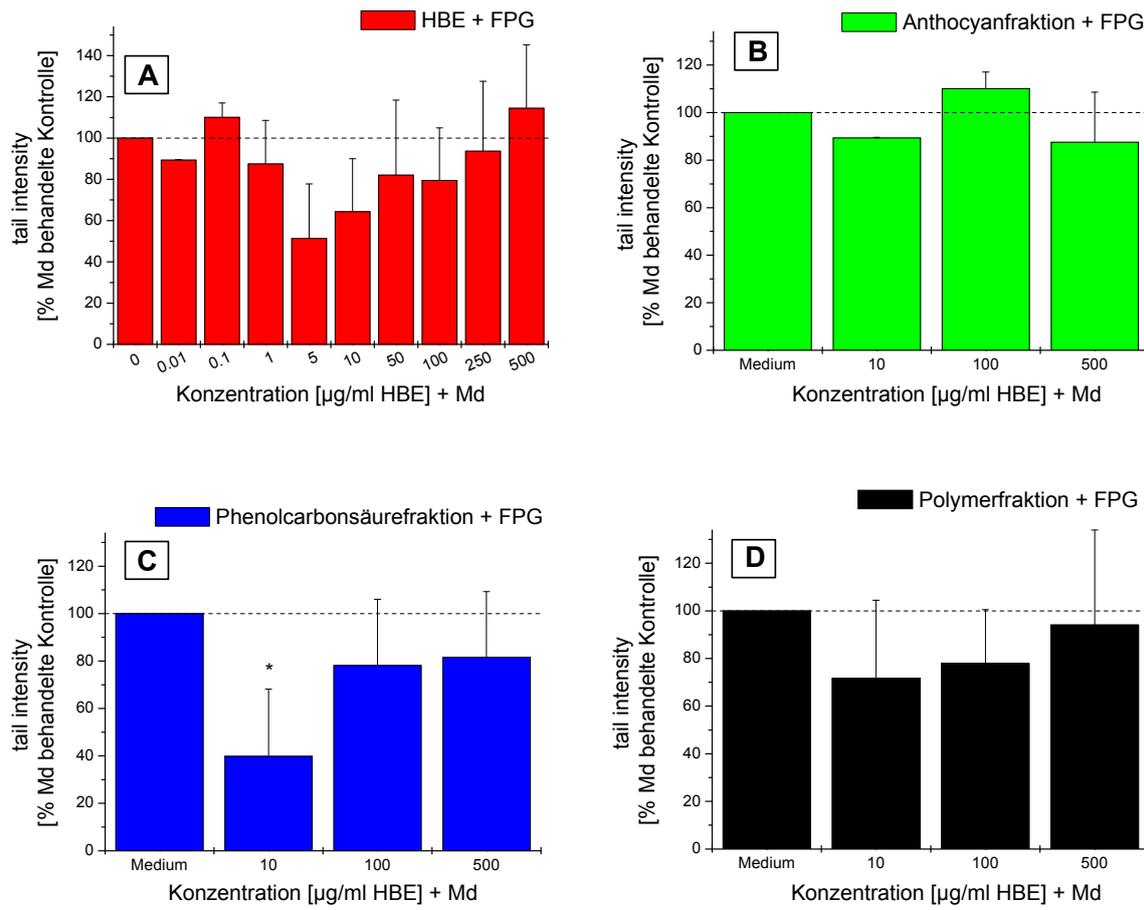


Abb. 7.18: Modulation Menadion-induzierter oxidativer DNA-Schäden in Caco-2 Zellen nach 1 h Vorinkubation mit HBE (A) und dessen Subfraktionen (Anthocyan- (B), Phenolcarbonsäure- (C) und Polymerfraktion (D)) und Nachbehandlung mit Menadion (Md); 6 µM; 1 h; nur Inkubationen mit FPG-Behandlung; n = 3-5; mean ± SD; Student's t-test: \*p < 0.05.

Nach 24 h Vorinkubationen der Caco-2 Zellen mit der Polymer- (H) und der Anthocyanfraktion (F) konnte keine Reduzierung von oxidativen DNA-Schäden festgestellt werden (siehe Abb. 7.19). Demgegenüber zeigte sich sowohl mit dem HBE (E) als auch mit der Phenolcarbonsäurefraktion (G) ein signifikanter Einfluss auf Caco-2 Zellen im niedrigen Konzentrationsbereich (5 - 10 µg/ml HBE). Somit wurden mit den 1 h Vorinkubationen vergleichbare Ergebnisse erzielt.

Die beiden Konzentrationsabhängigen Ergebnisse der Kurzzeit- und Langzeitinkubationen (1 und 24 h) ähnelten einer „U-Form“, d.h. im niedrigen Konzentrationsbereich war für beide Zeiträume eine tendenzielle Abnahme und im höheren Konzentrationsbereich eine Zunahme oxidativer DNA-Schäden zu beobachten. In der Literatur ist dieser Effekt eines „U-förmigen“ Kurvenverlaufs schon mehrmals beschrieben [Schaefer et al., 2006a; Schaefer et al., 2006b]. Jedoch muss bei dem Vergleich mit der Literatur beachtet werden, dass bei Schäfer et al. keine Katalase dem Zellkulturmedium zugesetzt worden war und dadurch die Zunahme an oxidativen DNA-Schäden bei steigender Anthocyankonzentration auf eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung durch Anthocyane zurückgeführt werden könnte. In einer Studie von Fritz et al. wurde die

Aufhebung dieses prooxidativen Effektes der Anthocyane durch Zusatz von Katalase ins Zellkulturmedium beschrieben. Hierbei wurde Delphinidin in unterschiedlichen Konzentrationen mit und ohne Zusatz von Katalase (100 U/ml) ins Zellkulturmedium mit HT-29 Zellen inkubiert. Es zeigte sich keine Zunahme oxidativer DNA-Schäden bei steigender Anthocyankonzentration [Fritz *et al.*, 2008]. Ein vergleichbares Ergebnis wurde in einer aktuellen Studie bei Inkubationen mit Cyanidin (20 - 100  $\mu\text{M}$ ) und dem Zusatz von Katalase ins Zellkulturmedium (HT-29 Zellen) von Esselen *et al.* beobachtet [Esselen *et al.*, 2011b].

Die Daten zu den Vorinkubationen, bei denen keine FPG-Behandlung stattfand, sind hier nicht gezeigt, da der Einfluss des untersuchten HBE und der HBE-Subfraktionen im Vergleich zu den FPG-behandelten Proben eher geringe Effekte auf (oxidative) DNA-Schäden aufwies (siehe Anhang; Abb. 10.4 und Abb. 10.5).

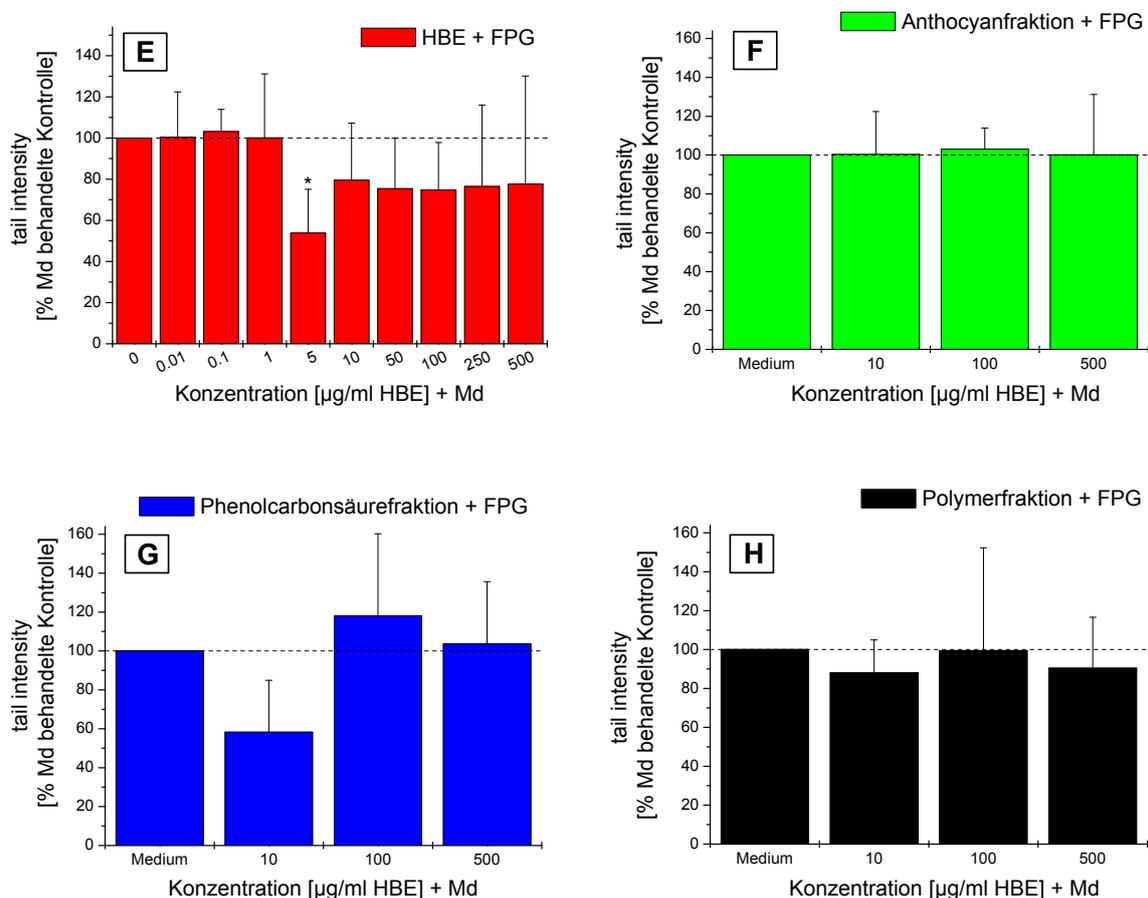


Abb. 7.19: Modulation Menadion-induzierter oxidativer DNA-Schäden in Caco-2 Zellen nach 24 h Vorinkubation mit HBE (E) und dessen Subfraktionen (Anthocyan- (F), Phenolcarbonsäure- (G) und Polymerfraktion (H)) und Nachbehandlung mit Menadion (Md); 6  $\mu\text{M}$ ; 1 h; nur Inkubationen mit FPG Behandlung;  $n = 3-5$ ; mean  $\pm$  SD; Student's *t*-test: \* $p < 0.05$ .

### **7.5.2.2 Testung der mit HBE-beladenen Kapselsystemen**

Bei Untersuchungen der drei HBE-beladenen Kapselsystemen (Pektinamidhohl- (I), Molkenprotein- (K) und Apfelpektinkapseln (L)), die intakt oder mechanisch aufgeschlossen (siehe Kap. 6.4.6) eingesetzt wurden, konnten nach 1 h Vorinkubation mit Caco-2 Zellen (siehe Abb. 7.20), keine Effekte auf oxidative DNA-Schäden nachgewiesen werden. Dies war höchstwahrscheinlich auf die verzögerte Freisetzung des HBE aus den Kapseln im Zellkulturmedium zurückzuführen. Demgegenüber wurde nach 24 h Vorinkubationen mit den Kapselsystemen (M) (O) (P) mit Caco-2 Zellen analog zum HBE, eine signifikante Abnahme oxidativer DNA-Schäden im Konzentrationsbereich von 5 und 10 µg/ml HBE beobachtet. Wobei kein Unterschied in der Wirksamkeit zwischen aufgeschlossenen und intakten Kapseln nachgewiesen werden konnte. Die beiden Kapselsysteme (Molkenprotein- (O) und Apfelpektinkapseln (P)) zeigten eine mit dem HBE vergleichbare Wirksamkeit (siehe Abb. 7.21).

Eine weitere Analogie wurde im Vergleich der Konzentrationsverläufe HBE (Abb. 7.18 und Abb. 7.19 (A) (E)) mit den drei HBE-beladenen Kapselsystemen deutlich. Es wurde ebenfalls ein „U-förmiger“ Verlauf beobachtet. Dies lässt den Schluss zu, dass diese drei Verkapselungsmaterialien keinen Einfluss auf die Wirksamkeit des HBE besitzen.

Bei Inkubationen mit HBE-beladenen multidispersen Hüllkapseln (siehe Abb. 7.20 (J) und Abb. 7.21 (N)) wurde keine Reduzierung oxidativer DNA-Schäden nachgewiesen. Vermutlich ist dafür die äußere Ölphase der Kapsel verantwortlich, die zu einem Aufschwimmen der Kapseln im Zellkulturmedium führte (siehe Kap. 6.3.4). Wodurch die wirksamen Komponenten des HBE offensichtlich weder nach 1 noch nach 24 h Vorinkubation freigesetzt wurden.

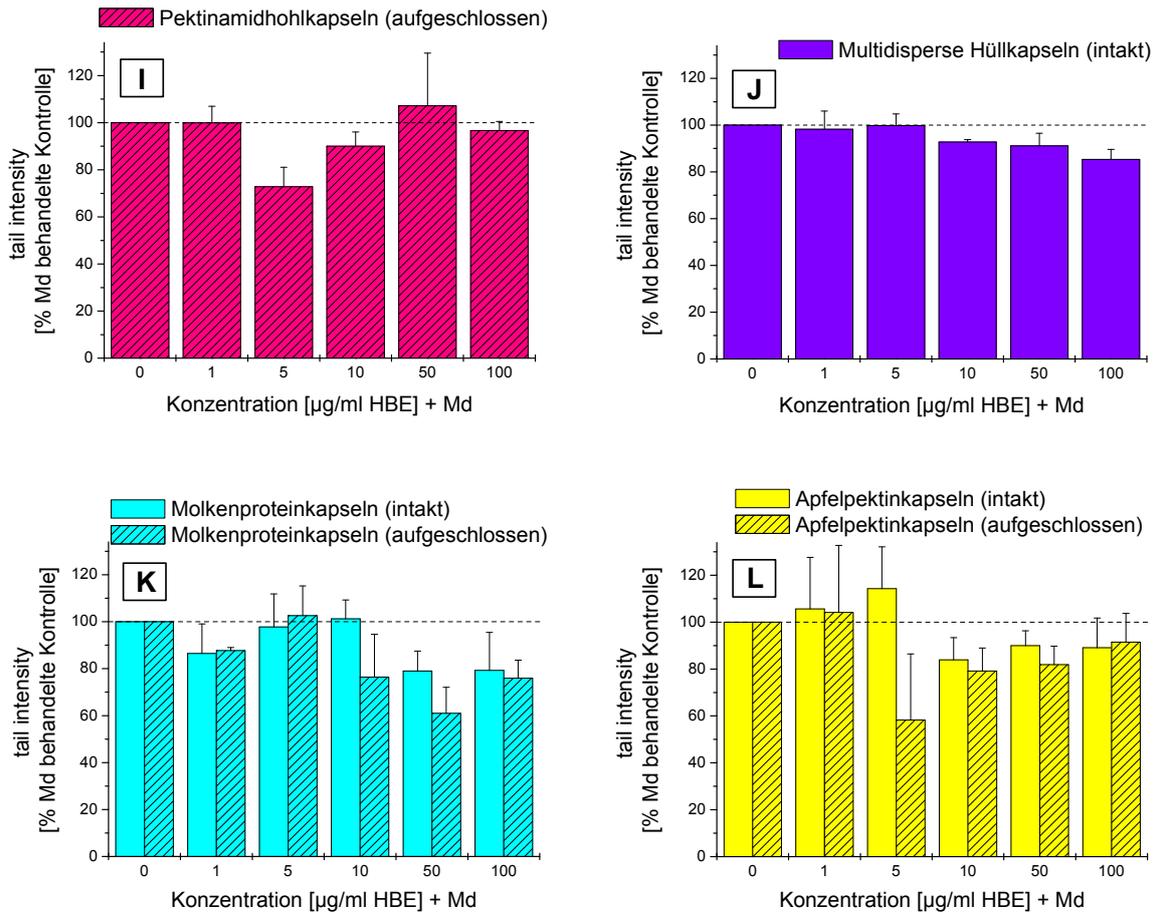


Abb. 7.20: Modulation Menadion-induzierter oxidativer DNA-Schäden in Caco-2 Zellen nach 1 h Vorinkubation mit unterschiedlichen HBE-beladenen Kapselpräparationen (Pektinamidhohl- (I), multidisperse Hüll- (J), Molkenprotein- (K), Apfelpektinkapseln (L); mechanisch aufgeschlossen bzw. intakt) und Nachbehandlung mit Menadion (Md); 6 µM; 1 h; nur Inkubationen mit FPG Behandlung; n = 3-5; mean ± SD.

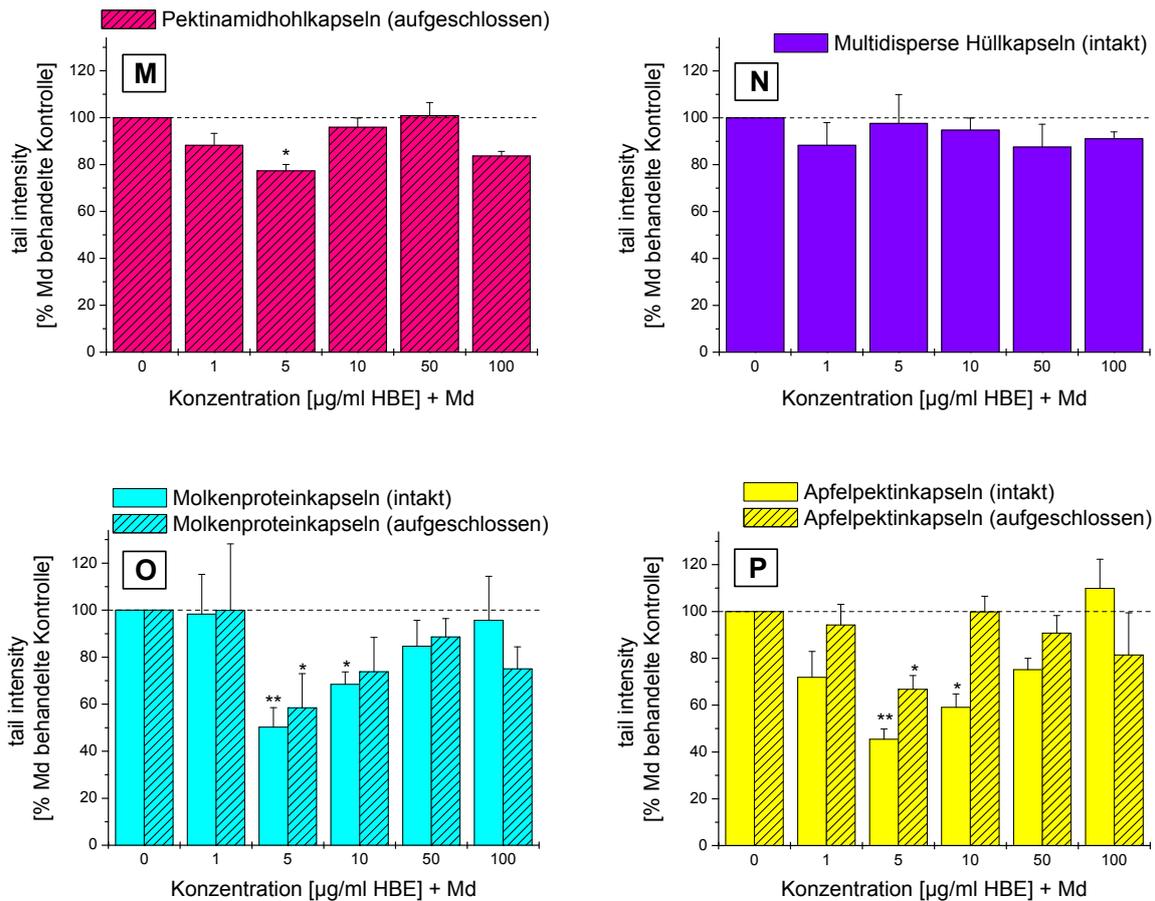


Abb. 7.21: Modulation Menadion-induzierter oxidativer DNA-Schäden in Caco-2 Zellen nach 24 h Vorinkubation mit unterschiedlichen HBE-beladenen Kapselpräparationen (Pektinamidhohl- (M), multidisperse Hüll- (N), Molkenprotein- (O), Apfelpektinkapseln (P); mechanisch aufgeschlossen bzw. intakt) und Nachbehandlung mit Menadion (Md); 6 µM; 1 h; nur Inkubationen mit FPG Behandlung; n = 3-5; mean ± SD; Student's t-test: \*p < 0.05; \*\*p < 0.01.

### 7.5.3 Bestimmung des Glutathiongehalts

Die Bestimmung des zellulären Glutathiongehalts in Caco-2 Zellen wurde mit einer modifizierten Methode nach Gallagher *et al.* bestimmt [Gallagher *et al.*, 1994]. Hierbei wurde in einer NADPH-abhängigen Reaktion über eine Glutathionreduktase (GSR) GSSG zu GSH oxidiert und dabei 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) kontinuierlich zu 5-Thio-2-nitrobenzoat (TNB) reduziert. Die Zunahme der Extinktion (Bildung von TNB) kann bei 412 nm verfolgt und photometrisch ausgewertet werden (siehe Kap. 6.5.4).

Als Substanzpositivkontrolle wurde analog zur Durchführung des Comet Assay Quercetin (Konzentration: 30 µM) verwendet, da in zahlreichen Studien eine Erhöhung des GSH-Levels der Zellen beschrieben wurde [Bellion *et al.*, 2008; Bellion *et al.*, 2009; Schaefer *et al.*, 2006a]. Bei allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Vorinkubationen mit Quercetin wurde sowohl in Caco-2 als auch in HT-29 Zellen, eine signifikante Erhöhung des GSH-Levels gegenüber der Positivkontrolle (Menadion behandelte Zellen) beobachtet (nicht gezeigt).

Um den Grundgehalt an GSH in der Zelllinie Caco-2 zu quantifizieren, wurden bei jedem Versuch eine Negativkontrolle (ohne Menadion-Behandlung) und eine Positivkontrolle (mit Menadion-Behandlung) mitgeführt. Da alle Ergebnisse auf die Positivkontrolle bezogen wurden, die der maximalen Abnahme an GSH in der Zelle entsprach, musste immer Negativkontrolle (in den Abbildungen als Medium bezeichnet) und Probe miteinander verglichen werden. Das bedeutete: Je geringer die Abnahme an GSH im Vergleich zur Negativkontrolle war, desto positiver war der Effekt. Dieser Vergleich war jedoch nur möglich, da sich die Positivkontrolle zur Negativkontrolle signifikant unterschied (wurde nicht durch zusätzliche \* gekennzeichnet, da dies für alle Inkubationen zutraf).

Auf die Ergebnisse der Untersuchungen mit Caco-2 Zellen wird im Folgenden näher eingegangen, wobei die Ergebnisse der Studien mit HT-29 Zellen im Anhang aufgeführt sind (Abb. 10.10 und Abb. 10.11).

### **7.5.3.1 Testung des HBE und der HBE-Subfraktionen**

In vergleichenden Untersuchungen mit HBE (A) und den entsprechenden drei HBE-Subfraktionen (Anthocyan- (B), Phenolcarbonsäure- (C) und Polymerfraktion (D), ihrem Anteil am HBE entsprechend, siehe Kap. 6.4.6) zur Beeinflussung des Glutathiongehalts in der Zelllinie Caco-2 nach 1 h Vorinkubation wurden keine Effekte nachgewiesen. Die erhaltenen Ergebnisse sowohl nach Vorinkubation mit HBE als auch mit HBE-Subfraktionen (0.01 - 250 µg/ml HBE) lagen im Bereich der Menadion-behandelten Kontrolle, woraus man schlussfolgern konnte, dass der GSH-Gehalt der Caco-2 Zellen in Kurzzeitinkubationen (1 h Inkubation) nicht beeinflusst wurde (siehe Abb. 7.22). Lediglich in der höchsten eingesetzten HBE Konzentration (500 µg/ml) wurde eine zusätzliche GSH-Depletion gegenüber der Menadion-behandelten Kontrolle nachgewiesen.

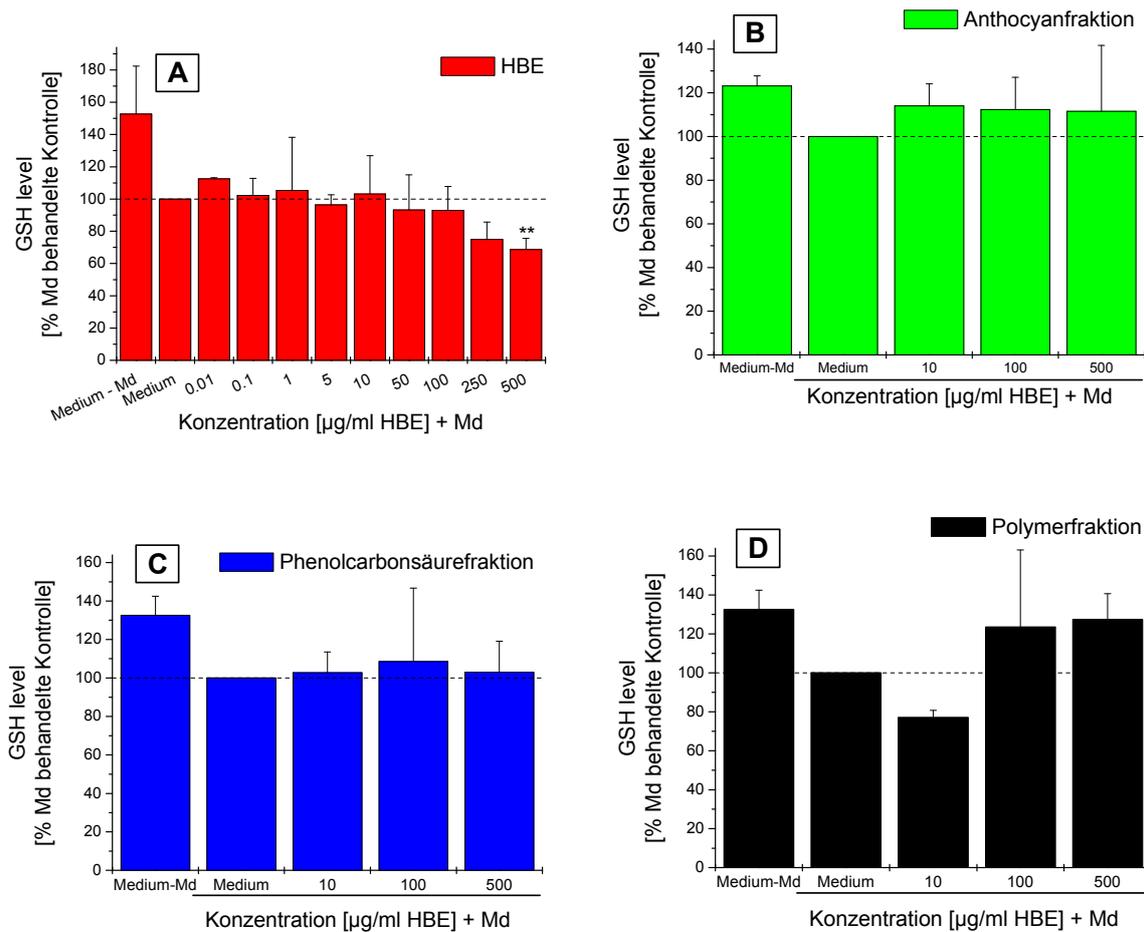


Abb. 7.22: Modulation des Glutathiongehalts in Caco-2 Zellen nach 1 h Vorinkubation mit HBE (A) und dessen Subfraktionen (Anthocyan- (B), Phenolcarbonsäure- (C) und Polymerfraktion (D)) und Nachbehandlung mit Menadion (Md); 6  $\mu\text{M}$ ; 1 h;  $n = 3-5$ ; mean  $\pm$  SD; Student's  $t$ -test: \*\* $p < 0.01$ .

Im Gegensatz zu den 1 h Inkubationen wurde nach einer 24 h Behandlung mit HBE (E) im Konzentrationsbereich von 50 - 500  $\mu\text{g/ml}$  eine tendenzielle Erhöhung des Glutathiongehalts gegenüber der Menadion-behandelten Kontrolle in Caco-2 Zellen beobachtet (siehe Abb. 7.23). Ein vergleichbares Ergebnis wurde in der Literatur im Rahmen einer Humanstudie (Konsum von 700 ml anthocyanreichem Mehrfruchtsaft über einen Zeitraum von 4 Wochen) beschrieben [Weisel *et al.*, 2006]. Eine nach Vorinkubation mit HBE vergleichbare Zunahme des Glutathions in Caco-2 Zellen wurde lediglich bei einer Konzentration von 76  $\mu\text{g/ml}$  (entspricht dem Anteil in 500  $\mu\text{g/ml}$  HBE) Phenolcarbonsäurefraktion (G) nachgewiesen. Dieser positive Effekt der Phenolcarbonsäurefraktion (G) war zu erwarten, da in der Literatur präventive Effekte nach 24 h Vorinkubation mit Apfelsaftextrakten auf den Glutathiongehalt in Caco-2 Zellen beschrieben waren [Bellion *et al.*, 2008; Schaefer *et al.*, 2006b]. Vorinkubationen der weiteren HBE-Subfraktionen (Polymer- (H) und Anthocyanfraktion (F)) zeigten keinen Einfluss auf den Glutathiongehalt der Caco-2 Zellen.

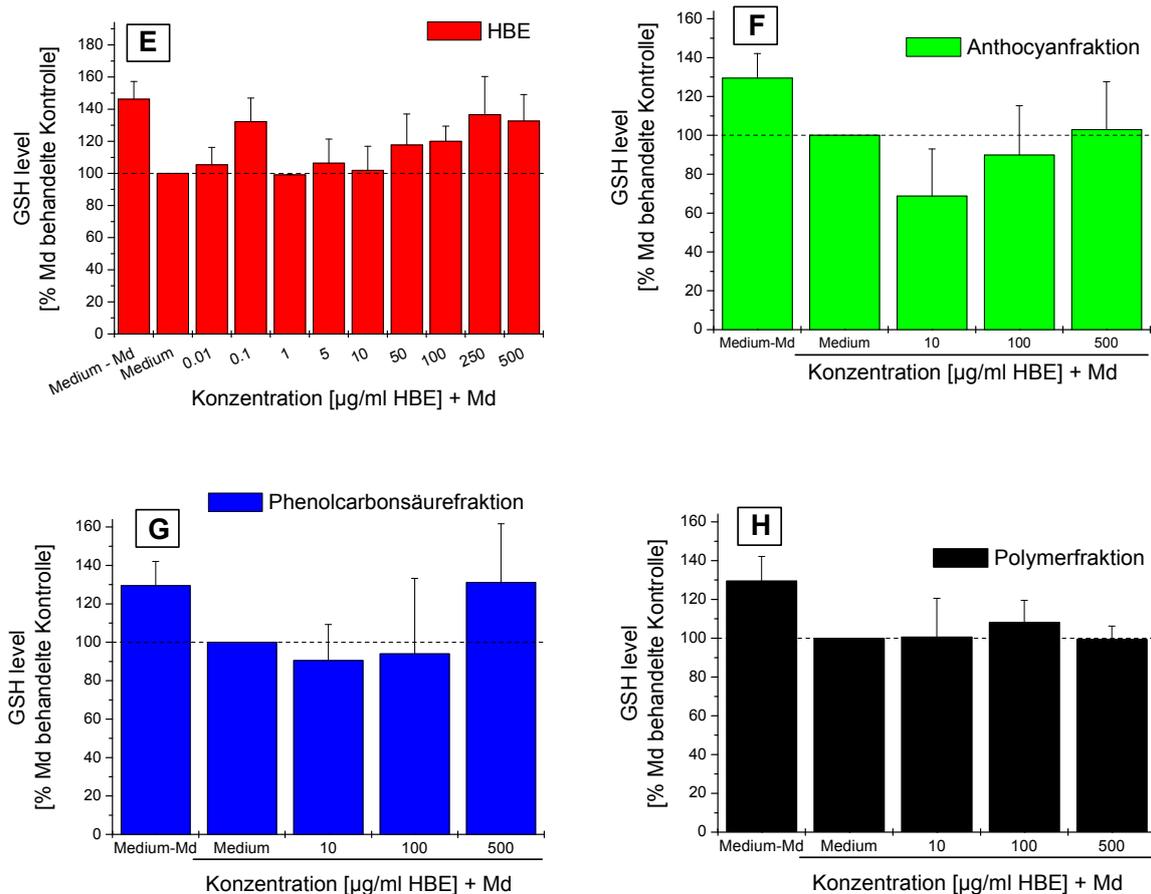


Abb. 7.23: Modulation des Glutathiongehalts in Caco-2 Zellen nach **24 h** Vorinkubation mit HBE (E) und dessen Subfraktionen (Anthocyan- (F), Phenolcarbonsäure- (G) und Polymerfraktion (H)) und Nachbehandlung mit Menadion (Md); 6 µM; 1 h; n = 3-5; mean ± SD.

### 7.5.3.2 Testung der mit HBE-beladenen Kapselsysteme

In der Abb. 7.24 ist die Modulation des Glutathiongehalts in Caco-2 Zellen nach 1 h Vorinkubation mit den unterschiedlichen HBE-beladenen Kapselsystemen (Pektinamidhohl- (I), multidispersen Hüll- (J), Molkenprotein- (K) und Apfelpektinkapseln (L)) dargestellt. Die Kurzzeitinkubationen der Zellen mit multidispersen Hüll- (J), Molkenprotein- (K) und Apfelpektinkapseln (L) lieferten mit den HBE (A) Inkubationen vergleichbare Ergebnisse. Dabei zeigte sich, dass lediglich im hohen Konzentrationsbereich (250 - 500 µg/ml HBE) eine tendenzielle Zunahme des Glutathiongehalts im Vergleich zur Menadion-behandelten Kontrolle stattfand. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls bei Inkubationen mit Pektinamidhohlkapseln (I) im höheren Konzentrationsbereich (250 - 500 µg/ml HBE) beobachtet (siehe Abb. 7.24).

Des Weiteren stellte sich heraus, dass die Molkenproteinkapseln (K) intakt wirksamer waren als mechanisch aufgeschlossen (250 µg/ml HBE), wohingegen bei Vorinkubationen mit Apfelpektinkapseln (L) keine Unterschiede in der Wirksamkeit festzustellen waren.

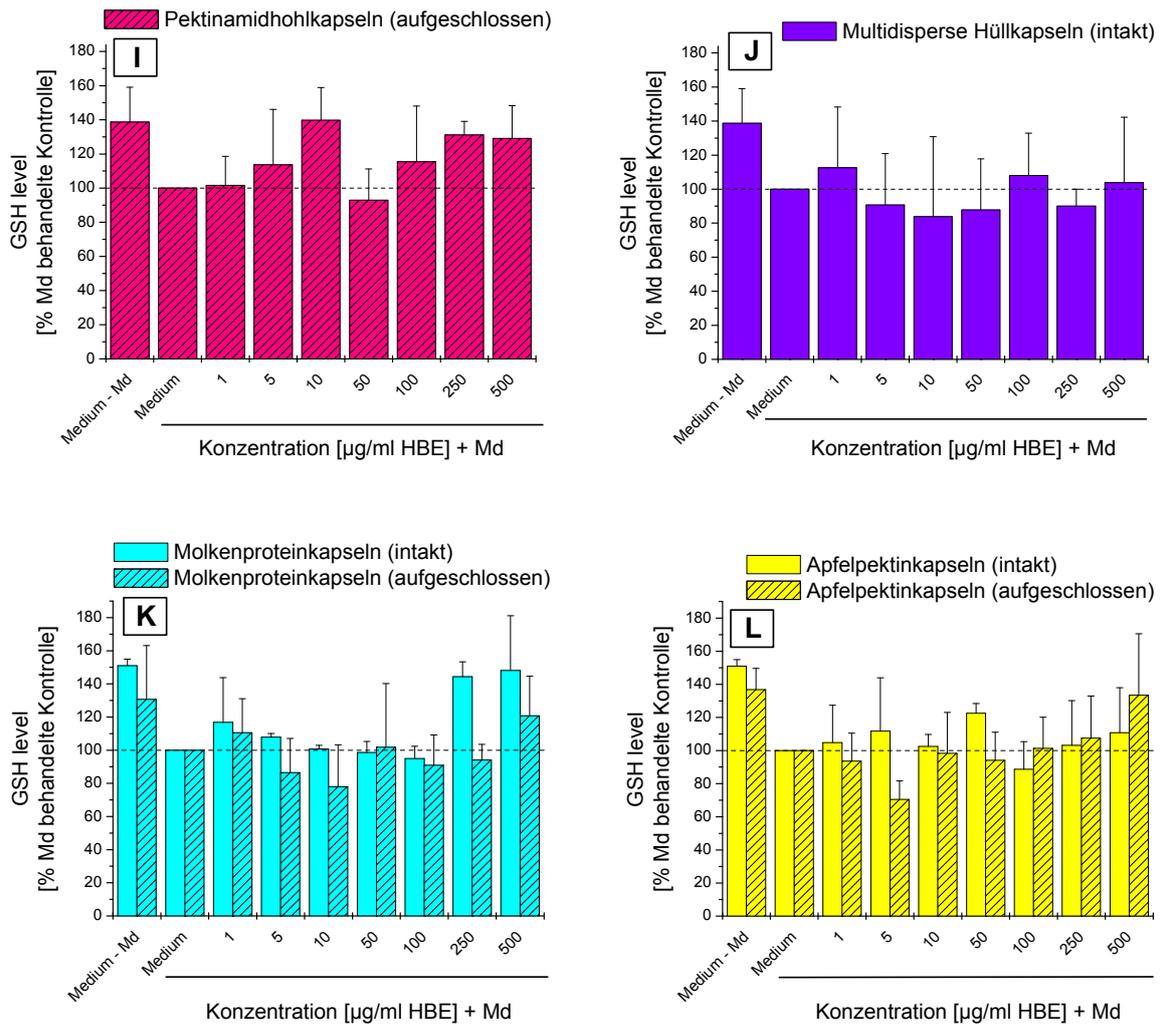


Abb. 7.24: Modulation des Glutathiongehalts in Caco-2 Zellen nach 1 h Vorinkubation mit unterschiedlichen HBE-beladenen Kapselpräparationen (Pektinamidhohl- (I), multidisperse Hüll- (J), Molkenprotein- (K), Apfelpektinkapseln (L); mechanisch aufgeschlossen bzw. intakt) und Nachbehandlung mit Menadion (Md); 6 µM; 1 h; n = 3-5; mean ± SD.

Eine tendenzielle Zunahme des Glutathiongehalts der Caco-2 Zellen mit steigender HBE-Beladung (24 h Inkubation) wurde für die HBE-beladenen Kapselsysteme Pektinamidhohl- (M), Molkenprotein- (O) und Apfelpektinkapseln (P) im Vergleich zur Menadion-behandelten Kontrolle beobachtet (siehe Abb. 7.25). Hierbei stellte sich heraus, dass Apfelpektinkapseln (P), ob mechanisch aufgeschlossen oder intakt, bei einer Konzentration von 500 µg/ml HBE den potentesten Effekt auf den Glutathiongehalt in Caco-2 Zellen zeigten. Die Effekte der HBE-beladenen Pektinamidhohl- (M) und Molkenproteinkapseln (O) waren mit denen des HBE (E) vergleichbar (siehe Abb. 7.23). Dies zeigt erneut, dass durch die eingesetzten Verkapselungstechniken (Pektinamidhohl-, Apfelpektin und Molkenproteinkapseln) die Wirksamkeit des HBE nicht beeinflusst wurde und analoge Ergebnisse zum nicht verkapselten HBE erzielt werden konnten.

Für die HBE-beladenen multidispersen Hüllkapseln (siehe Abb. 7.24 (J) und Abb. 7.25 (N)) wurde in diesem Testsystem keine Erhöhung des Glutathions in Caco-2 Zellen beobachtet. Es ist zu vermuten, dass die Kapseln aufgrund ihrer äußeren Ölphase aufschwammen (siehe Kap. 6.3.4), wodurch die Freisetzung der wirksamen Komponenten des HBE offensichtlich weder nach 1 h noch nach 24 h Inkubation stattfand.

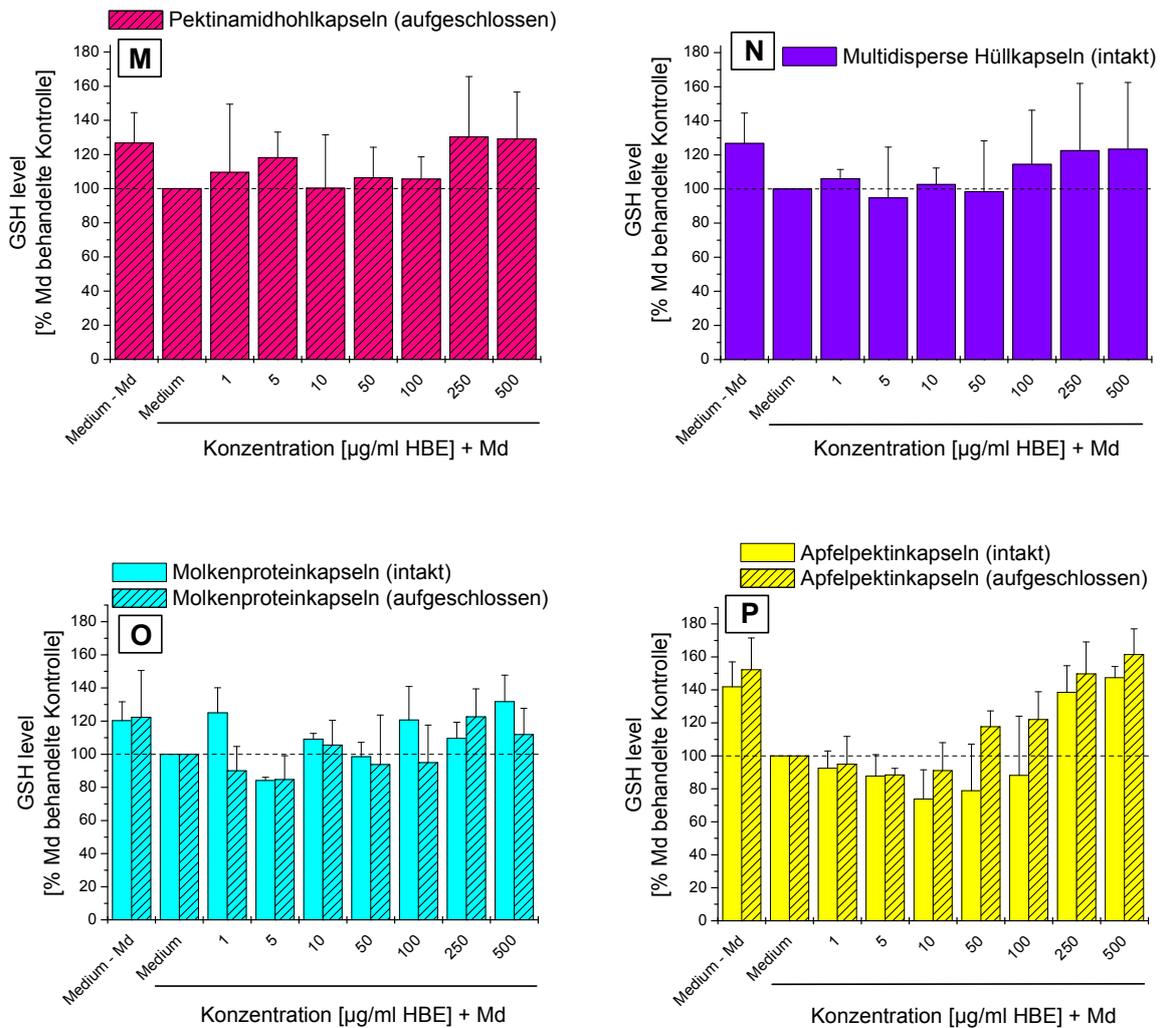


Abb. 7.25: Modulation des Glutathiongehalts in Caco-2 Zellen nach **24 h** Vorinkubation mit unterschiedlichen HBE-beladenen Kapselpräparationen (Pektinamidhohl- (M), multidisperse Hüll- (N), Molkenprotein- (O), Apfelpektinkapseln (P); mechanisch aufgeschlossen bzw. intakt) und Nachbehandlung mit Menadion (Md); 6 µM; 1 h; n = 3-5; mean ± SD.

### 7.5.4 Bestimmung intrazellulärer ROS (DCF Assay)

Der Dichlorfluorescein (DCF) Assay ermöglicht die Bestimmung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die in der Zelle gebildet werden und dadurch oxidativen Stress auslösen können. Er beruht auf einem relativen Fluoreszenzanstieg durch Oxidation des intrazellulär vorliegenden Fluoreszenzfarbstoffs Dichlorfluorescein-diacetat (DCFH-DA) zu Dichlorfluorescein (siehe Kap. 6.5.2).

Die Induktion von ROS wurde in Caco-2 bzw. HT-29 Zellen mittels *tert*-Butylhydroperoxid (TBH) vorgenommen. Hierbei stellte sich eine Konzentration von 250  $\mu$ M TBH für beide Zelllinien als ideal heraus (siehe Kap. 6.5.2).

Um die aus der Literatur bekannte Reduzierung der ROS durch Quercetin zu überprüfen und gleichzeitig eine Substanzpositivkontrolle zu etablieren, wurden Inkubationen mit Quercetin über einen Konzentrationsbereich von 0.1 - 100  $\mu$ M durchgeführt (siehe Abb. 7.26 (rechts)).

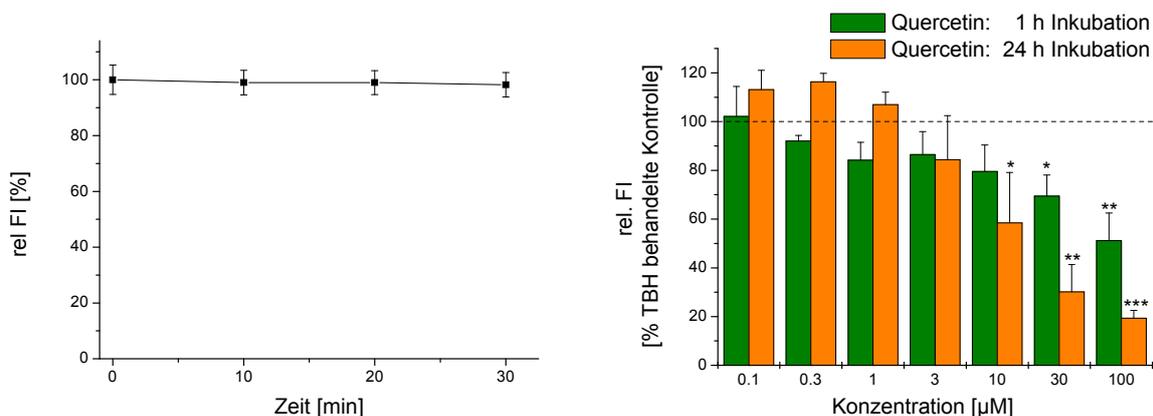


Abb. 7.26: Links: Fluoreszenzmessung von DCF (50  $\mu$ M) mit HBE (500  $\mu$ g/ml) über einen Zeitraum von 3 h,  $n = 3$ ;  $\text{mean} \pm \text{SD}$ . Rechts: Modulation der TBH-induzierten intrazellulären ROS-Level in Caco-2 Zellen nach **1 und 24 h** Vorinkubation mit Quercetin (0.1 - 100  $\mu$ M) und Nachbehandlung mit TBH; 250  $\mu$ M; 40 min;  $n = 3-5$ ;  $\text{mean} \pm \text{SD}$ ; Student's *t*-test: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Dabei konnten Literaturbekannte Ergebnisse der Reduktion TBH-induzierter ROS in Caco-2 Zellen ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M nach 24 h Vorinkubation bestätigt werden [Bellion et al., 2008; Bellion et al., 2009; Schaefer et al., 2006a]. In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich 1 h Vorinkubationen durchgeführt, die eine signifikante Abnahme der TBH-induzierten ROS ab einer Konzentration von 30  $\mu$ M Quercetin zeigten. Aus diesem Grund wurde als Substanzpositivkontrolle eine Konzentration von 30  $\mu$ M Quercetin bei allen durchgeführten Inkubationen (1 h als auch 24 h) mitgeführt. Um die maximale Konzentration der durch TBH-Behandlung erzeugten intrazellulären ROS in Caco-2 Zellen zu bestimmen, wurde bei allen Versuchsansätzen zusätzlich eine Mediumkontrolle (mit TBH-Behandlung; entspricht 100% in den Abbildungen) mitgeführt.

Des Weiteren musste im Vorfeld überprüft werden, ob eine Interaktion zwischen dem Fluoreszenzfarbstoff DCF und dem zu untersuchenden HBE vorliegen könnte. Hierzu wurde eine DCF-Lösung (50  $\mu\text{M}$ ) mit HBE (500  $\mu\text{g/ml}$ ) vermischt und über 30 min inkubiert. Gleichzeitig wurde die Fluoreszenzintensität mittels Plattenlesegerät verfolgt. Es zeigte sich, dass die Inhaltsstoffe des HBE keinen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität aufwiesen (siehe Abb. 7.26 ()).

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Studien mit Caco-2 Zellen näher erläutert, wobei die Ergebnisse zu den HT-29 Zellen im Anhang aufgeführt sind (siehe Abb. 10.12 und Abb. 10.13).

#### **7.5.4.1 Testung des HBE und der HBE-Subfraktionen**

In Abhängigkeit vom Gehalt an HBE (A) im Inkubationsmedium wurde mit zunehmender Konzentration eine Abnahme der TBH-induzierten intrazellulären ROS in Caco-2 Zellen beobachtet. Eine signifikante Abnahme der TBH-induzierten ROS gegenüber der Mediumkontrolle (0  $\mu\text{g/ml}$  HBE) wurde ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  nach 1 h Inkubation gezeigt (siehe Abb. 7.27). Bei Inkubationen (1 h) mit den beiden Subfraktionen Anthocyan- (B) und Polymerfraktion (D) konnte über den gesamten Konzentrationsbereich (1 - 500  $\mu\text{g/ml}$  HBE) kein Einfluss auf die TBH-induzierten intrazellulären ROS nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde nach Inkubation mit der Phenolcarbonsäurefraktion (C) bei einer Konzentration von 76  $\mu\text{g/ml}$  (1 h; entspricht dem Anteil in 500  $\mu\text{g/ml}$  HBE) eine signifikante Verminderung der TBH-induzierten ROS detektiert (siehe Abb. 7.27). Es ist aus der Literatur bekannt, dass Phenolcarbonsäuren (aus dem Apfel), im Konzentrationsbereich von 10 - 100  $\mu\text{M}$ , die durch TBH-induzierten ROS in Caco-2 Zellen signifikant reduzierten [Bellion et al., 2008; Bellion et al., 2010].

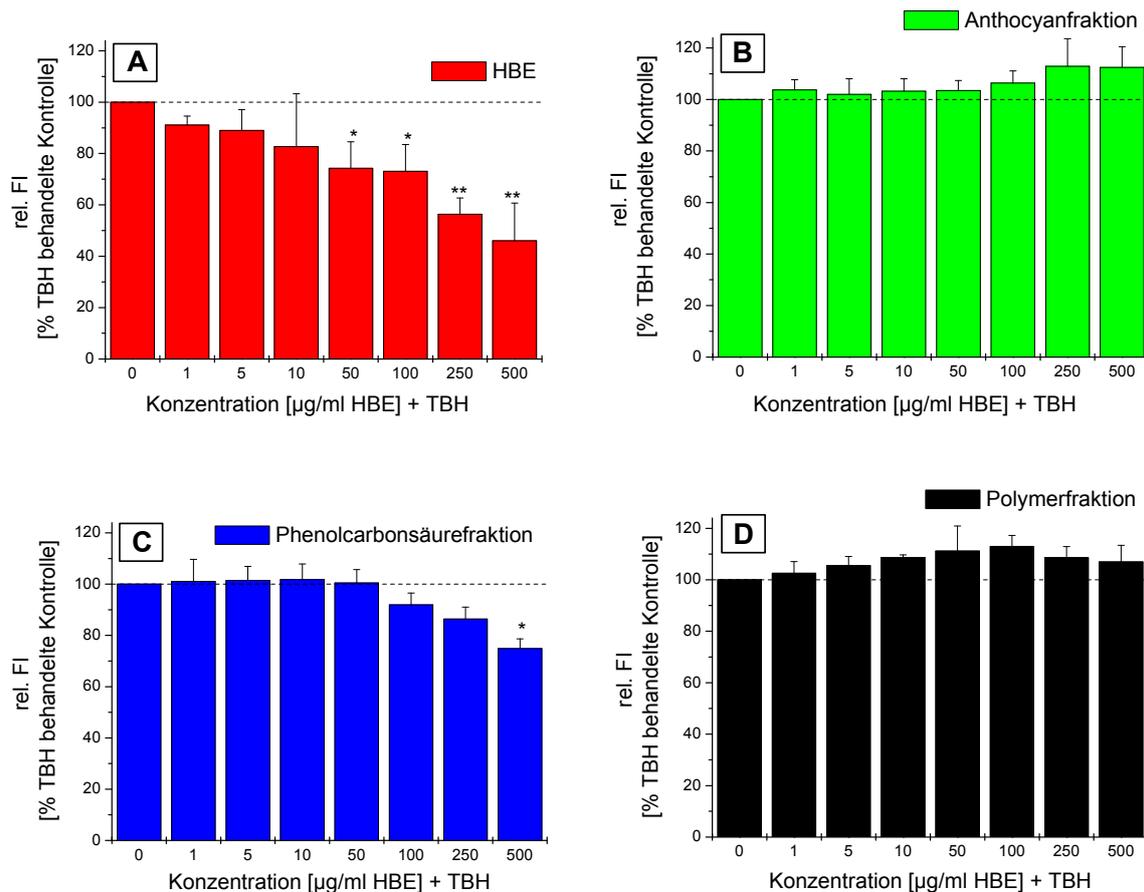


Abb. 7.27: Modulation der TBH-induzierten intrazellulären ROS-Level in Caco-2 Zellen nach 1 h Vorinkubation mit HBE (A) und dessen Subfraktionen (Anthocyan- (B), Phenolcarbonsäure- (C) und Polymerfraktion (D); 0 bis 500 µg/ml) und Nachbehandlung mit TBH; 250 µM; 40 min); n = 3-5; mean ± SD; Student's t-test: \*p < 0.05; \*\*p < 0.01.

In Abb. 7.28 sind vergleichend die Ergebnisse der 24 h Vorinkubationen mit HBE (E) und den HBE-Subfraktionen (Anthocyan- (F), Phenolcarbonsäure- (G) und Polymerfraktion (H) mit Caco-2 Zellen, ihrem Anteil am HBE entsprechend, siehe Kap. 6.4.6) dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass die erzielten Effekte auf den TBH-induzierten ROS-Gehalt der Caco-2 Zellen nach 24 h mit denen der 1 h Vorinkubationen vergleichbar waren. Vorinkubationen mit HBE zeigten ab 100 µg/ml HBE und ab 38 µg/ml Phenolcarbonsäurefraktion (G) (entspricht dem Anteil in 250 µg/ml HBE) signifikante Erniedrigungen der TBH-induzierten intrazellulären ROS. Die beiden weiteren Subfraktionen, die Anthocyan- (F) und die Polymerfraktion (H), wiesen keinen Einfluss auf den TBH-induzierten ROS-Gehalt der Caco-2 Zellen auf (siehe Abb. 7.28).

Die nach 1 und 24 h Vorinkubationen mit der Phenolcarbonsäurefraktion (C) (G) erzielten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass vor allem diese Fraktion im HBE einen Beitrag zur Reduzierung TBH-induzierten oxidativen Stresses in Caco-2 Zellen leistet (siehe Abb. 7.27 und Abb. 7.28). Damit kann jedoch nicht der komplette Effekt des HBE auf TBH-induzierte intrazelluläre ROS in Caco-2 Zellen erklärt werden. Vermutlich ist ein Zusammenspiel der einzelnen Fraktionen für dessen ROS reduzierende Wirksamkeit verantwortlich.

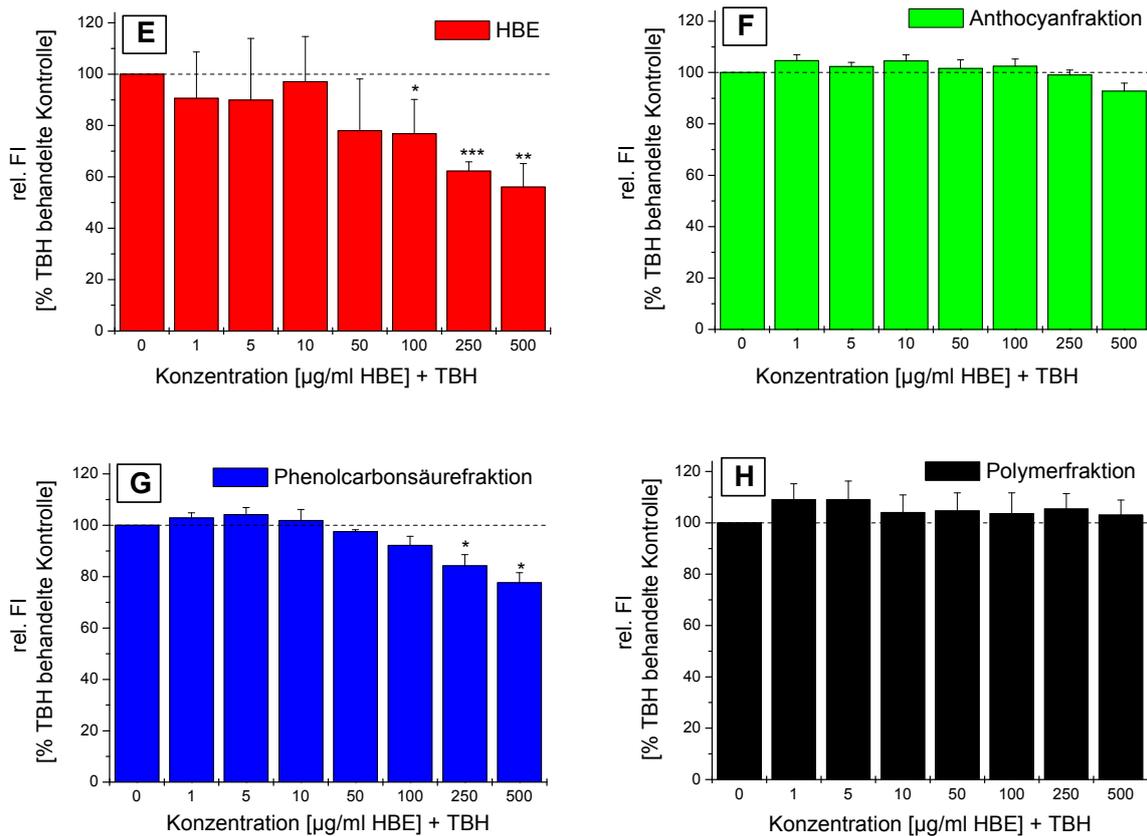


Abb. 7.28: Modulation der TBH-induzierten intrazellulären ROS-Level in Caco-2 Zellen nach 24 h Vorinkubation mit HBE (E) und dessen Subfraktionen (Anthocyan- (F), Phenolcarbonsäure- (G) und Polymerfraktion (H); 0 bis 500 µg/ml) und Nachbehandlung mit TBH; 250 µM; 40 min; n = 3-5; mean ± SD; Student's t-test: \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.

#### 7.5.4.2 Testung der mit HBE-beladenen Kapselsysteme

Zum Einfluss der unterschiedlichen Kapselpräparationen auf die Modulation TBH-induzierter intrazellulärer ROS in Caco-2 Zellen nach 1 h Vorinkubation stellte sich heraus, dass alle HBE-beladenen Pektinamidhohl- (I), Molkenprotein- (K) und Apfelpektinkapseln (L) (intakt oder mechanisch aufgeschlossen) einen signifikanten Einfluss besaßen (siehe Abb. 7.29). Diese signifikante Erniedrigung der TBH-induzierten ROS war bei allen drei untersuchten HBE-beladenen Kapselsystemen in vergleichbaren Konzentrationsbereichen (500 µg/ml HBE) zu beobachten. Eine Reduzierung der TBH-induzierten ROS in Caco-2 Zellen mit steigenden HBE Konzentrationen (wie schon bei den Vorinkubationen mit unverkapseltem HBE beobachtet (A) (E) Abb. 7.27 und Abb. 7.28), konnte durch die Vorinkubationen mit den drei HBE-beladenen Kapselsystemen nach 1 h Inkubation bestätigt werden (siehe Abb. 7.29).

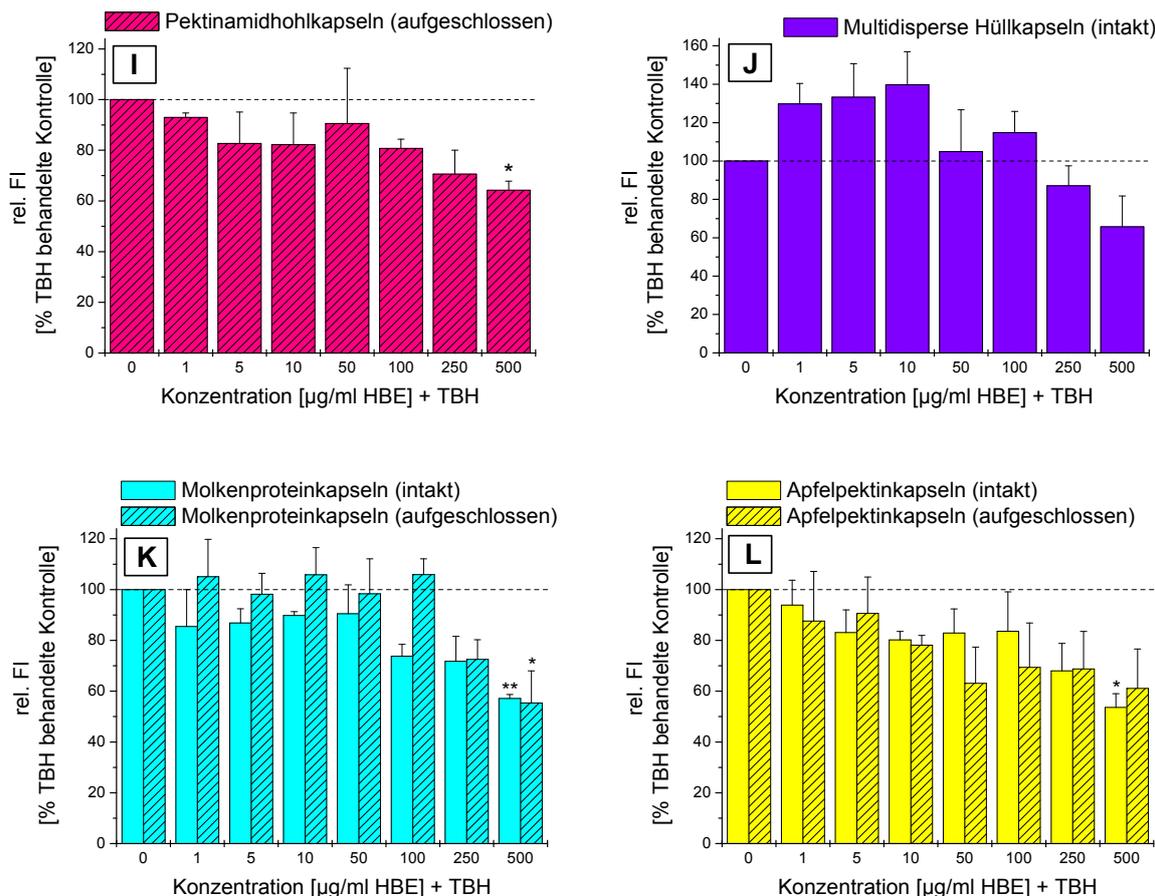


Abb. 7.29: Modulation der TBH-induzierten intrazellulären ROS-Level in Caco-2 Zellen nach 1 h Vorinkubation mit unterschiedlichen HBE-beladenen Kapselpräparationen (Pektinamidhohl- (I), multidisperse Hüll- (J), Molkenprotein- (K), Apfelpektinkapseln (L); 0 bis 500  $\mu\text{g/ml}$ ; mechanisch aufgeschlossen bzw. intakt) und Nachbehandlung mit TBH; 250  $\mu\text{M}$ ; 40 min);  $n = 3-5$ ; mean  $\pm$  SD; Student's *t*-test: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

Nach 24 h Vorinkubationen mit den HBE-beladenen Kapselpräparationen (Pektinamidhohl- (M), Molkenprotein- (N), multidisperse Hüll (O) und Apfelpektinkapseln (P)) mit Caco-2 Zellen wurden mit den 1 h Inkubationen vergleichbare Ergebnisse erhalten (siehe Abb. 7.30). Es zeigte sich, dass die signifikantesten Effekte zur Reduzierung intrazellulärer ROS durch HBE-beladene Pektinamidhohl- (M), Molkenprotein- (N) und Apfelpektinkapseln (P) bei einer Konzentration von 500  $\mu\text{g/ml}$  HBE nachgewiesen werden konnten. Dabei stellten sich die Apfelpektinkapseln als potentestes System heraus, da eine erste signifikante Erniedrigung TBH-induzierter ROS schon ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  HBE nachweisbar war.

Durch diese Vergleichbarkeit der Ergebnisse des HBE (A) (E) und der drei HBE-beladenen Systeme (Pektinamidhohl- (I) (M), Molkenprotein- (K) (N) und Apfelpektinkapseln (L) (P) wurde gezeigt, dass die Verkapselungstechniken bzw. die verwendeten Materialien offensichtlich keinen Einfluss auf die antioxidative Wirksamkeit des HBE besaßen. Für das Kapselsystem multidisperse Hüllkapseln (J) (N) wurde weder nach 1 h noch nach 24 h Vorinkubation ein Effekt auf TBH-induzierte ROS in Caco-2 Zellen nachgewiesen (siehe Abb. 7.29 und Abb. 7.30). Der Grund dafür könnte die äußere Ölphase der Kapseln darstellen

(siehe Kap. 6.3.4), wodurch es vermutlich zum aufschwimmen im Zellkulturmedium kam. Dadurch fand offensichtlich keine Freisetzung der wirksamen Komponenten des HBE bei 1 h und 24 h Vorinkubation statt.

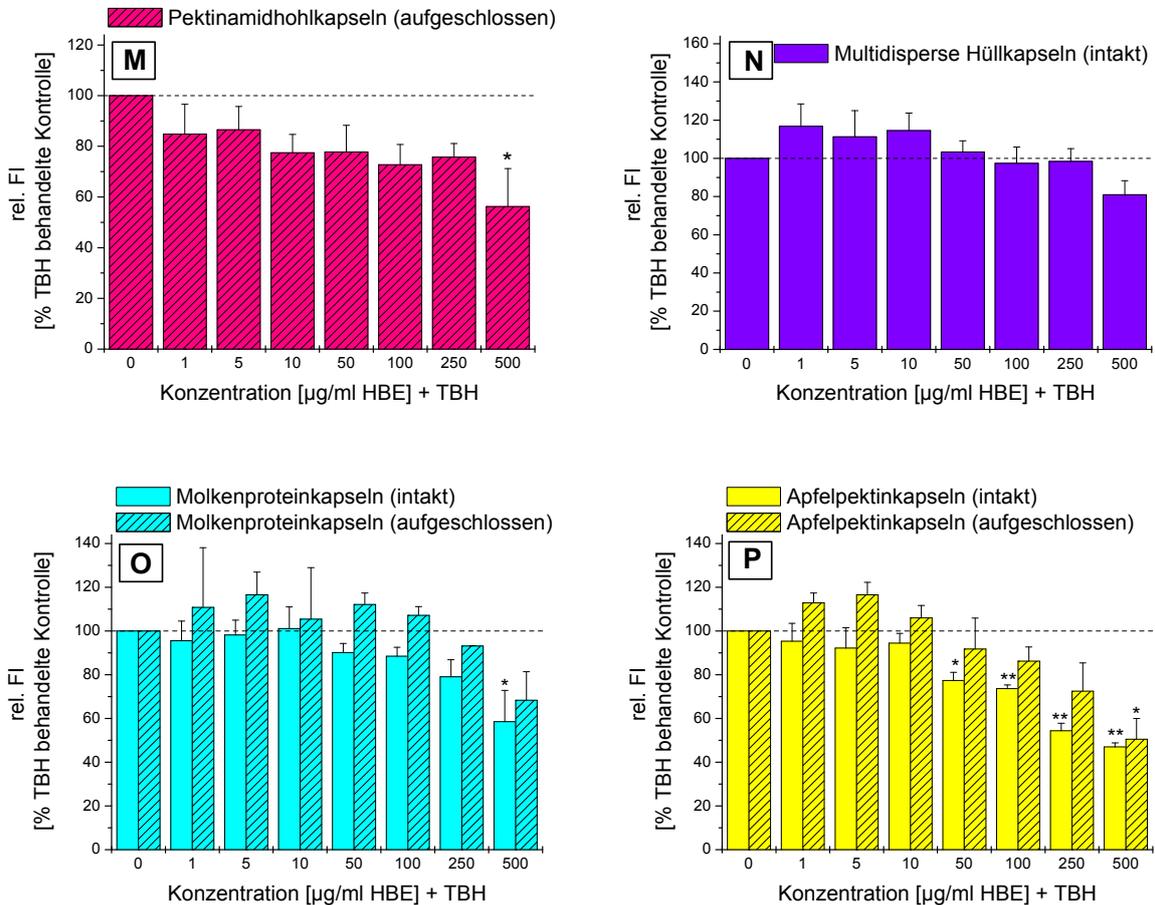


Abb. 7.30: Modulation der TBH-induzierten intrazellulären ROS-Level in Caco-2 Zellen nach 24 h Vorinkubation mit unterschiedlichen HBE-beladenen Kapselpräparationen (Pektinamidhohl- (M), multidisperse Hüll- (N), Molkenprotein- (O), Apfelpektinkapsel (P); 0 bis 500 µg/ml; mechanisch aufgeschlossen bzw. intakt) und Nachbehandlung mit TBH; 250 µM; 40 min); n = 3-5; mean ± SD; Student's t-test: \*p < 0.05; \*\*p < 0.01.

## 8 Diskussion

Es ist aus der Literatur bekannt, dass die Bioverfügbarkeit einer Substanz am Zielort für deren Wirksamkeit im menschlichen Körper von entscheidender Bedeutung ist [Crozier *et al.*, 2009]. Aufgrund dieser Tatsache wurde die Stabilität und Freisetzung von Anthocyanen aus Wildheidelbeerextrakt (HBE) (*Vaccinium myrtillus* L.) im Vergleich zu unterschiedlichen HBE-beladenen Verkapselungssystemen unter Bedingungen des Gastrointestinaltrakts (GIT) untersucht. Dafür wurden von verschiedenen Projektpartnern TP 2, 3 und 5 (die sich auf die Verkapselung von aktiven Stoffen spezialisiert haben) HBE-beladene Kapseln zur Verfügung gestellt.

Da das Hauptaugenmerk der in dieser Arbeit durchgeführten Studien auf bekanntermaßen biologisch aktiven Inhaltsstoffen des HBE (Anthocyanen) lag, war es unerlässlich, authentische Referenzsubstanzen zur Charakterisierung und Quantifizierung der Einzelverbindungen im HBE zu erhalten. Die in dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Anthocyanstandards wurden zum einen käuflich erworben und zum anderen von Dr. Michael Kraus, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt [Kraus *et al.*, 2010]. Mit Hilfe dieser Reinsubstanzen war es möglich eine HPLC-Methode zu etablieren, die eine Trennung aller 15 im HBE enthaltenen Anthocyane gewährleistete. Ein Vergleich dieser Methode bzw. der erhaltenen Chromatogramme mit literaturbekannten Daten ergab, dass es gelungen war, eine „Baseline“-Trennung aller Anthocyane zu erhalten [Latti *et al.*, 2008; Latti *et al.*, 2009; Mauray *et al.*, 2009; Sakakibara *et al.*, 2009]. Zusätzlich wurde ein für Wildheidelbeeren authentisches Anthocyanprofil von 15 Anthocyanen (Del-3-O-glc, Cy-3-O-glc, Del-3-O-ara, Cy-3-O-gal, Del-3-O-gal, Pet-3-O-glc, Cy-3-O-ara, Mal-3-O-glc, Pet-3-O-gal, Pet-3-O-ara, Peo-3-O-glc, Mal-3-O-ara, Mal-3-O-gal, Peo-3-O-gal, Peo-3-O-ara) bestätigt (siehe Abb. 7.1) [Kahkonen *et al.*, 2003; Kraus *et al.*, 2010; Latti *et al.*, 2008; Latti *et al.*, 2009].

### 8.1 Stabilität und Freisetzung der Anthocyane im simulierten Gastrointestinaltrakt (GIT)

Um den Einfluss des Gastrointestinaltrakts auf die Anthocyane des HBE und der daraus hergestellten HBE-beladenen Kapselsysteme (Pektinamidhohl-, Molkenprotein-, multidisperse Hüll- und Apfelpektinkapseln; siehe Kap. 6.3) zu überprüfen, wurden in Kooperation mit TP 6 (AG Mäder) vergleichende *in vitro* Freisetzungs- und Stabilitätsuntersuchungen im simulierten Magensaft (SGF; engl. *simulated gastric fluid*) bei einem pH-Wert von 1.5 durchgeführt. Hierfür wurde *in vitro* (kontinuierliche Durchmischung bei 37 °C) eine köpermimetische Magensaftlösung (SGF, nach [Abdalla *et al.*, 2008]) eingesetzt und sowohl der HBE, als auch die Kapselpräparate (Pektinamidhohl-, Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln) inkubiert. Die genaue Charakterisierung der einzelnen Kapseln (Größe, Zusammensetzung und HBE-Beladung) sind in Tab. 6.2 zusammengefasst. Es stellte sich heraus, dass die multidispersen Hüllkapseln, aufgrund ihrer geringen HBE-Beladung, nicht für die Freisetzungsversuche eingesetzt werden konnten (siehe Abb. 6.7). Anschließend

erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Probenaufbereitung und die Analytik mittels HPLC-UV/VIS bei 520 nm. Hierbei zeigte sich, dass bei Inkubationen über einen Zeitraum von 120 min mit HBE die Anthocyankonzentration im Medium (SGF) relativ konstant zwischen 87% und 97% der eingesetzten Menge (2.5 mg/ml entspricht 100% Gesamtanthocyane) verblieb (siehe Abb. 7.3; A - D). Dieser Effekt ist auf den pH-Wert des Magens von 1.5 zurückzuführen, da die Anthocyane dort als stabilisierte Flavylum-Kationen vorliegen und somit ein Abbau bzw. eine Strukturänderung verhindert wird [McGhie *et al.*, 2007]. Dass Anthocyane bei niedrigeren pH-Werten (1 - 3) stabilisiert vorliegen, ist bereits aus der Literatur bekannt und in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben. Zum Beispiel zeigte Woodward *et al.*, dass Cyanidin-3-O-glukosid und Pelargonidin-3-O-glukosid (200 µM) während einer Inkubation in simuliertem Magensaft (pH 2, ohne Enzym) über einen Zeitraum von 30 min nicht abgebaut wurden [Woodward *et al.*, 2011]. Ein weiterer Beweis dafür, dass Anthocyane unter den Bedingungen des Magens nicht abgebaut werden lieferte die Gruppe um McDougall. Diese inkubierte einen aus Rotkraut isolierten anthocyanreichen Extrakt über 2 h in simuliertem Magensaft (pH 2, mit Enzym (Pepsin)). Dabei wurde keine Abnahme der Anthocyankonzentration über die Zeit beobachtet [McDougall *et al.*, 2007]. Ein vergleichbares Ergebnis lieferte eine Studie von Bermudez-Soto *et al.*, in der ein anthocyanreicher Apfelbeerenextrakt in simuliertem Magensaft (pH 2, mit Enzym (Pepsin)) über 2 h inkubiert und keine Abnahme der Anthocyankonzentration nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich wurde in dieser Studie Cyanidin-3-O-rutinosid bei pH 2 inkubiert und keine Abnahme der Anthocyankonzentration festgestellt [Bermudez-Soto *et al.*, 2007].

Des Weiteren wurden im Rahmen der Dissertation drei unterschiedliche HBE-beladene Kapselsysteme (Pektinamidhohl-, Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln) unter den Bedingungen des Magens in SGF inkubiert. Bei den untersuchten Kapselsystemen Pektinamidhohl- und Apfelpektinkapseln lagen bereits zu Beginn der Inkubation ca. 20% und bei den Molkenproteinkapseln ca. 60% der enthaltenen Anthocyane frei im Medium vor (siehe Abb. 7.3). Nach 20 min wurde der Hauptanteil der Anthocyane des HBE aus den erstgenannten Kapseln freigesetzt, wohingegen der Hauptanteil der Anthocyane aus Molkenproteinkapseln innerhalb der ersten 10 min stattfand. Im weiteren Verlauf von 100 min wurde in diesem System keine Abnahme der Anthocyankonzentration beobachtet. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Inkubationen mit unverkapseltem HBE in SGF, da ebenfalls keine Abnahme der Anthocyankonzentration über einen Zeitraum von 120 min nachgewiesen wurde. Die großen Unterschiede in den Freisetzungsraten der Systeme untereinander könnten hauptsächlich auf die unterschiedlichen Kapseldurchmesser zwischen 180 µm bis 2000 µm (siehe Tab. 6.2) zurückgeführt werden. Es wird vermutet, dass je kleiner eine Kapsel ist, desto mehr Oberfläche steht dem umgebenden Medium als Kontaktfläche bzw. zur Freisetzung zur Verfügung.

Ein Vergleich der Konzentrations-Zeit-Verläufe bei Studien mit Pektinamidhohl- und Apfelpektinkapseln war eine schnellere Freisetzung der Anthocyane aus den Pektinamidhohlkapseln in SGF zu erwarten, da das System einen Kapseldurchmesser von > 1000 µm aufwies (siehe Abb. 6.6) und nicht durch ein Coating vor Diffusionsprozessen geschützt wurde. Analoge Ergebnisse wurden in einer aktuell publizierten Studie

nachgewiesen, bei der feste, mit Heidelbeerextrakt beladene Pektinamidkugeln (Durchmesser 1000 - 2000  $\mu\text{m}$ ) ohne Schellack-Beschichtung verwendet wurden. Es zeigte sich, dass innerhalb von 1 h bis zu 70% der enthaltenen Anthocyane freigesetzt wurden [Oehme *et al.*, 2011]. Im Gegensatz zu dieser Studie waren die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Apfelpektinkapseln durch eine zusätzlich aufgebrachte Schellackschicht geschützt, was zu einer verzögerten Freisetzung führen sollte.

Die rasche Freisetzung der Anthocyane aus den mit Schellack beschichteten Apfelpektinkapseln in SGF kann anhand rasterelektronenmikroskopischen (REM)-Aufnahmen, die am Institut für Geowissenschaften, Abt. Geologie, der CAU Kiel angefertigt wurden erklärt werden (siehe Abb. 8.1 (links)).

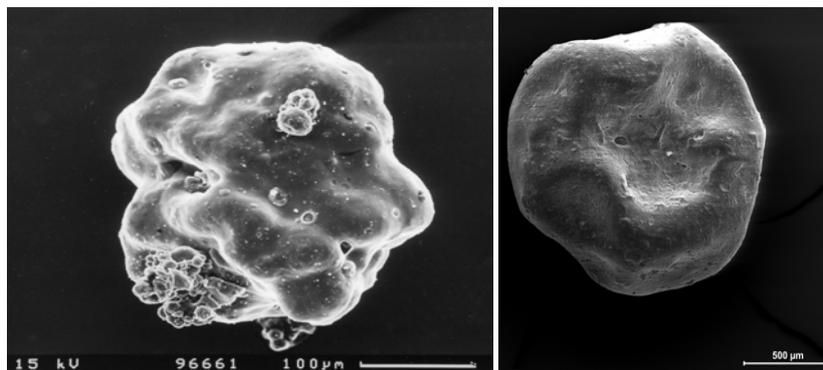


Abb. 8.1: links: REM-Aufnahme der untersuchten Apfelpektinkapsel mit Schellackbeschichtung (100  $\mu\text{m}$ ) [Institut für Geowissenschaften, CAU Kiel]; rechts: REM-Aufnahme von Schellack beschichteten Pektinamidkugeln [Oehme *et al.*, 2011].

Darauf ist eindeutig zu erkennen, dass die Kapseln eine raue, unregelmäßige und brüchige Beschichtung aufwiesen. Dies kann laut Literatur dazu führen, dass der Schutzfilm aus Schellack permeabel wird und somit eine ungewollte, frühzeitige Freisetzung stattfindet [Tzika *et al.*, 2003]. Ein ähnliches Phänomen trat bei einer Studie von Maestrelli *et al.* auf. Dort wurden mit Theophyllin beladene Pektinamidkapseln, die mit Schellack in unterschiedlichen Stärken ummantelt waren, in einer Magensaftsimulation (pH 1.1, ohne Enzym) inkubiert. Dabei wurden bei Schellackschichten, die 0 - 33% des Kapselvolumens betrug, eine schnelle Freisetzung von 20 - 100% des verkapselten Theophyllins beobachtet. Zurückgeführt wurde diese Freisetzung auf Poren, die das Eindringen von Flüssigkeit ermöglichten und somit zu einem vorzeitigen Aufquellen der Schellackschicht führten [Maestrelli *et al.*, 2008]. Diese Beobachtungen mit Theophyllin beladenen Pektinamidkapseln in simulierten Magensaft (pH 1.1, ohne Enzym) konnten von Mura *et al.* ebenfalls gezeigt werden [Mura *et al.*, 2003].

In der Studie von Öhme *et al.* wurden die mit Heidelbeerextrakt beladenen Pektinamidkugeln noch zusätzlich mit einer Schellackschicht in unterschiedlichen Schichtdicken überzogen. Hierbei wurde mit steigender Schichtdicke der Schellackbeschichtung eine verzögerte bzw. verhinderte Freisetzung im Magenmilieu (pH 2.0, SGF) über den Inkubationszeitraum erreicht. Nach 3 h Inkubation, lagen bei einer Schellackbeschichtung von 8% über 70% der

verkapselten Anthocyane frei vor. Ab einer Beschichtung von 15% Schellack konnte eine Freisetzung der verkapselten Anthocyane im Magensaft unter 40% und ab einer Beschichtung von 19% Schellack unter 20% gesenkt werden. Eine noch effizientere Freisetzungshemmung (< 5%, 3 h, SGF) wurde vor allem durch eine dicke (15% Schellack), gleichmäßige und glatte Beschichtung der eingesetzten Pektinamidkugeln erreicht (siehe Abb. 8.1 (rechts)) [Oehme et al., 2011].

Aufgrund der frühzeitigen und kompletten Freisetzung der Anthocyane aus den untersuchten HBE-beladenen Kapselsystemen (unabhängig vom Kapseltyp) im simulierten Magensaft (SGF) war es nicht möglich, die Präparate direkt in die Simulation des Dünndarms (FeSSIF, siehe Kap. 6.7.1.2) zu überführen. Deshalb wurden weiterführende Inkubationen, die den nächsten Bereich des GIT (Dünndarmsimulation, FeSSIF) simulieren sollten mit unverdauten Kapselsystemen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass im Vergleich der Studien mit HBE und den drei untersuchten HBE-beladenen Kapselsystemen (Pektinamidhohl-, Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln) ab einer Inkubationsdauer von 20 min, signifikant höhere Anthocyankonzentrationen über die Inkubationsdauer von 130 min erreicht wurden. Nach 150 min betrug der Unterschied, bezogen auf die Gesamtanthocyangehalte des Systems, zwischen HBE und den HBE-beladenen Kapselsystemen über 30% (siehe Abb. 8.2). Dieser Unterschied in der Gesamtanthocyankonzentration kann auf eine verzögerte und kontinuierliche Freisetzung der Anthocyane aus den Kapseln zurückgeführt werden. Die Freisetzung der Anthocyane aus den beiden HBE-beladenen Kapselsystemen Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln wiesen einen ähnlichen Verlauf auf, welcher sich lediglich in der Anfangskonzentration (60% und 20% der eingesetzten Anthocyankonzentration) unterschied (siehe Abb. 8.2).

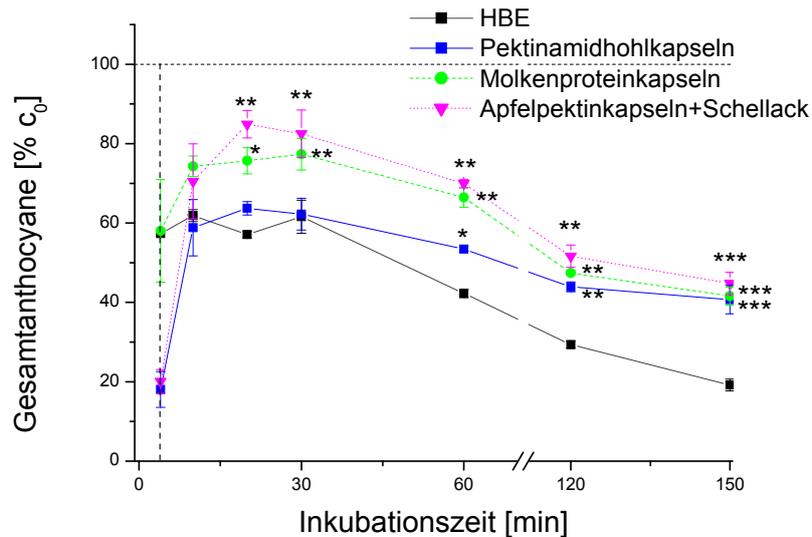


Abb. 8.2: Kontrollierte gastrointestinale Freisetzungen der Anthocyane in simuliertem Dünndarminhalt (FeSSIF) mit HBE und HBE-beladenen Kapselsystemen (Pektinamidhohl-, Molkenprotein-, Apfelpektinkapseln mit Schellackbeschichtung;  $c_0$ : 2.5 mg/ml HBE als 100% Gesamtanthocyane angegeben). Erfassung der Gesamtanthocyankonzentration mittels HPLC-UV/VIS (520 nm;  $n = 3$ , mean  $\pm$  SD), Student's *t*-test: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Die horizontal gestrichelte Linie stellt die Zeit dar, die benötigt wird um die HBE-beladenen Kapselsysteme mit FeSSIF zu homogenisieren und anschließend die Probe in die Apparatur einzuspannen.

Nach 20 min Inkubation mit beiden Kapselsystemen wurde ein signifikanter Konzentrationsunterschied im Vergleich zu Untersuchungen mit unverkapseltem HBE beobachtet; dieser konnte mit Pektinamidhohlkapseln erst nach 1 h Inkubation nachgewiesen werden. Diese Unterschiede können auf die spezifischen Kapselmerkmale, wie Größe, Herstellung, Material und Beschichtung zurückgeführt werden (siehe Tab. 6.2), die eine entscheidende Rolle bei der Freisetzung von Wirkstoffen spielen. Es wird vermutet, dass je kleiner eine Kapsel ist, desto mehr Oberfläche steht dem umgebenden Medium als Kontaktfläche zur Verfügung und umso schneller erfolgt die Wirkstofffreisetzung. Des Weiteren wurde in literaturbekannten Studien gezeigt, dass unterschiedliche Schellackbeschichtungen bzw. Schichtdicken ein verändertes Freisetzungsverhalten lieferten [Maestrelli *et al.*, 2008; Oehme *et al.*, 2011]. In einem Artikel von Betz *et al.* wurde anschaulich gezeigt, wie bei der Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Molkenproteinkapseln die Anthocyankonzentrationen beeinflusst werden können. Sowohl durch unterschiedliche Temperaturen 70 - 90 °C als auch durch Veränderung des pH-Werts (1.5 oder 3.0) könnte ein Abbau der Anthocyanen um bis zu 10% auftreten. Des Weiteren kann bei diesem System eine prozessbedingte Oberflächenbindung der Anthocyane angenommen werden, da der HBE komplett in dem verwendeten Kapselmaterial gelöst wurde. Dies führte dazu, dass die gleiche Konzentration an Anthocyanen über die ganze Kapsel verteilt vorlag (siehe Abb. 6.3) [Betz *et al.*, 2011]. Ein ähnlicher Effekt muss bei der Herstellung der Apfelpektinkapseln mittels Sprühtrocknung angenommen werden. So wurde der HBE ebenfalls komplett im Kapselmaterial gelöst und anschließend über eine heiße Düse (> 100 °C) versprüht (siehe Abb. 6.4). Dadurch lagen die

Anthocyane über die ganze Kapsel verteilt vor. Eine zusätzliche Schellackbeschichtung wurde aufgetragen, wodurch eine frühzeitige Freisetzung verhindert werden sollte. Dies wird im Vergleich der beiden Kurvenverläufe der Anthocyankonzentration zum Zeitpunkt  $t = 0$  h deutlich (Molkenproteinkapseln: 60% und Apfelpektinkapseln: 20% freigesetzte Anthocyane) (siehe Abb. 8.2). Robert *et al.* zeigten, dass bei dem Verkapseln von anthocyanreichen Extrakten auch das verwendete Kapselmaterial eine Rolle spielt. Es stellte sich heraus, dass Maltodextrine beim verkapseln mittels Sprühtrocknung besser als Sojabohnenproteinisolat geeignet waren [Robert *et al.*, 2010].

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit durchgeführten Inkubationen in SGF, bei denen nach 10 min alle Anthocyane aus den HBE-beladenen Kapselsystemen frei vorlagen und im weiteren Verlauf kein Abbau stattfand, wurde in FeSSIF erst nach 20 min ein Maximum (abhängig vom Kapseltyp) an Anthocyanen erreicht (siehe Abb. 8.2). Die Anthocyankonzentration nahm sowohl nach der Freisetzung aus den Kapseln, als auch bei den HBE Inkubationen stetig ab. Dies ist hauptsächlich auf den pH-Wert des verwendeten Mediums (FeSSIF: pH 6.8) und die damit verbundene Strukturänderungen bzw. den daraus resultierenden Abbau der Anthocyane zurückzuführen (siehe Abb. 2.4) [McGhie *et al.*, 2007; Pascual-Teresa *et al.*, 2008]. Des Weiteren zeigte ein Vergleich der Inkubationen in FeSSIF mit SGF, dass die Freisetzung (unabhängig vom Kapseltyp) nie 100% der eingesetzten Anthocyankonzentration erreichte. Dies kann mit einem pH-Wert-abhängigen Abbau der gleichzeitig zur Freisetzung stattfand, erklärt werden. Bei Inkubationen eines anthocyanreichen Apfelbeerenextrakt in simuliertem Dünndarminhalt (pH 7.5, mit Enzym (Pankreatin)) wurde nach 2 h eine Abnahme der Gesamtanthocyankonzentration um 43% nachgewiesen [Bermudez-Soto *et al.*, 2007]. Ein vergleichbares Ergebnis wurde bei Inkubationen von Cyanidin-3-O-glukosid und Pelargonidin-3-O-glukosid (200  $\mu$ M) mit simuliertem Dünndarminhalt (pH 6.7, mit Enzym (Pankreatin)) erzielt. Es wurde nach Ablauf der Inkubation (30 min) eine signifikante Abnahme der Anthocyankonzentration um 30% gegenüber der Ausgangskonzentration nachgewiesen [Woodward *et al.*, 2011].

Um eine Aussage über eine mögliche Protein-Anthocyan-Bindung treffen zu können, wurden Untersuchungen mit der für die Molkenproteinkapselherstellung verwendeten Proteinlösung und HBE in FeSSIF durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass über den gesamten Inkubationszeitraum (150 min) im Gegensatz zum HBE (ohne Proteinlösung) eine um 30% höhere Anthocyankonzentrationen nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 7.4). Dieses Ergebnis unterstützt die in der Literatur aufgestellte Vermutung einer Protein-Anthocyan-Bindung [Viljanen *et al.*, 2005]. In einer aktuellen Studie wurde der Zusammenhang zwischen Molekülstruktur und Proteinbindungsaffinität an Rinder- $\gamma$ -globulin mittels Fluoreszenztitration untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass eine Methylierung der Hydroxygruppen des Anthocyan und eine Hydrierung der Doppelbindungen am C-Ring die Proteinbindungsaffinität reduziert. Eine Erhöhung der Affinität zu  $\gamma$ -Globulin wurde sowohl durch Hydroxylierung des A, B und C-Rings, als auch durch Glykosylierung des Anthocyan erreicht [Xiao *et al.*, 2011].

Durch Inkubationen mit humanem Dünndarminhalt (näher an der *in vivo* Situation) wurde deutlich, dass der Abbau der Anthocyane durch unterschiedliche Verkapselungstechniken (Pektinamidhohl-, Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln) beeinflusst wurde. Durch die mit der Verkapselung erreichte verzögerte Freisetzung konnte über einen definierten Zeitraum (bis zu 8 h) der Anthocyanabbau kompensiert werden (siehe Abb. 8.3). Dass Anthocyane im Dünndarm einem starken Abbau bzw. einer schnellen Metabolisierung durch Darmbakterien (*Bifidobacterium* und *Lactobacillus*) unterliegen, wurde von Avila *et al.* gezeigt. Diese isolierten Bakterienstämme, die hohe intra- und extrazelluläre  $\beta$ -Glukosidase Aktivitäten aufwiesen, wurden mit Del-3-O-glc und Mal-3-O-glc über 1, 5 und 24 h inkubiert (pH 6.8). Nach 5 h Inkubation waren 60% und nach 24 h 100% des eingesetzten Del-3-O-glc abgebaut, wobei als Hauptabbauprodukt Gallussäure und in Spuren Homogentisinsäure und Syringasäure nachgewiesen wurden. Bei Inkubationen mit Mal-3-O-glc wurden Syringasäure, Homogentisinsäure, Gallussäure und in Spuren *p*-Cumarsäure detektiert. Während der Inkubationen mit Del-3-O-glc und Mal-3-O-glc konnten die entsprechenden Aglyka nachgewiesen werden [Avila *et al.*, 2009]. In einer Vielzahl weiterer Studien wurde die Spaltung der Anthocyane durch die Mikroflora des Darms beschrieben. Dabei wurden die eingesetzten Anthocyane durch eine spezifische  $\beta$ -Glukosidase Aktivität zu den korrespondierenden Anthocyanidinen aufgespalten, welche sowohl durch die Mikroflora [Aura *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2009; Keppler *et al.*, 2005; Kraus *et al.*, 2010], als auch aufgrund des pH-Wertes [Woodward *et al.*, 2009] im Darm weiter abgebaut wurden.

Durch vergleichende Inkubationen (gleiche Konzentrationen, 6 mg/ml HBE entspricht 100% Gesamtanthocyane) im Carbonat-Phosphat-Puffer und humanem Dünndarminhalt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Mikroflora einen größeren Einfluss auf den Abbau der Anthocyane besaß als der pH-Wert. So wurde ein schnellerer Abbau mit humanem Dünndarminhalt gegenüber Puffer gezeigt. Solche sogenannten Kontrollinkubationen, mit denen die Stabilität der Substanzen im Puffer überprüft, um dadurch einen Rückschluss auf den mikrobiellen Abbau zu ziehen, waren aus der Literatur bereits bekannt und fanden regelmäßig Anwendung. So zeigte beispielweise Knaup *et al.*, dass die untersuchten Quercetinglykoside im Puffer (pH 6.3) nicht abgebaut wurden, wohingegen mit humanem Dünndarminhalt ein schneller Abbau stattfand [Knaup *et al.*, 2007; Knaup *et al.*, 2008]. In einer Studie von Labib *et al.* wurden ebenfalls Inkubationen mit Puffer (pH 6.3) mit der zu testenden Substanz (Hispidulin) durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen aus Inkubationen mit Schweinedarminhalt (Caecum) verglichen. So konnte gezeigt werden, dass die Substanz im Caecum schneller abgebaut wurde als im Puffer [Labib *et al.*, 2006].

Inkubationen mit HBE in unterschiedlichen Konzentrationen (6 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.06 mg/ml HBE) zeigten sowohl im Puffer, als auch mit humanen Dünndarminhalten mit steigenden Anthocyankonzentrationen unterschiedliche Kurvenverläufe. So war bei Inkubationen mit einer hohen Anthocyankonzentration (6 mg/ml HBE) ein geringerer Abbau als bei niedriger Konzentration (0.06 mg/ml) zu beobachten. Eine Erklärung könnte sein, dass in höheren Konzentrationsbereichen Copigmentierungseffekte mit anderen Bestandteilen des HBE wie Phenolsäuren auftraten und dadurch die Anthocyane stabilisiert wurden (siehe Kap. 2.7.1).

Des Weiteren wäre eine Selbstassoziation der Anthocyanmoleküle untereinander denkbar (siehe Kap. 2.7.2).

Ein Vergleich der erhaltenen Ergebnisse in den Dünndarmsimulationsmodellen zeigte, dass durch Inkubationen mit simuliertem Dünndarminhalt (FeSSIF) eine schnellere Freisetzung aus den unterschiedlichen HBE-beladenen Kapselsystemen stattfand, als durch die Inkubationen mit humanen Dünndarminhalten. So wurden höhere Anthocyankonzentrationen im Medium erreicht (siehe Abb. 8.3).

Eine Erklärung für den geringeren Abbau im FeSSIF Medium könnte zum einen die fehlende Enzym- und Bakterienaktivität darstellen [Abdalla *et al.*, 2008]. Zum anderen unterscheiden sich die beiden Versuchsaufbauten (Anaerobkammer, End-Over-End-Apparatur) grundlegend voneinander (siehe Kap. 6.7).

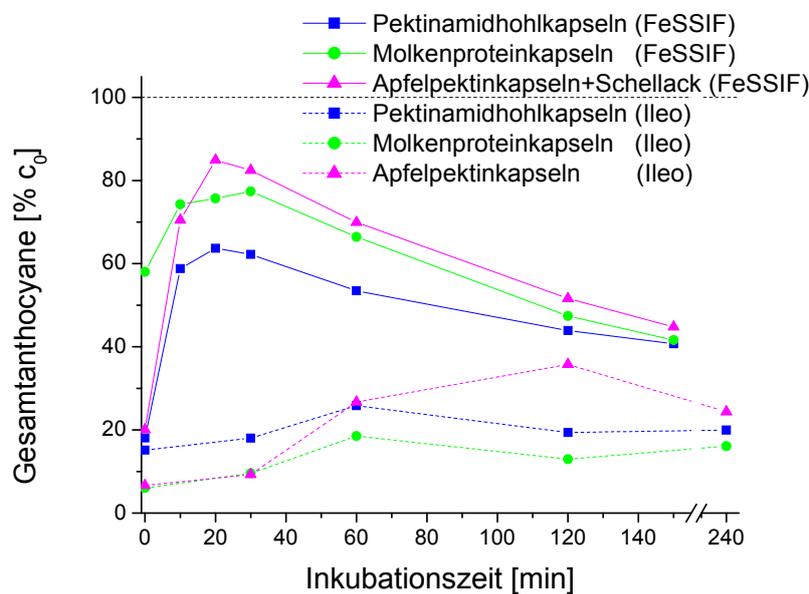


Abb. 8.3: Kontrollierte gastrointestinale Freisetzungen der Anthocyane (in vitro) in simuliertem Dünndarm (FeSSIF) und humanem Dünndarminhalt (Ileostomabeutelinhalt) mit HBE-beladenen Kapselsystemen (Pektinamidhohl-, Molkenprotein-, Apfelpektinkapsel mit Schellackbeschichtung). Erfassung der Gesamtanthocyankonzentration mittels HPLC-UV/VIS und HPLC-DAD (520 nm; n = 2-3)

In Übereinstimmung mit in der Literatur publizierten Ergebnissen könnte ein struktureller Einfluss des Zuckers am Anthocyanmolekül einen Einfluss auf deren Abbaugeschwindigkeit haben [Kraus *et al.*, 2010; McDougall *et al.*, 2007]. Es stellte sich heraus, dass Arabinoside am stabilsten waren, wohingegen Galaktoside und Glukoside fast gleich schnell abgebaut wurden (siehe Abb. 8.4 (A)). Des Weiteren zeigten Studien von Kraus *et al.*, dass die Stabilität der Anthocyane in humanem Dünndarminhalt mit steigender Methylierung am B-Ring anstieg (Malvidin > Petunidin > Cyanidin > Delphinidin). Wohingegen in der vorliegenden Arbeit ein vom Aglykon weitgehend unabhängiger Abbau in humanem Dünndarminhalt beobachtet wurde (siehe Abb. 8.4 (rechts)) [Kraus *et al.*, 2010].

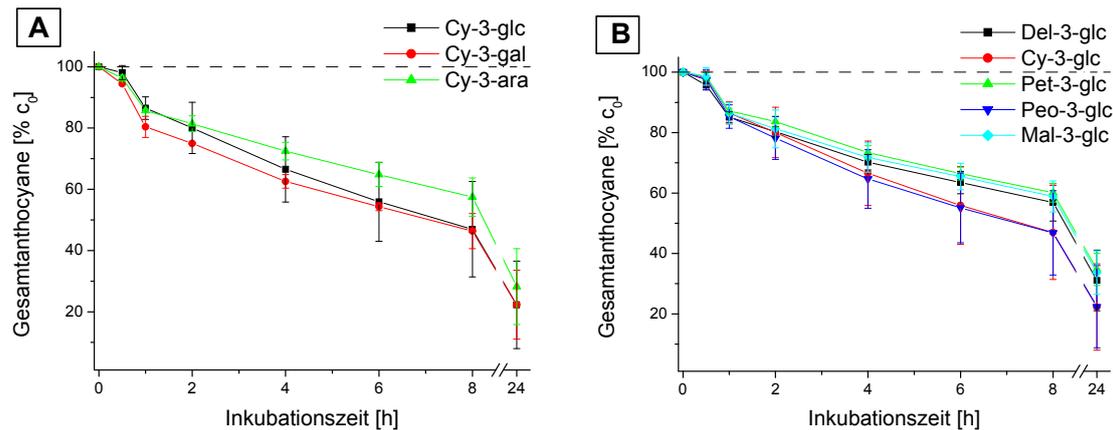


Abb. 8.4: Vergleich der Konzentrationsabnahme ausgewählter Anthocyane des HBE in Abhängigkeit vom Zuckerrest (A) und vom Aglyka (B) ( $c_0$ : 6 mg/ml HBE als 100% Gesamtanthocyane angegeben, humaner Dünndarminhalt, 24 h, 37 °C, anaerobe Bedingungen). Erfassung der Gesamtanthocyankonzentration mittels HPLC-DAD (520 nm;  $n = 2$ ,  $\text{mean} \pm \text{Range}$ )

### 8.1.1 Fazit gastrointestinale Freisetzung und Stabilität

Aufgrund der durchgeführten *in vitro* Freisetzungs- und Stabilitätsuntersuchungen mit den zur Verfügung gestellten HBE-beladenen Kapselsystemen konnte belegt werden, dass es möglich ist (unabhängig vom Kapseltyp) eine verzögerte Freisetzung von Anthocyanen im Dünndarm zu erreichen. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass eine unerwünschte Freisetzung der Anthocyane während der Magenpassage durch eine zusätzliche Schellackbeschichtung verhindert wird. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Einsatz solcher Schellackbeschichtungen eine frühzeitige Freisetzung im Magen verhindern könnte. Bei den Studien von Öhme *et al.* zeigte sich, dass die effizienteste Freisetzungshemmung (< 5% des verkapselten Wirkstoffes, 3 h, SGF) durch eine dicke (15% Schellack), gleichmäßige und glatte Beschichtung der eingesetzten Pektinamidkugeln erreicht wurde [Öehme *et al.*, 2011].

Im simulierten Dünndarmmilieu (FeSSIF) tragen die HBE-beladenen Kapselsysteme (Pektinamidhohl-, Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln) zu einer verzögerten Freisetzung und höheren Anthocyankonzentrationen bei. Nach 150 min Inkubation wurden im Vergleich zum HBE (20% Gesamtanthocyane), sogar doppelt so hohe Konzentrationen (50% Gesamtanthocyane) nachgewiesen (siehe Abb. 8.2). Dieses Ergebnis erlaubt jedoch weder eine Aussage zum Ausmaß der Resorption durch die Darmmukosa noch zum Einfluss des oberen Verdauungstrakts auf die Verfügbarkeit der Anthocyane. Zusätzlich muss der enzymatische und bakterielle Abbau der Kapselmaterialien im Dünndarm und Dickdarm berücksichtigt werden. Dadurch können „neue“ Substanzen mit einem möglichen protektiven Wirkpotential entstehen. So wurde bei Inkubationen von amidiertem Pektin mit humanem Dünndarm- und Dickdarminhalt gezeigt, dass zwischen 70% und 80% der Ausgangsmenge zu SCFA's (engl. *short chain fatty acid*, kurzkettige Fettsäuren) abgebaut wurden [Knaup *et al.*, 2008]. Es ist weiterhin bekannt, dass die entstandenen SCFA's, vor allem Butyrat, die

Bildung von Bifido- und Lactobazillen im Darm unterstützt. Zusätzlich wird vermutet, dass SCFA's positive Wirkungen auf die Zellproliferation, Apoptose und die Muzin Produktion haben [Roy *et al.*, 2006].

Durch Inkubationen mit humanem Dünndarminhalt (Ileostomabeutelinhalt, näher an der *in vivo* Situation) wurde deutlich, dass der Konzentrations-Zeit-Verlauf der Anthocyane durch unterschiedliche Verkapselungstechniken (Pektinamidhohl-, Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln) positiv beeinflusst wurde. Durch die mit der Verkapselung erreichte kontinuierliche Freisetzung konnte über einen definierten Zeitraum (bis zu 8 h) der Anthocyanabbau offensichtlich kompensiert werden.

Ein Vergleich der Ergebnisse beider Dünndarmsimulationen zeigte, dass bei simuliertem Dünndarm (FeSSIF) eine schnellere Freisetzung aus den unterschiedlichen HBE-beladenen Kapselsystemen stattfand und höhere Anthocyankonzentrationen erreicht wurden. Dieser Unterschied in der Freisetzung ist zum einen durch die Verwendung unterschiedlicher Versuchsaufbauten, zum anderen durch intestinale Enzyme oder mikrobielle Enzymaktivität im humanen Dünndarm zu erklären. In einer Studie von Keppler *et al.* wurde gezeigt, dass zwischen 90% und 100% der Anthocyane (Cy-3-O-glc, Mal-3-O-glc, Peo-3-O-glc) durch die Mikroflora des Schweindarms innerhalb von 2 h zu den korrespondierenden Phenolsäuren, abgebaut wurden [Keppler *et al.*, 2005]. Ein mit dieser Studie vergleichbares Ergebnis wurde von Han und Mitarbeitern beobachtet. Es zeigte sich, dass nach Inkubation (3 h) mit Cy-3-O-glc in humanem Darminhalt ca. 70% des Anthocyan durch die Mikroflora metabolisiert wurde [Han *et al.*, 2009].

In Zukunft wird es notwendig sein, die HBE-beladenen Kapselsysteme derart zu optimieren, dass eine Freisetzung im Magen verhindert wird und anschließend die intakten Kapseln den Dünndarm erreichen. Dann wäre es möglich, eine kontinuierliche Freisetzung und konstante Anthocyankonzentration im Dünndarm zu erreichen.

## 8.2 Stabilität der Anthocyane unter Zellkulturbedingungen und Bestimmung eines unlöslichen Rückstands

Um die Untersuchungen zur Wirksamkeit des HBE korrekt bewerten zu können, ist die Kenntnis der Stabilität der Anthocyane unter Zellkulturbedingungen essentiell. Daher wurde mittels HPLC-UV/VIS die Konzentrationsabnahme der Anthocyane im Zellkulturmedium (pH 7.4, ohne FKS) untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Anthocyane des HBE (500 µg/ml HBE entspricht 100% Gesamtanthocyane) innerhalb der ersten Stunde um 14% abgebaut wurden. Nach 24 h Inkubation konnten lediglich 4.3% der eingesetzten Anthocyane wiedergefunden werden. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass Anthocyane bei höheren pH-Werten (> 3) relativ schnell abgebaut werden [McGhie *et al.*, 2007]. In einer Studie von Dai *et al.* wurde nach 24 h Inkubation eines Brombeerextrakts in Zellkulturmedium (mit 10% FKS) eine Abnahme der Anthocyankonzentration um 84% ermittelt [Dai *et al.*, 2009]. Des Weiteren wurden vergleichende Inkubationen (24 h) in PBS mit und ohne Zusatz von FKS durchgeführt. Dabei wurde ohne Zusatz von FKS eine Anthocyanabnahme um 37% und mit dem Zusatz von FKS eine Abnahme um 90% beobachtet [Dai *et al.*, 2009]. Diese erhöhte Abnahme der Anthocyane könnte auf eine mögliche Anthocyan-Protein-Bindung zurückgeführt werden, denn es ist aus der Literatur bekannt, dass Anthocyane eine Proteinbindungsaffinität besitzen [Ackermann, 2010; Xiao *et al.*, 2011].

Werden die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen mit weiteren bekannten Daten aus der Literatur gegenüber gestellt (siehe Tab. 8.1), so wird deutlich, dass der Anthocyanabbau über die Zeit vergleichbar war. Da im Rahmen dieser Arbeit die durchgeführten Inkubationen ohne Zusatz von FKS stattfanden, lässt sich der Abbau lediglich auf den pH-Wert des Zellkulturmediums von 7.4 zurückführen. Für diese Annahme sprechen die Daten von Woodward *et al.* und Kay *et al.*, die in Pufferlösungen nach 2 h bzw. 1.5 h Inkubation (Cy-3-O-glc) eine vergleichbare Konzentrationsabnahme von 15% bzw. 12% der eingesetzten Anthocyane beobachteten [Kay *et al.*, 2009; Woodward *et al.*, 2009]. Nach 24 h Inkubation von Cy-3-O-glc in der Pufferlösung (pH 7.4) wurde von Woodward *et al.* eine Abnahme der Anthocyankonzentration um 86% nachgewiesen [Woodward *et al.*, 2009].

Wie in Abb. 7.9 (A und B) und Abb. 7.10 (D und E) zu erkennen ist, wurden bei Inkubationen von HBE in Zellkulturmedium Anthocyankonzentrationen über 100% Gesamtanthocyane detektiert. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die eingesetzte HBE Menge (500 µg/ml) als 100% Gesamtanthocyane angegeben wurde. Auf diesen theoretischen 100%-Wert wurden alle durch HPLC-UV/VIS Messungen erhaltenen Ergebnisse bezogen.

Tab. 8.1: Vergleich von Ergebnissen aus der Literatur und eigenen Ergebnissen zum Anthocyanabbau in Puffersystem und Zellkulturmedien.

Produkt	Inkubationsbedingungen	Abnahme der Anthocyankonzentration [%] (Zeit)	Referenz
Anthocyane	H <sub>2</sub> O, 43 °C	46 (3 h)	[Kearsley et al., 1981]
Cy-3-glc	Puffer, pH 7.4, 37 °C	15 (2 h); 86 (24 h)	[Woodward et al., 2009]
Cy-3-glc	Phosphatpuffer, pH 7.4, 37 °C	12 (1.5 h)	[Kay et al., 2009]
Brombeerextrakt	PBS (ohne FKS), pH 7.4, 25 °C	37 (24 h)	[Dai et al., 2009]
	PBS (mit 10% FKS), pH 7.4, 37 °C	90 (24 h)	
HBE	Zellkulturmedium (ohne FKS), pH 7.4, 37 °C	14 (1 h), 95.7 (24 h)	eigene Ergebnisse
	Puffer, pH 6.3, 37 °C	10 (1 h), 63 (24 h)	eigene Ergebnisse
Anthocyanfraktion	Zellkulturmedium (ohne FKS), pH 7.4, 37 °C	34 (1 h), 98.7 (24 h)	eigene Ergebnisse
Cy-3-glc	Zellkulturmedium (ohne FKS), pH 7.4, 37 °C	11 (1 h), 88.7 (24 h)	eigene Ergebnisse
Cy-3-gal	Zellkulturmedium (ohne FKS), pH 7.4, 37 °C	11.9 (1 h), 90 (24 h)	eigene Ergebnisse

\* Abkürzungen: FKS: Fötales Kälberserum

In zahlreichen *in vitro* Studien wurde gezeigt, dass beim Abbau der Anthocyane aus dem A-Ring Phloroglucinolaldehyd und aus dem B-Ring die für das jeweilige Aglykon charakteristische Phenolcarbonsäure gebildet wurden [Fleschhut et al., 2006; Wang et al., 2010; Woodward et al., 2009]. Bei Untersuchungen von Woodward und Mitarbeitern stellte sich heraus, dass nach 24 h Inkubation in Puffer (pH 7.4) Cy-3-O-glc zu 86% abgebaut wurde, wobei der Anteil neu gebildeter Abbauprodukte lediglich 7% Protokatechusäure und 4% Phloroglucinolaldehyd betrug [Woodward et al., 2009]. Demgegenüber wurde in einer *in vivo*

Studie (Humanstudie) gezeigt, dass 73% der eingesetzten Cyanidin Glukoside zu Protokatechussäure metabolisiert wurden [Vitaglione *et al.*, 2007]. Aus den Ergebnissen der *in vitro* Inkubationen ergab sich die Frage nach dem Verbleiben der restlichen Anthocyane. In einer *in vitro* Studie von Fleschut *et al.* wurde die Bildung von Intermediaten mit Anthocyan-ähnlichen Absorptionsspektren beschrieben. Aufgrund massenspektrometrischer Analysen wurde vermutet, dass es sich um Dimerisierungsprodukte zweier Anthocyanmoleküle handelte. Es wurde postuliert, dass die reaktiven chinoiden Basen der Anthocyane, die im pH-Bereich von 7.4 auftreten, miteinander zu Dimeren reagierten (siehe Abb. 2.6) [Fleschhut *et al.*, 2006]. Weitere Hinweise, wie eine Bildung von polymeren Produkten durch Anthocyane stattfinden könnte, wurden während einer Lagerstudie mit Cyanidin-3-O-rutinosid und Cyanidin-3-O-glukosid (500 µg/ml) gewonnen. Hierbei wurden die Reinsubstanzen bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 3, pH 3.5, pH 4) mit Phenolsäuren (Protokatechussäure, Hydroxybenzoesäure, Ferulasäure, Syringasäure und Vanillinsäure), Procyanidinen und Flavone (Apigenin Glykoside) inkubiert und die Zunahme der polymeren Produkte (Copigmente), über eine Zunahme der Extinktion mittels pH-differential Methode photometrisch bestimmt. Es stellte sich heraus, dass durch die Zugabe von Flavonen sowohl ein Stabilisierung der Anthocyane als auch eine Farbzunahme nachgewiesen werden konnte [Pacheco-Palencia *et al.*, 2010]. In einer aktuellen Studie wurde der genaue Bildungsmechanismus (Copigmentierung) von Anthocyanen mit Phenolsäuren (Ferulasäure, Kaffeesäure, Sinapursäure, etc.) in Rotwein beschrieben. Am Beispiel von Mal-3-O-glc und Ferulasäure wird die Bildung eines möglichen Copigments in Abb. 8.5 dargestellt. Im ersten Schritt erfolgt eine Additionsreaktion zwischen der Vinylgruppe der Ferulasäure und dem C<sub>4</sub> (C-Ring) des Malvidins. Im zweiten Schritt folgt eine Oxidationsreaktion (Abspaltung von CO<sub>2</sub>) und Ausbildung eines D-Rings (Pyranring).

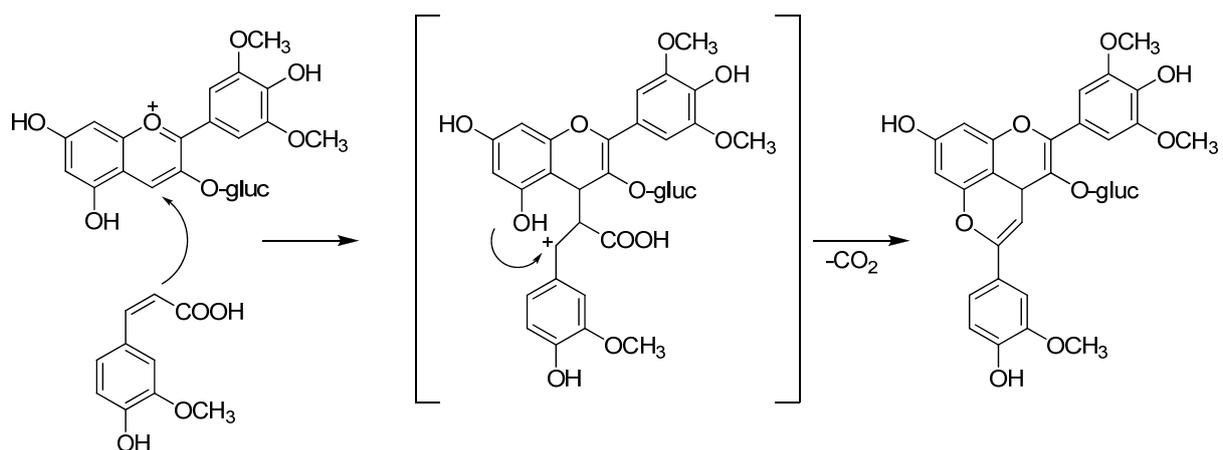


Abb. 8.5: Postulierte Bildung eines Anthocyan-Copigments in Rotwein am Beispiel von Mal-3-O-glc mit Ferulasäure [Freitas *et al.*, 2010].

Um im ersten Schritt eine Aussage über die Menge des unlöslichen Rückstands treffen zu können, wurden in dieser Arbeit gravimetrische Bestimmungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass im Verlauf von 24 h Inkubation im Zellkulturmedium sowohl mit HBE als auch mit

der Anthocyanfraktion (die ihrem Anteil am HBE entsprechend eingesetzt wurde) eine vergleichbare Menge (9%) Rückstand neu gebildet wurde. Dies spricht für eine von der Copigmentierung unabhängigen Bildung neuer Produkte bei Inkubationen mit der Anthocyanfraktion (Anthocayn-Anthocyan-Komplexe), wobei die Bildung möglicher Copigmente (wie in Abb. 8.5 gezeigt) bei den HBE-Inkubationen nicht ausgeschlossen werden können. Anhand der Inkubationen mit Reinsubstanzen (Cy-3-glc und Cy-3-gal) konnte das Ergebnis der Anthocyanfraktion bestätigt werden. Zusätzlich wurde festgestellt, dass größere Mengen an unlöslichem Rückstand (ca. 30%) vorlagen was möglicherweise in einer höheren Affinität der Anthocyanmoleküle zueinander begründet sein könnte. Weiterhin konnte die Bildung einer vergleichbaren Menge an unlöslichem Rückstand unabhängig vom Zuckerrest beobachtet werden.

### 8.2.1 Fazit zur Stabilität der Anthocyane und Bildung eines unlöslichen Rückstands im Zellkulturmedium

Durch die Stabilitätsuntersuchungen der Anthocyane des HBE im Zellkulturmedium ist es nun möglich, eine Bewertung der im folgenden Abschnitt dargestellten, antioxidativen Wirkungen zu geben. Es zeigte sich, dass nach 1 h Inkubation noch über 90% der eingesetzten Anthocyane (unabhängig ob HBE, Anthocyanfraktion oder Reinsubstanz) in ihrer ursprünglichen Form vorlagen. Nach 24 h Inkubation wurden lediglich 4 - 5% der eingesetzten Menge wiedergefunden. Dies spricht dafür, dass nach 24 h ein Abbau bzw. die Bildung eines unlöslichen Rückstands stattgefunden hat und somit keine Aussage mehr über die Wirkung der Anthocyane selbst getroffen werden kann. Es wurde jedoch von Kern *et al.* gezeigt, dass die Gallussäure, die beim Abbau von Delphinidin im Zellkulturmedium entsteht, eine potente wachstumshemmende Wirkung auf humane Tumorzellen besitzt [Kern *et al.*, 2007].

Da bisher der Abbaumechanismus aufgrund der strukturellen Unkenntnis des neugebildeten unlöslichen Rückstands unklar ist, besteht auf diesem Gebiet in Zukunft noch Forschungsbedarf. Über mögliche Wirkungen des neugebildeten unlöslichen Rückstands im menschlichen Körper gibt es zurzeit noch keine Erfahrung. Eine mit den Procyanidinen vergleichbare Wirksamkeit wäre denkbar, wobei zuerst eine nähere Quantifizierung und Charakterisierung der postulierten Polymere erfolgen müsste. Hierfür könnte eine SEC (engl. *size exclusion chromatography*) oder eine asymmetrische Fluss-Feldfraktionierung Anwendung finden.

### 8.3 Antioxidative Wirksamkeit in Caco-2 Zellen

Es wird vermutet, dass Anthocyane aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften in der Lage sind, Radikale in der Zelle abzufangen und dadurch oxidativem Stress im Körper entgegen zu wirken. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit *in vitro* die Modulation ausgewählter Biomarker, die mit oxidativem Stress assoziiert sind, an Kolonkarzinomzelllinien (Caco-2 und HT-29) untersucht werden. Um diese Modulation korrekt bewerten zu können, war die Kenntnis der Stabilität der Anthocyane, aus dem HBE unter Zellkulturbedingungen essentiell. Wie in Kap. 7.3 (siehe Abb. 7.9 (B)) gezeigt, wurde die Stabilität der Anthocyane des HBE im Zellkulturmedium mit Caco-2 Zellen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass nach 1 h Inkubation der Großteil an Anthocyanen noch nicht abgebaut war (über 85% der eingesetzten Menge war noch vorhanden) und somit Einflussfaktoren, die Stabilität und Abbau betreffen, bei dieser Inkubationsdauer ausgeschlossen werden konnten. Demgegenüber wurden in einem Zeitraum von 24 h mehr als 90% der eingesetzten Anthocyane abgebaut. Diese Inkubationsdauer (24 h) wurde jedoch ebenfalls für die *in vitro* Inkubationen gewählt, um die Langzeitwirkung bzw. die Wirkung der entstandenen Abbauprodukte auf die ausgewählten Biomarker zu untersuchen. Dass Abbauprodukte aus Anthocyanen und Anthocyanidinen *in vitro* einen Einfluss auf Zellen besitzen können, wurde in der Literatur bereits gezeigt. So wurden bei Studien mit Delphinidin und dessen Abbauprodukt Gallussäure im HT-29-Zellsystem, signifikante Abnahmen der Zellproliferationen nach 6 h Inkubation beobachtet [Kern *et al.*, 2007]. Vergleichbare Ergebnisse konnten bei Inkubationen mit sechs Abbauprodukten (Gallussäure, 3-O-Methylgallussäure, Phloroglucinolaldehyd, Syringasäure, Vanillinsäure und Protocatechusäure) aus Anthocyanen des Rotweins mit Caco-2 Zellen detektiert werden. Nach 72 stündiger Inkubation wurde eine signifikante Inhibierung der Zellproliferation durch Gallussäure, 3-O-Methylgallussäure, Phloroglucinolaldehyd und Vanillinsäure nachgewiesen, wobei Syringasäure und Protocatechusäure keine Effekte zeigten [Forester *et al.*, 2011].

Für die Untersuchungen zur biologischen Wirksamkeit wurden Biomarker ausgewählt, die in direktem Zusammenhang mit oxidativen Zellschäden stehen. Dabei handelte es sich um die Modulation (oxidativer) DNA-Schäden mittels Comet Assay, den zellulären Gehalten an Glutathion mittels Glutathion Bestimmungsmethode und die Modulation intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mittels DCF Assay. Da ein Einfluss auf die Basisschäden (sehr gering) der Zellen nicht quantifizierbar ist, wurde sich einer zusätzlichen Inkubation mit Oxidantien zur Induktion von moderatem oxidativem Stress bedient [Schaefer *et al.*, 2006a; Schaefer *et al.*, 2006b]. Zur Untersuchung möglicher zytotoxischer Effekte wurde ein Farbreaktionstest (Alamar Blue Assay) durchgeführt. Mittels der vorgestellten *in vitro* Testsystemen sollte geprüft werden, ob die unterschiedlichen Verkapselungstechniken und die dabei verwendeten Materialien einen Einfluss auf die biologische Wirksamkeit der Anthocyane besitzen. Des Weiteren wurden HBE und HBE-beladene Kapselsysteme vergleichend untersucht. Zusätzlich sollte geprüft werden, welche HBE-Subfraktionen (von

Projektpartner TP 1 zur Verfügung gestellt) des HBE für dessen mögliche biologische Wirksamkeit verantwortlich sind.

Um die physiologische Relevanz (*in vivo*) der eingesetzten HBE Konzentrationen (bis zu 500 µg/ml HBE) in den *in vitro* Untersuchungen zu erklären, muss berücksichtigt werden, dass die tägliche Aufnahmemenge an Anthocyanen stark von den Verzehrsgewohnheiten der Konsumenten abhängig ist. So können beispielsweise durch den Verzehr einer Portion Heidelbeeren 500 mg Anthocyane aufgenommen werden, wohingegen eine Portion Holunderbeeren 2.000 mg Anthocyane enthalten kann [He *et al.*, 2010]. Es ist bekannt, dass 40% der oral aufgenommenen Menge an Anthocyanen den Dickdarm erreichen [Gonzalez-Barrio *et al.*, 2010]. Dies würde bedeuten, dass bei einer Aufnahme von 500 mg Anthocyane ca. 200 mg den Dickdarm erreichen. Wird davon ausgegangen, dass durch zusätzlich aufgenommene Nahrung bzw. Flüssigkeiten eine Verdünnung (400 - 2000 ml) stattfindet, so könnten im Darm Konzentrationen bis zu 100 - 500 µg/ml Anthocyane vorliegen. Im Vergleich dieser errechneten Konzentrationen mit den in dieser Arbeit eingesetzten HBE-Konzentrationen (der HBE enthält zu 27% Anthocyane, siehe Kap. 6.2) wird deutlich, dass diese eine physiologische Relevanz besitzen.

Um die Unterschiede in der Wirksamkeit des HBE und der HBE-Subfraktionen (Anthocyan-, Phenolcarbonsäure- und Polymerfraktion) *in vitro* (Caco-2) auf einen Blick darzustellen, wurden alle Ergebnisse dieser Arbeit (siehe Kap. 7.5) in Tab. 8.2 zusammengefasst.

Tab. 8.2: Zusammenfassung der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit HBE und den HBE-Subfraktionen auf die Zellvitalität, intrazelluläre ROS, GSH Level und (oxidative) DNA-Schäden in Caco-2 Zellen.

Biomarker	Wirkung							
	HBE		Anthocyan-fraktion		Phenolcarbonsäure-fraktion		Polymer-fraktion	
	1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h
Zellvitalität	-	-	-	-	-	-	-	-
Intrazelluläre ROS	↓	↓	-	-	↓	↓	-	-
GSH Level	-	(↑) <sup>#</sup>	-	-	-	(↑) <sup>#</sup>	(↑) <sup>#</sup>	-
(oxidative) DNA-Schäden	↓ <sup>#</sup>	↓	-	-	↓	↓	-	-

(): Wirksamkeit im Konzentrationsbereich > 250 µg/ml

<sup>#</sup>: Tendenz zu erkennen

-: kein Effekt

Ein Einfluss auf die Zellvitalität (Caco-2) wurde weder nach 1 h noch nach 24 h Inkubation mit HBE (Konzentrationsbereich 10 bis 500 µg/ml) nachgewiesen (siehe Abb. 7.14 (A) und Abb. 7.15 (E)). Lediglich bei Inkubationen mit HT-29 Zellen konnten in der höchsten eingesetzten Konzentration (500 µg/ml HBE) signifikante zytotoxische Effekte beobachtet werden (siehe Anhang Abb. 10.1 (A) und Abb. 10.2 (E)).

Die erzielten Ergebnisse sind im Einvernehmen mit einer Studie von Yi *et al.*, in der bei hohen Konzentrationen (1 - 3 mg/ml Heidelbeerextrakt) ein signifikanter Einfluss auf die Proliferation (72 h) von HT-29 und Caco-2 Zellen detektiert wurde [Yi *et al.*, 2005]. Des Weiteren wurde bei Inkubationen unterschiedlicher Krebszelllinien (HT-29, MCF-7, HCT116) mit anthocyanreichen Fruchtexttrakten (Himbeer-, roter/schwarzer Brombeer-, Heidelbeer-, Cranberry- und Erdbeerextrakt; im Konzentrationsbereich von 0 bis 200 µg/ml Extrakt) eine konzentrationsabhängige (25 - 200 µg/ml Extrakt) Inhibierung der Zellproliferation beobachtet [Seeram *et al.*, 2006]. In einer aktuellen Studie bei der ein Granatapfelextrakt (0 - 600 µg/ml) eingesetzt wurde, konnte eine signifikante antiproliferative Wirkung auf die MCF-7 Zelllinie bestätigt werden [Jayakumar *et al.*, 2011]. Untersuchungen an HT-29 Zellen, die mit einem anthocyanreichen Heidelbeerextrakt im Konzentrationsbereich von 25 - 200 µg/ml im Sulforhodamin B (SRB) Assay inkubiert wurden zeigten, dass nach 72 h bei einer Konzentration von 200 µg/ml eine Wachstumshemmung um bis zu 50% stattfand [Zhao *et al.*, 2004]. In einer aktuellen Studie von Esselen *et al.* wurden HT-29 Zellen in Anwesenheit von Katalase (siehe Kap. 3.2.1.2) mit Heidelbeer- und Traubenextrakt (0 - 500 µg/ml) im SRB

Assay inkubiert. Dabei wurde lediglich in der höchsten eingesetzten Konzentration (500 µg/ml) eine Wachstumshemmung beobachtet [Esselen *et al.*, 2011a]. Durch den Vergleich von Literatur Daten mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen zum HBE im Alamar Blue Assay wird deutlich, dass bei noch längeren Inkubationszeiten (> 24 h) zum Teil starke zytotoxische Effekte auftreten können.

Werden die im Rahmen der Dissertation erhaltenen Ergebnisse des HBE mit den HBE-Subfraktionen verglichen, so zeigt sich, dass unabhängig von der Fraktion keine zytotoxischen Effekte auf Caco-2 Zellen nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 7.14 (B - D) und Abb. 7.15 (F - H)). Die Ergebnisse zu den HT-29 Zellinkubationen mit den HBE-Subfraktionen sind im Anhang in den Abb. 10.1 und Abb. 10.2 dargestellt. Werden jedoch längere Inkubationszeiten zwischen 24 und 72 h gewählt und sowohl Anthocyanfraktion als auch Phenolcarbonsäurefraktion, die aus Erdbeerextrakt isoliert wurden, mit HT-29 Zellen inkubiert, so kann im höheren Konzentrationsbereich (> 250 µg/ml) ein Einfluss auf die Vitalität (30% und 60%) beobachtet werden [Zhang *et al.*, 2008]. Wurden statt der Fraktionen aus Erdbeerextrakt die isolierten Reinsubstanzen (Anthocyane) untersucht, so konnte ebenfalls eine Abnahme der Zellvitalität (HT-29) bei Konzentrationen von 100 µg/ml Anthocyan beobachtet werden [Zhang *et al.*, 2008]. Ob ein strukturabhängiger Einfluss des Anthocyan auf die Zellproliferation besteht wurde ebenfalls in Studien untersucht. Es wurde gezeigt, dass sowohl die Hydroxylierung des B-Rings als auch die Glykosylierung und Acylierung des Aglykon die Proliferation beeinflusst. In einer Untersuchung von Marko *et al.* wurde bei Inkubationen (72 h) mit den Anthocyanidinen (Cyanidin, Delphinidin, Malvidin, Peonidin, Pelargonidin) eine von der Struktur abhängigen Inhibierung (Del > Cy > Pel > Peo > Mal), bei gleicher Konzentration (100 µM) des Zellwachstums beobachtet [Marko *et al.*, 2004]. Ein vergleichbares Ergebnis, dass nicht acylierte Anthocyane die Zellproliferation stärker beeinflussen als acylierte wurde von Jing *et al.* erzielt. Zusätzlich wurde in diesen Studien gezeigt, dass monoglykosylierte Anthocyane potentere Inhibitoren der HT-29 Zellproliferation, als di- oder triglykosylierte, sind [Jing *et al.*, 2008]. Aufgrund solcher Studien ist es möglich, eine Aussage über die Wirksamkeit der einzelnen Anthocyane auf die Proliferation von Zellen *in vitro* zu treffen.

In einigen Studien wurden prooxidative Effekte von Anthocyanen im Zellkulturmedium, aufgrund der Bildung von Wasserstoffperoxid, beschrieben. Die Bildung von ROS (Wasserstoffperoxid) durch Anthocyane (Delphinidin; Konzentration 1 - 75 µM) in Zellkulturmedium wurde in einer Studie von Fritz *et al.* bestimmt. Hierbei wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Wasserstoffperoxidkonzentration im Zellkulturmedium nachgewiesen [Fritz *et al.*, 2008]. Den Einfluss des gebildeten Wasserstoffperoxids auf den intrazellulären ROS, GSH Level und weiterer Biomarker des oxidativen Stresses in Caco-2 und LoVo Zellen wurde von Cvorovic *et al.* untersucht. Es stellte sich heraus, dass bei Inkubationen mit den Anthocyanen Delphinidin und Cyanidin eine konzentrationsabhängige (25 - 100 µM) Bildung von ROS stattfand. Dadurch wurden eine signifikante Depletion des intrazellulären GSH und eine Erhöhung des ROS Levels gemessen [Cvorovic *et al.*, 2011]. In Inkubationen von Kern *et al.* und Esselen *et al.* wurde festgestellt, dass durch Zugabe von Katalase (100 U/ml) die Bildung von Wasserstoffperoxid durch Anthocyane im Zellkultur-

medium komplett unterdrückt werden konnte [Esselen *et al.*, 2011b; Kern *et al.*, 2007]. Aus diesem Grund (um eine mögliche H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung zu unterdrücken) wurden alle Inkubationen dieser Dissertation mit dem Zusatz von Katalase (100 U/ml) ins Zellkulturmedium durchgeführt.

Eine Besonderheit der Caco-2 Zellen stellt, im Vergleich zu HT-29 Zellen, eine fehlende Aktivität des Enzyms NQO 1 (NADPH-abhängige Chinon-Oxidoreduktase I) dar. Daraus resultiert eine stärkere Empfindlichkeit der Caco-2 Zellen gegenüber Menadion-induziertem oxidativem Stress [Karczewski *et al.*, 1999]. Deutlich wird dieser Unterschied der Zellen (HT-29 und Caco-2) im Vergleich der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse des DCF Assays, in dem die intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies ermittelt werden. In Inkubationen mit HBE wurde eine signifikante Erniedrigung der TBH-induzierten intrazellulären ROS in Caco-2 Zellen schon ab einer Konzentration von 50 µg/ml (1 h Inkubation) und 100 µg/ml (24 h Inkubation) beobachtet (siehe Abb. 7.27 (A) und Abb. 7.28 (E)), wohingegen in HT-29 Zellen lediglich bei einer Konzentration von 500 µg/ml (1 h Inkubation) ein signifikanter Effekt detektierbar war (siehe Abb. 10.12 und Abb. 10.13).

Im Vergleich dieser Ergebnisse mit den aus der Literatur bekannten Daten wird deutlich, dass ähnliche Effekte im DCF Assay an oxidativ gestressten (durch 2,2'-Azobis-2-methylpropionamidin-dihydrochlorid) Caco-2 Zellen detektiert wurde. Hierbei wurde ein anthocyanreicher Brombeerextrakt im Konzentrationsbereich von 3 - 50 µg/ml mit Caco-2 Zellen inkubiert und eine signifikante Erniedrigung intrazellulärer ROS gemessen [Elisia *et al.*, 2008]. Eine Studie von Milbury *et al.* zeigte, dass Heidelbeerextrakt in einer Konzentration > 10 µg/ml auf ARPE-19 Zellen (humane Netzhautepithelzellen) ebenfalls eine potente Wirksamkeit gegen oxidativen Stress bzw. gegen intrazelluläre ROS besaß [Milbury *et al.*, 2007]. Ein vergleichbares Ergebnis konnte bei Inkubationen von HT-29 Zellen mit verschiedenen aus Rotfruchtsäften gewonnen Extrakten im DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) Assay (Messung der antioxidativen Kapazität einer Substanz) erzielt werden [Kulisic-Bilusic *et al.*, 2009].

Auffällig war, dass die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit der Anthocyanfraktion (enthält die 15 im HBE vorkommenden Anthocyane, siehe Kap. 6.2) im Vergleich zum HBE weder nach 1 h noch nach 24 h Inkubation einen Effekt auf TBH-induzierte ROS zeigte (siehe Abb. 7.27 (B) und Abb. 7.28 (F)), da aus der Literatur eine signifikante Wirksamkeit von Anthocyanen gegenüber freien Radikalen bekannt war. So wurde von Wang *et al.* nach Inkubation mit einer Anthocyanfraktion, die aus Heidelbeeren gewonnen wurde, mit steigender Konzentration (15 - 100 µg/ml) eine potente Wirkung gegen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten oxidativen Stress in ECV-Zellen (humane Nabel epithelzellen) nachgewiesen [Wang *et al.*, 2010]. Des Weiteren wurde an der Nierenzelllinie (PC-12) eine Abnahme induzierter ROS durch Anthocyane, die aus der Süßkartoffel isoliert wurden, schon in geringen Konzentrationen (5 - 20 µg/ml) ermittelt [Ye *et al.*, 2010].

Im Gegensatz zu Inkubationen mit der Anthocyanfraktion zeigten die Vorinkubationen mit der Phenolcarbonsäurefraktion eine mit dem HBE vergleichbare Reduzierung der TBH-induzierten intrazellulären ROS (siehe Abb. 7.27 (C) und Abb. 7.28 (G)). Dieses Ergebnis war in Caco-2 Zellen nicht überraschend, da Quercetin neben anderen Substanzen (Myricetin, *p*-Cumarsäure, Phloroglucinolaldehyd, Kaffeesäure, Protocatechusäure, 5-Hydroxyvanillinsäure, Quercetinrhamnosid, Quercetinarabinosid, Gallussäure, Epicatechin, Catechin, Cumarsäure-Derivate, Depsid, Quercetinglukuronid, Quercetin-galaktosid, Chlorogensäure, Cumaroyl-Iridoid, Myricetin-glukosid, Myricetin-galaktosid) in der Phenolcarbonsäurefraktion enthalten war (siehe Kap. 6.2). So ist aus der Literatur bekannt, dass Quercetin in geringen Konzentrationen (30  $\mu$ M) eine potente Wirksamkeit gegen TBH-induzierte intrazelluläre ROS, sowohl in Caco-2 als auch in HT-29 Zellen, aufweist [Bellion *et al.*, 2008; Bellion *et al.*, 2009; Schaefer *et al.*, 2006b].

Für die getestete Polymerfraktion wurden im Rahmen dieser Arbeit keine Effekte auf die TBH-induzierten intrazellulären ROS in Caco-2 und HT-29 Zelle nachgewiesen.

Die in den 1 und 24 stündigen Vorinkubationen mit den drei HBE-Subfraktionen erzielten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Phenolcarbonsäurefraktion des HBE einen Beitrag zur Reduzierung des durch TBH-induzierten oxidativen Stresses in Caco-2 Zellen leistet. Damit kann jedoch nicht der vollständige Effekt des HBE auf TBH-induzierte intrazelluläre ROS in Caco-2 Zellen erklärt werden. Vermutlich ist ein Zusammenspiel der einzelnen Fraktionen für dessen potente Wirksamkeit verantwortlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde außer dem Einfluss auf TBH-induzierte ROS noch die Modulation des Glutathiongehalts in Caco-2 und HT-29 Zellen bestimmt. Dabei wurde nach Vorinkubationen (1 h) mit der Polymerfraktion eine tendenzielle Zunahme des Glutathiongehalts der Zellen (Caco-2) beobachtet (siehe Abb. 7.22 (D)). Dieser Anstieg kann durch die in der Polymerfraktion (Procyanidine, Copigmente, siehe Kap. 6.2) enthaltenen Procyanidine erklärt werden, da in früheren Studien mit Apfelextrakten (enthielten einen hohen Anteil an Procyanidinen) an Caco-2 Zellen eine Erhöhung des Glutathiongehalts detektiert wurde [Bellion *et al.*, 2009]. Einen weiteren Beleg für die potente Wirksamkeit von Procyanidinen auf Marker des oxidativen Stresses lieferten Kim *et al.*. Bei Inkubationen von B16 Zellen (Melanomzellen) mit Procyanidinen (5 - 50  $\mu$ g/ml) wurde mit steigender Konzentration eine signifikante Erhöhung des Glutathiongehalts nachgewiesen [Kim *et al.*, 2009].

Eine bei Vorinkubation mit der Polymerfraktion vergleichbare Wirksamkeit zeigte sich in Vorinkubationen (24 h) mit der Phenolcarbonsäurefraktion (siehe Abb. 7.23 (G)). Dieser Anstieg des Glutathiongehalts in Caco-2 Zellen war zu erwarten, da aus der Literatur bekannt war, dass Phenolcarbonsäuren (z.B. aus Apfelsaft) einen Einfluss auf den GSH Level der Zellen besitzen. Von Schäfer *et al.* wurde nach 24 h Inkubationen mit Quercetin eine signifikante Erhöhung des Glutathiongehalts in Darmkrebszellen ab einer Konzentration von 30  $\mu$ M (Caco-2) und 10  $\mu$ M (HT-29) beobachtet [Schaefer *et al.*, 2006a]. Wird in Caco-2 Zellen gleichzeitig mit einer Zunahme des Glutathiongehalts eine erhöhte Glutathionperoxidase (GP<sub>x</sub>) Aktivität beobachtet, so spricht dies, für eine potente Wirkung

der eingesetzten Phenolcarbonsäuren gegen induzierten oxidativen Stress [Bellion *et al.*, 2010; Wijeratne *et al.*, 2005]. Ein Anstieg der GP<sub>x</sub>- und GSR-Enzymaktivitäten, konnte auch während einer humanen Interventionsstudie (15 Patienten) mit anthocyanreichem Traubenextrakt (600 mg pro Tag über 1 Woche) nachgewiesen werden. Die Erhöhung der GP<sub>x</sub>-Enzymaktivität war gegenüber der Kontrollgruppe, die kein Traubenextrakt konsumierte, signifikant erhöht [Young *et al.*, 2000]. Eine bestehende Korrelation zwischen einer erhöhten GP<sub>x</sub>-Aktivität und einer Zunahme an GSH wurde eindeutig in Tierstudien an Ratten und Mäusen, die mit anthocyanreichen Extrakten durchgeführt wurden, bewiesen. Den Tieren wurde Heidelbeer- bzw. Brombeerextrakt in Trinkwasser gelöst in den Konzentrationen von 5 - 20 mg/ml über einen Zeitraum von 5 bzw. 35 Tage verabreicht. Danach wurden die Tiere getötet und definierte Biomarker des oxidativen Stress (GP<sub>x</sub>-Aktivität, SOD, GSH, etc.) untersucht. Es stellte sich heraus, dass bei einer signifikant erhöhten GP<sub>x</sub>-Aktivität auch ein erhöhter Gehalt an Glutathion im Plasma messbar war [Hassimotto *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2010]. Diese Korrelation wurde von der eingesetzten Extraktkonzentration beeinflusst. Dies konnte in einer Studie an Mäusen (Fütterung von Heidelbeerextrakt in den Konzentrationen: 50 - 200 mg/kg am Tag über 5 Tage) gezeigt werden, in der mit steigender Konzentration eine Erhöhung des Glutathiongehalts im Plasma erfolgte [Bao *et al.*, 2008].

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur Modulation des Glutathiongehalts der Caco-2 und HT-29 Zellen zeigten, dass lediglich ein tendenzielle Zunahme des Glutathiongehalts mit steigender HBE Konzentration (100 - 500 µg/ml HBE) in Caco-2 Zellen nach 24 h Vorinkubation nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 7.23 (E)). Der Glutathiongehalt der HT-29 Zellen wurde weder nach 1 h noch nach 24 h Vorinkubation mit HBE (0.01 - 500 µg/ml) beeinflusst (siehe Anhang Abb. 10.10 und Abb. 10.11). Es wurde deutlich, dass *in vitro* mit geringen HBE-Konzentrationen keine Effekte auf den Glutathiongehalt der Zellen messbar waren. Demgegenüber wurden bei zwei humanen *in vivo* Studien nach dem Verzehr eines anthocyanreichen Rotfruchtsaftes signifikante Erhöhungen des GSH Levels erfasst. In der einen Humanstudie, bei der gesunde Probanden einen roten anthocyanhaltigen Mehrfruchtsaft konsumierten (700 ml pro Tag über einen Zeitraum von 4 Wochen), wurde eine signifikante Erhöhung des GSH Levels im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt [Weisel *et al.*, 2006]. Bei der anderen Studie (Hämodialysepatienten) wurde nach Gabe von 200 ml pro Tag, eines roten anthocyanhaltigen Mehrfruchtsaftes (Anthocyangehalt 301 mg/l) über einen Zeitraum von 4 Wochen eine signifikante Erniedrigung des Malondialdehyd (MDA; Marker für Lipidperoxidation) und eine Erhöhung des GSH-Status beobachtet [Spormann *et al.*, 2008].

Bei der Modulation Menadion-induzierter oxidativer DNA-Schäden in Caco-2 Zellen wiesen vor allem Inkubationen mit niedrigen Konzentrationen (5 - 50 µg/ml HBE) signifikante Effekte auf (siehe Abb. 7.18 und Abb. 7.19). Der daraus resultierende „U-förmige“ Verlauf der Konzentrationswirkungskurven wurde schon bei Untersuchungen anderer Substanzen in einigen Arbeiten beobachtet [Schaefer *et al.*, 2006a; Schaefer *et al.*, 2006b]. Jedoch muss beim Vergleich mit der Literatur beachtet werden, dass z.B. bei Schäfer *et al.* dem Zellkulturmedium keine Katalase zugesetzt wurde und dadurch die Zunahme an oxidativen DNA-Schäden bei steigender Anthocyankonzentration auf eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung durch Anthocyane im Zellkulturmedium zurückgeführt werden könnte. In einer Studie von Fritz *et al.* wurde die Aufhebung dieses prooxidativen Effektes der Anthocyane durch Zusatz von Katalase ins Zellkulturmedium beschrieben. Hierbei wurde Delphinidin in unterschiedlichen Konzentrationen mit und ohne Zusatz von Katalase (100 U/ml) ins Zellkulturmedium mit HT-29 Zellen inkubiert. Es wurde keine Zunahme oxidativer DNA-Schäden bei steigender Anthocyankonzentration beobachtet [Fritz *et al.*, 2008]. Ein vergleichbares Ergebnis wurde in einer aktuellen Studie bei Inkubationen mit Cyanidin (20 - 100 µM) und dem Zusatz von Katalase ins Zellkulturmedium (HT-29 Zellen) von Esselen *et al.* erzielt [Esselen *et al.*, 2011b]. Auf Effekte der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung durch Anthocyane und daraus resultierenden prooxidativen Wirkungen musste in dieser Arbeit nicht geachtet werden, da bei allen durchgeführten Inkubationen 100 U/ml Katalase dem Zellkulturmedium zugegeben wurde (siehe Kap. 6.4.6).

Eine mit dem HBE vergleichbare Wirksamkeit auf die Modulation Menadion-induzierter oxidativer DNA-Schäden wurde lediglich bei Vorinkubationen mit der Phenolcarbon-säurefraktion erreicht (siehe Abb. 7.18 (C) und Abb. 7.19 (G)). Demgegenüber zeigten weder die Polymer- noch die Anthocyanfraktion einen Effekt auf Menadion-induzierte oxidative DNA-Schäden (siehe Abb. 7.18 (B)(D) und Abb. 7.19 (F)(H)). Das Ergebnis der Vorinkubation mit der Phenolcarbon-säurefraktion kann durch eine *in vitro* Studie an, mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestressten humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y), nach Inkubation mit Johannisbeer-extrakt bzw. der daraus gewonnenen Phenolcarbon-säurefraktion bestätigt werden. Sowohl für den Extrakt als auch für die Fraktion wurden im gleichen Konzentrationsbereich (0.25 µg/ml) identische Effekte auf oxidative DNA-Schäden beobachtet [Ghosh *et al.*, 2006]. Aus der Literatur war bisher bekannt, dass Anthocyane aufgrund der radikal-inaktivierenden Eigenschaften in der Lage sind, die DNA vor freien Radikalen zu schützen, was mit einer Erniedrigung von DNA-Schäden assoziiert wurde [Mas *et al.*, 2000]. In einer Studie von Acquaviva *et al.* konnte genau diese Fragestellung geklärt werden. Dafür wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder UV-Licht behandelte Plasmid-DNA mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cy-3-O-glc (100 - 400 µM) inkubiert und die oxidativen DNA-Schäden ermittelt. Es wurde mit steigender Anthocyankonzentration eine Abnahme oxidativer Plasmid-DNA-Schäden beobachtet [Acquaviva *et al.*, 2003]. Diese Untersuchungen zur Wirksamkeit von Anthocyanen *in vitro* wurden durch zahlreiche *in vivo* Studien (Mensch), bei denen nach Verzehr von anthocyanreichen Fruchtexttrakten oder Säften, signifikante Effekte auf oxidative DNA-Schäden charakterisiert wurden, verifiziert. Beispielsweise wurde in einer Humanstudie, bei der gesunde Probanden einen roten anthocyanhaltigen Mehrfruchtsaft konsumierten (700 ml pro Tag über einen Zeitraum von 4 Wochen), eine Verringerung der oxidativen DNA-

Schäden im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt [Weisel *et al.*, 2006]. In einer Studie mit Hämodialysepatienten wurde nach Gabe von 200 ml pro Tag, eines roten anthocyanhaltigen Mehrfruchtsaftes (Anthocyangehalt 301 mg/l) über einen Zeitraum von 4 Wochen eine signifikante Erniedrigung der oxidativen DNA-Schäden, beobachtet [Spormann *et al.*, 2008]. Eine Abnahme oxidativer DNA-Schäden in Lymphozyten wurde in einer aktuellen Studie von Henning *et al.* nachgewiesen. Dafür verzehrten 21 gesunde weibliche Probanden über einen Zeitraum von 3 Wochen täglich 250 g Erdbeeren [Henning *et al.*, 2010].

Die in der vorliegenden Dissertation erzielten *in vitro* Ergebnisse durch Vorinkubationen der Zelllinien (Caco-2, HT-29) mit HBE und den HBE-Subfraktionen zeigten, dass es nicht einfach ist, die Wirkkomponente eines Fruchtextrakts zu identifizieren bzw. den Mechanismus der Wirksamkeit des HBE zu erklären. Dies könnte zum einen dadurch erklärt werden, dass die Aktivitäten der Fraktionen zum Teil durch die Fraktionierung verloren gingen. Zum anderen könnte ein synergistischer Effekt der einzelnen Fraktionen für die Wirksamkeit des HBE ursächlich verantwortlich sein.

Um eine bessere Vergleichbarkeit der *in vitro* Ergebnisse der Inkubationen des HBE mit den eingesetzten HBE-beladenen Kapselsystemen (Pektinamidhohl-, Molkenprotein-, multidisperse Hüll- und Apfelpektinkapseln) zu gewährleisten, wurden alle Ergebnisse dieser Arbeit in Tab. 8.3 zusammengefasst dargestellt. Bei den Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln sollte zusätzlich untersucht werden, inwieweit ein vor der Inkubation durchgeführter Aufschluss der Kapseln deren Wirksamkeiten veränderten.

Im Vergleich der HBE-beladenen Kapselsysteme mit dem HBE wurde deutlich, dass weder die Pektinamidhohlkapseln noch die multidispersen Hüllkapseln einen Einfluss auf die Zellvitalität zeigten (siehe Abb. 7.16 (I)(J) und Abb. 7.17 (M)(N)). Vermutlich war bei den multidispersen Hüllkapseln dafür die äußere Ölphase der Kapsel verantwortlich (siehe Kap. 6.3.4). Dadurch können keine Interaktionen mit dem Medium bzw. den Zellen stattfinden und die Kapseln verblieben intakt, was offensichtlich weder nach 1 noch nach 24 h Inkubation zu einer Freisetzung der wirksamen Komponenten des HBE führte. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit einer aktuellen Studie, die sich mit dem Einfluss von proteinstabilisierten Nanoemulsionen auf die Vitalität von Caco-2 Zellen befasste. Dabei wurde festgestellt, dass die Zytotoxizität der Emulsionen vom verwendeten Emulgator und dessen Konzentrationen abhängig waren. Wurde beispielsweise der Emulgator Tween-80 in den Konzentrationen 0,5, 2 und 3 mg/ml zugegeben und über 72 h mit Caco-2 Zellen inkubiert, so konnten signifikante Einflüsse auf die Zellvitalität um 30%, 90% und > 90% nachgewiesen werden [He *et al.*, 2011]. Wie schon erwähnt, zeigten die Pektinamidhohlkapseln keinen Einfluss auf die Zellvitalität von Caco-2 Zellen im Alamar Blue Assay. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass ein zytotoxischer Effekt *in vitro* von dem eingesetzten Pektin und dessen Konzentration abhängig ist. In einer Studie von Cheng *et al.* wurden aus Ginseng isolierte Pektine in unterschiedlichen Konzentrationen (0 - 5 mg/ml) mit HT-29 Zellen inkubiert. Dabei zeigte sich, dass abhängig vom eingesetzten Pektin ein signifikanter zytotoxischer Effekt nach 72 h Inkubation ab 2,5 mg/ml Pektin zu beobachten war [Cheng *et al.*, 2011]. Bei Untersuchungen eines modifizierten Pektins aus Zitrus auf die Vitalität von Prostatakrebszellen (LNCaP und

PC3) konnten nach 48 h Inkubation bei einer Konzentration von 1% (w/v) signifikante Effekte nachgewiesen werden [Yan *et al.*, 2010]. Demgegenüber wurden weder nach 3 h noch nach 16 h Inkubationen von Caco-2 Zellen mit Pektinamid in einer Konzentration von 0.5% (w/v) zytotoxische Effekte beobachtet [Bernkop-Schnurch *et al.*, 2006].

Des Weiteren konnten im Rahmen dieser Arbeit sowohl nach 1 h als auch nach 24 h Inkubation mit Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln im Konzentrationsbereich > 50 µg/ml HBE signifikante zytotoxische Effekte auf Caco2- Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 7.16 (K)(L) und Abb. 7.17 (O)(P)). Mittels dieser beiden Systeme sollte zusätzlich untersucht werden, inwieweit ein vor der Inkubation durchgeführter Aufschluss der Kapseln mittels Ultra Turrax die Wirksamkeit der Systeme verändert. Dadurch musste der in den Kapselsystemen enthaltene HBE nicht erst aus den Kapseln freigesetzt werden, sondern lag direkt in einem Gemisch mit den Kapselmaterialien vor. Bei den Inkubationen mit Caco-2 Zellen und aufgeschlossenen bzw. intakten Kapseln zeigte sich, dass die Ergebnisse von aufgeschlossenen Kapseln mit denen der intakten Kapseln vergleichbar waren (siehe Abb. 7.16 (K)(L) und Abb. 7.17 (O)(P)).

Tab. 8.3: Zusammenfassung der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit HBE und HBE-beladenen Kapselsystemen (Pektinamidhohl-, multidisperse Hüll-Molkenprotein-, Apfelpektinkapseln; mechanisch aufgeschlossen bzw. intakt) auf die Zellvitalität, intrazelluläre ROS, GSH-Level und (oxidative) DNA-Schäden in Caco-2 Zellen nach 1 und 24 h Vorinkubation.

Biomarker	Wirkung													
	HBE		Pektinamid-hohlkapsel		Molkenproteinkapsel				multidisperse Hüllkapsel		Apfelpektinkapsel			
	1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h
			aufgeschlossen	intakt	aufgeschlossen	intakt	aufgeschlossen	intakt	intakt	intakt	aufgeschlossen	aufgeschlossen	intakt	intakt
Zellvitalität	-	-	-	-	↓	(↓)#	↓	(↓)#	-	-	↓	(↓)#	↓	(↓)#
Intrazelluläre ROS	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-	-	↓	↓	↓	↓
GSH Level	-	(↑)#	(↑)#	(↑)#	(↑)#	(↑)#	(↑)#	(↑)#	-	-	(↑)#	(↑)#	(↑)#	(↑)#
(oxidative) DNA-Schäden	↓#	↓	↓#	↓		↓		↓	-	-	-	↓	↓#	↓

(): Wirksamkeit im Konzentrationsbereich > 250 µg/ml

#: Tendenz zu erkennen

-: kein Effekt

Die signifikant zytotoxischen Einflüsse der beiden Kapselsysteme (ob intakt oder aufgeschlossen) auf Caco-2 Zellen könnten auf den niedrigen pH Wert (pH 1.5) der Kapseln (siehe Kap. 6.3.5) zurückzuführen sein. Der Einsatz dieser Systeme in der Zellkultur hatte vermutlich zur Folge, dass die optimalen Kulturbedingungen (pH 7.4) für Caco-2 Zellen [DSMZ, 2004] gestört waren und dadurch zytotoxische Effekte auftraten. Ein zusätzlicher Effekt auf die Zellvitalität von Caco-2 Zellen könnte durch die Kapselmaterialien selbst ausgelöst werden. Wie in Tab. 6.2 gezeigt enthalten die Apfelpektinkapseln ein Pektin, das nicht in den zuvor diskutierten Pektinamidhohlkapseln eingesetzt wurde. Aufgrund dessen wäre ein zusätzlicher zytotoxischer Einfluss, unabhängig vom pH-Wert, auf Caco-2 Zellen durch das Apfelpektin durchaus denkbar [Bernkop-Schnurch *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2010]. Im Vergleich dazu, wurden nach 48 h Inkubation von Milzlymphozyten der Maus mit Molkenproteinkonzentraten (1.6 - 0.0015 mg/ml) keine zytotoxischen Effekte nachgewiesen [Cross *et al.*, 1999]. In einer aktuellen Studie von Gosh *et al.* konnte ein vergleichbares Ergebnis erzielt werden. Dabei wurden nach 48 h Inkubation von Mäusefibroblasten (L929 Zellen) mit unterschiedlichen Molkenproteinlösungen keine zytotoxischen Effekte beobachtet [Ghosh *et al.*, 2011].

Ein Vergleich der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse nach Vorinkubation mit HBE und den verwendeten HBE- beladenen Kapselpräparaten (Pektinamidhohl-, multidisperse Hüll-, Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln) auf deren antioxidatives Potential *in vitro* (Caco-2 Zellen) zeigte, dass die Wirksamkeit des HBE abhängig von der Verkapselungstechnik beeinflusst wurde. Am deutlichsten wurde dieser Aspekt bei den multidispersen Hüllkapseln, die aufgrund der äußeren Ölphase (siehe Kap. 6.3.4) im Zellkulturmedium aufschwammen und somit die Freisetzung der wirksamen Komponenten des HBE verhindert wurde. Dadurch konnten keine Effekte (1 und 24 h Inkubation) auf die untersuchten Biomarker des oxidativen Stresses in den verwendeten Testsystemen auf Caco-2 Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 7.20 (J), Abb. 7.21 (N), Abb. 7.24 (J), Abb. 7.25 (N), Abb. 7.29 (J) und Abb. 7.30 (N)). Dieser negative Einfluss (aufschwimmen der Kapseln im Zellkulturmedium) aufgrund der äußeren Ölphase muss jedoch nur bei *in vitro* Testsystemen beachtet werden. Pflanzenöl, wie es für die Herstellung dieses Kapseltyps verwendet wurde (siehe Tab. 6.2), wird täglich mit der Nahrung aufgenommen und im Körper abgebaut. Dies bedeutet, dass bei kontrolliertem Konsum dieser multidispersen Hüllkapseln *in vivo* keine negativen Effekte zu erwarten sind. Die Ölphase der Kapsel kann durch unterschiedliche Enzyme (Lipasen) während der Magen-Darm-Passage abgebaut und der enthaltene Wirkstoff freigesetzt werden [Singh *et al.*, 2011]. Es ist aus der Literatur bekannt, dass solche Wasser in Öl-Emulsionen schon seit längerem verwendet werden, um Substanzen erstens zu stabilisieren und zweitens deren Transport durch den Magen-Darm-Trakt zu kontrollieren [Singh *et al.*, 2011].

Durch Inkubationen mit den HBE-beladenen Kapselsystemen (Pektinamidhohl-, Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln) an Caco-2 wurden mit dem HBE vergleichbare Ergebnisse erhalten. Es zeigte sich, dass sowohl eine signifikante Erniedrigung TBH-induzierter intrazellulärer ROS (siehe Abb. 7.29 (I)(K)(L) und Abb. 7.30 (M)(O)(P)) und eine Reduzierung Menadion-induzierter oxidativer DNA-Schäden (siehe Abb. 7.20 (I)(K)(L) und

Abb. 7.21 (M)(O)(P)) als auch eine tendenzielle Erhöhung des Glutathiongehalts (siehe Abb. 7.24 (I)(K)(L) und Abb. 7.25 (M)(O)(P)) in Caco-2 Zellen nachgewiesen werden konnten. Dies bedeutet, dass die Verkapselungsmethoden für HBE dessen potente antioxidative Wirksamkeit auf die untersuchten Biomarker in Caco-2 Zellen nach der Freisetzung im Zellkulturmedium nicht beeinflussten. Ein additiver antioxidativer Einfluss der Kapselmaterialien auf die in Caco-2 Zellen untersuchten Biomarker wurde nicht beobachtet, da durch Inkubationen mit HBE-beladenen Kapseln keine potenteren Effekte als die des HBE erreicht wurden. Dass jedoch ein zusätzlicher Einfluss der Kapselmaterialien *in vitro* berücksichtigt werden sollte, zeigte eine Studie von Kent *et al.*. Dabei wurden Molkenproteinisolate mit humanen Prostataepithelzellen inkubiert und eine signifikante Erhöhung (64%) des Glutathiongehalts der Zellen im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen [Kent *et al.*, 2003].

Wird die *in vitro* Situation jedoch der *in vivo* Situation gegenübergestellt so wird deutlich, dass die Kapselmaterialien weiter an Bedeutung gewinnen. Beispielsweise Pektin, welches in zwei Kapselsystemen enthalten war (Pektinamidhohl- und Apfelpektinkapseln; siehe Tab. 6.2), wird auch durch die tägliche Nahrung (Obst und Gemüse) aufgenommen [Thakur *et al.*, 1997]. Es ist bekannt, dass Pektin durch enzymatischen und bakteriellen Abbau im Dünndarm und Dickdarm gespalten wird. Dadurch können weitere Substanzen mit einem möglichen protektiven Wirkpotential gebildet werden. So wurde bei Inkubationen von amidiertem Pektin mit humanem Dünndarm- und Dickdarminhalt gezeigt, dass zwischen 70% und 80% der Ausgangsmenge zu SCFA's (engl. *short chain fatty acid*, kurzkettige Fettsäuren) abgebaut wurden [Knaup *et al.*, 2008]. Es ist weiterhin literaturbekannt, dass die entstandenen SCFA's, vor allem Butyrat, die Bildung von Bifido- und Lactobakterien im Darm unterstützten können. Zusätzlich wird vermutet, dass SCFA's positive Wirkungen auf die Zellproliferation, Apoptose und die Muzin Produktion haben [Roy *et al.*, 2006].

Ein weiteres *in vivo* bedeutsames Kapselmaterial ist Molkenproteinisolat, das bei der Herstellung der Molkenproteinkapseln verwendet wurde (siehe Tab. 6.2). Molkenproteine (20%) sind neben Casein (80%) Hauptbestandteile der Milch und werden durch die tägliche Nahrung (tägliche Aufnahme an Milch pro Person in Deutschland betrug 2007 100 - 130 g; [Rimbach *et al.*, 2010]) aufgenommen. Nachdem Molkenproteine unmetabolisiert den Magen passierten und intakt den Dünndarm erreichten, findet dort eine Spaltung zu unterschiedlichen, teilweise essentiellen, Aminosäuren (Leucin, Isoleucin, Methionin, Valin, Cystein, etc.) statt. Diese können wiederum vom Körper resorbiert und verteilt werden [Luhovyy *et al.*, 2007]. So ist aus der Literatur bekannt, dass Molkenproteine nach der Spaltung zu Aminosäuren (Cystein) bei der Bildung von Glutathion beteiligt sein können und dadurch die intrazelluläre antioxidative Kapazität erhöhen könnten [Marshall, 2004].

### 8.3.1 Fazit zur antioxidativen Wirksamkeit

Bei den Untersuchungen zur antioxidativen Wirksamkeit des HBE im Vergleich zu den HBE-beladenen Kapselsystemen stellte sich heraus, dass die multidispersen Hüllkapseln aufgrund der äußeren Ölphase in dieser Formulierung nicht für die Verwendung in den *in vitro* Experimente geeignet waren. Durch Inkubationen mit HBE-beladenen Kapselsystemen wurden im Konzentrationsbereich 50 - 500 µg/ml durch HBE-beladene Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln ein signifikanter Einfluss auf die Zellvitalität beobachtet. Eine tendenzielle Erhöhung des Glutathiongehalts der Zelle (100 - 500 µg/ml), eine Reduzierung der ROS mit steigender Konzentration (100 - 500 µg/ml) und ein positiver Einfluss auf die Bildung von oxidativen DNA-Schäden (5 - 10 µg/ml) wurden nach Inkubation mit den HBE-beladenen Kapselsystemen - Pektinamidhohl-, Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln - nachgewiesen. Die biologischen Wirkungen der Pektinamidhohl-, Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln waren mit denen des nicht verkapselten HBE vergleichbar.

Aus diesem Grund lässt sich sagen, dass der Einsatz von Verkapselungstechniken *in vitro* zu keiner Reduzierung der biologischen Wirksamkeit der Wirkkomponenten führten. Damit stellen die getesteten Kapselsysteme (Pektinamidhohl-, Molkenprotein- und Apfelpektinkapseln) eine gute Möglichkeit dar, bioaktive Stoffe zu verkapseln, um Zielorte im Körper zu erreichen, ohne dass die Wirksamkeit *in vitro* beeinflusst wird. Die in dieser Arbeit beobachteten *in vitro* Effekte auf ausgewählte Biomarker des oxidativen Stresses, müssen in der Zukunft in *in vivo* Studien verifiziert werden.

## 9 Literatur

- Abdalla, A., Klein, S., & Mader, K. (2008) A new self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for poorly soluble drugs: characterization, dissolution, *in vitro* digestion and incorporation into solid pellets. *European journal of pharmaceutical sciences*. 35, 457-464.
- Abolins, M., Sausserde, R., Liepniece, M., & Sterne, D. (2009) Cranberry and blueberry production in Latvia. *Latvian journal of agronomy*. 12, 7-13.
- Ackermann, M. (2010) Studien zum Verhalten von Anthocyanen aus Heidelbeeren im Humanstoffwechsel – Stabilisierung und Bindung durch Proteine. *Dissertation, Uni Würzburg*.
- Acquaviva, R., Russo, A., Galvano, F., Galvano, G., Barcellona, M. L., Li Volti, G., & Vanella, A. (2003) Cyanidin and cyanidin 3-O-beta-D-glucoside as DNA cleavage protectors and antioxidants. *Cell biology and toxicology*. 19, 243-252.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology*. 55, 373-399.
- Aramwit, P., Bang, N., & Srichana, T. (2010) The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits. *Food research international*. 43, 1093-1097.
- Arturssona, P., Palm, K., & Luthman, K. (1996) Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced drug delivery review*. 22, 67-84.
- Asen, S., Stewart, R. N., & Norris, K. H. (1972) Copigmentation of Anthocyanins in Plant-Tissues and Its Effect on Color. *Phytochemistry*. 11, 1139-&.
- Augustin, M. A., & Hemar, Y. (2009) Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical society reviews*. 38, 902-912.
- Aura, A. M., Martin-Lopez, P., O'Leary, K. A., Williamson, G., Oksman-Caldentey, K. M., Poutanen, K., & Santos-Buelga, C. (2005) In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *European journal of nutrition*. 44, 133-142.
- Aura, A. M. (2008) Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemical review*. 7, 407-427.
- Avila, M., Hidalgo, M., Sanchez-Moreno, C., Pelaez, C., Requena, T., & de Pascual-Teresa, S. (2009) Bioconversion of anthocyanin glycosides by bifidobacteria and lactobacillus. *Food research international*. 42, 1453-1461.
- Ax, K., Mayer-Miebach, E., Link, B., Schuchmann, H., & Schubert, H. (2003) Stability of lycopene in oil-in-water emulsions. *Engineering in life sciences*. 3, 199-201.
- Bakowska-Barczak, A. M., & Kolodziejczyk, P. P. (2010) Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial crops and products*, 9.
- Balakumar, T., Vincent, V. H. B., & Paliwal, K. (1993) On the interaction of UV-B radiation (280-315-nm) with water-stress in crop plants. *Physiologia plantarum*. 87, 217-222.

- Bansode, S. S., Banarjee, S. K., Gaikwad, D. D., Jadhav, S. L., & Thorat, R. M. (2010) Microencapsulation: a review. *International journal of pharmaceutical sciences review and research*. 1, 38-43.
- Bao, L., Yao, X. S., Yau, C. C., Tsi, D., Chia, C. S., Nagai, H., & Kurihara, H. (2008) Protective effects of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract on restraint stress-induced liver damage in mice. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56, 7803-7807.
- Baranauskiene, R., Venskutonis, P. R., Dewettinck, K., & Verhe, R. (2006) Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.) and marjoram (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into milk protein-based matrices. *Food research international*. 39, 413-425.
- Becci, P. J., Hess, F. G., Babish, J. G., Gallo, M. A., & Voss, K. A. (1983a) Reproduction study of grape color extract in rats. *Food and chemical toxicology*. 21, 79-83.
- Becci, P. J., Hess, F. G., Gallo, M. A., Johnson, W. D., & Babish, J. G. (1983b) Subchronic feeding study of grape color extract in beagle dogs. *Food and chemical toxicology*. 21, 75-77.
- Beck-Texte. (2010) Lebensmittelrecht: EG-Lebensmittel-Basisverordnung, Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB). *dtv*. 4. Auflage.
- Bellion, P., Hofmann, T., Pool-Zobel, B. L., Will, F., Dietrich, H., Knaup, B., Richling, E., Baum, M., Eisenbrand, G., & Janzowski, C. (2008) Antioxidant effectiveness of phenolic apple juice extracts and their gut fermentation products in the human colon carcinoma cell line caco-2. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56, 6310-6317.
- Bellion, P., Olk, M., Will, F., Dietrich, H., Baum, M., Eisenbrand, G., & Janzowski, C. (2009) Formation of hydrogen peroxide in cell culture media by apple polyphenols and its effect on antioxidant biomarkers in the colon cell line HT-29. *Molecular nutrition and food research*. 53, 1226-1236.
- Bellion, P., Digles, J., Will, F., Dietrich, H., Baum, M., Eisenbrand, G., & Janzowski, C. (2010) Polyphenolic apple extracts: Effects of raw material and production method on antioxidant effectiveness and reduction of DNA damage in Caco-2 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58, 6636-6642.
- Bermudez-Soto, M. J., Tomas-Barberan, F. A., & Garcia-Conesa, M. T. (2007) Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food chemistry*. 102, 865-874.
- Bernkop-Schnurch, A., Majzoob, S., Atyabi, F., Dorkoosh, F., Kafedjiiski, K., & Loretz, B. (2006) Pectin-cysteine conjugate: synthesis and in-vitro evaluation of its potential for drug delivery. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 58, 1601-1610.
- Betz, M., Tolkach, A., & Kulozik, U. (2010) Acidic whey protein gels for encapsulation of bioactive plant compounds. *5th International Symposium on Food rheology and structure*, 188-191.
- Betz, M., & Kulozik, U. (2011) Whey protein gels for the entrapment of bioactive anthocyanins from bilberry extract. *International Dairy Journal*. 21, 703-710.

- Bobe, G., Wang, B., Seeram, N. P., Nair, M. G., & Bourquin, L. D. (2006) Dietary anthocyanin-rich tart cherry extract inhibits intestinal tumorigenesis in APC(Min) mice fed suboptimal levels of sulindac. *Journal of agricultural and food chemistry*. 54, 9322-9328.
- Böhm, H., Boeing, H., Hempel, J., Raab, B., & Kroke, A. (1998) Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*. 37, 147-163.
- Borges, G., Roowi, S., Rouanet, J. M., Duthie, G. G., Lean, M. E., & Crozier, A. (2007) The bioavailability of raspberry anthocyanins and ellagitannins in rats. *Molecular nutrition and food research*. 51, 714-725.
- Borkowski, T., Szymusiak, H., Gliszczynska-Swiglo, A., & Tyrakowska, B. (2005) The effect of 3-O-beta-glucosylation on structural transformations of anthocyanidins. *Food research international*. 38, 1031-1037.
- Bose, S., & Bogner, R. H. (2007) Solventless pharmaceutical coating processes: A review. *Pharmaceutical development and technology*. 12, 115-131.
- Brouillard, R., & Dubois, J. E. (1977) Mechanism of structural transformations of anthocyanins in acidic media. *Journal of the american chemical society*. 99, 1359-1364.
- Brouillard, R., Chassaing, S., Isorez, G., Kueny-Stotz, M., & Figueiredo, P. (2010) The visible flavonoids or anthocyanins: From research to applications. *Recent advances in polyphenol research*. 2, 1-22.
- Brownmiller, C., Howard, L. R., & Prior, R. L. (2008) Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of food science*. 73, H72-79.
- Buch, K., Penning, M., Wächtersbach, E., Maskos, M., & Langguth, P. (2009) Investigation of various shellac grades: Additional analysis for identity. *Drug development and industrial pharmacy*. 35, 694-703.
- Burdulis, D., Sarkinas, A., Jasutiene, I., Stackeviciene, E., Nikolajevs, L., & Janulis, V. (2009) Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium Myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium Corymbosum* L.) fruits. *Acta poloniae pharmaceutica*. 66, 399-408.
- Cai, H., Marczylo, T. H., Teller, N., Brown, K., Steward, W. P., Marko, D., & Gescher, A. J. (2010) Anthocyanin-rich red grape extract impedes adenoma development in the Apc(Min) mouse: Pharmacodynamic changes and anthocyanin levels in the murine biophase. *European journal of cancer*. 46, 811-817.
- Cai, Y. Z., & Corke, H. (2000) Production and properties of spray-dried Amaranthus betacyanin pigments. *Journal of food science*. 65, 1248-1252.
- Carkeet, C., Clevidence, B. A., & Novotny, J. A. (2008) Anthocyanin excretion by humans increases linearly with increasing strawberry dose. *Journal of nutrition*. 138, 897-902.

- Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, M. D., Paez-Hernandez, M. E., Rodriguez, J. A., & Galan-Vidal, C. A. (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chemistry*. 113, 859-871.
- Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., & Meireles, M. A. A. (2011) Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. *Food research international*. 44, 499-509.
- Champagne, C. P., & Fustier, P. (2007) Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current opinion in biotechnology*. 18, 184-190.
- Chantret, I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, M. G., & Zweibaum, A. (1988) Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human-colon carcinoma-cells - a survey of 20 cell-lines. *Cancer research*. 48, 1936-1942.
- Chen, L. Y., & Subirade, M. (2006) Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials*. 27, 4646-4654.
- Cheng, H., Li, S., Fan, Y., Gao, X., Hao, M., Wang, J., Zhang, X., Tai, G., & Zhou, Y. (2011) Comparative studies of the antiproliferative effects of ginseng polysaccharides on HT-29 human colon cancer cells. *Medical oncology*. 28, 175-181.
- Chiste, R. C., Lopes, A. S., & de Faria, L. J. G. (2010) Thermal and light degradation kinetics of anthocyanin extracts from mangosteen peel (*Garcinia mangostana* L.). *International journal of food science and technology*. 45, 1902-1908.
- Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P., & Kaina, B. (2003) Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*. 193, 3-34.
- Clifford, M. N. (2000) Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the science of food and agriculture*. 80, 1063-1072.
- Coates, E. M., Popa, G., Gill, C. I. R., McCann, M., McDougall, G. J., Stewart, D., & Rowland, I. (2007) Colon-available raspberry extract exhibit anti-cancer effects on in vitro models of colon cancer. *Proceedings of the nutrition society*. 66, 67a-67a.
- Cohen, E., Ophir, I., & Shaul, Y. B. (1999) Induced differentiation in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line. *Journal of cell science*. 112, 2657-2666.
- Collins, A. R., Dusinska, M., Gedik, C. M., & Stetina, R. (1996) Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ health perspect*. 104, 465-469.
- Cooke, D., Schwarz, M., Boocock, D., Winterhalter, P., Steward, W. P., Gescher, A. J., & Marczylo, T. H. (2006) Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the Apc(Min) mouse model of intestinal carcinogenesis - Relationship with tissue anthocyanin levels. *International journal of cancer*. 119, 2213-2220.
- Cooney, J. M., Jensen, D. J., & McGhie, T. K. (2004) LC-MS identification of anthocyanins in boysenberry extract and anthocyanin metabolites in human urine following dosing. *Journal of the science of food and agriculture*. 84, 237-245.
- Criddle, D. N., Gillies, S., Baumgartner-Wilson, H. K., Jaffar, M., Chinje, E. C., Passmore, S., Chvanov, M., Barrow, S., Gerasimenko, O. V., Tepikin, A. V., Sutton, R., & Petersen, O. H. (2006) Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox

- cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. *Journal of biological chemistry*. 281, 40485-40492.
- Cross, M. L., & Gill, H. S. (1999) Modulation of immune function by a modified bovine whey protein concentrate. *Immunology and cell biology*. 77, 345-350.
- Crow, J. P. (1997) Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric oxide*. 1, 145-157.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009) Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*. 26, 1001-1043.
- Cvorovic, J., Tramer, F., Granzotto, M., Candussio, L., Decorti, G., & Passamonti, S. (2011) Oxidative stress-based cytotoxicity of delphinidin and cyanidin in colon cancer cells. *Archives of biochemistry and biophysics*. 501, 151-157.
- Dai, J., Gupte, A., Gates, L., & Mumper, R. J. (2009) A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and chemical toxicology*. 47, 837-847.
- Del Bo, C., Ciappellano, S., Klimis-Zacas, D., Martini, D., Gardana, C., Riso, P., & Porrini, M. (2010) Anthocyanin absorption, metabolism, and distribution from a wild blueberry-enriched diet (*Vaccinium angustifolium*) is affected by diet duration in the sprague-dawley rat. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58, 2491-2497.
- Dickinson, E., & Davies, E. (1999) Influence of ionic calcium on stability of sodium caseinate emulsions. *Colloids and surfaces B-biointerfaces*. 12, 203-212.
- Dixon, R. A., Xie, D. Y., & Sharma, S. B. (2005) Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? *New phytologist*. 165, 9-28.
- DSMZ. (2004) Human and animal cell line. *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*, [www.dmsz.de](http://www.dmsz.de).
- Dulebohn, R. V., Yi, W. G., Srivastava, A., Akoh, C. C., Krewer, G., & Fischer, J. G. (2008) Effects of blueberry (*Vaccinium ashei*) on DNA damage, lipid peroxidation, and phase II enzyme activities in rats. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56, 11700-11706.
- Eiro, M. J., & Heinonen, M. (2002) Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 50, 7461-7466.
- Eisenbrand, G., & Schreier, P. (2006) Lexikon Lebensmittelchemie. *Römp. 2. Auflage*.
- Elisia, I., & Kitts, D. D. (2008) Anthocyanins inhibit peroxyl radical-induced apoptosis in Caco-2 cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 312, 139-145.
- Elzoghby, A. O., Abo El-Fotoh, W. S., & Elgindy, N. A. (2011) Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. *Journal of controlled release*.
- Esselen, M., Fritz, J., Hutter, M., Teller, N., Baechler, S., Boettler, U., Marczylo, T. H., Gescher, A. J., & Marko, D. (2011a) Anthocyanin-rich extracts suppress the DNA-

- damaging effects of topoisomerase poisons in human colon cancer cells. *Molecular nutrition and food research*. 55, S143-S153.
- Esselen, M., Boettler, U., Teller, N., Bachler, S., Hutter, M., Rufer, C. E., Skrbek, S., & Marko, D. (2011b) Anthocyanin-Rich Blackberry Extract Suppresses the DNA-Damaging Properties of Topoisomerase I and II Poisons in Colon Carcinoma Cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 59, 6966-6973.
- Evans, D. F., Pye, G., Bramley, R., Clark, A. G., Dyson, T. J., & Hardcastle, J. D. (1988) Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut*. 29, 1035-1041.
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L., & O'Neill, K. L. (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutation research*. 339, 37-59.
- Fallingborg, J., Christensen, L. A., Ingemannielsen, M., Jacobsen, B. A., Abildgaard, K., & Rasmussen, H. H. (1989) Ph-profile and regional transit times of the normal gut measured by a radiotelemetry device. *Alimentary pharmacology and therapeutics*. 3, 605-613.
- Fallingborg, J., Christensen, L. A., Jacobsen, B. A., Ingemannielsen, M., Rasmussen, H. H., Abildgaard, K., & Rasmussen, S. N. (1994) Effect of olsalazine and mesalazine on intraluminal ph of the duodenum and proximal jejunum in healthy humans. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 29, 498-500.
- Fallingborg, J. (1999) Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Danish medical bulletin*. 46, 183-196.
- FAO. (2008) World blueberry production. *Food and agriculture organization of the united nations*, [www.fao.org](http://www.fao.org).
- Farah, M. E., Maia, M., Furlani, B., Bottos, J., Meyer, C. H., Lima, V., Penha, F. M., Costa, E. F., & Rodrigues, E. B. (2008) Current concepts of trypan blue in chromovitrectomy. *Developments in ophthalmology*. 42, 91-100.
- Faria, A., Pestana, D., Azevedo, J., Martel, F., de Freitas, V., Azevedo, I., Mateus, N., & Calhau, C. (2009) Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells - Putative involvement of GLUT2. *Molecular nutrition and food research*. 53, 1430-1437.
- Faria, A., Pestana, D., Teixeira, D., de Freitas, V., Mateus, N., & Calhau, C. (2010) Blueberry anthocyanins and pyruvic acid adducts: anticancer properties in breast cancer cell lines. *Phytotherapy research*. 24, 1862-1869.
- Felgines, C., Talavera, S., Gonthier, M. P., Texier, O., Scalbert, A., Lamaison, J. L., & Remesy, C. (2003) Strawberry Anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *Journal of nutrition*. 133, 1296-1301.
- Felgines, C., Talavera, S., Texier, O., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J. L., & Remesy, C. (2005) Blackberry anthocyanins are mainly recovered from urine as methylated and glucuronidated conjugates in humans. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53, 7721-7727.

- Felgines, C., Talavera, S., Texier, O., Besson, C., Fogliano, V., Lamaison, J. L., la Fauci, L., Galvano, G., Remesy, C., & Galvano, F. (2006) Absorption and metabolism of red orange juice anthocyanins in rats. *British journal of nutrition*. 95, 898-904.
- Felgines, C., Texier, O., Garcin, P., Besson, C., Lamaison, J. L., & Scalbert, A. (2009) Tissue distribution of anthocyanins in rats fed a blackberry anthocyanin-enriched diet. *Molecular nutrition and food research*. 53, 1098-1103.
- Felgines, C., Krisa, S., Mauray, A., Besson, C., Lamaison, J. L., Scalbert, A., Merillon, J. M., & Texier, O. (2010) Radiolabelled cyanidin 3-O-glucoside is poorly absorbed in the mouse. *British journal of nutrition*. 103, 1738-1745.
- Fernandes, I., Faria, A., Azevedo, J., Soares, S., Calhau, C., De Freitas, V., & Mateus, N. (2010) Influence of anthocyanins, derivative pigments and other catechol and pyrogallol-type phenolics on breast cancer cell proliferation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58, 3785-3792.
- Ferreira, D. S., Faria, A. F., Grosso, C. R. F., & Mercadante, A. Z. (2009) Encapsulation of blackberry anthocyanins by thermal gelation of curdlan. *Journal of the brazilian chemical society*. 20, 1908-1915.
- Fleischhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., & Kulling, S. E. (2006) Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *European journal of nutrition*. 45, 7-18.
- Forester, S. C., & Waterhouse, A. L. (2008) Identification of cabernet sauvignon anthocyanin gut microflora metabolites. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56, 9299-9304.
- Forester, S. C., & Waterhouse, A. L. (2011) Gut metabolites of anthocyanins, gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde, inhibit cell proliferation of Caco-2 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58, 5320-5327.
- Frank, J., Biesalski, H. K., Dominici, S., & Pompella, A. (2000) The visualization of oxidant stress in tissues and isolated cells. *Histology and histopathology*. 15, 173-184.
- Frank, K., Pietuch, M., & Schuchmann, H. (2010) Verkapselung von Anthocyanen in submikronen Emulsionstropfen: Einfluss ausgewählter Emulgatorsysteme auf die Mikrostruktur von anthocyanhaltigen Doppemulsionen. *Chemie Ingenieur Technik*. 82, 1.
- Freitas, V., & Mateus, N. (2010) Formation of pyranoanthocyanins in red wines: a new and diverse class of anthocyanin derivatives. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 11.
- Fritz, J., Kern, M., Pahlke, G., Vatter, S., & Marko, D. (2006) Biological activities of malvidin, a red wine anthocyanidin. *Molecular nutrition and food research*. 50, 390-395.
- Fritz, J., Roth, M., Holbach, P., Esselen, M., & Marko, D. (2008) Impact of delphinidin on the maintenance of DNA integrity in human colon carcinoma cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56, 8891-8896.
- Gallagher, E. P., Kavanagh, T. J., & Eaton, D. I. (1994) Glutathione, oxidized glutathione, and mixed disulfides in biological samples. *Methods in toxicology*. 1b, 349-366.

- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007) Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food research international*. 40, 1107-1121.
- Ghosh, A., Ali, M. A., Selvanesan, L., & Dias, G. J. (2011) Structure-function characteristics of the biomaterials based on milk-derived proteins. *International journal of biological macromolecules*. 46, 404-411.
- Ghosh, D., McGhie, T. K., Zhang, J. L., Adaim, A., & Skinner, M. (2006) Effects of anthocyanins and other phenolics of boysenberry and blackcurrant as inhibitors of oxidative stress and damage to cellular DNA in SH-SY5Y and HL-60 cells. *Journal of the science of food and agriculture*. 86, 678-686.
- Gonzalez-Barrio, R., Borges, G., Mullen, W., & Crozier, A. (2010) Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58, 3933-3939.
- Goto, T., & Kondo, T. (1991) Structure and molecular stacking of anthocyanins - flower color variation. *Angewandte Chemie-International Edition in Englisch*. 30, 17-33.
- Gradinaru, G., Biliaderis, C. G., Kallithraka, S., Kefalas, P., & Garcia-Viguera, C. (2003) Thermal stability of Hibiscus sabdariffa L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. *Food chemistry*. 83, 423-436.
- Gunasekaran, S., Ko, S., & Xiao, L. (2007) Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. *Journal of food engineering*. 83, 31-40.
- Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, B. (1990) The measurement and mechanism of lipid-peroxidation in biological-systems. *Trends in biochemical sciences*. 15, 129-135.
- Ha, H. L., Shin, H. J., Feitelson, M. A., & Yu, D. Y. (2010) Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. *World journal of gastroenterology*. 16, 6035-6043.
- Hagl, S., Deusser, H., Soyalan, B., Janzowski, C., Will, F., Dietrich, H., Albert, F. W., Rohner, S., & Richling, E. (2011) Colonic availability of polyphenols and D-(-)-quinic acid after apple smoothie consumption. *Molecular nutrition and food research*. 55, 368-377.
- Hallagan, J. B., Allen, D. C., & Borzelleca, J. F. (1995) The safety and regulatory status of food, drug and cosmetics color additives exempt from certification. *Food and chemical toxicology*. 33, 515-528.
- Halliwell, B., & Chirico, S. (1993) Lipid-peroxidation - Its mechanism, measurement, and significance. *American journal of clinical nutrition*. 57, S715-S725.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2008) Free radicals in biology and medicine. *Oxford university press, England*. 4. Auflage, 850.
- Halliwell, B. (2008) Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of biochemistry and biophysics*. 476, 107-112.
- Han, S. J., Ryu, S. N., Trinh, H. T., Joh, E. H., Jang, S. Y., Han, M. J., & Kim, D. H. (2009) Metabolism of cyanidin-3-O-beta-D-glucoside isolated from black colored rice and its antiscratching behavioral effect in mice. *Journal of food science*. 74, H253-258.

- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2001) Anthocyanins and other flavonoids. *Natural product reports*. 18, 310-333.
- Hassimotto, N. M. A., & Lajolo, F. M. (2011) Antioxidant status in rats after long-term intake of anthocyanins and ellagitannins from blackberries. *Journal of the science of food and agriculture*. 91, 523-531.
- He, & Giusti, M. M. (2010) Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. *Annual review of food science and technology*. 1, 163-186.
- He, Tan, Y. N., Tian, Z. Q., Chen, L. Y., Hu, F. Q., & Wu, W. (2011) Food protein-stabilized nanoemulsions as potential delivery systems for poorly water-soluble drugs: preparation, in vitro characterization, and pharmacokinetics in rats. *International journal of nanomedicine*. 6, 521-533.
- He, J., Magnuson, B. A., & Giusti, M. M. (2005) Analysis of anthocyanins in rat intestinal contents - Impact of anthocyanin chemical structure on fecal excretion. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53, 2859-2866.
- He, J., Wallace, T. C., Keatley, K. E., Failla, M. L., & Giusti, M. M. (2009) Stability of black raspberry anthocyanins in the digestive tract lumen and transport efficiency into gastric and small intestinal tissues in the rat. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57, 3141-3148.
- Heinonen, M. (2007) Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics - a Finnish perspective. *Molecular nutrition and food research*. 51, 684-691.
- Henning, S. M., Seeram, N. P., Zhang, Y. J., Li, L. Y., Gao, K., Lee, R. P., Wang, D. C., Zerlin, A., Karp, H., Thames, G., Kotlerman, J., Li, Z. P., & Heber, D. (2010) Strawberry consumption is associated with increased antioxidant capacity in serum. *Journal of medicinal food*. 13, 116-122.
- Hogan, S., Chung, H., Zhang, L., Li, J. R., Lee, Y., Dai, Y. M., & Zhou, K. Q. (2010) Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from acai. *Food chemistry*. 118, 208-214.
- Hollands, W., Brett, G. M., Dainty, J. R., Teucher, B., & Kroon, P. A. (2008) Urinary excretion of strawberry anthocyanins is dose dependent for physiological oral doses of fresh fruit. *Molecular nutrition and food research*. 52, 1097-1105.
- Huang, H. T. (1955) Decolorization of anthocyanins by fungal enzymes. *Journal of agricultural and food chemistry*. 3, 141-146.
- Hwang, Y. P., Choi, J. H., Yun, H. J., Han, E. H., Kim, H. G., Kim, J. Y., Park, B. H., Khanal, T., Choi, J. M., Chung, Y. C., & Jeong, H. G. (2011) Anthocyanins from purple sweet potato attenuate dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats by inducing Nrf2-mediated antioxidant enzymes and reducing COX-2 and iNOS expression. *Food and chemical toxicology*. 49, 93-99.
- Ichiyanagi, T., Rahman, M. M., Kashiwada, Y., Ikeshiro, Y., Shida, Y., Hatano, Y., Matsumoto, H., Hirayama, M., & Konishi, T. (2004a) Absorption and metabolism of delphinidin 3-O-beta-D-glucoside in rats. *Biofactors*. 21, 411-413.
- Ichiyanagi, T., Rahman, M. M., Kashiwada, Y., Ikeshiro, Y., Shida, Y., Hatano, Y., Matsumoto, H., Hirayama, M., Tsuda, T., & Konishi, T. (2004b) Absorption and

- metabolism of delphinidin 3-O-beta-D-glucopyranoside in rats. *Free radical biology and medicine*. 36, 930-937.
- Ichiyanagi, T., Shida, Y., Rahman, M. M., Hatano, Y., & Konishi, T. (2006) Bioavailability and tissue distribution of anthocyanins in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract in rats. *Journal of agricultural and food chemistry*. 54, 6578-6587.
- Jackman, R. L., Yada, R. Y., Tung, M. A., & Speers, R. A. (1987) Anthocyanins as food colorants - a review. *Journal of food biochemistry*. 11, 201-247.
- Jaksevic, M., Aaby, K., Borge, G. I. A., Jeppsson, B., Ahrne, S., & Molin, G. (2011) Antioxidative protection of dietary bilberry, chokeberry and *Lactobacillus plantarum* HEAL19 in mice subjected to intestinal oxidative stress by ischemia-reperfusion. *BMC complementary and alternative medicine*. 11, 12.
- Jantratid, E., Janssen, N., Reppas, C., & Dressman, J. B. (2008) Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: An update. *Pharmaceutical research*. 25, 1663-1676.
- Jayakumar, R., & Kanthimathi, M. S. (2011) Inhibitory effects of fruit extracts on nitric oxide-induced proliferation in MCF-7 cells. *Food chemistry*. 126, 956-960.
- Jing, P., Bomser, J. A., Schwartz, S. J., He, J., Magnuson, B. A., & Giusti, M. M. (2008) Structure-function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56, 9391-9398.
- Kahkonen, M. P., Heinamaki, J., Ollilainen, V., & Heinonen, M. (2003) Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the science of food and agriculture*. 83, 1403-1411.
- Kahle, K., Kraus, M., Scheppach, W., & Richling, E. (2005) Colonic availability of apple polyphenols - A study in ileostomy subjects. *Molecular nutrition and food research*. 49, 1143-1150.
- Kahle, K., Kraus, M., Scheppach, W., Ackermann, M., Ridder, F., & Richling, E. (2006) Studies on apple and blueberry fruit constituents: Do the polyphenols reach the colon after ingestion? *Molecular nutrition and food research*. 50, 418-423.
- Kalt, W., Blumberg, J. B., McDonald, J. E., Vinqvist-Tymchuk, M. R., Fillmore, S. A. E., Graf, B. A., O'Leary, J. M., & Milbury, P. E. (2008) Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56, 705-712.
- Karczewski, J. M., Peters, J. G., & Noordhoek, J. (1999) Quinone toxicity in DT-diaphorase-efficient and -deficient colon carcinoma cell lines. *Biochemical pharmacology*. 57, 27-37.
- Kay, C. D., Mazza, G., Holub, B. J., & Wang, J. (2004) Anthocyanin metabolites in human urine and serum. *British journal of nutrition*. 91, 933-942.
- Kay, C. D., Mazza, G., & Holub, B. J. (2005) Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. *Journal of nutrition*. 135, 2582-2588.

- Kay, C. D. (2006) Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans. *Nutrition research reviews*. 19, 137-146.
- Kay, C. D., Kroon, P. A., & Cassidy, A. (2009) The bioactivity of dietary anthocyanins is likely to be mediated by their degradation products. *Molecular nutrition and food research*. 53, S92-S101.
- Kearsley, M. W., & Rodriguez, N. (1981) The stability and use of natural colors in foods - anthocyanin, beta-carotene and riboflavin. *Journal of food technology*. 16, 421-431.
- Kelly, K. A., Havrilla, C. M., Brady, T. C., Abramo, K. H., & Levin, E. D. (1998) Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environ health perspect*. 106, 375-384.
- Kent, K. D., Harper, W. J., & Bomser, J. A. (2003) Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cells. *Toxicology in vitro*. 17, 27-33.
- Keppler, K., & Humpf, H. U. (2005) Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorganic and medicinal chemistry*. 13, 5195-5205.
- Kern, M., Fridrich, D., Reichert, J., Skrbek, S., Nussler, A., Hofem, S., Vatter, S., Pahlke, G., Rufer, C., & Marko, D. (2007) Limited stability in cell culture medium and hydrogen peroxide formation affect the growth inhibitory properties of delphinidin and its degradation product gallic acid. *Molecular nutrition and food research*. 51, 1163-1172.
- Keston, A. S., & Brandt, R. (1965) The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Analytical biochemistry*. 11, 1-5.
- Kim, Y. J., & Yokozawa, T. (2009) Modulation of oxidative stress and melanogenesis by proanthocyanidins. *Biological and pharmaceutical bulletin*. 32, 1155-1159.
- Klinke, R., & Silbernagl, S. (1996) Lehrbuch der Physiology. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*. 2. Auflage, 842.
- Knaup, B., Kahle, K., Erk, T., Valotis, A., Scheppach, W., Schreier, P., & Richling, E. (2007) Human intestinal hydrolysis of phenol glycosides - a study with quercetin and p-nitrophenol glycosides using ileostomy fluid. *Molecular nutrition and food research*. 51, 1423-1429.
- Knaup, B., Kempf, M., Fuchs, J., Valotis, A., Kahle, K., Oehme, A., Richling, E., & Schreier, P. (2008) Model experiments mimicking the human intestinal transit and metabolism of D-galacturonic acid and amidated pectin. *Molecular nutrition and food research*. 52, 840-848.
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., & Brouillard, R. (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. 64, 923-933.
- Kraus, M., Kahle, K., Ridder, F., Schantz, M., Scheppach, W., Schreier, P., & Richling, E. (2010) Colonic availability of bilberry anthocyanins in humans. *ACS symposium series: Flavor and health benefits of small fruits, American Chemical Society, USA*. 1035, 159-176.

- Kuhnau, J. (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World review of nutrition and dietetics*. 24, 117-191.
- Kulusic-Bilusic, T., Schnabele, K., Schmoller, I., Dragovic-Uzelac, V., Krisko, A., Dejanovic, B., Milos, M., & Pifat, G. (2009) Antioxidant activity versus cytotoxic and nuclear factor kappa B regulatory activities on HT-29 cells by natural fruit juices. *European food research and technology*. 228, 417-424.
- Labib, S., Hummel, S., Richling, E., Humpf, H. U., & Schreier, P. (2006) Use of the pig caecum model to mimic the human intestinal metabolism of hispidulin and related compounds. *Molecular nutrition and food research*. 50, 78-86.
- Latti, A. K., Riihinen, K. R., & Kainulainen, P. S. (2008) Analysis of anthocyanin variation in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Finland. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56, 190-196.
- Latti, A. K., Kainulainen, P. S., Hayirlioglu-Ayaz, S., Ayaz, F. A., & Riihinen, K. R. (2009) Characterization of anthocyanins in caucasian blueberries (*Vaccinium arctostaphylos* L.) native to turkey. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57, 5244-5249.
- Laval, J. (1996) Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Pathologie und biologie*. 44, 14-24.
- LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., & Bondy, S. C. (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical research in toxicology*. 5, 227-231.
- Lebet, V., Arrigoni, E., & Amado, R. (1998) Measurement of fermentation products and substrate disappearance during incubation of dietary fibre sources with human faecal flora. *Food science and technology*. 31, 473-479.
- Lee, J., Finn, C. E., & Wrolstad, R. E. (2004) Anthocyanin pigment and total phenolic content of three vaccinium species native to the Pacific Northwest of North America. *Hortscience*. 39, 959-964.
- Leopold, C. S., & Farag, Y. (2011) Development of shellac-coated sustained release pellet formulations. *European journal of pharmaceutical sciences*. 42, 400-405.
- Lindl, T. (2002) Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. *Spektrum Akademischer Verlag*. 5. Auflage.
- Liu, J., Zhang, W., Jing, H., & Popovich, D. G. (2010) Bog bilberry (*Vaccinium uliginosum* L.) extract reduces cultured Hep-G2, Caco-2, and 3T3-L1 cell viability, affects cell cycle progression, and has variable effects on membrane permeability. *Journal of food science*. 75, H103-H107.
- Lucas-Abellan, C., Fortea, I., Gabaldon, J. A., & Nunez-Delicado, E. (2008) Encapsulation of quercetin and myricetin in cyclodextrins at acidic pH. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56, 255-259.
- Luhovyy, B. L., Akhavan, T., & Anderson, G. H. (2007) Whey proteins in the regulation of food intake and satiety. *Journal of the American College of Nutrition*. 26, 704S-712S.
- MacDougal, D., & Crummet, W. B. (1980) Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Analytical chemistry*. 52, 2242-2249.

- Maestrelli, F., Cirri, M., Corti, G., Mennini, N., & Mura, P. (2008) Development of enteric-coated calcium pectinate microspheres intended for colonic drug delivery. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 69, 508-518.
- Malien-Aubert, C., Dangles, O., & Amiot, M. J. (2001) Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra and intermolecular copigmentation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 49, 170-176.
- Marko, D., Puppel, N., Tjaden, Z., Jakobs, S., & Pahlke, G. (2004) The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation. *Molecular nutrition and food research*. 48, 318-325.
- Marks, S. C., Mullen, W., Borges, G., & Crozier, A. (2009) Absorption, metabolism, and excretion of cider dihydrochalcones in healthy humans and subjects with an ileostomy. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57, 2009-2015.
- Marshall, K. (2004) Therapeutic applications of whey protein. *Alternative medicine review*. 9, 136-156.
- Mas, T., Susperregui, J., Berke, B., Cheze, C., Moreau, S., Nuhrich, A., & Vercauteren, J. (2000) DNA triplex stabilization property of natural anthocyanins. *Phytochemistry*. 53, 679-687.
- Matsumoto, H., Ichiyanagi, T., Iida, H., Ito, K., Tsuda, T., Hirayama, M., & Konishi, T. (2006) Ingested delphinidin-3-rutinoside is primarily excreted to urine as the intact form and to bile as the methylated form in rats. *Journal of agricultural and food chemistry*. 54, 578-582.
- Mauray, A., Milenkovic, D., Besson, C., Caccia, N., Morand, C., Michel, F., Mazur, A., Scalbert, A., & Felgines, C. (2009) Atheroprotective effects of bilberry extracts in Apo E-deficient mice. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57, 11106-11111.
- Maynard, S., Schurman, S. H., Harboe, C., de Souza-Pinto, N. C., & Bohr, V. A. (2009) Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis*. 30, 2-10.
- McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., & Stewart, D. (2007) Anthocyanins from red cabbage - stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*. 68, 1285-1294.
- McDougall, G. J., Ross, H. A., Ikeji, M., & Stewart, D. (2008) Berry extracts exert different antiproliferative effects against cervical and colon cancer cells grown in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56, 3016-3023.
- McGhie, T. K., & Walton, M. C. (2007) The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Molecular nutrition and food research*. 51, 702-713.
- Meunier, V., Bourrie, M., Berger, Y., & Fabre, G. (1995) The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell biology and toxicology*. 11, 187-194.
- Milbury, P. E., Graf, B., Curran-Celentano, J. M., & Blumberg, J. B. (2007) Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) anthocyanins modulate heme oxygenase-1 and glutathione S-

- transferase-pi expression in ARPE-19 cells. *Investigative ophthalmology and visual science*. 48, 2343-2349.
- Montrose, D. C., Horelik, N. A., Madigan, J. P., Stoner, G. D., Wang, L. S., Bruno, R. S., Park, H. J., Giardina, C., & Rosenberg, D. W. (2011) Anti-inflammatory effects of freeze-dried black raspberry powder in ulcerative colitis. *Carcinogenesis*. 32, 343-350.
- Mura, P., Maestrelli, F., Cirri, M., Rodriguez, M. L. G., & Alvarez, A. M. R. (2003) Development of enteric-coated pectin-based matrix tablets for colonic delivery of theophylline. *Journal of drug targeting*. 11, 365-371.
- Murapa, P., Dai, J., Chung, M., Mumper, M., & D'Orazio, J. (2011) Anthocyanin-rich fractions of blackberry extracts reduce UV-induced free radicals and oxidative damage in keratinocytes. *Phytotherapy research*, 7.
- Muschiolik, G. (2007) Multiple emulsions for food use. *Current opinion in colloid and interface science*. 12, 213-220.
- Mutschler, E., Schaible, H.-G., & Vaupel, P. (2007) Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen *Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft* 6., völlig überarberarbeitete und erweiterte Auflage, 839.
- Naidu, R., Semple, K. T., Megharaj, M., Juhasz, A. L., Bolan, N. S., Gupta, S. K., Clothier, B. E., & Schulin, R. (2008) Bioavailability: Definition, assessment and implications for risk assessment. *Developments in soil science*. 32, 39-51.
- Nurmi, T., Mursu, J., Heinonen, M., Nurmi, A., Hiltunen, R., & Voutilainen, S. (2009) Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57, 2274-2281.
- Nyman, N. A., & Kumpulainen, J. T. (2001) Determination of anthocyanidins in berries and red wine by high-performance liquid chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*. 49, 4183-4187.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., & Pognan, F. (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European journal of biochemistry*. 267, 5421-5426.
- Odrizola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., & Martin-Belloso, O. (2009) Influence of storage temperature on the kinetics of the changes in anthocyanins, vitamin C, and antioxidant capacity in fresh-cut strawberries stored under high-oxygen atmospheres. *Journal of food science*. 74, C184-C191.
- Oehme, A., Valotis, A., Krammer, G., Zimmermann, I., & Schreier, P. (2011) Preparation and characterization of shellac-coated anthocyanin pectin beads as dietary colonic delivery system. *Molecular nutrition and food research*. 55, 1-11.
- Okamoto, T., Kusunoki, M., Kusuvara, K., Yamamura, T., & Utsunomiya, J. (1995) Water and electrolyte balance after ileal J pouch-anal anastomosis in ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis. *International journal of colorectal disease*. 10, 33-38.
- Pacheco-Palencia, L. A., & Talcott, S. T. (2010) Chemical stability of acai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) anthocyanins as influenced by naturally occurring and externally added polyphenolic cofactors in model systems. *Food chemistry*. 118, 17-25.

- Paredes-Lopez, O., Cervantes-Ceja, M. L., Vigna-Perez, M., & Hernandez-Perez, T. (2010) Berries: Improving human health and healthy aging, and promoting quality life-a review. *Plant foods for human nutrition*. 65, 299-308.
- Pascual-Teresa, S., & Sanchez-Ballesta, M. T. (2008) Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry reviews*. 7, 281-299.
- Pascual-Teresa, S., Moreno, D. A., & Garcia-Viguera, C. (2010) Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. *International journal of molecular sciences*. 11, 1679-1703.
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., & Mattivi, F. (2002) The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochemical and biophysical research communications*. 296, 631-636.
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., & Mattivi, F. (2003) The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS letters*. 544, 210-213.
- Penning, M. (1996) Aqueous shellac solutions for controlled release coatings. *Chemical aspects of drug delivery systems*, 146-154.
- Pietta, P. G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*. 63, 1035-1042.
- Porter, C. J., Trevaskis, N. L., & Charman, W. N. (2007) Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature reviews. Drug discovery*. 6, 231-248.
- Prior, R. L., Lazarus, S. A., Cao, G. H., Muccitelli, H., & Hammerstone, J. F. (2001) Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*. 49, 1270-1276.
- Prior, R. L., Wu, X. L., & Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53, 4290-4302.
- Prior, R. L., & Wu, X. L. (2006) Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free radical research*. 40, 1014-1028.
- Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Meier, C., Kahkonen, M., Heinonen, M., Hopia, A., & Oksman-Caldentey, K. M. (2001) Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of applied microbiology*. 90, 494-507.
- Remy, S., Fulcrand, H., Labarbe, B., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2000) First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions. *Journal of the science of food and agriculture*. 80, 745-751.
- Rentsch, W., Schwarz, M., & Winterhalter, P. (2007) Pyranoanthocyanins - an overview on structures, occurrence, and pathways of formation. *Trends in food science and technology*. 18, 526-534.
- Rimbach, G., Möhring, J., & Erbesdobler, H. (2010) Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger. *Springer Verlag, Berlin*. 1. Auflage.

- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., & Saenz, C. (2010) Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International journal of food science and technology*. 45, 1386-1394.
- Rottem, S., & Barile, M. F. (1993) Beware of mycoplasmas. *Trends in biotechnology*. 11, 143-151.
- Rousset, M. (1986) The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie*. 68, 1035-1040.
- Roy, C. C., Kien, C. L., Bouthillier, L., & Levy, E. (2006) Short-chain fatty acids: ready for prime time? *Nutrition in clinical practice*. 21, 351-366.
- Rube, A., Klein, S., & Mader, K. (2006) Monitoring of in vitro fat digestion by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Pharmaceutical research*. 23, 2024-2029.
- Sadilova, E., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006) Anthocyanins, colour and antioxidant properties of eggplant (*Solanum melongena* L.) and violet pepper (*Capsicum annum* L.) peel extracts. *Journal of biosciences*. 61, 527-535.
- Sadilova, E., Carle, R., & Stintzing, F. C. (2007) Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular nutrition and food research*. 51, 1461-1471.
- Sakakibara, H., Ogawa, T., Koyanagi, A., Kobayashi, S., Goda, T., Kurnazawa, S., Kobayashi, H., & Shimoi, K. (2009) Distribution and excretion of bilberry anthocyanins in mice *Journal of agricultural and food chemistry*. 57, 9856-9856.
- Sambruy, Y., Ferruzza, S., Ranaldi, G., & De Angelis, I. (2001) Intestinal cell culture models: applications in toxicology and pharmacology. *Cell biology and toxicology*. 17, 301-317.
- Santavirta, J., Mattila, J., Kokki, M., & Matikainen, M. (1991a) Mucosal morphology and faecal bacteriology after ileoanal anastomosis. *International journal of colorectal disease*. 6, 38-41.
- Santavirta, J., Harmoinen, A., Karvonen, A. L., & Matikainen, M. (1991b) Water and electrolyte balance after ileoanal anastomosis. *Diseases of the colon and rectum*. 34, 115-118.
- Schaefer, S., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F., & Janzowski, C. (2006a) Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. *Molecular nutrition and food research*. 50, 24-33.
- Schaefer, S., Baum, M., Eisenbrand, G., & Janzowski, C. (2006b) Modulation of oxidative cell damage by reconstituted mixtures of phenolic apple juice extracts in human colon cell lines. *Molecular nutrition and food research*. 50, 413-417.
- Schneeweiss, I., & Rehage, H. (2005) Non-spherical capsules for the food industry. *Chemie Ingenieur Technik*. 77, 236-239.
- Schreiber, H. D., Swink, A. M., & Godsey, T. D. (2010) The chemical mechanism for Al<sup>3+</sup> complexing with delphinidin: A model for the bluing of hydrangea sepals. *Journal of inorganic biochemistry*. 104, 732-739.

- Schuchmann, H. P., & Danner, T. (2004) Emulsification: More than just comminution. *Chemie Ingenieur Technik*. 76, 364-375.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Hardy, M. L., & Heber, D. (2004) Total cranberry extract versus its phytochemical constituents: Antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines. *Journal of agricultural and food chemistry*. 52, 2512-2517.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Zhang, Y. J., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H. S., & Heber, D. (2006) Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*. 54, 9329-9339.
- Shih, P. H., Yeh, C. T., & Yen, G. C. (2007) Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *Journal of agricultural and food chemistry*. 55, 9427-9435.
- Silbernagl, S., & Despopoulos, A. (2007) Taschenatlas der Physiologie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*. 7. Auflage.
- Singh, H., & Sarkar, A. (2011) Behaviour of protein-stabilised emulsions under various physiological conditions. *Advances in colloid and interface science*. 165, 47-57.
- Singh, M. N., Hemant, K. S. Y., Ram, M., & Shivakumar, H. G. (2010) Microencapsulation: a promising technique for controlled drug delivery. *Research in pharmaceutical sciences*. 5, 65-77.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*. 175, 184-191.
- Sliwka, W. (1975) Microencapsulation. *Angewandte Chemie-International Edition in Englisch*. 14, 539-550.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*. 150, 76-85.
- Spormann, T. M., Albert, F. W., Rath, T., Dietrich, H., Will, F., Stockis, J. P., Eisenbrand, G., & Janzowski, C. (2008) Anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative cell damage in an intervention study with patients on hemodialysis. *Cancer epidemiology biomarkers and prevention*. 17, 3372-3380.
- Springob, K., Nakajima, J., Yamazaki, M., & Saito, K. (2003) Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Natural product reports*. 20, 288-303.
- Stadtman, E. R. (2004) Role of oxidant species in aging. *Current medicinal chemistry*. 11, 1105-1112.
- Steinert, R. E., Ditscheid, B., Netzel, M., & Jahreis, G. (2008) Absorption of black currant anthocyanins by monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells mounted in uising type chambers. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56, 4995-5001.
- Stern, J., Bruwer, M., Huber, F. X., & Decker-Baumann, C. (1999) Stoma physiology. *Chirurg*. 70, 627-634.

- Talavera, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Lamaison, J. L., & Remesy, C. (2003) Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *Journal of nutrition*. 133, 4178-4182.
- Talavera, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Manach, C., Lamaison, J. L., & Remesy, C. (2004) Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *Journal of nutrition*. 134, 2275-2279.
- Talavera, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J. L., & Remesy, C. (2005) Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53, 3902-3908.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., & Ohmiya, A. (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant journal*. 54, 733-749.
- Terao, J. (2009) Dietary flavonoids as antioxidants. *Food factors for health promotion*. 61, 87-94.
- Thakur, B. R., Singh, R. K., & Handa, A. K. (1997) Chemistry and uses of pectin - A review. *Critical reviews in food science and nutrition*. 37, 47-73.
- Thomasset, S., Berry, D. P., Cai, H., West, K., Marczylo, T. H., Marsden, D., Brown, K., Dennison, A., Garcea, G., Miller, A., Hemingway, D., Steward, W. P., & Gescher, A. J. (2009) Pilot study of oral anthocyanins for colorectal cancer chemoprevention. *Cancer prevention research*. 2, 625-633.
- Tian, Q. G., Giusti, M. M., Stoner, G. D., & Schwartz, S. J. (2006) Urinary excretion of black raspberry (*Rubus occidentalis*) anthocyanins and their metabolites. *Journal of agricultural and food chemistry*. 54, 1467-1472.
- Turnberg, L. A., Bieberdorf, F. A., Morawski, S. G., & Fordtran, J. S. (1970) Interrelationships of chloride, bicarbonate, sodium, and hydrogen transport in the human ileum. *The Journal of clinical investigation*. 49, 557-567.
- Tzika, M., Alexandridou, S., & Kiparissides, C. (2003) Evaluation of the morphological and release characteristics of coated fertilizer granules produced in a Wurster fluidized bed. *Powder technology*. 132, 16-24.
- Upton, R. (2001) Bilberry fruit: *vaccinium myrtillus* L. *American herbal pharmacopoeia and therapeutic compendium*.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 160, 1-40.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International journal of biochemistry and cell biology*. 39, 44-84.
- Vanzo, A., Terdoslavich, M., Brandoni, A., Torres, A. M., Vrhovsek, U., & Passamonti, S. (2008) Uptake of grape anthocyanins into the rat kidney and the involvement of bilitranslocase. *Molecular nutrition and food research*. 52, 1106-1116.

- Velmurugan, B., Singh, R. P., Kaul, N., Agarwal, R., & Agarwal, C. (2010) Dietary feeding of grape seed extract prevents intestinal tumorigenesis in APC(min/+) mice. *Neoplasia*. 12, 95-102.
- Viljanen, K., Kylli, P., Hubbermann, E. M., Schwarz, K., & Heinonen, M. (2005) Anthocyanin antioxidant activity and partition behavior in whey protein emulsion. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53, 2022-2027.
- Vitaglione, P., Donnarumma, G., Napolitano, A., Galvano, F., Gallo, A., Scalfi, L., & Fogliano, V. (2007) Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *Journal of nutrition*. 137, 2043-2048.
- Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010) Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International dairy journal*. 20, 292-302.
- Walle, T. (2004) Absorption and metabolism of flavonoids. *Free radical biology and medicine*. 36, 829-837.
- Walton, M. C., Hendriks, W. H., Broomfield, A. M., & McGhie, T. K. (2009) Viscous food matrix influences absorption and excretion but not metabolism of blackcurrant anthocyanins in rats. *Journal of food science*. 74, H22-H29.
- Wang, B. C., He, R., & Li, Z. M. (2010) The stability and antioxidant activity of anthocyanins from blueberry. *Food technology and biotechnology*. 48, 42-49.
- Wang, C. J., Wang, J. M., Lin, W. L., Chu, C. Y., Chou, F. P., & Tseng, T. H. (2000) Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food and chemical toxicology*. 38, 411-416.
- Wang, H., Cao, G. H., & Prior, R. L. (1997) Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of agricultural and food chemistry*. 45, 304-309.
- Wang, H., & Joseph, J. A. (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free radical biology and medicine*. 27, 612-616.
- Wang, L. S., & Stoner, G. D. (2008) Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer letters*. 269, 281-290.
- Weinberger, D. R., Tunbridge, E. M., & Harrison, P. J. (2006) Catechol-o-methyltransferase, cognition, and psychosis: Val(158)Met and beyond. *Biological Psychiatry*. 60, 141-151.
- Weisel, T. (2006) Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung von flavonoid-/polyphenolreichen Mischfruchtsäften bei Probanden. *Dissertation*, TU Kaiserslautern.
- Weisel, T., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F., Stockis, J. P., Kulling, S., Rufer, C., Johannes, C., & Janzowski, C. (2006) An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *Biotechnology journal*. 1, 388-397.
- Wijeratne, S. S. K., Cuppett, S. L., & Schlegel, V. (2005) Hydrogen peroxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in Caco-2 human colon cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53, 8768-8774.

- Woodward, G., Kroon, P., Cassidy, A., & Kay, C. (2009) Anthocyanin stability and recovery: Implications for the analysis of clinical and experimental samples. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57, 5271-5278.
- Woodward, G. M., Needs, P. W., & Kay, C. D. (2011) Anthocyanin-derived phenolic acids form glucuronides following simulated gastrointestinal digestion and microsomal glucuronidation. *Molecular nutrition and food research*. 55, 378-386.
- Wu, Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2006a) Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of agricultural and food chemistry*. 54, 4069-4075.
- Wu, L.-H., Xu, Z.-L., Dong, D., He, S.-A., & Yu, H. (2011) Protective effect of anthocyanins extract from blueberry on TNBS-induced IBD model of mice. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 8.
- Wu, V. C. H., Lacombe, A., Tyler, S., & Edwards, K. (2010) Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7. *International journal of food microbiology*. 139, 102-107.
- Wu, X. L., Gu, L. W., Prior, R. L., & McKay, S. (2004) Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry*. 52, 7846-7856.
- Wu, X. L., Pittman, H. E., McKay, S., & Prior, R. L. (2005) Aglycones and sugar moieties alter anthocyanin absorption and metabolism after berry consumption in weanling pigs. *Journal of nutrition*. 135, 2417-2424.
- Wu, X. L., Pittman, H. E., & Prior, R. L. (2006b) Fate of anthocyanins and antioxidant capacity in contents of the gastrointestinal tract of weanling pigs following black raspberry consumption. *Journal of agricultural and food chemistry*. 54, 583-589.
- Xiao, J., Kai, G., Yang, F., Liu, C., Xu, X., & Yamamoto, K. (2011) Molecular structure-affinity relationship of natural polyphenols for bovine gamma-globulin. *Molecular nutrition and food research*. 55, 1-7.
- Xiong, S. Y., Melton, L. D., Easteal, A. J., & Siew, D. (2006) Stability and antioxidant activity of black currant anthocyanins in solution and encapsulated in glucan gel. *Journal of agricultural and food chemistry*. 54, 6201-6208.
- Yan, J., & Katz, A. (2010) PectaSol-C modified citrus pectin induces apoptosis and inhibition of proliferation in human and mouse androgen-dependent and- independent prostate cancer cells. *Integrative cancer therapies*. 9, 197-203.
- Yao, N., Lan, F., He, R. R., & Kurihara, H. (2010) Protective effects of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract against endotoxin-induced uveitis in mice. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58, 4731-4736.
- Ye, J. L., Meng, X. J., Yan, C. L., & Wang, C. B. (2010) Effect of purple sweet potato anthocyanins on beta-amyloid-mediated PC-12 cells death by inhibition of oxidative stress. *Neurochemical research*. 35, 357-365.

- Yi, W. G., Fischer, J., Krewer, G., & Akoh, C. C. (2005) Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53, 7320-7329.
- Yi, W. G., Akoh, C. C., Fischer, J., & Krewer, G. (2006) Absorption of anthocyanins from blueberry extracts by Caco-2 human intestinal cell monolayers. *Journal of agricultural and food chemistry*. 54, 5651-5658.
- Yoshida, K., Mori, M., & Kondo, T. (2009) Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Natural product reports*. 26, 884-915.
- Young, J. F., Dragsted, L. O., Daneshvar, B., Lauridsen, S. T., Hansen, M., & Sandstrom, B. (2000) The effect of grape-skin extract on oxidative status. *British journal of nutrition*. 84, 505-513.
- Yun, J. M., Afaq, F., Khan, N., & Mukhtar, H. (2009) Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, induces apoptosis and cell cycle arrest in human colon cancer HCT116 cells. *Molecular carcinogenesis*. 48, 260-270.
- Zhang, Y. J., Seeram, N. P., Lee, R., Feng, L., & Heber, D. (2008) Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell anti proliferative properties. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56, 670-675.
- Zhao, C., Giusti, M. M., Malik, M., Moyer, M. P., & Magnuson, B. A. (2004) Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *Journal of agricultural and food chemistry*. 52, 6122-6128.
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2003) Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *Journal of agricultural and food chemistry*. 51, 502-509.
- Zu, X. Y., Zhang, Z. Y., Zhang, X. W., Yoshioka, M., Yang, Y. N., & Li, J. (2010) Anthocyanins extracted from Chinese blueberry (*Vaccinium uliginosum* L.) and its anticancer effects on DLD-1 and COLO205 cells. *Chinese medical journal*. 123, 2714-2719.

## 10 Anhang

In diesem Kapitel werden alle Daten die nicht im Ergebnisteil der Arbeit gezeigt wurden zusammengefasst dargestellt.

### 10.1 Testung auf Zellvitalität (Alamar Blue Assay)

Zur Erfassung der Zellproliferation und zytotoxischer Effekte wurde der Alamar Blue Assay verwendet. Es handelt sich hierbei um einen Farbreaktionstest, bei dem die Reduktion von Resazurin zu Resorufin in direktem Verhältnis zu metabolischen Intermediaten erfasst wird. Diese Intermediate sind in proliferierenden Zellen im Gegensatz zu nicht proliferierenden Zellen erhöht. Somit ist es möglich, durch eine Absorptionzunahme eine Aussage über die Vitalität der Zellen (HT-29) zu treffen (siehe Kap. 6.5.1).

Im Folgenden sind die Ergebnisse zu den 1 und 24 h Inkubationen der HT-29 Zellen mit HBE und den HBE-Subfraktionen (Anthocyan-, Phenolcarbonsäure- und Polymerfraktion) dargestellt (siehe Abb. 10.1 und Abb. 10.2).

### 10.1.1 Testung des HBE und der HBE-Subfraktionen

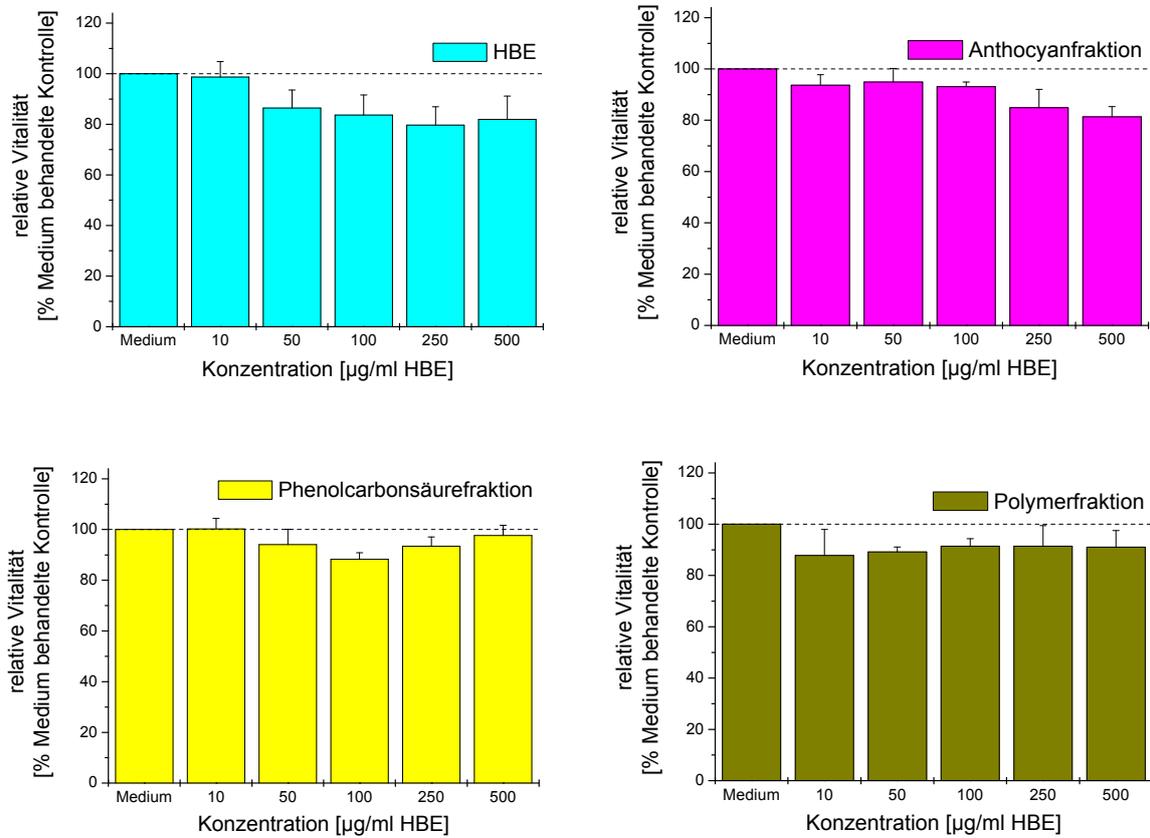


Abb. 10.1: Testung auf zytotoxische Effekte in HT-29 Zellen nach 1 h Inkubation mit HBE und den drei HBE-Subfraktionen (Anthocyan-, Phenolcarbonsäure- und Polymerfraktion) mittels Alamar Blue Assay ( $n = 3$ ;  $\text{mean} \pm \text{SD}$ ) im Vergleich zur Medium-behandelten Kontrolle.

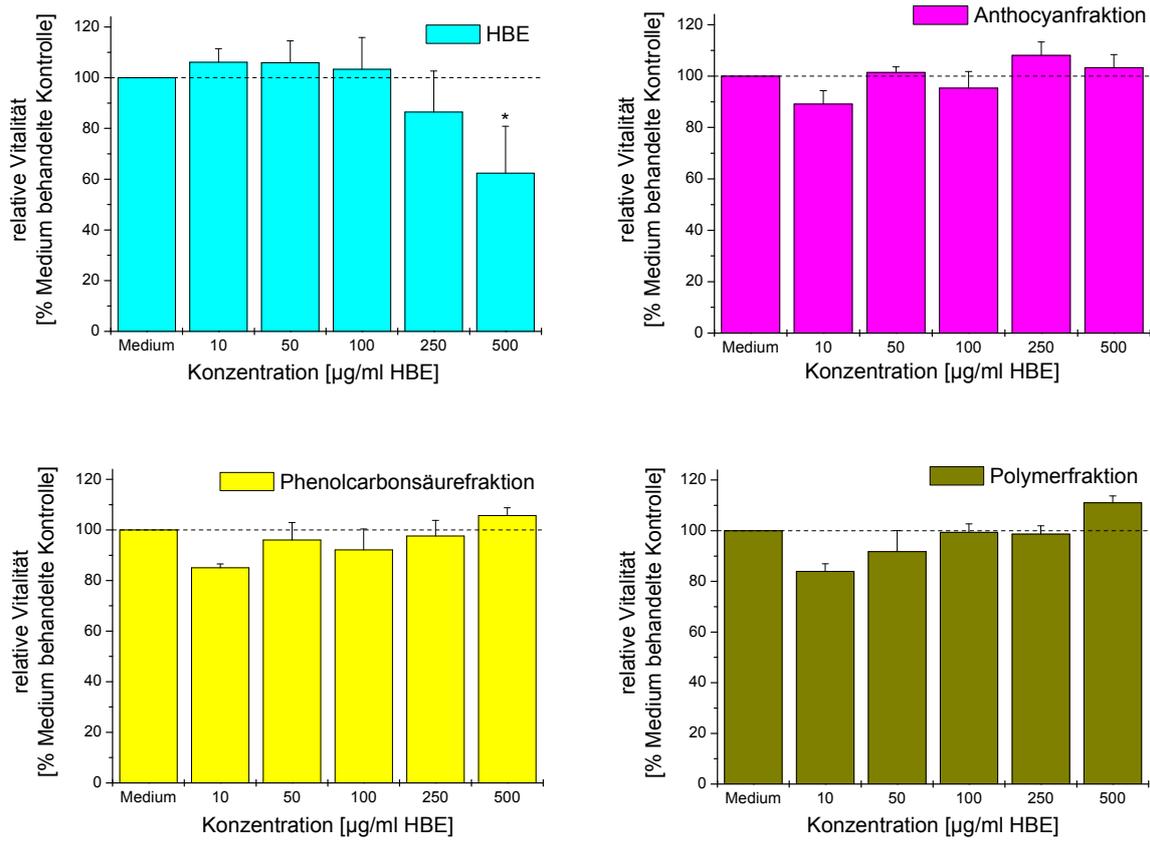


Abb. 10.2: Testung auf zytotoxische Effekte in HT-29 Zellen nach 24 h Inkubation mit HBE und den drei HBE-Subfraktionen (Anthocyan-, Phenolcarbonsäure- und Polymerfraktion) mittels Alamar Blue Assay ( $n = 3$ ; mean  $\pm$  SD) im Vergleich zur Medium-behandelten Kontrolle. Student's t-test: \* $p < 0.05$ .

## 10.2 Testung auf (oxidative) DNA-Schäden (Comet Assay)

Zur Erfassung von (oxidativen) DNA-Schäden wurde die alkalische Einzelzellgelelektrophorese, der sog. Comet Assay modifiziert nach Collins *et al.* und Singh *et al.* herangezogen [Collins *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 1988].

Hierbei wurden die zu untersuchenden Zellen (HT-29 und Caco-2) in Agarosegel auf Objektträger aufgetragen, die Zellmembran lysiert, mit oder ohne Enzym (Formamido-pyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG)) behandelt (um eine Aussage über das Ausmaß oxidativer DNA-Schäden zu erhalten), die DNA entwunden und anschließend die Elektrophorese gestartet. Dabei wandern entstandenen DNA-Fragmente im Gel, die nach Anfärben mit Ethidiumbromid mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops ausgewertet werden können. Aufgrund der Größe des Kometenschweifes ist es möglich, eine Aussage über vorhandene und induzierte Strangbrüche zu treffen (siehe Kap. 6.5.3).

In den Folgenden Kapiteln (siehe 10.2.1 bis 10.2.4) wird sowohl auf die Etablierung des Comet Assay (Konzentrations-Wirkungsverläufe) für HT-29 und Caco-2 Zellen als auch auf die Ergebnisse zu den Inkubationen mit HBE und HBE-Subfraktionen mit und ohne FPG-Behandlung eingegangen (siehe Abb. 10.3 bis Abb. 10.9).

### 10.2.1 Etablierung des Comet Assay

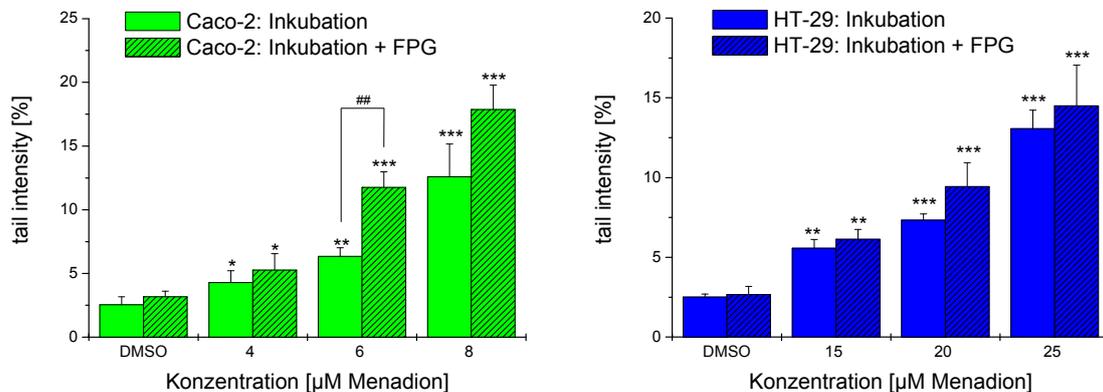


Abb. 10.3: Konzentrations-Wirkungsverlauf von Menadion (Md) auf die sogenannte tail intensity in Caco-2 und HT-29 Zellen (mit und ohne FPG), ( $n = 3-8$ ; mean  $\pm$  SD), Student's *t*-test: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

## 10.2.2 Testung des HBE und der HBE-Subfraktionen (ohne FPG-Behandlung)

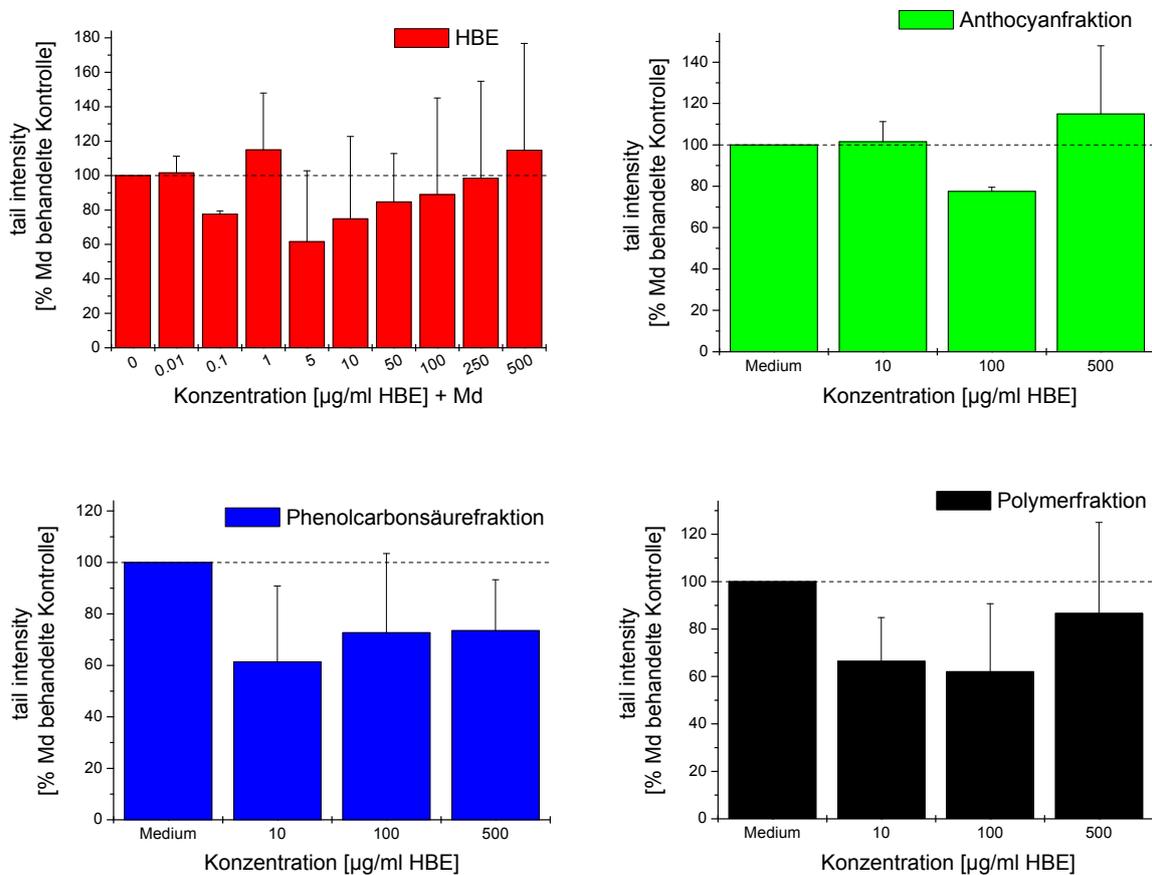


Abb. 10.4: Modulation Menadion-induzierter oxidativer DNA-Schäden in Caco-2 Zellen nach 1 h Vorinkubation mit HBE und dessen Subfraktionen (Anthocyan-, Phenolcarbonsäure- und Polymerfraktion) und Nachbehandlung mit Menadion (Md); 6 µM; 1 h; nur Inkubationen ohne FPG-Behandlung; n = 3-5; mean ± SD.

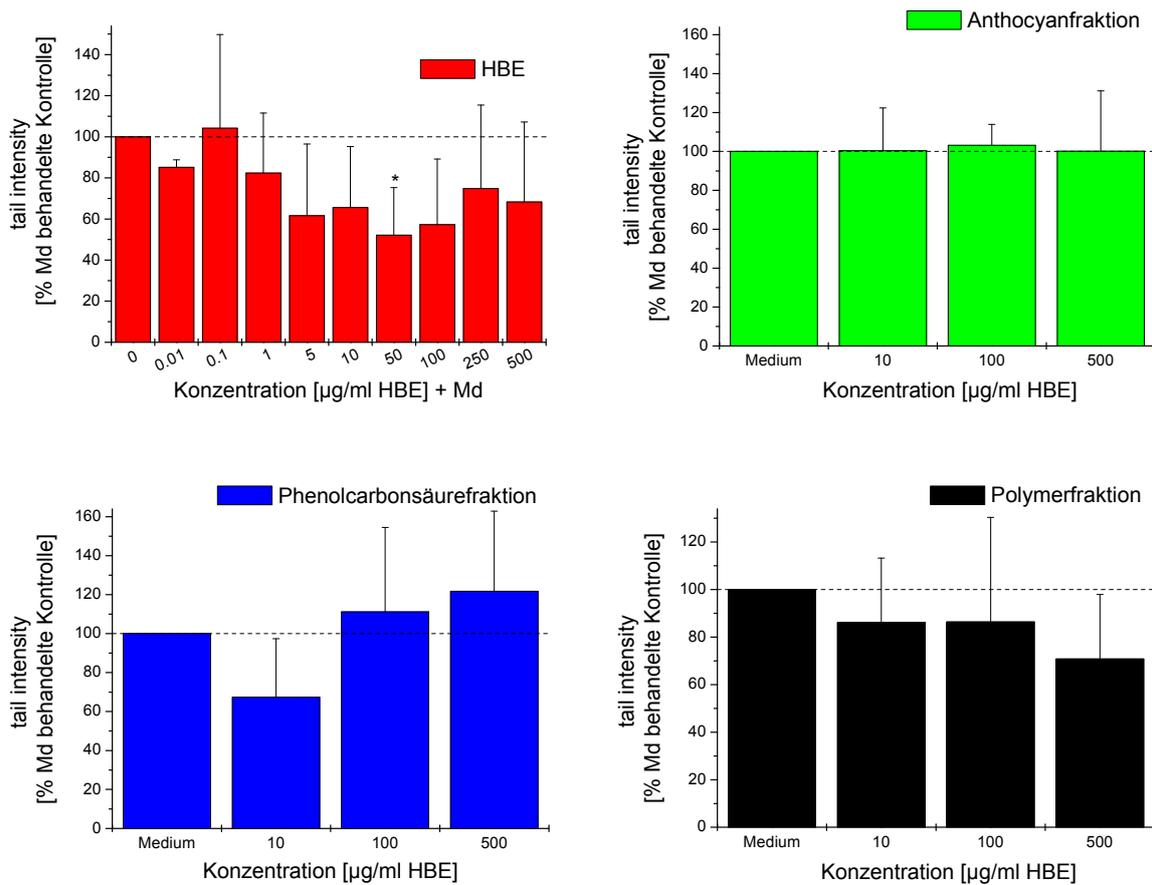


Abb. 10.5: Modulation Menadion-induzierter oxidativer DNA-Schäden in Caco-2 Zellen nach 24 h Vorinkubation mit HBE und dessen Subfraktionen (Anthocyan-, Phenolcarbonsäure- und Polymerfraktion) und Nachbehandlung mit Menadion (Md); 6 µM; 1 h; nur Inkubationen ohne FPG-Behandlung; n = 3-5; mean ± SD, Student's t-test: \*p < 0.05.

### 10.2.3 Testung des HBE und der HBE-Subfraktionen (ohne FPG-Behandlung)

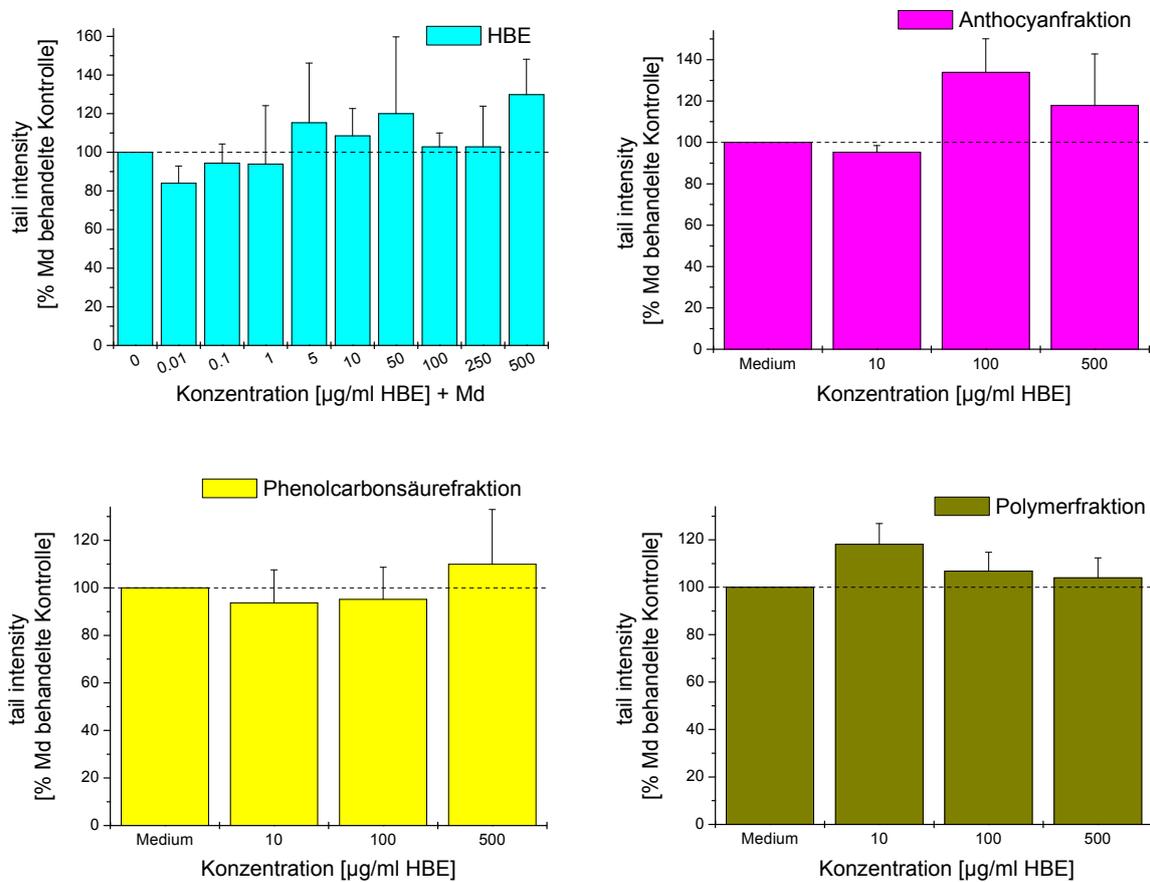


Abb. 10.6: Modulation Menadion-induzierter oxidativer DNA-Schäden in HT-29 Zellen nach 1 h Vorinkubation mit HBE und dessen Subfraktionen (Anthocyan-, Phenolcarbonsäure- und Polymerfraktion) und Nachbehandlung mit Menadion (Md); 20  $\mu\text{M}$ ; 1 h; nur Inkubationen ohne FPG-Behandlung;  $n = 3-5$ ; mean  $\pm$  SD.

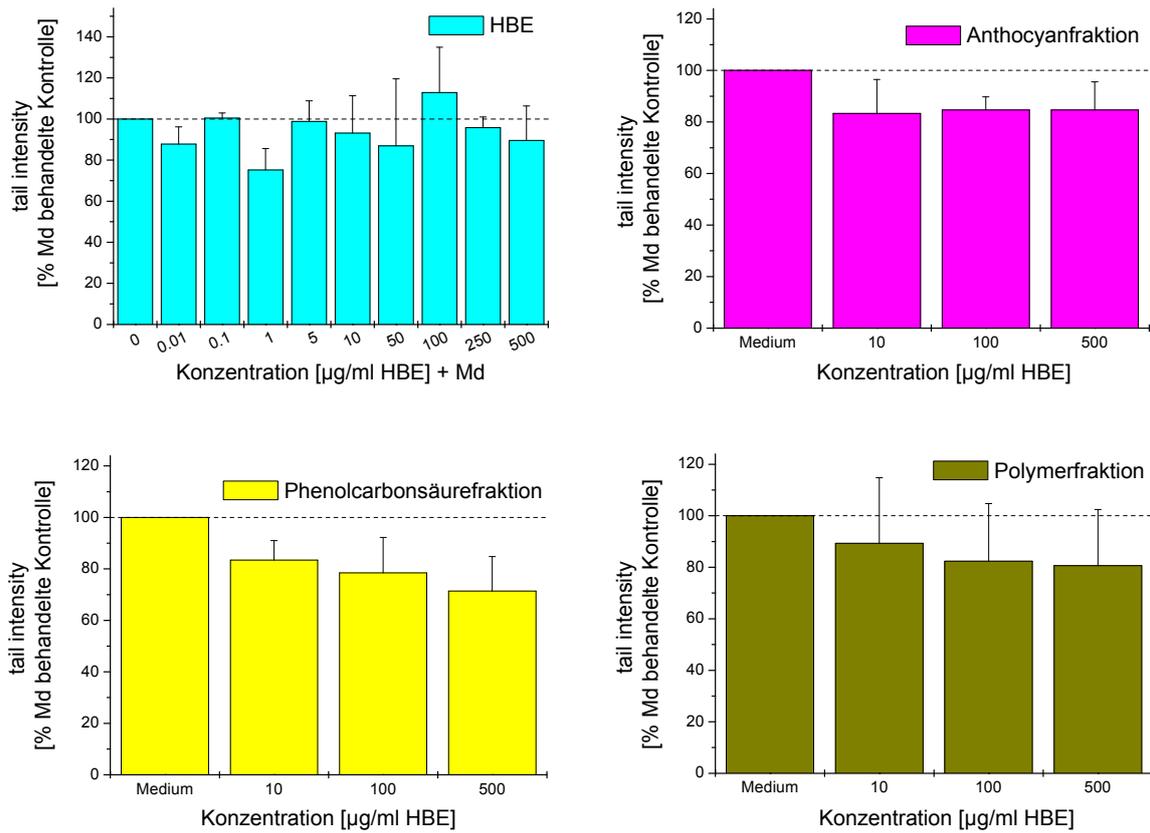


Abb. 10.7: Modulation Menadion-induzierter oxidativer DNA-Schäden in HT-29 Zellen nach 24 h Vorinkubation mit HBE und dessen Subfraktionen (Anthocyan-, Phenolcarbonsäure- und Polymerfraktion) und Nachbehandlung mit Menadion (Md); 20 µM; 1 h; nur Inkubationen ohne FPG-Behandlung; n = 3-5; mean ± SD.

### 10.2.4 Testung des HBE und der HBE-Subfraktionen (mit FPG-Behandlung)

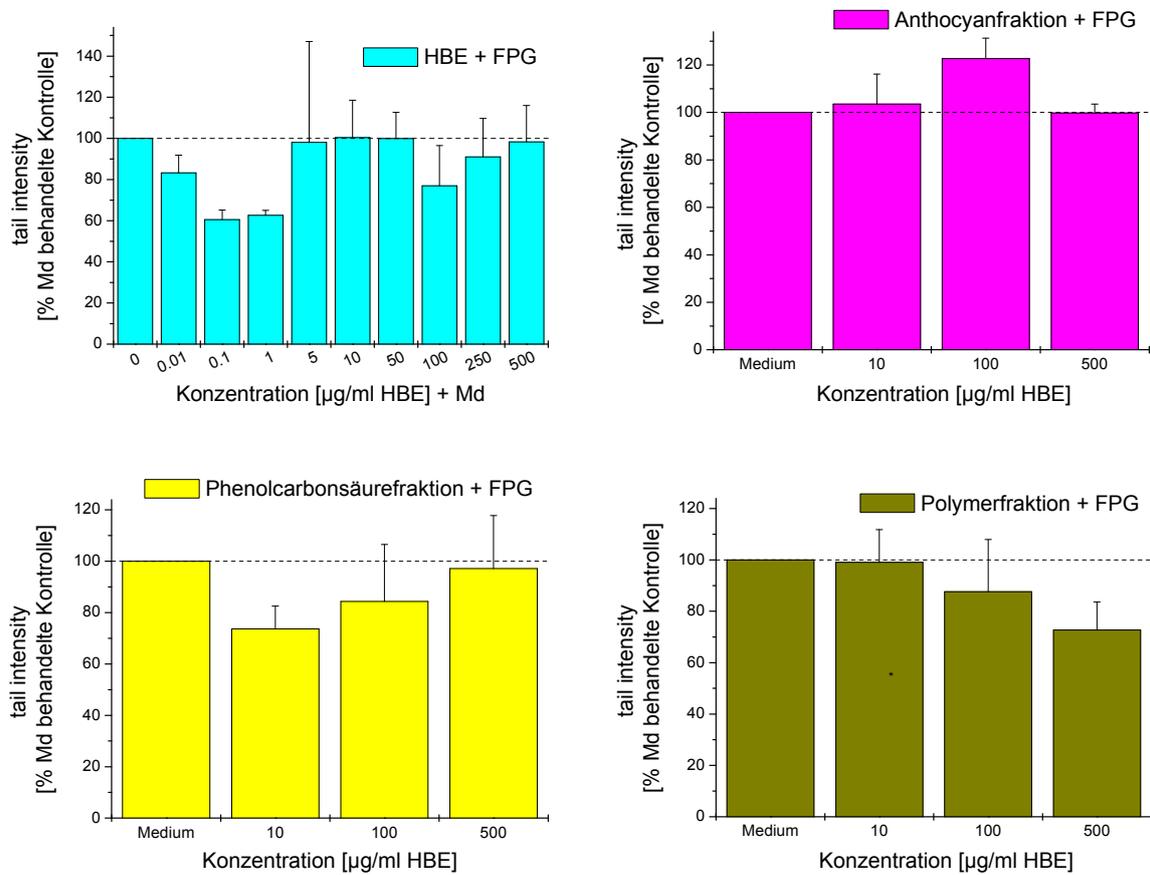


Abb. 10.8: Modulation Menadion-induzierter oxidativer DNA-Schäden in HT-29 Zellen nach 1 h Vorinkubation mit HBE und dessen Subfraktionen (Anthocyan-, Phenolcarbonsäure- und Polymerfraktion) und Nachbehandlung mit Menadion (Md); 20 µM; 1 h; nur Inkubationen mit FPG-Behandlung; n = 3-5; mean ± SD.

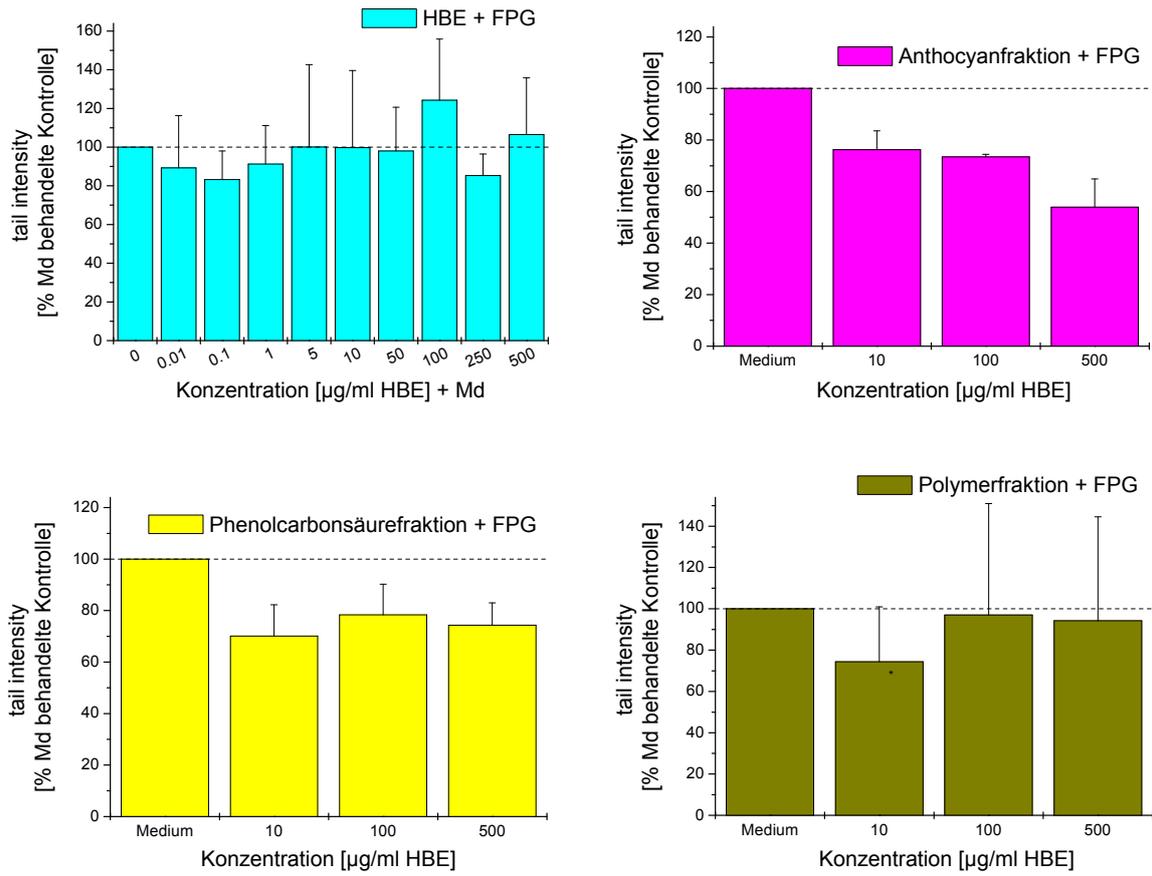


Abb. 10.9: Modulation Menadion-induzierter oxidativer DNA-Schäden in HT-29 Zellen nach 24 h Vorinkubation mit HBE und dessen Subfraktionen (Anthocyan-, Phenolcarbonsäure- und Polymerfraktion) und Nachbehandlung mit Menadion (Md); 20 µM; 1 h; nur Inkubationen mit FPG-Behandlung; n = 3-5; mean ± SD.

## 10.3 Bestimmung des Glutathiongehalts

Die Bestimmung des zellulären Glutathiongehalts in Caco-2 Zellen wurde mit einer nach Gallagher *et al.* modifizierten Methode bestimmt [Gallagher *et al.*, 1994]. Hierbei wurde in einer NADPH-abhängigen Reaktion über eine Glutathionreduktase (GSR) GSSG zu GSH oxidiert und dabei 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) kontinuierlich zu 5-Thio-2-nitrobenzoat (TNB) reduziert. Die Zunahme der Extinktion (Bildung von TNB) kann bei 412 nm verfolgt und photometrisch ausgewertet werden (siehe Kap. 6.5.4).

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Inkubationen (1 und 24 h) der HT-29 Zellen mit HBE und den HBE-Subfraktionen (Anthocyan-, Phenolcarbonsäure- und Polymerfraktion) dargestellt (siehe Abb. 10.10 und Abb. 10.11)

### 10.3.1 Testung des HBE und der HBE-Subfraktionen

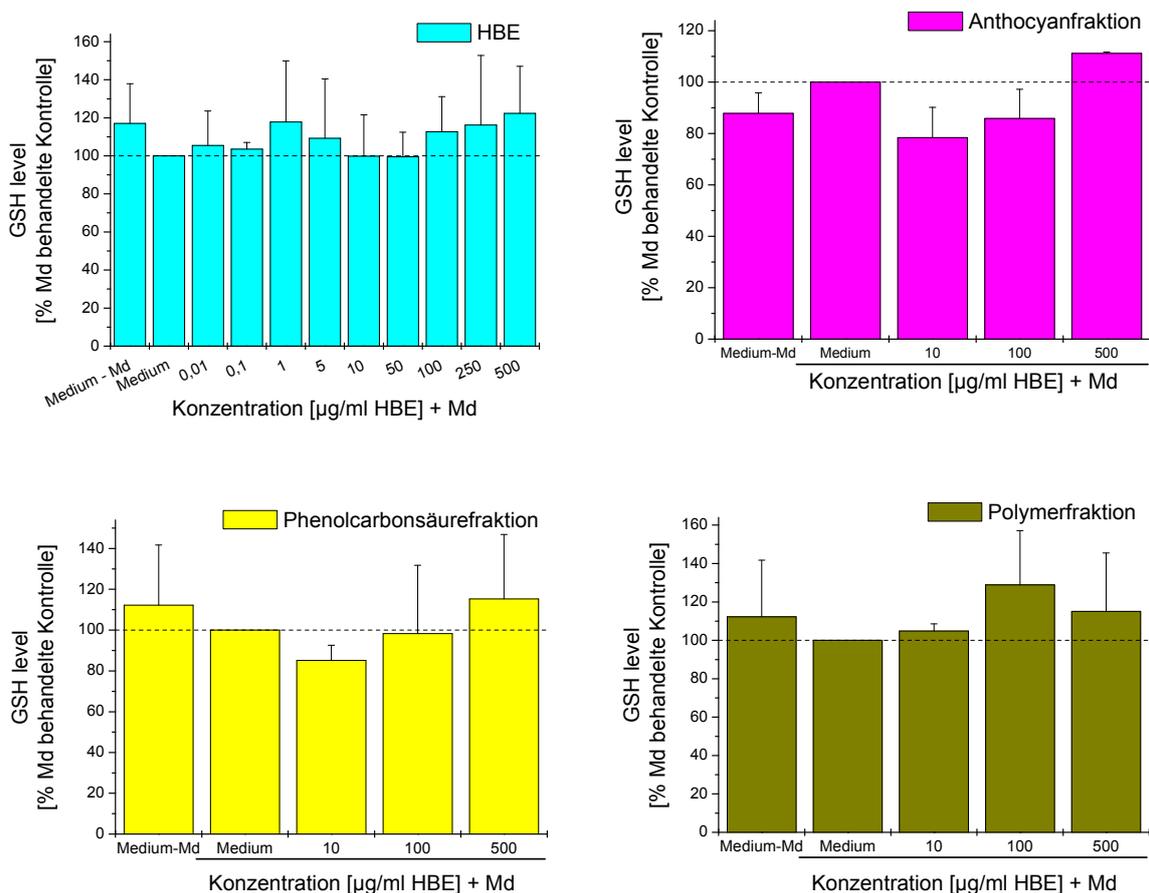


Abb. 10.10: Modulation des Glutathiongehalts in HT-29 Zellen nach 1 h Vorinkubation mit HBE und dessen Subfraktionen (Anthocyan-, Phenolcarbonsäure- und Polymerfraktion) und Nachbehandlung mit Menadion (Md); 20 µM; 1 h; n = 3-5; mean ± SD.

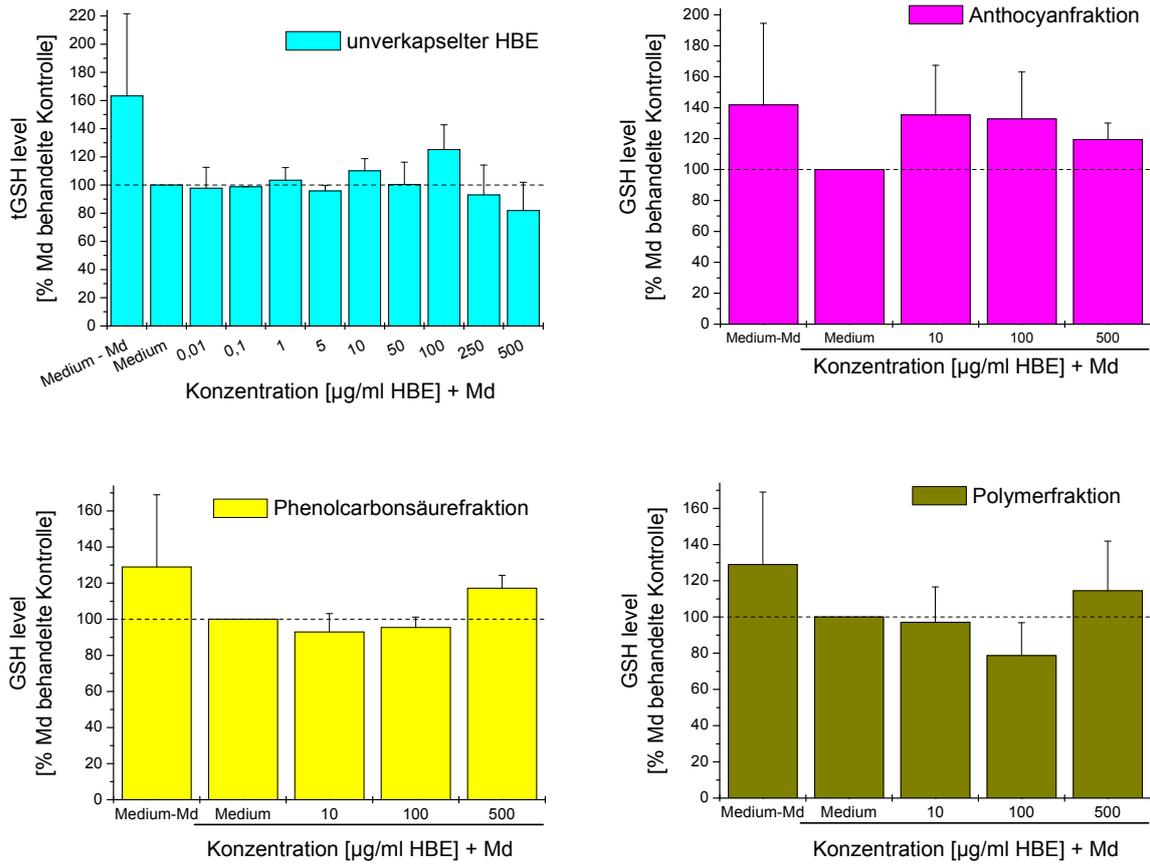


Abb. 10.11: Modulation des Glutathiongehalts in HT-29 Zellen nach **24 h** Vorinkubation mit HBE und dessen Subfraktionen (Anthocyan-, Phenolcarbonsäure- und Polymerfraktion) und Nachbehandlung mit Menadion (Md); 20 µM; 1 h; n = 3-5; mean ± SD.

## 10.4 Bestimmung intrazellulärer ROS (DCF Assay)

Der Dichlorfluorescein (DCF) Assay ermöglicht die Bestimmung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die durch oxidativen Stress in der Zelle gebildet werden. Er beruht auf einem relativen Fluoreszenzanstieg durch Oxidation des intrazellulären Fluoreszenzfarbstoffs Dichlorfluorescindiacetat (DCFH-DA) zu Dichlorfluorescein (siehe Kap. 6.5.2).

Im Folgenden sind die Ergebnisse zu den 1 und 24 h Inkubationen der HT-29 Zellen mit HBE und den HBE-Subfraktionen (Anthocyan-, Phenolcarbonsäure- und Polymerfraktion) dargestellt (siehe Abb. 10.12 und Abb. 10.13)

### 10.4.1 Testung des HBE und der HBE-Subfraktionen

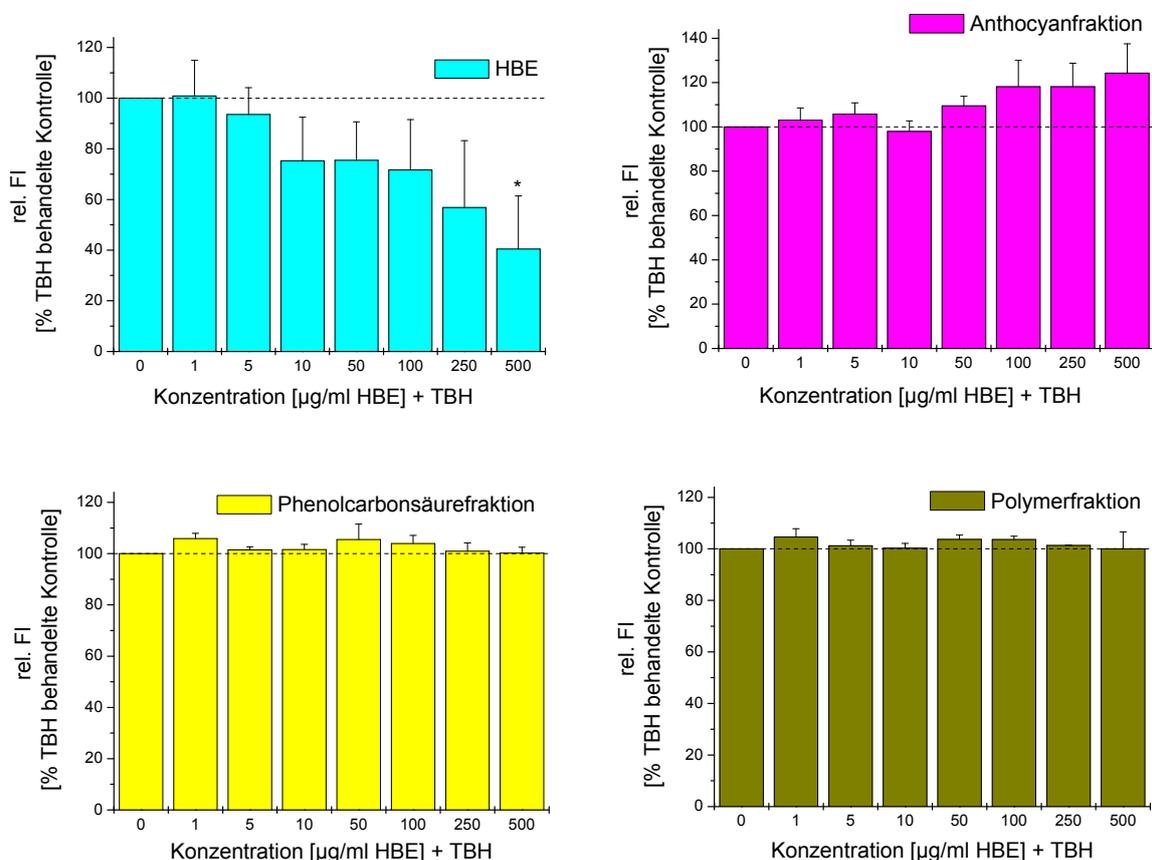


Abb. 10.12: Modulation des TBH-induzierten intrazellulären ROS-Levels in HT-29 Zellen nach 1 h Inkubation mit HBE und dessen Subfraktionen (Anthocyan-, Phenolcarbonsäure- und Polymerfraktion) und Nachbehandlung mit TBH; 250 µM; 40 min; n = 3-5; mean ± SD; Student's t-test: \*p < 0.05.

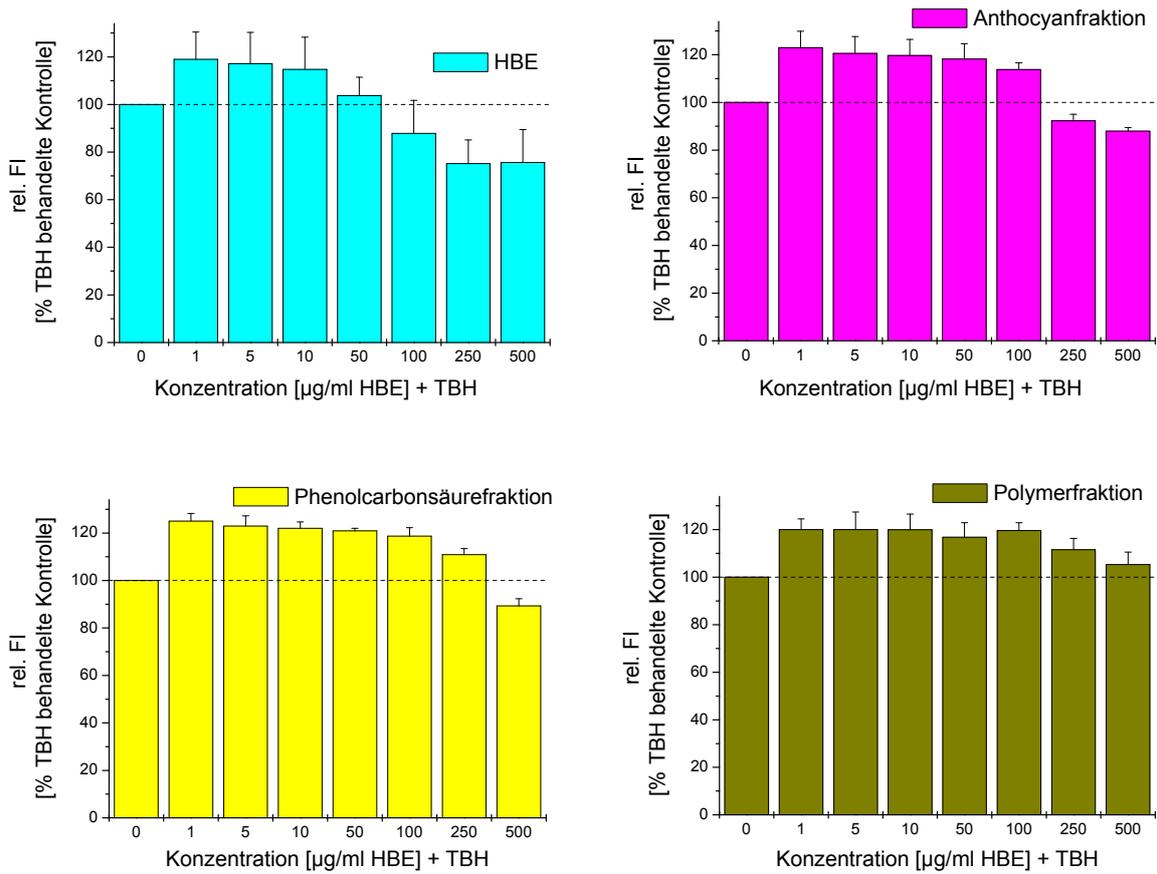


Abb. 10.13: Modulation des TBH-induzierten intrazellulären ROS-Levels in HT-29 Zellen nach 24 h Inkubation mit HBE und dessen Subfraktionen (Anthocyan-, Phenolcarbonsäure- und Polymerfraktion) und Nachbehandlung mit TBH; 250 µM; 40 min); n = 3-5; mean ± SD.

## Danksagung

In diesem Kapitel möchte ich mich bei allen bedanken, die mich unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- \* Frau Prof. E. Richling für die Überlassung des spannenden Themas, die zahlreichen anregenden und hilfreichen Diskussionen und das entgegengebrachte Vertrauen.
- \* Frau Juniorprof. M. Esselen für die Übernahme des Amtes der Zweitprüferin.
- \* Herrn Prof. H.-U. Endress und Frau Prof. H. Schuchmann für die kompetente Leitung und Koordinierung des Clusterprojektes, sowie allen Arbeitsgruppenleiter/innen der einzelnen Teilprojekte und den Mitgliedern des Projektbegleitenden Ausschusses.
- \* Dem Programm zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) und dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (via AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) für die Förderung des Forschungsvorhabens (AiF 15614 N).
- \* Den Doktoranden der beteiligten Forschungsgruppen; Johannes Oidtmann, Sabine Leick, Michael Betz, Kerstin Frank, Sonja Berg, Andreas Juadjur, Henry Jäger und Christopher Kropat für die Diskussionen und den Spaß den wir während der Projekt- und Doktorandentreffen hatten.
- \* Dolores Müller, Lilli Weidel und Annika Witt für die gewissenhafte Durchführung ihrer Forschungsarbeiten (Zwei wurden erfolgreich veröffentlicht!).
- \* Inga Buschauer, Max Kronenwerth, Christiane Mohn, Tamara Schauß und Lilli Weidel für die vielen schönen Stunden im Labor und Büro.
- \* Hannah Deußner für die Hilfsbereitschaft bei allen großen und kleinen Problemen, die netten Stunden im gemeinsamen Büro und die entgegengebrachte Freundschaft.
- \* Thomas Erk und Sven Triebel für die erlebnisreichen Stunden an der Uni und die rauschenden Abende bzw. Nächte in denen wir Kaiserslautern unsicher gemacht haben.
- \* Ingrid, Heike, Rainer, Eva und Sylvia für den morgendlichen Kaffee und ihre Hilfe bei aller Art von Problemen.
- \* Dem Arbeitskreis von Prof. D. Schrenk für die gute und nette Zusammenarbeit im und außerhalb des Labors.
- \* Gina Montoya und Dolores Müller für die zahlreichen hilfreichen Diskussionen, ihre herzlich erfrischende Art im Labor/Büro, das ein oder andere Bier, die vielen schönen Geschenke und die gute Freundschaft.
- \* Allen ehemaligen Doktoranden des Arbeitskreises von Prof. G. Eisenbrand für die Hilfe im Labor.
- \* Nico Watzek, Denise Scherbl und Stephanie Pickard für die Zusammenarbeit und ihre Bereitschaft immer zu helfen.
- \* Und zuletzt meinen Eltern und ganz besonders meiner Frau Kristine, für die unermüdliche Unterstützung während des Studiums und der Promotion.

## Lebenslauf

Name: Markus Schantz  
geboren am: 04.08.1983  
Geboren in: Dahn, Deutschland  
Familienstand: ledig  
Nationalität: Deutsch

### Schulbildung

---

1990 – 1994      Grundschule Dahn  
1995 – 2003      Otfried-von-Weißenburg-Gymnasium Dahn  
Abschluss Abitur

### Studium

---

10/ 2003 – 10/ 2007    Studium der Lebensmittelchemie und Toxikologie an der Technischen  
Universität Kaiserslautern  
10/ 2007 – 03/2008    Diplomarbeit an der TU Kaiserslautern im Fachbereich Lebensmittel-  
chemie und Toxikologie  
Thema: „Studien zur Stabilität und Metabolisierung von Inhaltsstoffen  
aus grünem Tee im humanen Dünndarm“.  
**Abschluss:** Diplom und 1. Staatsexamen

### Promotion

---

Seit 04/ 2008      Promotion an der TU Kaiserslautern im Fachbereich Lebensmittel-  
chemie und Toxikologie im der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Riehling  
Thema: „Intestinale Freisetzung und antioxidative Wirksamkeit eines  
Heidelbeerextrakts (HBE) (*Vaccinium myrtillus* L.) im Vergleich zu  
unterschiedlichen HBE-beladenen Verkapselungssystemen“.  
04/ 2008 – 04/2010    Promotionsstipendium nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz

---

## **Erklärung zur eigenständigen Durchführung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation sowie die vorliegende schriftliche Ausarbeitung eigenständig, ohne fremde Hilfe und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln durchgeführt habe.

Kaiserslautern, den

---

Markus Schantz